



**İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİKROBİYAL BİYOFİLM TABAKASI ÜZERİNE FARKLI
FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKENLERİN İNCELENMESİ**

**Cansu VATANSEVER
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı**

**Danışman
Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN**

Haziran, 2011

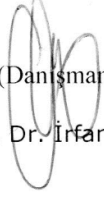
İSTANBUL

Bu çalışma 23/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Üye (Danışman)

Doç. Dr. İrfan Türetgen



Üye

Prof. Dr. Aysin Çotuk



Üye

Prof. Dr. Gülşen Altuğ



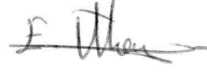
Üye

Doç. Dr. Ayten Erdem



Üye

Yard. Doç. Esra İlhan Sungur



Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 8385 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ders dönemim, tez deney ve yazım aşamalarım sırasında akademik bilgi, tecrübe ve önerileri ile tezimin her satırına sabırla emek veren, anlayışını, manevi desteğini ve iyi niyetini her zaman hissettiren danışmanın Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN'e, akademik bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra değerli görüş ve fikirleri ile sadece tezime değil aynı zamanda eğitim hayatıma büyük katkıları olan Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK' a, istatistiksel analizlerin yapılması sırasında hiçbir zaman yardımını esirgemeyen ve bu konuda bildiğim her şeyi borçlu olduğum Yard. Doç. Dr. İlknur ÖZALP TÜRETGEN ve Yard. Doç. Dr. Özlem SERTEL BERK' e, tez deneylerim boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, gerek yardımları gerekse fikirleri ile tezimin gelişmesine destek olan Yard. Doç. Dr. Esra İLHAN SUNGUR' a, verdiği fikirler ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Araş. Gör. Nazmiye Özlem ŞANLI YÜRÜDÜ'ye, yardımları, destekleri ve dostluklarını her an hissettiren arkadaşlarım Uzman Mikrobiyolog Duygu BAŞ, Ayşenur TÜRKMEN, Nihal GÜZELLER, Tuğçe TÜCCAR, Nesrin ÖZ ve Öznur DEMİRCİ' ye, üyesi olmaktan her zaman gurur duyduğum İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ailesine, her türlü desteği hiçbir zaman esirgeyemeyen, bugünlere gelmemdeki en büyük destekçilerim olan, her koşulda kendimi güvende hissetmemi sağlayan ve en önemlisi her zaman yanımda olan babam Behçet VATANSEVER, annem Emine VATANSEVER ve olmasaydı kendimi eksik hissedeceğim, varlığıyla hayatım anlam katan kardeşim Cansel VATANSEVER' e, her zaman dualarını yanımda hissettiğim, en büyük manevi destekçilerim dedem Niyazi KOBAK ve anneannem Hatice KOBAK' a teşekkür ederim.

İstanbul, 2011

Cansu VATANSEVER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ÖZET	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	12
2.1.LEGIONELLA PNEUMOPHILA	12
2.2. BİYOFİLM TABAKASI VE EPS	16
2.3. MİKROBİYAL TUTUNMA	20
2.4. SU SİSTEMLERİNDE MİKROBİYAL BİYOFİLMİN ÖNEMİ.....	26
2.5. MODEL SİSTEMLER	29
2.6. ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL ŞARTLARIN MİKROORGANİZMALARI ÜZERİNE ETKİLERİ..	30
2.6.1. Sıcaklık	30
2.6.1.1. Hücre Zarının Düşük Sıcaklığa Adapte Olması.....	31
2.7.2. pH	32
2.6.3. Ozmotik Şok	33
2.6.4. Dezenfeksiyon.....	35
3. MALZEME VE YÖNTEM	39
3.1. SU SİRKÜLASYON TANKI VE İŞLETİM KOŞULLARI.....	39
3.2. BAKTERİYOLOJİK ANALİZ.....	40
3.3. PARAMETRELERİN UYGULANMASI	41
3.3.1. pH Uygulaması	41
3.3.2. Sıcaklık Uygulaması.....	41
3.3.3. Ozmotik Şok Uygulaması.....	41
3.3.4. Dezenfektan Uygulaması.....	42
3.4. EPS ELDESİ VE ÖLÇÜMÜ	42
3.4.1. EPS Eldesi	42
3.4.2. EPS Ölçümü	43
3.5. EPİFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME	44
3.6. BAKTERİYOLOJİK ANALİZ.....	45
3.7. EPİFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME	45
3.8. ÇÖZÜNMÜŞ OKSİJEN ÖLÇÜMÜ.....	45
3.9. TOPLAM ÇÖZÜNMÜŞ MADDE MİKTARI ÖLÇÜMÜ	46
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	46
3.11. ARAŞTIRMADA KULLANILNA BESİYERLERİ VE KİMYASAL MALZEMELER	47

3.11.1. R2A Agar.....	47
3.11.2. Charcoal Yeast Ekstract (CYE) Agar	47
3.11.3. BCYE Besiyeri Katkısı.....	48
3.11.4. Fosfat Tamponu (PBS).....	48
3.11.5. NaCl-Formaldehit Çözeltisi	48
3.11.6. Fenol Çözeltisi	48
3.11.7. 5-Cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)	49
3.11.8. 4-,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	49
3.11.9. pH Parametrelerinin Hazırlanışı	49
3.11.9.1. 1M KOH Çözeltisi	49
3.11.9.2. 5M KOH Çözeltisi	49
3.11.9.3. 1M HCl Çözeltisi	49
3.11.9.4. 5M HCl Çözeltisi	49
3.11.10. 3M Tuz Çözeltisi	50
3.11.11. Monokloramin Çözeltisi	50
3.11.11.1. 2 ppm Monokloramin Çözeltisi	50
3.11.11.2. 500 ppm Monokloramin Çözeltisi	50
3.11.11.3. 1000 ppm Monokloramin Çözeltisi	50
3.11.12. %6'lık NaOCl (Sodyum hipoklorit Çözeltisi).....	50
3.11.13. %0.5'lik Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi	50
4. BULGULAR	51
4.1. AYLAR.....	51
4.1.1. 1. Ay.....	51
4.1.2. 2. Ay.....	52
4.1.1. 3. Ay.....	53
4.1.1. 4. Ay.....	54
4.1.1. 5. Ay.....	55
4.1.1. 6. Ay.....	56
4.2. PARAMETRELER.....	57
4.2.1. Kontrol.....	57
4.2.1. 60 °C.....	59
4.2.1. 4 °C.....	61
4.2.1. pH 3.....	63
4.2.1. pH 5.....	65
4.2.1. pH 11.....	67
4.2.1. Saf Su.....	69
4.2.1. 3M Tuz Çözeltisi.....	71
4.2.1. 2 ppm Monokloramin.....	73
4.2.1. 500 ppm Monokloramin.....	75
4.2.1. 1000 ppm Monokloramin.....	77

4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	83
4.3.1. HPC Sonuçları.....	83
4.3.1.1. 1. Parametre: 60°C	83
4.3.1.2. 2. Parametre: 4°C	85
4.3.1.3. 3. Parametre: pH 3.....	87
4.3.1.4. 4. Parametre: pH 5.....	89
4.3.1.5.5. Parametre: pH11.....	91
4.3.1.6.6. Parametre Saf Su.....	93
4.3.1.5.7. Parametre 3M Tuz çözeltisi	95
4.3.1.8. 8. Parametre: 2 ppm Monokloramin.....	97
4.3.1.9. 9. Parametre 500 ppm Monokloramin	99
4.3.1.10. 10. Parametre 1000 ppm Monokloramin	101
4.3.1.11. Parametreler Arası Farkların İncelenmesi	103
4.3.2. Epifloresan Sonuçları.....	105
4.3.2.1.1. Parametre: Kontrol	105
4.3.2.2.2. Parametre: 60 °C	107
4.3.2.3.3. Parametre: 4°C	109
4.3.2.4.4. Parametre: pH 3	111
4.3.2.5.5. Parametre: pH 5	113
4.3.2.6.6. Parametre: pH11.....	115
4.3.2.7.7. Parametre Saf Su.....	117
4.3.2.8.8. Parametre 3M Tuz çözeltisi	119
4.3.2.9.9. Parametre: 2 ppm Monokloramin.....	121
4.3.2.10.10. Parametre 500 ppm Monokloramin	123
4.3.2.11.11. Parametre 1000 ppm Monokloramin	125
4.3.2.12. Parametreler Arası Farkların İncelenmesi	127
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	130
KAYNAKLAR.....	146
ÖZGEÇMİŞ.....	157

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1	: Model su sirkülasyon sisteminin şematik diyagramı.....	40
Şekil 3.2	:Fenol- sülfürik asit yönteminde karbonhidrat miktarı ölçümü için hazırlanan standart eğri. Standart eğriyi hazırlamak için karbonhidrat olarak glikoz kullanılmıştır.....	44
Şekil 4.1	: 1. ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve <i>L. pneumophila</i> sayıları.....	52
Şekil 4.2	: 2. ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve <i>L. pneumophila</i> sayıları.....	53
Şekil 4.3	: 3. ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve <i>L. pneumophila</i> sayıları.....	54
Şekil 4.4	: 4. ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve <i>L. pneumophila</i> sayıları.....	55
Şekil 4.5	: 5. ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve <i>L. pneumophila</i> sayıları.....	56
Şekil 4.6	: 6. ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve <i>L. pneumophila</i> sayıları.....	57
Şekil 4.7	: Kontrol örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	58
Şekil 4.8	: Kontrol örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı.....	58
Şekil 4.9	: Kontrol örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.....	59
Şekil 4.10	: Aylık olarak 2 saat süreyle 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	60
Şekil 4.11	: Aylık olarak 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı.....	60
Şekil 4.12	: Aylık olarak 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.....	61
Şekil 4.13	: Aylık olarak 24 saat süreyle 4 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	62
Şekil 4.14	: Aylık olarak+ 4 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı.....	62
Şekil 4.15	: Aylık olarak 4 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.....	63
Şekil 4.16	: Aylık olarak 24 saat süreyle pH 3'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	64
Şekil 4.17	: Aylık olarak pH 3'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı.....	64
Şekil 4.18	: Aylık olarak pH 3'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.....	65
Şekil 4.19	: Aylık olarak pH 5'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	66
Şekil 4.20	: Aylık olarak pH 5'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı.....	66
Şekil 4.21	: Aylık olarak pH 5'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.....	67

Şekil 4.22 : Aylık olarak pH 11'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	68
Şekil 4.23 : Aylık olarak pH 11'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı.....	68
Şekil 4.24 : Aylık olarak pH 11'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.....	69
Şekil 4.25 : Aylık olarak saf suya maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	70
Şekil 4.26 : Aylık olarak saf suya maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı.....	70
Şekil 4.27 : Aylık olarak saf suya maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları	71
Şekil 4.28 : Aylık olarak 3M tuz çözeltisine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları	72
Şekil 4.29 : Aylık olarak 3M tuz çözeltisine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı	72
Şekil 4.30 : Aylık olarak 3M tuz çözeltisine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları	73
Şekil 4.31 : Aylık olarak 2 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları	74
Şekil 4.32 : Aylık olarak 2 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı	74
Şekil 4.33 : Aylık olarak 2 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları	75
Şekil 4.34 : Aylık olarak 500 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları.....	75
Şekil 4.35 : Aylık olarak 500 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı	76
Şekil 4.36 : Aylık olarak 500 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları	77
Şekil 4.37 : Aylık olarak 1000 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, <i>L. pneumophila</i> ve karbonhidrat miktarları	77
Şekil 4.38 : Aylık olarak 1000 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayısı	78
Şekil 4.39 : Aylık olarak 1000 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.....	79
Şekil 4.40 : 6 aylık deney süresinde aylık olarak alınan biyofilm örneklerinde ölçülen karbonhidrat miktarı.....	80
Şekil 4.41 : 6 aylık deney süresinde aylık olarak ölçülen pH ve oksijen miktarları...80	
Şekil 4.42 : Epifloresan mikroskopta DAPI ile boyanmış bakteri hücreleri (mavi sinyaller).....	81
Şekil 4.43 : Epifloresan mikroskopta görüntülenen canlı bakteri hücreleri (kırmızı sinyaller).....	81
Şekil 4.44 : BCYE agarda üremiş <i>L. pneumophila</i> kolonileri	82

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	: 6 aylık deney süresince aylara göre ölçülen pH, çözülmüş oksijen, TÇM ve karbonhidrat miktarları.....	79
Tablo 4.2	: 60°C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	83
Tablo 4.3	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	84
Tablo 4.4	: 4°C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	85
Tablo 4.5	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	86
Tablo 4.6	: pH 3 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	87
Tablo 4.7	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	88
Tablo 4.8	: pH 5 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	89
Tablo 4.9	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	90
Tablo 4.10	.. : pH 11 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	91
Tablo 4.11	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	92
Tablo 4.12	: Saf Su Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	93
Tablo 4.13	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	94
Tablo 4.14	: 3M Tuz Çözeltisi Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	95
Tablo 4.15	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	96
Tablo 4.16	: 2 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	97
Tablo 4.17	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	98
Tablo 4.18	: 500 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	99
Tablo 4.19	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	100
Tablo 4.20	: 1000 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	101
Tablo 4.21	: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar).....	102
Tablo 4.22	: Parametrelere Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler.....	103
Tablo 4.23	:Parametreler Arasındaki Anlamlı Farklılaşmaları Gösteren Post-Hoc Analiz Sonuçları.....	104

Tablo 4.24 : Direkt Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	105
Tablo 4.25 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	106
Tablo 4.26 : 60°C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	107
Tablo 4.27 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	108
Tablo 4.28 : 4°C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	109
Tablo 4.29 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	110
Tablo 4.30 : pH 3 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	111
Tablo 4.31 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	112
Tablo 4.32 : pH 5 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	113
Tablo 4.33 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	114
Tablo 4.34 : pH 11 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	115
Tablo 4.35 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	116
Tablo 4.36 : Saf Su Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	117
Tablo 4.37 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	118
Tablo 4.38 : 3M Tuz Çözeltisi Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	119
Tablo 4.39 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	120
Tablo 4.40 : 2 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	121
Tablo 4.41 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	122
Tablo 4.42 : 500 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	123
Tablo 4.43 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	124
Tablo 4.44 : 1000 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	125
Tablo 4.45 : Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)	126
Tablo 4.46 : Parametrelere Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler	127
Tablo 4.47 : Parametreler Arasındaki Anlamlı Farklılaşmaları Gösteren Post-Hoc Analiz Sonuçlar	128

ÖZET

MİKROBİYAL BİYOFİLM TABAKASI ÜZERİNE FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKENLERİN İNCELENMESİ

Suda yaşayan mikroorganizmalar çeşitli sebeplerden dolayı bir yüzeye tutunarak biyofilm tabakası meydana getirirler. Bu tabaka, canlı veya cansız bir yüzeye tutunarak, kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi matriks (EPS) içinde yaşayan mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanır. Mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen EPS tabakası bir çimento gibi rol oynayarak mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmalarını sağlarken, aynı zamanda bakterileri besinsizlik, avcı protozoonlar, sıcaklık ve pH dalgalanmaları, dezenfektan uygulamaları, biyositler, toksinler ve kuruluk gibi değişen çevresel şartlara karşı da korumaktadır.

Biyofilmler, *Legionella* cinsini de kapsayan farklı cinsteki mikroorganizmaları da barındırabilirler. Özellikle soğutma kulesi suyunun uygun derecedeki sıcaklığı nedeniyle biyofilm yapısı içinde hayatta kalabilen ve üreyebilen *Legionella* türleri, soğutma kulesi fanları tarafından meydana getirilen aerosoller aracılığıyla çevreye yayılmaktadırlar. *Legionella pneumophila*, insanda Legionelloz'un en yaygın sebebidir ve yetişkinlerde, hastane kaynaklı ve toplulukla ilişkili pnömoni'nin ortak nedenidir.

Soğutma kuleleri dışında, su dağıtım sistemleri, borular, depolar, dış üniteleri, gıda üretim ekipmanları gibi su ile temas eden pek çok yüzeyde biyofilm tabakası meydana gelmektedir. Söz konusu yüzeylerde meydana gelen biyofilm tabakası ile mücadelede gerek fiziksel gerekse kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Fakat EPS tabakası, mikroorganizmaları bir kalkan gibi koruduğundan dolayı pek çok metot mücadelede yetersiz kalmaktadır. Ortamın sıcaklığında, pH ve ozmotik yoğunluğunda meydana gelen değişimler, biyofilm bakterileri tarafından algılanmakta ve bakteriler arasında veya bakteri içinde yapılan genetik düzenlemelerle biyofilm içinde bulunan bakteriler direnç kazanmaktadırlar. Bununla birlikte jelsi yapıdaki matriks, dezenfektanların biyofilmin iç kısmındaki bakterilere ulaşmasını engelleyerek veya geciktirerek mikroorganizmaları korumaktadır.

Ülkemizde hastane, alış veriş merkezi, endüstriyel tesisler ve otel gibi çok katlı binaların büyük bir kısmında soğutma kuleleri kullanılmaktadır. Kule suyunun mikroorganizmalardan arındırılması için en sık kullanılan metot dezenfeksiyon uygulamasıdır. Fakat yapılan rutin uygulamaların, biyofilm üyesi mikroorganizmalar ve özellikle *Legionella* bakterisi üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmaların sayısı oldukça azdır. Ayrıca, hipotez konumuz olan farklı fiziksel ve kimyasal stres kaynaklarının biyofilm tabakasındaki bakteriler üzerindeki etkileri konusunda fazla çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, soğutma kulesinden alınan kule suyu ve *Legionella pneumophila* ATCC 33152 suşu aşılınmış soğutma kulesi model sisteminde 6 aylık süre boyunca sisteme yerleştirilen cam kuponlar üzerinde biyofilm tabakası oluşumuna olanak sağlanmıştır. Aylık olarak alınan toplam 22 adet kupon, 24 saat süreyle her bir parametre için 2'şer adet olmak üzere, farklı sıcaklık, pH, ozmotik konsantrasyon ve farklı dozlardaki dezenfektana maruz bırakılmıştır. 24 saatin bitiminde söz konusu parametrelerin *L. pneumophila* ve aerobik mezofilik heterotrofik bakterilere (HB) etkisi izlenmiştir ve epifloresan mikroskop yardımıyla ölü/canlı mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir. Ayrıca cam kupon yüzeyinde oluşan biyofilm tabakası kantitatif olarak ölçülmüştür.

Çalışma sonucunda biyofilm tabakasındaki *L. pneumophila* ve aerobik heterotrofik bakterilerin, sıcaklık ve pH değişimleri ile ozmotik şok ve şok dezenfeksiyona karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca kullanılan klasik kültür metodu ve epifloresan mikroskopi tekniğinin sonuçları karşılaştırıldığında, mikroorganizmaların karşılaştıkları olumsuz şartlar karşısında canlılıklarını korudukları fakat kültüre edilebilirliklerini kaybederek VBNC (viable but non culturable) fazına geçtikleri tespit edilmiştir.

SUMMARY

INVESTIGATION OF DIFFERENT PHYSICAL AND CHEMICAL AGENTS ON MICROBIAL BIOFILM LAYER

Microorganisms which are living in water can adhere to the surfaces because of many different reasons and develop biofilm layers on surfaces. This layer can be described as a 'Bacterial community which adhering to live or dead surface by producing a polymeric matrix called extracellular polymeric substances (EPS)'. This EPS layer acts as cement for microorganisms for irreversible attachment to surfaces and can protect microorganisms from nutrient limitations, temperature and pH alteration, biocides, toxins or short-term drying.

Biofilm can harbor variety of different genera, including *Legionella*. Particularly, the suitable water temperature range in cooling tower water favors the growth and survival of *L. pneumophila* in cooling tower and this microorganism can be disseminated over a wide field through the aerosols which are produced by cooling tower fan. *L. pneumophila* is the most frequent cause of human legionellosis and a relatively common cause of community-acquired and nosocomial pneumonia in adults.

Besides cooling towers, surfaces that subject to biofilms are systems which include water as network water pipes, dental units, food producing equipments and some medical equipments. Some chemical and physical decontamination weak against methods are biofilm layer. EPS layer can protect microorganisms as a shield. Exchanges of environment's temperature, pH and concentration sensed by biofilm microorganisms and bacteria become more achieve resistant through genetic regulations. Furthermore, matrix can protect the bacteria through the medium of inhibit or delay disinfectant's penetration to biofilm bacteria.

In our country, cooling towers are frequently used in some buildings such as hospitals, shopping centers, hotels. Disinfection is most widely used method for controlling

microorganisms, but so far no reliable data was found about the effect of routine applications on biofilm microorganisms and *L. pneumophila*.

In this study, biofilm formation has been allowed for six month-period on glass microscope slides in a cooling tower water added model system which is experimentally infected by *L. pneumophila* ATCC 33152 and some cooling tower as primer inoculum. Totally, 22 coupons have been taken and analyzed after 24 hours exposition to different conditions of temperature, pH, concentration and different doses of disinfectants, and at the end of the 24 hours of exposure, effects of these parameters on aerobic heterotrophic bacteria and *L. pneumophila* are followed. Furthermore, number of live/dead microorganisms were analyzed by epifluorescence microscopy. Additionally, the biofilm amount on glass slides were analyzed quantitatively.

It has determined that biofilm layer can protect microorganisms from pH and temperature alterations, osmotic shock and shock disinfection. According to the results of culture and epifluorescence microscopy, it is revealed that microorganisms started to enter VBNC (viable but not culturable) phase.

1.GİRİŞ

Bakteriler bir yüzeye tutunarak yaşamayı serbest yaşama tercih ederler. Bu durumun nedeni, bakterinin tutunacağı yüzeyin, çevresini kaplayan ortamdan yakalanmış olan organik- inorganik materyallerden dolayı besin kaynağı olması, suyun akışıyla söz konusu yüzeye besin maddelerinin devamlılığının sağlanması veya su akışı sayesinde bol miktarda oksijen bulunması olabilmektedir (Melo ve Bott, 1997). Biyofilm genel olarak, yüzeye tutunmuş mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmaktadır. Biyofilm üzerine yapılan çalışmalar, doğal su sistemlerinde bakterilerin yüzeylere tutunmuş halde bulunmalarıyla birlikte, aşağı yukarı 20- 30 yıl önce başlamıştır. Biyofilmle ilgili olarak bazı gerçeklerin açığa çıkarıldığı ilk incelemede, “Suyun pek çok kısmında bakterilerin serbest olarak yaşamadığı kesin bir süreçtir, bununla birlikte üreme suyla çevrelenmiş yüzeylerde gerçekleşir” ifadesiyle bu durumu açıklamıştır. Dahası, sucul çevrelerdeki gemi karinalarında mikroorganizmalar tarafından meydana gelen bozulmanın ciddi bir problem olarak tanımlanması da söz konusu yayınından bir yıl önce gerçekleşmiştir (Heinrici, 1933). Kısaca günümüzden yaklaşık 100 yıl kadar önce biyofilmin yapısı kabul edilmiş ve bilimsel olarak mikrobiyal fizyolojisinin durumu belgelenmiş olmakla birlikte, bu sürecin moleküler seviyeleri henüz anlaşılmaya başlanmıştır. Konfokal lazer taramalı mikroskop gibi önemli tekniklerdeki son zamanlarda kaydedilen ilerlemeler, biyofilmin yapı, morfoloji ve populasyon dinamiği hakkında bilgilerimizi arttırmaktadır (Hermanowicz, 1999, O’Toole ve diğ., 2000).

Biyofilm gelişimi, organik ve inorganik moleküllerin yüzeye taşınması ile beraber yüzeyin şartlandırılması, öncü mikroorganizmanın ilk olarak elektrostatik etkileşimler ve fiziksel güçler ile kendi kendilerine yüzeye tutunması ile başlamaktadır. Bu aşamaların ardından, ekstrasellüler polimerik tabakanın (EPS) oluşumu gerçekleşmektedir. Söz konusu bu tabaka, hücrelerin yüzeye yapışmasını sağlamanın yanında, sudan az miktardaki besini yakalayan ve konsantre eden iyon değiştirici bir sistem olarak da iş görmektedir. Besin moleküllerini tutmasının yanı sıra ekzopolimer

ağ, yapısında bulunan mikroorganizmalara fiziksel destek sağlamakla beraber, elektrostatik etkileşimler aracılığıyla da, ortamda bulunan diğer mikrobiyal hücreler için bir kapan vazifesi görmektedir. EPS, hücreler, su ve hücrelerce salgılanan hücre dışı makro moleküllerden oluşmaktadır. EPS oluşumunun ardından yüzeye tutunma geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Süreç, ikincil hücrelerin yapıya eklenmesiyle devam etmektedir. İkincil olarak yapıya dahil olan hücreler, diğer hücrelerin kullandığı, kendi atıklarını üretmenin yanında, birincil hücrelerin atıklarını metabolize etmektedirler. Bu adımın sonunda olgun bir biyofilm meydana gelmektedir. Olgun, tamamıyla aktif olan biyofilm, yüzeyde yaşayan canlı bir dokuya benzemektedir. Kompleks olmasının yanı sıra, metabolik olarak her biri kendi için uygun bölgelerde yaşayan farklı türdeki mikroorganizmalardan oluşan bir işbirliği topluluğudur. Yapıda bulunan anaerobik zon, aerobik biyofilmin altında gelişmektedirler. Biyofilmler, kritik kalınlığa ulaştıkları zaman yapıdan olası kopmalar meydana gelmektedir. Söz konusu kopmalara, akışın fazla olduğu bölgelerde daha sıklıkla rastlanmaktadır. Olgun bir biyofilm, sisteme bağlı olarak birkaç hafta ile birkaç ay arasında meydana gelebilmektedir (Melo ve Bott, 1997, Szymanska, 2003, Allison, 2003, Dreeszen, 2003).

Günümüzde evsel ve endüstriyel su sistemlerindeki mikrobiyolojik kirlilik, her geçen gün daha da önemli hale gelmektedir. Kaynaktan çıkmasını takiben evlere ya da endüstriyel sistemlere kadar ulaşan su, uzun yollar kat etmekte ve bazen uzun süreler boyunca sistemde bekleyebilmektedir. Bu süre zarfında sisteme herhangi bir noktadan dahil olan mikroorganizmalar, su ile beraber yol almakta ve sistem duvarlarına tutunarak çoğalmaktadırlar. Mikroorganizmaların hayatta kalabilmesi ve üreyebilmesi için gerekli olan organik ve inorganik bileşenleri içermesi dolayısıyla biyolojik açıdan önemi olan bir sıvı ile kontak halinde bulunan her yüzey, mikrobiyal hücre tutunması için potansiyel bir hedeftir. Sistem içinde bulunan bakteriyel biyokütlenin %99' unu, iç yüzeylere tutunarak meydana gelen olası biyofilmler oluşturmakta olup, bu biyokütle, biyokontaminantların ana kaynağını temsil etmektedir. Endüstriyel ekipmanlarda meydana gelen biyofilmlerde en önemli nokta, sisteme gelen su ile taşınan küçük partiküllerin, eş zamanlı olarak birikmesidir. Organik yapıya sahip partiküller, mikroorganizmalar için substrat olarak rol oynamakta ve mikroorganizmalar tarafından yıkılarak, biyokütlenin üremesine yardımcı olmaktadır. Özellikle soğutma kulesi ve dekoratif havuzları gibi açık sirkülasyon sistemlerinin, sudaki besinlerin arttırılmasında

oldukça fazla yararı bulunmaktadır. Bu sistemlerde ilginç olan nokta, eğer mikroorganizmalar tarafından kontamine edilmiş bir yüzey ve kullanılabilir besin var ise, biyofilm yapısının, su fazında daha fazla mikroorganizma olmasa bile gelişmeye devam etmesidir (Melo ve Bott, 1997, Fang ve diğ., 2008).

Soğutma kuleleri gibi açık akuatik ortamlar, su fazında, uzak noktalarda bulunan bakterilere besinin difüzyonunu kolaylaştırmaktadır. Bunun yanı sıra aerobik bakterilerin hayatta kalabilmeleri için gerekli olan oksijen de sistem tarafından sağlanmaktadır. Söz konusu süreç sirkülasyon sistemleri, buharlaştırıcı soğutma sistemleri sayesinde su ve hava arasındaki temas yoluyla sağlanan havalandırma işlemi sonucunda çözünmüş oksijenli su elde edilmesini kapsamaktadır. Sirkülasyon sistemlerinin yanı sıra şehirdeki şebeke suyunu ev, işyerleri gibi son kullanım noktalarına ulaştıran dağıtım sistemlerinde de meydana gelebilen biyofilm tabakası, sistemde bulunan besin seviyesinden, boru materyalinden ve sistemdeki suyun sıcaklığı ve akış hızı gibi şartlardan etkilemektedir. Ayrıca sistem tarafından temin edilen karbon ve azot gibi besinler de mikrobiyal üreme için gerekli olup üremeyi teşvik etmektedirler (Melo ve Bott, 1997).

Biyofilmler, akciğer gibi dokular, medikal cihazlar, endüstriyel veya evsel su taşıma boruları veya doğal su sistemleri gibi geniş çeşitlilikteki yüzeylerde meydana gelebilmektedirler (Donlan, 2002). Su sistemlerinde oluşan biyofilm tabakası, endüstri, tıp ve günlük hayatla ilgili önemli problemlerle yakından ilişkilidir. Endüstride meydana gelen biyofilmler, verimlilikte önemli kayıplara, süreçlerin aksamasına, ekipmanda zararlara neden olmakla beraber borularda ve ekipmanda biyolojik açıdan bozunmalardan da sorumludurlar. Tüm bunlarla birlikte sistemden sıvı geçişine karşı direnç gelişimine, biyofiltrelerin tıkanmasına ve metal yüzeylerde korozyona da neden olmaktadır. Gıda üretim işlemlerinde meydana gelen kontaminasyon, gıdanın temas ettiği yüzeyde biyofilm oluşumu gibi sonuçlara neden olmaktadır. Gemi gövdelerinde oluşan biyofilmden dolayı da, deniz taşımacılığında önemli enerji kayıpları meydana gelmektedir. Sağlıkta alanında ise biyofilmlerin kronik enfeksiyon senaryolarının büyük bir kısmıyla ilişkili olduğu kesinleşmiştir. Ekonomik olarak, biyofilm kaynaklı kayıplar dünya çapında yıllık milyar dolarlara ulaşmaktadır (Hallam ve diğ., 2001, Gilbert ve diğ., 2003, Zhang ve Bishop, 2003). Toplum sağlığı kuruluşları, su dağıtım

sistemlerindeki biyofilmin, birincil ve fırsatçı bakteriler, virüsler, protozoonlar ve mantarları içerdiğini belgeleriyle beraber belirtmektedirler. Birincil patojenlerin (kişilerde sağlık problemlerine neden olan), biyofilmde rastlanmasına rağmen, su kaynaklı salgınların biyofilmle bağlantısına dair çok az bilgi bulunmaktadır. Fırsatçı patojenler, AIDS hastaları, diyabetikler, organ nakli bekleyenler ve pek çok kanser hastası gibi bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde olduğu kadar, yaşlı ve bebeklerde de hastalığa neden olmaktadır. Bu fırsatçı patojenlerin başında *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* ve *Mycobacterium avium* gelmektedir. Biyofilmler, meydana getirdikleri toplumsal sağlık problemlerine ek olarak, sistemin suyunda bulanıklığa, koku, tat ve renk değişimlere de neden olmaktadır (Hallam ve diğ., 2001, Mains, 2008).

Biyofilm tabakasının sayılan tüm bu dezavantajlarının yanında pek çok avantajı da mevcuttur. Biyofilmle ilişkili mikroorganizmalar, karasal ve bentik besin döngülerinde ve çevresel kirleticilerin biyolojik olarak yıkılmasında kritik rol oynamaktadırlar. Doğal su sistemlerinde yüzeyle ilişkili mikroorganizmalar, organik bileşenleri yıkarak ve ksenobiyotikleri detoksifiye ederek, su kalitesini korumaktadırlar. Ayrıca biyofilmler, toprakta çevresel açıdan tehlikeli bileşikler parçalayabilirler, biyoreaktörlerde kullanılabilirler veya mineral cevherlerinden kömür partiküllerinin ayrılmasında kullanılabilirler. Ek olarak mikrobiyal biyofilmlerin metabolik aktivitesi, atıksu arıtımında, lağım suyu arıtım uygulamalarında, fermentasyon süreçlerinin bir çeşidi için biyoteknolojide de kullanılmaktadır (Bos ve diğ., 1999, Gilbert ve diğ., 2003).

Sistem içinde bulunan sudan gelen organik partiküller nedeniyle mikroorganizmalar için besin kaynağı sağlayan veya gıda üretim işlemlerinde kullanılan ekipmanlar gibi besinle çevrilmiş ve erimiş besin içeren pek çok endüstriyel çevre, biyofilm meydana getirilmesi için uygun ortam sağlamaktadır. Soğutma kuleleri söz konusu olan endüstriyel çevrelere verilebilecek en iyi örneklerin başında gelmektedir. Soğutma kulesi içinde mikrobiyal üreme için gerekli olan besinler, sisteme gelen su içinde bulunmakta veya atmosferden sağlanmakta olup, suyun sirkülasyonu ile birikmektedir. Bu sebeple kuleler, mikroorganizmaların inkübasyonu ve üremesi için mükemmel bir çevre sağlamaktadır. Ek olarak, soğutma kulelerindeki suyun sıcaklığı da, mikroorganizma üremesi için ideal bir inkübasyon çevresi sağlamaktadır (Macchiarolo ve diğ., 1981, Yamamoto ve diğ., 1992).

Soğutma kulesi içinde bakteri, alg, mantar, protozoon ve virüs gibi çeşitli mikroorganizma türleri bulunmaktadır. Sistemdeki mikroorganizmaların çoğunluğunu ise besin ve enerji kaynağı olarak organik karbona gereksinim duyan heterotroflar oluşturmaktadır (Macdonald ve diğ., 2000, Critcheley ve Bentham, 2007). Soğutma kulesinde bulunan mikroorganizmalar çeşitli olmakla birlikte, bu çeşitli mikroorganizmaların başında, sağlık açısından önemli bir risk faktörü olması nedeniyle *L. pneumophila* gelmektedir. *L. pneumophila*, ilk kez 1977 yılında, Philadelphia’da meydana gelen akut pnömoni salgınından sonra tanımlanmış olan, lejyoner hastalığı ve pontiak ateşine neden olan ajandır (Ishimatsu ve diğ., 2001). *Legionella* türleri, protozoonlar içinde üreyebilen, mikrobiyal biyofilm toplulukları içinde hayatta kalabilen, hücre içi fakültatif, Gram negatif çomaklardır. Tatlı sular, bu bakterinin doğal ortamı olmakla birlikte kaplıca havuzları, duş başlıkları, sıcak su dağıtım sistemleri ve soğutma kuleleri gibi insan yapımı sistemler de *Legionella* türleri için uygun habitatlar sağlamaktadır. Bu gibi su sistemlerinde hızla çoğalan *Legionella* spp, akut akciğer enfeksiyonlarından sorumlu olmaktadır. Su sıcaklığının, çevre sıcaklığından daha yüksek olduğu bu insan yapımı sistemlerin, Legionelloz salgınlarının meydana gelmesinde etkili olduğu görülmüştür. Özellikle soğutma kuleleri, *L. pneumophila*’dan kaynaklanan legionelloz salgınlarını bulaştırmada oldukça önemlidir (We’ry ve diğ., 2008). Sistem tarafından üretilen aerosoller içinde, *Legionella* türleri tarafından kontamine edilmiş olanlar, salgınların temel kaynağını oluşturmaktadır. Bakterinin insana geçişi, soğutma kulesi, duş başlıkları, jakuzi, kaplıca havuzları ve diğer aerosol üreten insan yapımı araçlar gibi, çevresel kaynaklardan yayılan su damlacıkları aracılığıyla meydana gelmektedir. *Legionella* spp, üremek için, demir ve özel amino asitlerin bulunduğu çok özel şartlara ihtiyaç duymaktadır. Bundan dolayı da söz konusu bakteri, bakteriyel biyofilmler gibi, mikroorganizmaların hayatta kalmaları ve üreyebilmeleri için gerekli besinleri içeren bölgelerde içinde yaşayabilmekte, gelişebilmekte ve üreyebilmektedir (Miller ve Simpson, 1999, Ishimatsu ve diğ., 2001).

Legionella familyası, 40’ tan fazla tür ve 60’ a yakın serogrupa sahiptir. Her bir serogrup, hücre membranındaki farklı yüzey yapılarından dolayı alt tipler içermektedir ve bu alt tipler özel testlerle birbirinden ayrılabilirler. Bazı *Legionella* serogrupları, diğer serogruplara kıyasla daha virulenttirler. Özellikle *L. pneumophila* serogrup 1, legionelloz hastalarından en çok izole edilen bakteridir. Serogrup 4 ve 6 ise,

hastalıklarda, *L. pneumophila* serogrup 1'den sonra en sık izole edilen serogruplardır. İçlerinde *L. longbeachae*, *L. micdadei*, ve *L. bozemanii*'de bulunduğu diğer 17 tür de hastalıklarla ilişkilidir (Szewzyk ve diğ., 2000). İnkübasyon süresinin 2-10 gün arasında değiştiği lejyoner hastalığının şiddet aralığı, hafif bir öksürük ve düşük ateşten, hızlıca ilerleyen pnömoniye kadar gidebilmektedir. Lejyoner hastalığı özellikle, hasta ve bağışıklık sistemi zayıf kişilerde daha fazla meydana geldiğinden, sıklıkla fırsatçı bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bakterinin neden olduğu diğer bir hastalık olan Pontiak ateşi ise, soğuk algınlığına benzemektedir. İnkübasyon periyodu 1-3 gün süren hastalıkta yüksek ateş, tedavi olmaksızın 2-5 gün içinde tamamen iyileşmektedir (Szewzyk ve diğ., 2000, Boss ve Day, 2003).

Legionella, biyofilm topluluklarında bulunan parazit protozoonların içinde yaşayabilme özelliğine sahiptir (Declerk, 2009). Özgür yaşayan amipler, patojenik türlerin üremesi için ortam çevre sağlayarak, legionelloza neden olan *Legionella*'nın yayılması için kritik kaynak olarak yardım etmektedirler (Lau ve Ashbolt, 2008). *L. pneumophila*'nın taşınmasında önemli rol oynayan protozoonlar, aynı zamanda üremeye de yardımcı olmaları nedeniyle, muhtemelen bu bakterinin çevrede çoğalması için tek yoldurlar (Thomas ve diğ., 2004).

Legionella'nın üremesine yardımcı olan temel faktörlerin başında, sistemde kullanılan materyalin cinsi, su tarafından sağlanan besinler ve su sıcaklığı gelmektedir. Yapılan çalışmalarda, alınan su örneklerinde, en yüksek sayıda *Legionella*'nın, sıcaklığın 30-40 °C olduğu koşullarda saptandığı görülmektedir. Aynı çalışmada, sıcaklığın 50 °C'nin üzerine çıkarılması sonucunda *Legionella* sayısında ciddi bir azalma meydana geldiği ve 60 °C'nin üzerindeki veya 70 °C sıcaklıkta ise, dakikalar hatta saniyeler içinde mikroorganizmaların hızla öldüğü tespit edilmiştir (Szewzyk ve diğ., 2000).

Endüstriyel ve içme suyu sistemlerinde, boruda sıvı sürtünme direncinde artmaya, ısı enerji transfer direncinde artmaya, biyokorozyona ve su kalitesinde düşme gibi işlemsel problemlere neden olan biyofilmeler ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte aynı zamanda sağlık problemleri de yaratmaktadır (De Saravias ve De Mele, Macdonald ve diğ., 2000). Bu sebeple de gerek endüstriyel ekipmanlarda gerekse medikal cihazlarda oluşan biyofilmle mücadele, büyük bir ciddiyetle üzerinde durulması gereken önemli bir

konudur. Bulunduğu sistemin karakteristiğine bağlı olarak istenmeyen biyofilmi gidermede bazı stratejiler mevcuttur. Bu stratejiler 1- Mekanik temizlik, 2- Antimikrobiyal ajan kullanımı, 3- Dispersant veya biodispersant olarak adlandırılan özellikle sentetik sürfaktanlar gibi biyolojik açıdan daha fazla parçalanabilen ve daha az toksik olan yüzey aktif bileşenleri kullanarak biyofilmi yüzeyden kaldırması ile biyofilm gelişiminin durdurulması, 4- Yüzeye mikrobiyal tutunmayı engelleme, 5- Biyokütle soyulmasının teşvik edilmesidir. Mekanik temizlik ve antimikrobiyal ajan kullanımı, yukarıda bahsi geçen stratejiler içinde en çok kullanılan yöntemlerdir (Xavier ve diğ., 2005). Biyofilmler, kimyasal ve fiziksel uygulamalar ile yok edilebilmektedirler. Biyositler, genelde okside edici (klor, monokloramin, klordioksit) ve okside etmeyen (formaldehit) tipler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Fiziksel uygulamalar ise mekanik temizlik ve sıcak su uygulamalarını kapsamaktadır. Mekanik temizlik, ekipmanın çalışmadığı koşullarda uygulanabildiğinden dolayı maliyetlidir ve çok fazla iş gücü gerektirmektedir. Diş fırçaları ile yapılan dental temizlik mekanik temizliğe verilebilecek bir örnektir. Biyosit veya dezenfektan kullanımı, biyofilm mikroorganizmalarının, antimikrobiyal ajanlara duyarlılığının azalmasından dolayı etkili olmayabilmektedir. Dökülmenin teşvik edilmesi, istenmeyen biyofilmin giderilmesinde en son araştırılan olası stratejidir. Bu işlem amacıyla çeşitli maddelerin kullanılması, biyofilm kaldırılmasının gerekli olduğu, hem medikal hem endüstriyel uygulamalar için çekici alternatifler sağlayan biyofilm matriksinin, fiziksel bütünlüğünü bozarak, direkt olarak biyofilmin kaldırılmasına sebep olmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda bu alternatif, niteliği gereği toksik olan antimikrobiyal ajanların güvenliği azaltmasından dolayı avantaj sağlamaktadır (Macdonald ve diğ., 2000, Xavier ve diğ., 2005).

Doğal çevrelerde veya endüstriyel süreçlerde bakteri hücreleri çok çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmaktadırlar. Bu koşullar altında bakteri hücreleri uygun olmayan çevresel faktörleri algıladıktan sonra, olası zararlarından korunmak için mekanizmalar geliştirmektedirler. Biyofilm içindeki ve planktonik kültürdeki bakteriler, stres cevap genlerini indükleyerek, besin kalitesindeki değişim, hücre yoğunluğu, sıcaklık, pH ve ozmolarite gibi çevresel streslere karşı daha toleranslı fenotipler haline gelmektedirler. Söz konusu stres adaptasyonu, gen anlatımının kompleks bir şekilde düzenlenmesini içermektedir ve yapılan çalışmalarda prokaryotlarda stresle aktive

edilen genlerin iyi bir şekilde korunduğu görülmektedir. Daha önceden ılımlı bir asit stresine maruz bırakılmış bakteriler için, daha sonra karşılaştıkları öldürücü orandaki asit şokunda hayatta kalmaları, asit tolerans yanıtı olarak adlandırılmaktadır. Bu gibi dayanıklılık durumlarında Sigma faktör, genel stres cevabın anahtar elemanıdır (Jan ve diğ., 2000, Fux ve diğ., 2004). *ProS* geni tarafından kodlanan sigma stres faktörünün düzenlenmesi ve fonksiyonu özellikle *E. coli* ve *Pseudomonas* türleri gibi geniş çeşitlilikteki Gram negatif bakterilerde çalışılmıştır. Özellikle, *P. aeruginosa*, *P. putida* ve *P. fluorescens*'in *ProS* mutantlarında, hayatta kalma mücadelesi boyunca ozmotik, sıcaklık ve oksidatif streslerin azaldığı görülmüştür. *ProS*, stres koşullarına karşı adaptasyon için önemli bir faktör olarak belirtilmektedir. Zira, stres koşulları altında mikroorganizmanın hayatta kalabilmesi için önemli olan bir bileşik olan alginat'ı üretmektedir. Bu sebeple de, yüksek sıcaklığın alginat biyosentez yolu üzerindeki etkisi üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır. Çalışma sonuçlarına göre, stres koşulları altında alginat D geninin anlatımının daha fazla olarak gerçekleştiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, pek çok biyofilm oluşumunda gözlenmektedir. Mevcut çalışmalar, *P. putida* NBRI0987'de 30 °C'ye kıyasla 40 °C sıcaklık altında ürettiği koşullarda, *ProS* anlatımının teşvik edildiği gösterilmektedir (Srivastavas ve diğ., 2008). *ProS* geni, ozmotik şoktan korunmadan da sorumludur. Konu ile ilgili yapılan benzer çalışmalar, *RpoP* ve *ProU* olan ozmoregülasyon genlerinin anlatımının, bir ozmokoruyucu olan glisin betain'in sentezini kodladığını ve ozmolaritenin artmasıyla teşvik edildiğini göstermektedir. Biyofilm gelişimini engelleyen faktörlerden biri olan ozmotik şok şartları altında, bahsi geçen ozmokoruyucu olan glisin betain üretiminin teşvik edilmesi ile, yüksek tuzluluk şartları altında enzimlerin yapısal olarak bozulmaları engellenmektedir ve yaşamını devam ettirebilen hücrelerin üreme aktiviteleri sonucunda biyofilm yapısı kısmen yenilenebilmektedir (Trouessellier ve diğ., 1998, Fare's ve diğ., 2007).

Biyofilmler, mikroorganizmaları öldüren veya kontrol altına alan kimyasal uygulamalara karşı göstermiş oldukları yüksek seviyedeki direnç yapıları nedeniyle üzerinde önemle durulması gereken bir konudur. Görülen bu direnç, en sık olarak EPS ile ilişkilidir (Allison ve diğ., 2000). Biyofilm, biyositlerin ve diğer kimyasalların, yapısında bulunan hücrelere ulaşmasını engelleyen bir mekanizma olarak iş görmektedir. Bu mekanizma, mikroorganizmaların normal olarak hayatta kalamayacağı

ekstrem çevrelerde, varlıklarını sürdürebilmelerini sağlamaktadır (Critcheley ve Bentham, 2007). Bilindiği üzere biyofilm bakterileri, planktonik olanlara oranla antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençlidirler. Bu yüzden, endüstriyel sistemlerde biyofilmin kontrolü ve imhası oldukça zor ve maliyetlidir (Macdonald ve diğ., 2000). Biyofilm kontrolü amacıyla kullanılan en yaygın dezenfektanlardan biri olan klor, kullanım kolaylığı ve ekonomik olması açısından avantajlı olmasına karşın, yerleşmiş bir biyofilm söz konusu olduğunda bazı dezavantajlara sahiptir. Klor, kalın bir biyofilme girememekte ve organik materyaller ile reaksiyon sonucu konsantrasyonu düşmektedir. Yapılan çalışmalar (LeChevallier ve diğ., 1988, Momba ve diğ., 1999), biyofilm kontrolü için, monokloraminin, serbest klordan daha üstün olduğunu göstermektedir. Biyofilm yapısında bulunan organik bileşikler ile reaksiyonda, klordan daha düşük bir kapasiteye sahip olmasının sonucu olarak, biyofilm içinde bozunmadan ilerleyebilmesi nedeniyle, belli koşullar altında monokloraminin biyofilme, serbest klordan daha fazla girebildiği belirtilmektedir (Griebe ve diğ., 1994, Stewart ve diğ., 2001). Monokloramin kullanımının önemli olan bir diğer avantajı ise, dezenfeksiyon yan ürünlerinin azalmasına yardımcı olmasıdır. Monokloramin klordan daha zayıf bir biyosit olmasına rağmen, test edildiğinde biyofilme karşı daha etkili olduğu görülmüştür (Mains, 2008, Park ve Kim, 2008).

Doğal çevrelerde bakterilerin hayatta kalabilmesi üzerine yapılan araştırmalar, belli koşullar altında uygun besiyerinde bakterilerin kültüre edilebilirliğini kaybettiklerini fakat hala metabolik aktivite sinyallerinin var olduğunu ve böylece canlı olduklarını göstermektedir. Pek çok bakteri türünde, üreme için uygun şartlar sağlandığı takdirde tekrar kültüre edilebilir forma dönüşebilme yeteneğiyle birlikte kültüre edilebilirliğin kaybedilmesi, canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) faz olarak tanımlanır (Besnard ve diğ., 2002). Olumsuz çevresel şartlarla karşı karşıya kaldığında pek çok bakteri türünün VBNC fazına girdiği, yapılan çalışmalar neticesinde açık bir şekilde gösterilmektedir. Çevrede bulunan bakteri toplulukları sıklıkla, kullanılabilir besin kısıtlılığı, sıcaklık, tuzluluk, ozmotik stres, güneş ışınları, oksijen doygunluğundaki değişimlerden kaynaklanan streslere maruz kalmakta ve bu şartlar altında VBNC fazına girmektedir. Düşük sıcaklık da VBNC fazına sebep olan faktörlerden biridir. Yapılan çalışmalarda, oda sıcaklığında *Vibrio vulnificus*'un klasik açlık yanıtı sergilerken, düşük sıcaklık şartlarında, VBNC fazına girdiği ortaya konmuştur (Besnard ve diğ., 2002).

Vibrio cholera ile yapılan çalışmalar sonucunda da, mikroorganizmanın VBNC fazına girmesinin, besin yetersizliği ve diğer çevresel koşullara cevap olarak ortaya çıktığı bulunmuştur. Yapılan çalışmada, mikroskop kullanımı sonucunda besiyerine kıyasla 20-5000 kat daha fazla sayıda bakteri elde edilmiştir. Olumsuz koşullar altında mikroorganizmaların girdiği bu faz, önemli toplumsal sağlık riski oluşturmaktadır. Çünkü *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio vulnificus* ve *Escherichia coli* gibi pek çok patojenik bakteri VBNC fazına girebilmektedir (Saradeassai, 2005). VBNC yanıtı, spor formu gibi farklılaşmış bakterilerin stres yanıtına benzemektir. VBNC, çevresel stres boyunca hayatta kalabilmek için direnen bakteri hücrelerinin, genetik olarak programlanmış fizyolojik yanıtı olarak da tanımlanmaktadır. Bu benzerliği tamamlamak için, VBNC hücreleri bu uyku fazından çıkmak zorundadırlar. Mikroorganizmalar, şartlar uygun hale geldikleri zaman metabolik olarak aktif formlarına çoğu zaman geri dönerler. Söz konusu yeniden canlanma ile ilgili bilgiler henüz netlik kazanmamıştır ve VBNC'nin hayat döngüsü süreci mi yoksa hayat sürecinin sonu mu olduğu tam olarak kesinleşmemiştir (Besnard ve diğ., 2002).

VBNC fazına giren hücreler, hayatta kalabilmek adına bazı belirli, tahmin edilebilir değişimler geçirmektedirler. Bu değişimler zar yapısı, protein kompozisyonu ve lipid miktarında meydana gelmektedir. Bu yolla hücrelerin sağlamlığı artmaktadır. VBNC fazına giren hücreler, zar kompozisyonundaki değişimlere rağmen, zar bütünlüğü göstermektedirler. Örneğin, VBNC hücreleri kültüre edilebilir hücrelere kıyasla yeni uzun zincirli yağ asitleri üretmekle beraber ana yağ asitlerinin %60'ından fazlasının azaldığı normal sitoplazmik zar yapısı sergilemektedirler. VBNC fazına giren hücrelerde toplam lipid ve protein miktarı hızlıca azalarak, sitoplazma daha yoğun hale gelmektedir (Mc Dougald ve diğ.,1998). Bununla birlikte örneğin *V. vulnificus*'un, VBNC fazında normal sıcaklıkta üremeleri sırasında görülmeyen, 40 yeni protein ürettikleri bilinmektedir. Bu hücreler, sitoplazmik zar tarafından, bariyer geçirgenliğinin azaldığı sırada bozulmamış nükleotid ve sitoplazma içeren morfolojik bütünlük ve duvarda kalınlaşma sağlamaktadırlar. Araştırmacılar, geçirgenlikteki kaybın kültüre edilebilirliğinin kaybedilmesinin bir yolu olduğunu söylemektedir. Konu ile ilgili yapılan benzer bir çalışma sonucunda, *Vibrio cholera*'da hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasında bozulma olmamasıyla beraber bir kalınlaşma olduğu

bulunmuştur (Sardeassai, 2005). *Campylobacter jejuni*'de ise elektron mikroskobu ile yapılan incelemede asimetrik zar yapıları gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak, bu hücrelerin hücre zarlarında ve duvarlarında gözlenen bu değişimlerin, uzun süreli sağlamlılık ve direnç için alınmış önlemler olduğu sonucuna varılmıştır. Zardaki bu değişimler, açlık süresi boyunca hücrelerin direnç geliştirmesine paralel olabilmektedir. Bu mekanizmaların hepsinin, pek çok mikroorganizmada bulunduğu ve hücresel dayanıklılık önlemi olduğu apaçık ortadadır (Mc Dougal ve diğ., 1998). VBNC hücrelerinin, nükleik asiti ile ilgili olarak da yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda VBNC hücrelerinin DNA miktarını arttırdığı gözlenmektedir. Hücrelerin VBNC fazına girişi ile DNA'da yoğunlaşma olabilmekte ve bu durum, hücre duvarının kalınlaşmasıyla eş zamanlı olarak meydana gelebilmektedir. Bazı çalışmalar VBNC fazında, RNA miktarında artma olduğunu göstermektedir. Örneğin *Micrococcus luteus*'ta VBNC fazında RNA miktarının %50 daha fazla olduğu görülmüştür. Bazı faktörler, hücrelerin yeniden canlanmasına ve VBNC döngüsünün tamamlanmasına sebep olmaktadır. Hangi faktörlerin yeniden canlanmaya sebep olduğu kesin olarak açık değildir fakat bu duruma çevresel faktörler veya aktif olarak üreyen hücrelerden gelen sinyallerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Canlanmaya sebep olan çeşitli faktörlerin, besin eklenmesi, taze besi ortamına transfer, sıcaklık yükseltilmesi veya sıcaklık şoku olabileceği üzerinde durulmaktadır (Mc Dougal ve diğ., 1998, Sardeassai, 2005).

Çok genç bir disiplin olan biyofilm alanında muhtelif çevresel streslerin biyofilme olan etkileri gibi konularda ekolojik ve endüstriyel açıdan önem taşıyan çalışmalar nadir bulunmaktadır. Bu konulara açıklık getirmek amacıyla araştırmamız kapsamında, *L. pneumophila* ATCC suşu eklenmiş, laboratuvar ölçekli soğutma kulesi model sisteminde cam kuponlar üzerinde biyofilm tabakası meydana getirilmiştir. Aylık örneklemeler ile sıcaklık, pH, ozmotik ortam ve dezenfektan uygulamalarını kapsayan fiziksel ve kimyasal stres parametrelerin tabakada bulunan aerobik heterotrofik bakteriler, ölü/canlı sayısı ve *L. pneumophila* bakterisi üzerindeki etkisinin incelenmesi planlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Legionella spp, hem tatlı sularda hem de insan yapımı su sistemlerinde bulunabilen, Gram negatif, fakültatif, hücre içinde çoğalan, hareketli, sporsuz, çomak şeklinde bir bakteridir. Üremesi için en uygun sıcaklık 35- 37 °C arasındır ve üremesi için en uygun pH değeri 6.9'dur. Buna karşın, PCR temelli teknikler kullanarak, Sheehan ve arkadaşları tarafından, ekstrem asidik koşullarda yaşayabilen (pH 2.7) 4 tane *Legionella* izolatı saptanmıştır (Yellowstone doğal parkındaki çoğunluğu ökaryotik algal biyofilmden oluşan örneklerde). *L. pneumophila*'nın kısa süreli olarak aside karşı gösterdiği direnç, mikroorganizmanın bu tür ekstrem koşullarda varlığını sürdürebilmesinin yanında çevresel örneklerden izolasyonunda da önemli rol oynamaktadır (Bopp ve diğ., 1981). Bakteriler, laboratuvar ortamındaki kültürlerinde karbon kaynağı olarak amino asitleri kullanmakta ve L-sistein'e ihtiyaç duymaktadırlar. Ayrıca iz miktarda demir, çinko, manganez, potasyum, magnezyum ve bakıra gerektirir. Bakterinin bugüne kadar 59 türü tanımlanmış olup 70 farklı serogrubu tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bu türlerden 17 tanesinin legionelloz ajanı olduğu tespit edilmiştir (Critcheley ve Benthams, 2007, Lau ve Ashbolt, 2008, Declerk, 2009).

Legionella türleri tarafından meydana getirilen legionelloz, iki ayrı hastalık durumunu kapsamaktadır. Bunlarda biri Lejyoner hastalığıdır, hızlı ve doğru olarak teşhis edilmediği takdirde öldürücü olabilmektedir. Lejyoner hastalığı, çoklu organ yıkımı ile sonuçlanabilen şiddetli bir pnömonidir. Hastalık 1-14 gün arasında değişen inkübasyon süresine sahiptir ve klinik görünümü hafif solunum rahatsızlığından şiddetli atipik pnömoniye kadar gidebilmektedir. Hastalık genel olarak erkeklerde, 50 yaş üstü erişkinlerde, sigara kullananlarda, bağışıklık sistemi baskılanmış ve akciğer rahatsızlığı bulunan kişilerde görülmektedir. Bakterinin sebep olduğu diğer bir hastalık olan Pontiac ateşi ise grip benzeri bir hastalıktır. Söz konusu hastalıktan *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. feeleii* ve *L. anisa* olmak üzere 4 tür sorumludur. Hastalık durumunda bildirilen vakaların %90'ına *Legionella pneumophila* sebep olmaktadır ve insanlar için patojen olduğu ilk kez Amerikan lejyonerlerin Philadelphia'da 1976 yılında katıldıkları toplantıda 29 kişinin ölümüne neden olan salgının ardından tanımlanmıştır (Chritceley ve Benthams, 2007, Declerk, 2009).

Legionella cinsleri içerisinde en sık olarak, *L. pneumophila* serogrup 1, *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dumoffii* ve *L. bozemanii*'yi de içeren ve fırsatçı patojenler olarak bilinen türler, klinik vakalarla yakından ilişkilidir. *L. pneumophila* serogrup 1, Amerika ve Avrupa'da rastlanan Lejyoner hastalığının en az %70'ine neden olan etken olmakla beraber Lejyoner hastalığına neden olan birincil ajan olarak kabul edilmektedir. Soğutma kulelerinden kaynaklanan salgınların çoğu, *L. pneumophila* serogrup 1'den kaynaklanmaktadır (Chritceley ve Bentham, 2007, Lau ve Ashbolt, 2008). Habitat şartlarının *Legionella* üremesi için uygun olmaması nedeniyle doğal çevreler, legionellozla pek bağlantılı değildir. Sadece sıcaklık aralığı 35 °C ve 45 °C arasında değişen doğal sıcak sular, legionelloz için kaynak olarak düşünülmektedir. Taze su habitatlarında, sıcaklığın genel olarak çevre şartlarından daha yüksek olduğu insan yapımı su sistemlerine geçiş ile *L. pneumophila*, mevcut olan biyofilmde kolonize olmakta ve çoğalarak yüksek sayılara ulaşabilmektedir (Declerk, 2009).

Legionelloz, soğutma kuleleri, duş başlıkları, musluklar, spa havuzları, dekoratif fiskiyeler, ev, otel ve gemilerdeki su dağıtım sistemlerini içeren birçok çevresel kaynak gibi sıcak su sistemleriyle yakından ilişkilidir. *Legionella* taşınması temel olarak mikroorganizma içeren aerosollerin solunmasıyla ilişkilidir. Soğutma kulesinin *Legionella* tarafından kolonizasyonu ve bakteri yüklü aerosollerin üretimi, *Legionella* salgınlarının başlıca kaynaklarından biri olarak tanımlanmaktadır (Lau ve Ashbolt, 2008, Sabria ve diğ., 2006). *Legionella* ile kontamine olmuş aerosoller, bu hücre içi fakültatif patojenlerin taşınmasını sağlamaktadır. Akciğerlerde ilk olarak bu bakteriler alveolar makrofajların içine girmekte ve burada çoğalarak şiddetli ve ölümcül Lejyoner hastalığına neden olmaktadır (Alleron ve diğ., 2008). Söz konusu mikroorganizmalar soğutma kulesine, sudan veya hava emiş bölgesine kontamine aerosoller aracılığıyla girmektedirler. Soğutma kulelerinde bulunan yüksek sıcaklıktaki su, yüksek nem ve geniş yüzey alanı, üreme için uygun ortam sağlamaktadır. Mikrobiyal kolonizasyonun büyüklüğü değişkendir ve pek çok çevresel faktöre bağlı olmakla birlikte, yapılan çalışmalarda sıcaklık, pH, tuzluluk, kimyasal madde eklenmesi gibi faktörlerin kolonizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir. Biyofilm, su akış rejimi, besin kaynağındaki değişiklikler, kimyasal uygulamalar, gibi nedenlerle hızlıca yüzeyden kopabilirler. Soğutma kulesinin kesikli olarak çalışması ile de arttırılabilecek olan

biyofilm kopması, sirküle olan su fazı için mikrobiyal kaynak sağlamakta ve devamlı bir kaynak rolü oynamaktadır (Critcheley ve Bentham, 2007). Soğutma kulesi gibi yapay su sistemlerinde mikrobiyal üreme, boru duvarının, bina içindeki su tesisatındaki bağlantıları noktalarının, havalandırma ve klima sistemlerinin iç yüzeyinde oluşan biyofilm yapısında bulunmaktadır (Lau ve Ashbolt, 2008).

Biyofilmin su sistemlerindeki bu bakterilerin devamlılığında kritik rol oynadığı yaygın bir kanıdır. Biyofilm, yapısındaki topluluklara, sığınak ve besin sağlamakla birlikte dezenfektanların ekzopolimer matriks aracılığıyla bakterilere ulaşmasını da engellemektedir. *Legionella*'nın sudaki kontrolünde, klorlama, monokloramin uygulaması, yüksek sıcaklık, UV uygulaması gibi pek çok strateji kullanılmıştır. Kwaik ve diğ. (1998) ve Thomas ve diğ. (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda kontamine sisteme uygulanan bu uygulamalarla, kısa süreli başarı sağlanmıştır. Ancak kaynakta daha sonra yapılan incelemelerde bakteriye tekrar rastlanmıştır. Nitekim *L. pneumophila*'nin kontrolü devamlı bir uygulama gerektirmektedir. Kool ve diğ. (1999), Kool (2002) ve Momba ve Binda (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda biyofilm üzerine monokloraminle yapılan devamlı uygulamanın klora oranla daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Monokloraminin biyosidal etkisi serbest klora oranla daha yavaş olmakla birlikte yapısal olarak monokloramin, klordan daha karardır (Türetgen, 2004). Bu sebeple de monokloraminin kalıntı aktivitesi, dağıtım sistemlerinde uzun mesafelerde dezenfeksiyonu devam ettirebilmektedir. Yapılan çalışmalarda 0.5- 2mg/L rezidual monokloraminin biyofilmde bulunan toplam bakteri ve HBS (hetetrofik bakteri sayısı) 1-2 log azalttığı tespit edilmiştir. Serbest klordan daha fazla olarak biyofilme girebilme özelliğine sahip olan monokloramin, bu özelliğinin yanı sıra zararlı yan ürün olan trihalometanın da daha az olarak meydana gelmesine neden olmaktadır (Kool ve diğ., 1999, Flannery ve diğ., 2006, Alleron ve diğ., 2008, Park ve diğ., 2008). Pryor tarafından gerçekleştirilen, klor ve monokloramin aktivitesinin karşılaştırıldığı çalışmada, klor ve monokloramin uygulaması yapılan sıcak su sistemleri ve duş başlıklarındaki biyofilmlerden elde edilen *L. pneumophila* türleri, 16s rRNA ve direkt kültür metoduyla identifiye etmiş olup, monokloramin uygulaması sonucunda klora kıyasla daha az *Legionella* türüne rastlanmıştır. Yapılan benzer çalışmalarda da kültüre edilebilir *Legionella* türleri ve serogruplarının, dağıtım

sistemlerinin sıcak su tankının tipine, su sıcaklığına ve serbest klor miktarına göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Lau ve Ashbolt, 2008).

Legionella, tatlı sulardaki protozoonların içinde, hücre içi patojenler olarak hayatta kalabilmeleri ve bu hücrelerin içinde çoğalabilmeleriyle de bilinmektedirler. *Acanthamoeba*, *Hartmannella* ve *Naegleria*, *Legionella* ile kontamine olmuş sistemlerden en çok izole edilen protoozon cinsleridir. Konak-parazit etkileşiminin, sıcaklık, konağın besin şartlarının ve ferrik demirin kullanılabilirliği tarafından etkilendiği bilinmektedir. Bakteri, aynı şekilde insan makrofajlarını da enfekte edebilmektedir. Ökaryotik konaklarda gerçekleşen bakteri çoğalması, büyük bir olasılıkla bu patojenlerin çevreye yayılması için önemli bir vektördür (Steinert ve diğ., 1997, Forstmeier ve diğ., 2005, Alleron ve diğ., 2008). *L. pneumophila*'nın, makrofajlar ve amip içindeki hayat devirleri birbirine benzemektedir. Bakteri konak hücre içine alındığında, sindirilmeye karşı direnç göstermekte konak hücreyi öldürmeden önce içeride çoğalmaktadır. Hücre içi replikasyon lizozomla erimeyen, ribozomla kaplı fagozom içinde meydana gelmektedir. *L. pneumophila*'nın hayat devri iki faz içermektedir. İlk faz, replikasyon fazı olarak isimlendirilmektedir ve konak içinde gerçekleşmekte olup, ikinci fazı ise, aktif enfeksiyon fazı olarak isimlendirilmekte ve bakterin akuatik kaynaktaki konağın serbest kalmasından sonra meydana gelmektedir. Sonunda, konak hücreyi parçalayan bakterinin, konak içindeyken daha dirençli olduğu görülmektedir (Steinert ve diğ., 1997).

L. pneumophila'nın stresli çevresel şartlara karşı adaptasyon ve direnç stratejisi, sadece amip içindeki etkileşimler ve biyofilm lokalizasyonu ile ilgili değil, aynı zamanda VBNC fazına girebilmesiyle de alakalıdır (Steinert ve diğ., 1997). VBNC fazındaki hücreler, normalde üredikleri rutin besiyerinde üreme göstermezler. Bu bakteriler, canlılıklarını korumakla birlikte ve tipik olarak düşük seviyede metabolik aktivite ve solunum göstermekle birlikte uygun şartlar altında tekrar kültüre edilebilir duruma gelebilirler. Suyun düşük miktarda besin içerdiği, sıcaklığın yüksek olduğu, tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu veya klor uygulamalarını gerçekleştirildiği çeşitli stresli çevre koşullarında *L. pneumophila*, VBNC fazına girebilmektedir. VBNC fazındaki *L. pneumophila*'ya, *A. castellanii* veya *A. polyfaga* gibi amiplerin eklenmesi bu bakterilerin kültüre edilebilir faza dönmesiyle sonuçlanmaktadır (Alleron ve diğ.,

2008). Pek çok araştırmacı VBNC'nin olumsuz çevre şartlarıyla baş edebilmek için hücrelerin programlanmış genetik yanıtı olduğunu düşünmektedir. VBNC fazına geçen bakterilerin varlığını geleneksel kültür metoduyla belirlemek mümkün olmadığı için bakterilerinin güvenilir bir şekilde keşfi için flow sitometri ve moleküler tekniklerle kombine edilmiş epifloresan mikroskopi teknikleri gibi çeşitli metotlar geliştirilmiştir (Saradeassi, 2005).

2.2. BİYOFİLM TABAKASI VE EPS

Biyofilm, 'canlı veya cansız yüzeylere tutunarak kendi ürettikleri polimerik matriks içerisinde yaşayan hücre topluluğu', 'yoğun bir ekzopolimerik matriks içerisinde, mikroorganizmaların organize olarak oluşturduğu fonksiyonel ortaklık' (Dunne, 2002), 'geri dönüşümsüz olarak bir yüzey ile ilişkili olan ve temel maddesi polisakkarit materyalleri olan bir matriks içine gömülü hücre topluluğu'(Donlan, 2002) veya 'sulu matriks içine gömülü, çok tabakalı hücre topluluğundan ibaret olan, yüzeye tutunmuş mikrobiyal topluluklar' (Pearson ve Karatan, 2005) olarak tanımlanmaktadır. Bahsi geçen tanımlardan da anlaşılacağı üzere, herhangi bir oluşumun biyofilm olarak adlandırılabilmesi için mikroorganizma, yüzey ve EPS bileşenlerine sahip olması gerekmektedir. Bu 3 bileşenden herhangi birinin eksik olması halinde, oluşumun biyofilm olarak adlandırılması mümkün değildir. Biyofilm tabakasının temelini bu üç bileşen oluşturmaya karşın yapıda, biyofilmin meydana geldiği yüzeye bağlı olarak mineral kristalleri, korozyon partikülleri, alüminyum veya kil partikülleri, kan komponentleri gibi hücresel olmayan materyallerde bulunabilmektedirler (Donlan, 2002, Szymanska, 2003).

Yaşamın var olduğu her yerde bulunabilen biyofilm, özellikle katı-sıvı, katı-hava ve sıvı-hava ortamlarının kesişim bölgelerinde meydana gelmektedir. Mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun biyofilm meydana getirebilmesinin sonucu olarak dünyadaki tüm mikroorganizmaların %99'undan fazlası bu topluluk içinde yaşamaktadır (Beweridge ve diğ., 1997, Flemming, 2002). Doğada, bakteriler, sucül ortamlarda bir yüzeyde yaşamayı, serbest yaşama tercih ederler. Bunun nedeni, tutunduğu yüzeyin adsorbe olan materyallerden dolayı besin kaynağı olması, suyun akışıyla tutunduğu yere besin

maddesinin devamlılığının sağlanması ya da su akışı sayesinde bol oksijen bulunması olabilir (Melo ve Bott, 1997).

Biyofilm içinde yaşamak bakterilere pek çok avantaj sağlamaktadır. İlk olarak, matriks, mikroorganizmaları, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı koruyan bir koruyucu bariyer görevi üstlenmiştir. Biyofilm bakterileri, pek çok antibiyotik tarafından öldürülmeye karşı dirençli olmalarının yanında, bu bakteriler, immün sisteme ait fagositlerden de kaçabilmektedirler. Ayrıca matriks, küçük moleküllerin biyofilm içine ve dışına hareketlerini yavaşlatmakta ve böylece metabolik değişimler için mükemmel bir çevre yaratmaktadır. Matriksin diğer bir avantajı ise çevreden aldığı besinleri orada fıkse ederek onları konsantre etmek oligotrofik şartlar altında hayatta kalmak için genel mikrobiyal stratejinin önemli bir kısmını oluşturmaktır (Beweridge ve diğ., 1997, Flemming, 2002, Pearson ve Karatan, 2005). Biyofilmler, karasal ve akuatik çevrelerde, bitkisel dokularda, hayvanlarda, insanlarda ve ek olarak filtreler, porlu materyaller, depolar, boru sistemleri, gemi karinaları, su ısıtıcıları gibi sistemlerde de bulunabilmektedir. Ayrıca medikal cihazlarda da meydana gelerek sürekli enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (Allison ve diğ., 2000).

Bakterilerin canlı veya cansız bir yüzeye tutunmalarını takiben meydana gelen biyofilm, sağlık ve endüstriyel alanlarda çok sayıda probleme neden olmaktadır. Biyofilmler, doğrudan meydana getirdikleri ve medikal cihazlarla ilişkili olarak meydana gelen enfeksiyonlar açısından, toplum sağlığı için oldukça önemlidirler. Özellikle *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, ve *Pseudomonas aeruginosa* intravenöz ve üriner kataterler gibi medikal cihazlar ile kalp kapakçıkları ve kalp pilleri üzerinde kolonize olarak, kronik enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Ekstrasellüler matriks ile kaplanmış *P.aeruginosa* topluluğu da, akciğerlere yerleşerek kistik fibröz olarak bilinen hastalığa neden olmaktadır (Donlan, 2002, Pearson ve Karatan, 2005). Endüstriyel alanlarda da, mevcut sistemlerde meydana gelen biyofilmler, sürtünme direncinin artmasına, enerji transfer direncinin artmasına, verimlilikte önemli kayıplara, işlem süreçlerinin aksamasına, biyokorozyona bağlı olarak ekipman zararına ve su kalitesinde azalma gibi problemlere neden olmaktadır (Macdonald ve diğ., 2000, Gilbert ve diğ., 2003, Tnji ve diğ., 2007, Liu ve diğ., 2009)

Hiç kuşkusuz ki biyofilmin en önemli yapı taşlarının başında, mikroorganizmaları çevreleyen polimerik yapıli matriks gelmektedir. Biyofilm tanımında bahsi geçen polimerik matriks, bakterilerin hücre dışına saldıkları maddelerdir ve bakterileri bir arada tutan çimento gibi düşünölmektedir. Mikroorganizmalar morfoloji, yapı, tutarlılık, dayanıklılık, elastiklik, fizikokimyasal özellikler ve topluluğun aktivitesinden sorumlu olan bu matriks içine gömölüdürler (Allison ve diğ., 2000, Zhang ve Bishop, 2003). Ekstrasellölar matriks tüm biyofilmler için kompleks ve oldukça önemli bir bileşen olmakla beraber, biyofilmin fizyolojisi ve devamlılığı için önemli rol oynamaktadır (Kives ve diğ., 2006). Matriks için ekzopolisakkarit, ekzopolimer ve ekstrasellölar polimerik bileşenler tanımlamaları kullanılmaktadır. Matriks bileşeni hakkında çoğunlukla, ekstrasellölar polimerik matriksin kısa adı olarak EPS ifadesi kullanılmaktadır. Matriks, mikroorganizmaların yüzeye yapışmasına yardımcı olmakla beraber, biyofilm hücrelerine su veya besin sıkıntısı, biyositler, diğeri mikrobiyal ajanlar, sıvı akışı, kuruluk, toksik kimyasallar, UV ışınları, pH ve sıcaklık değışimleri gibi çoklu stres koşullarına karşı da dayanıklılık sağlamaktadır. Yapıştırıcı taban ve koruyucu bariyer görevini gören bu yapı, aynı zamanda gömölümüş hücreleri, suyun akışı ile kopmasına karşı da korumaktadır (Bergler ve diğ., 1992, Tsuneda ve diğ., 2003, Allison, 2003, Kives ve diğ., 2006, Hall-Stoodley ve Stoodley, 2006).

EPS tabakası jel benzeri, yüksek oranda su içeren ve yaygın olarak biyofilm matriksi ile dolu 3 boyutlu bir yapıdır (Allison ve diğ., 2000). Matriks su, hücreler ve salgılanan ekstrasellölar makromoleküllerden oluşmaktadır. Biyofilm matriksinin temel bileşeni, %97'den fazla oranda sudur (Zhang ve Bishop, 2003). Biyofilm matriksine canlılık ve bağlayıcılık veren su, biyofilmde meydana gelen difüzyon süreçleri için de gereklidir. Farklı türlerden oluşan yerleşik hücreler, matriksin %5'ini oluşturmaktadırlar. Mikrobiyal EPS, biyosentetik polimerler olup, söz konusu polimerler, karbonhidrat, protein, lipid, nükleik asitler ve çeşitli heteropolimerlerdir. Yapıda bulunan eriyen ürünler ve salınan enzimleri içeren globular glikoproteinler ve proteinler ise, matriksin %1-2'lik kısmını oluşturmaktadır. Ek olarak kara ve su biyofilmlerinin bazılarında eser miktarda humik aside de rastlanmaktadır. Sayılan çeşitli bileşenlerden oluşan EPS tabakasının moleküler ağırlığı, birkaç bin ile birkaç milyon arasında değışmektedir (Allison ve diğ., 2000, Allison, 2003, Zhang ve Bishop, 2003, Tsuneda ve diğ., 2003).

EPS'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri değişebilir olmakla birlikte temel olarak polisakkaritlerden meydana gelmektedir (Donlan, 2002). Polisakkarit zincirlerinin boyutu (büyüklüğü, hacmi, çapı) 103–108 kDa arasında değişmekle beraber fonksiyonel ve türe özgü olarak alt üniteler içermektedirler. Tekrarlanan ünitelerinin bileşenlerine bağlı olarak polisakkaritler, genelde negatif yüklüdürler ve bundan dolayı genelde hidrofobiktirler (Allison, 2003). EPS'nin anyonik gruplarından olan karboksil grupları, temel olarak EPS'deki, polisakkaritlerin negatif yükünden sorumludur. Nötral şekerlere ek olarak, ekstrasellüler polisakkaritler sıklıkla glukoronik asit, galakturonik asit veya mannuronik asit gibi heksuronik asitlerin değişen miktarlarını da içermektedirler. Polisakkaritlerdeki katyonik gruplar, amino şekerlerin bulunmasından dolayı olabilmekte ve EPS matriksinin jelliğini arttırmaktadırlar (Allison ve diğ., 2000, Tsuneda ve diğ., 2003).

Proteinler EPS'nin anyonik özelliğine katkıda bulunan bileşiklerdir. Aspartik asit ve glutamik asit gibi iki değerlikli amino asitlerin bulunmasından dolayı proteinler negatif yüklüdürler. Hidrofobik alanin, lösin ve glisin amino asitlerinin yüksek oranlarından dolayı ekstrasellüler proteinler, EPS'nin hidrofobik özelliğine katkıda bulunmaktadırlar. Üronik asit, asidik amino asit ve fosfat içeren nükleotitler de EPS'nin bileşenleridir ve EPS'ye, polianyonik özellik kazandırmaktadırlar. Söz konusu yapılar, biyofilm için çok önemlidirler. Çünkü bu yapıların, multivalent iyonlarla (Ca^{+2} , Mg^{+2}) elektrostatik etkileşimlerde gerekli oldukları düşünülmektedir. Bu nedenle, EPS matriks ağının düzen ve/veya stabilizasyonuna aracılık etmektedirler. Örneğin lektin benzeri proteinler, EPS ile multivalent iyonların doğrudan ya da dolaylı olarak çapraz bağlanması ile biyofilm matriksinin 3 boyutlu yapısının oluşmasına katkıda bulunmaktadırlar (Allison ve diğ., 2000, Sutherland, 2001, Allison, 2003).

EPS, kimyasal olarak farklı modifikasyonlardan meydana gelebilmektedir. Bu nedenle ekstrasellüler polisakkaritler; asetil, süksinil veya pirüvil grupları gibi organik bileşikler veya sülfat gibi inorganik bileşiklerden oluşabilmektedirler. Bu bileşenler, polisakkaritlerin suda çözülebilme ve moleküler düzenleri gibi yapısal ve fizikokimyasal özelliklerini değiştirmektedirler. Örneğin asetil grupları, iki değerlikli katyon bağlanmasının kapasitesini ve seçiciliğini azaltmakta, EPS tabakasının akışkanlığını ve polisakkaritlerin su tutma kapasitesini arttırmakta, EPS'yi enzimatik

olarak yıkımdan korumakta ve böylece biyofilm yapısını etkilemektedir. EPS molekülündeki hidrofobik/hidrofilik bölgeler ve bunların EPS matriksi içindeki dağılımı ise, biyofilmin su tutma kapasitesini ve yüzeye tutunma özelliğini belirlemektedir. EPS tabakasında bulunan, yaygın olarak polisakkaritler ve su molekülleri arasındaki hidroksil grupları arasında var olan hidrojen bağları ile C atomları arasında bulunan kovalent bağlar, EPS tabakasının devamlılığına yardımcı olmaktadır. Bunun yanı sıra iyonlar arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimler sonucunda ortaya çıkan elektrostatik güçler, itici güç olarak davranmakta ve bu durum sonucunda EPS matriksi, kabarık, süngerimsi ve porlu bir yapı kazanmaktadır (Allison ve diğ., 2000).

EPS üretim yeteneği yaygın olarak prokaryotik mikroorganizmalar (bakteri, arke) arasında görülmekle birlikte aynı zamanda ökaryotik mikroorganizmalarda da rastlanmaktadır (alg, mantar). EPS'nin varlığı, biyofilmin bütünlüğünü sağlamaya yardımcı olarak, bakterilerin büyük bir çoğunluğunun bu sayede bir arada bulunabilmelerini sağlamaktadır. Ek olarak EPS'nin oynadığı diğer bir rol de bakterilerin, diğer bakterilere ve yüzeye yapışmasına yardım etmektir (Allison ve diğ., 2000). Yüzeye tutunma, ekzopolisakkaritlerin aşırı üretimiyle, hücrelerden fizyolojik değişkenlerin bol miktarda akmaya başlamasıyla gerçekleşmektedir. Bu ekzopolisakkaritler, sadece hücrelerin yüzeye yapışmasını değil aynı zamanda, biyofilm yapısında bulunan farklı türlerin uzaysal olarak düzenlenmesini de kolaylaştırmaktadırlar (Allison, 2003). EPS bileşenlerinden lipopolisakkaritler, üronik asit ve biyosürfaktanlar adhezyonun önüne geçerken; polisakkaritler ve proteinler, bakteriyal adhezyonu arttırmaktadır. EPS bileşenleri, biyofilm yapısının ortaya çıkarılmasında ve yapıdaki mikroorganizmaları avcı organizmaların faaliyetlerinden ve zararlı kimyasallardan korumada önemlidir. Ek olarak EPS besinleri yakalayan, hücre içi iletişim moleküllerini yoğunlaştıran, hücre dışı enzimlerle polimerik bileşenlerin yıkımını ve horizontal gen transferi için gerekli olan, yüksek hücre yoğunluklarının gelişimini sağlayan bir matriks sunmaktadır (Allison ve diğ., 2000).

2.3. MİKROBİYAL TUTUNMA

Biyofilm oluşumunun başlangıcı, mikroorganizmanın yüzeye tutunmasıdır. Bakterinin cansız yüzeye ilk tutunmasındaki en önemli kriter ise, yüzey şartlarının durumudur.

Temiz bir yüzey, sıvı içine batırılırsa yüzey ve sıvı arasında hemen etkileşimler başlayarak yüzey, bulunduğu çevreyle bağlantılı olarak inorganik tuz, protein, glikoprotein ve humik bileşenlerinin adsorbe edilmesi ile değişikliğe uğramaktadır. Bu inorganik moleküllerin adsorbe edilmesi ile saniyeler için tutunma için uygun yüzey meydana gelmektedir. Etkileşim sonucu oluşan ince film tabakası, materyalin yüzey özelliklerini değiştirmekte ve mikrobiyal tutunma üzerinde etkili olmaktadır. Pek çok bakteri sıvı fazdan katı yüzeye doğru hareket ederek yüzeylerle ilk teması kurmaktadır (Murga ve diğ., 2001, Kolari, 2003).

Hücre ve tutunma için uygun hale gelen yüzey arasındaki etkileşimi fizikokimyasal değişkenler belirlemektedir. Bu durumu açıklamak için iki teori geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Van Pelt ve diğ. (1985) ve Van Loosdrecht ve diğ. (1987) tarafından ileri sürülen ‘ıslanma’ veya ‘hücre serbest enerjisi/hidrofobisite’ teorisidir. Bu teori, yüzey termodinamiğinin temelini oluşturmaktadır. Sistemin toplam serbest enerjisinin, bakterinin yüzeye teması ile azalması durumunda emilimin meydana geldiğini savunan teori, hidrofobik yüzeyler için hidrofobik bakterilerin afinitesini açıklayarak, hidrofobik bakterilerin daha güçlü tutunduğunu ileri sürmektedir. Bu teori, bakteri ve yüzeyin, yüzey geriliminin belirleyici olduğunu söylemekte ve elektrostatik etkileşimleri içermemektedir. 1971 yılında Marshall tarafından ileri sürülen diğer bir teori olan DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) teorisinde ise, itici ve çekici güçlerin tutunmaya etkisinin eşit olduğu öngörülmektedir. Mikrobiyal tutunma, çekici Van der Waals ve elektrostatik güçler ile (pek çok bakteri ve yüzey negatif yüklü olduğundan dolayı iticidir), daha az etkili olmakla birlikte Levis asit baz etkileşimleri ve Brownian güçlerinin dengesi olarak tanımlanmaktadır (Kolari, 2003, Splendiana ve diğ., 2006).

Bakterinin cansız yüzeye başlangıç tutunmasına, hidrofobik etkileşimler gibi spesifik olmayan etkileşimler aracılık etmekle birlikte bu hidrofobik etkileşimler, EPS’nin salınımı aracılığıyla ve fimbria veya fibriller içeren fibrilar yapının hücre yüzeyinden çıkarak tutunmaya yardımcı olmasıyla gerçekleşmektedir. Bunların pek çoğu, hazırlanmış yüzey veya diğer bakterilerin elementlerine tutunabilmeyi sağlayan spesifik adhezinler ile düzenlenmektedir (Allison ve diğ., 2000, Kolari, 2003).

Bunun yanı sıra:

- Yüzeyler ilgili özellikler: Dokusu, pürüzlülüğü, hidrofobisitesi

- Sıvı akışı ile ilgili özellikler: Akış hızı, pH, sıcaklık, katyonlar, antimikrobiyal ajanlar
- Hücrelerle ilgili özellikler: Hücre yüzey fobisitesi, fimbria, flagella ve EPS de tutunmada etkilidir (Szymanska, 2003).

Yüzeye mikrobiyal tutunmayı düzenleyen yüzey özellikleri (bakteri yüzey hidrofobisitesi ve bakteri yüzey yükü), sürfaktanlar kullanılarak değiştirilebilir. Yapılarından dolayı, lipofilik ve hidrofilik grup içeren sürfaktanlar, hidrofobik yüzeye kendi kendilerine demir atarlar ve su fazına doğru hidrofilik grupları yöneltirler. Bunun sonucunda, bakterinin yüzeye tutunmasını sağlamak gibi hidrofobik etkileşimlerin gücünü azaltırlar. Kesişim yüzeylerine tutunan sürfaktanlar, elektriksel tabakaya zarar vermenin yanı sıra bakteri yüzey yükünü de modifiye ederler. Bu sayede yüzeye tutunma ve biyofilm gelişimi engellenebilmektedir (Splendiana ve diğ., 2006).

Biyofilm oluşumu 4 aşamadan meydana gelmektedir. 1- Geri dönüşümlü yaklaşma 2- Geri dönüşümsüz tutunma 3- Olgunlaşma 4- Kopma. Bu aşamaların son kısmı, biyofilm gelişim döngüsünde bakterinin planktonik faza geçişini sağlamaktadır. Geri dönüşümlü yaklaşımda bakterinin yüzey ile reaksiyona girebilmesi için, bakterinin yüzeye yakınlığını algılaması gerekmektedir. Planktonik hücrelerin proton ve sinyal molekülleri saldığı bilinmekte olup bu proton ve sinyal molekülleri, eğer bakteri bir yüzeye bitişik değilse yüzen hücreden ışınsal olarak dışarı çıkmaktadır. Canlı hücrelerin, faz-kontrast veya konfokal ışık mikroskopuyla direk olarak gözlemlenmesinde, planktonik hücrelerin yüzeyden etkilendiğı ve türe özgü davranışları aracılığıyla, ilk karşılaşmalarında yüzey alanını keşfettiğı gözlemlenmiştir. Bazı türlere ait hücreler, bir yüzeye yerleşmeden ve tutunma davranışlarına başlamadan önce yüzeyin etrafında dolaşmaktadırlar. Bu hareketin ardından kolonize olan yüzeyde tek sıra hücreden oluşan bir tabaka meydana getirmektedirler. Tutunmanın başlangıç aşamasında birkaç bakteri türü modern moleküler tekniklerle incelenmiş ve hücrelerin birkaç dakika içinde yüzeye tutunma ile ilgili genlerin anlatımı yaptığı görülmüştür (Costerton, 1999).

Biyofilm oluşumunun ikinci aşaması olan geri dönüşümsüz tutunmaya geçiş, Characklis tarafından karakterize edilmiştir. Characklis (1990) tarafından yapılan çalışma

sonucunda hücrelerin yüzeyle zayıf etkileşiminden kalıcı bağlanmaya geçmelerinin, ekstrasellüler polimerler aracılığıyla gerçekleşmekte olduğu sonucu çıkmıştır. Cansız bir yüzeye tutunma, bakteriyel EPS sentezi ile harekete geçmektedir. EPS bileşenlerinden lipopolisakkaritler, üronik asit ve biyosülfaktanlar, adhezyonun önüne geçerken; polisakkaritler ve proteinlerin, bakteriyel adhezyonu arttırdığı görülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, geri dönüşümsüz bağlanmaya geçişin, tip IV pilus aracılığıyla gerçekleştiği de düşünülmektedir. Bakteriler, bakteri ve yüzey arasında köprü oluşturan flagella, pili gibi bakteriyel yüzey yapıları tarafından elektrostatik iticiliği yenmekte olup bu yapıların küçük yarıçapları, elektrostatik itme ve hidrofobik etkileşimlerde azalmaya neden olmaktadır. Flagella ve pilinin bakteri hücre duvarından genel olarak daha hidrofobik olmalarından dolayı da tutunma sürecinde keşişim yüzeylerinden kolayca suyun yerini değiştirebilmektedir (Stoodley ve diğ., 2002, Gomez-Saurez ve diğ., 2002, Splendiana ve diğ., 2006).

Biyofilm oluşumunun diğer fazı olan olgunlaşma, kompleks yapının, kanalların, porların ve bakterilerin substrat yüzeyinden uzağa, yeniden dağılımının gerçekleştiği aşamadır. Bu aşamada, ekzopolisakkaritler gibi eksopolimerlerin üretimi, üreme ile hücresel kümelerin oluşması, metabolik değişimler, çevre tarafından teşvik edilen, hücre-hücre etkileşimine yardımcı olan ve bu etkileşimleri kolaylaştıran genetik düzenlemeler gibi yüzeye tutunan hücreleri olgunlaştıran aktiviteler gerçekleşmektedir. Bu durum, tutunmuş hücrelerin yoğunluğunun artması ile sonuçlanır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda olgun biyofilmde bulunan *P. aeruginosa*'nın planktonik türlerine kıyasla farklı protein profiline sahip olduğu görülmüştür. Proteomunun %50'den fazlasının (800 proteinden fazla) gen anlatımında büyük farklılıklara sahip olduğu görülürken, bunların 300'den fazlasının olgun biyofilmde gözlenmesine karşın, planktonik bakterilerde gözlenmediği saptamıştır. İdentifiye edilen yeni proteinler fosfolipit ve lipopolisakkarit (lps) biyosentezi, zar transportu ve salınım, adaptasyon ve korunma mekanizması ile ilgili proteinler olmak üzere 5'e ayrılmıştır (Liu ve Tay, 2001, Stoodley ve diğ., 2002).

Son aşama olan kopma aşaması, genel olarak biyofilmden ayrılan hücreleri tanımlamak için kullanılır. Hücrelerin, biyofilmden kendiliğinden kopmaları iki sürece ayrılmaktadır. Erozyon ve soyulma, bu işlemin büyük bir kısmının temelini

oluşturmaktadır ve kopma olaylarında sıklıkla görülmektedir. Erozyon, hücrelerin tek tek biyofilmden sürekli olarak kopması olup biyofilmden küçük kayıplara neden olurken; soyulma, hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve biyofilmden ağır kayıplara neden olmaktadır. Bununla birlikte, biyofilmden bakterilerin aktif olarak kopması, fizyolojik olarak da düzenlenebilen bir olaydır. Allison ve diğ., (1998) tarafından, *P.flourescans*'ın biyofilmden kopması ile ilgili yapılan çalışmada, kopmanın EPS'deki azalmayla bağlantılı olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada, *N*-acyl-C6 homoserine lakton eklenmesinin, biyoofilmin azalmasına ve ekzopolimerlerin kaybedilmesine neden olduğunu gösterilmiştir (Stoodley ve diğ., 2001, Stoodley ve diğ., 2002).

Biyofilmin temel mimarisi incelendiğinde mikrokoloninin, biyoofilmin temel yapısal ünitesi olduğu görülmektedir. İçerdiği türlere bağlı olarak mikrokoloniler %25 hücre ve %75 matriksten meydana gelmektedirler. Matriks materyalleri, yoğun olarak mikrokoloninin merkezinde bulunmaktadırlar. Matriks içindeki bakteriyal hücreler, Brown hareketleri ile karakterize edilmektedirler ve koloniler mantar benzeri şekiller olarak tanımlanmaktadır. Biyofilm yapısındaki pek çok hücre, mantar yapının taç kısmında bulunurken, çok azı sap kısmında bulunmaktadır (Costerton, 1999). Mikrokoloninin ince yapısında, çok fazla miktarda su kanalları olduğu ve bu geçirgen kanallar yardımıyla oksijen, besin ve artık maddelerin taşındığı belirtilmiştir. Bu kanallar aracılığıyla besinlerin biyofilm boyunca taşınması, ilkel bir dolaşım sistemi olarak görülmektedir (Stoodley ve diğ., 2002, De Saravia ve De Mele).

Biyofilm yapısında bulunan hücreler arasında "Quorum Sensing" (QS) olarak bilinen hücreler arası sinyal sistemleri aracılığıyla gerçekleştirilen bir iletişim mevcuttur. QS, hücre popülasyon yoğunluğunun değişimine karşılık gen anlatımının düzenlenmesidir. QS ile haberleşen bakteriler, otoindükleyici olarak adlandırılan kimyasal sinyal molekülleri üreterek salgılamaktadırlar ve eşik değerde bulunan otoindükleyici konsantrasyonu, gen anlatımında değişmelere sebep olmaktadır. QS sistemi, hormon benzeri küçük moleküller olan otoindükleyici üretimi, salınması, fark edilmesi ve bu moleküllere karşılık verilmesini kapsamaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, fizyolojik aktivitelerin pek çoğunu düzenlemek için QS haberleşme zincirini kullanmaktadırlar. Bu süreçler simbiyoz, virulans, konjugasyon, antibiyotik üretimi, motilite, sporulasyon ve biyofilm oluşumunu kapsamaktadır (Miller ve Bassler, 2001).

Ayrıca bu mekanizma sayesinde hücreler, değişen çevresel şartlara cevaben çok hızlı bir şekilde uygun gen anlatımlarının düzenlenmesiyle gerekli fenotipe sahip olabilmektedirler. Besinin sınırlı ya da yetersiz olduğu, ozmotik stres ya da pH değişimlerinin söz konusu olduğu şartlar altında genetik olarak yapılan düzenlenmenin sonucunda bakteriler hayatta kalmayı başarabilmektedirler (Kjelleberg ve Molin, 2002). Bu sinyal yanıt sistemlerinin kullanılması, popülasyon ölçeğinde bakterilerin belirli davranışları senkronize halde sergilemesini ve sonuç olarak çok hücreli bir organizma gibi davranmasını sağlamaktadır (Waters ve Bassler, 2005). Genel olarak Gram negatif bakteriler haberleşmede otoindükleyici olarak açıl homoserin laktonu; Gram pozitif bakteriler ise oligopeptitleri kullanmaktadırlar (Miller ve Bassler, 2001).

Gram negatif bakteriler tarafından kullanılan farklı QS sinyal sistemleri bulunmakla birlikte bunların içinde en iyi karakterize edilen kimyasal madde, 70'den fazla türden izole edilen LuxR-N-açıl homoserin laktonudur (AHL). AHL'nin uzunluğu, doyumluk derecesi ve zincirdeki açıl alanının yeri değişkenlik göstermektedir. Sentezlenen AHL, difüzyon veya aktif transport ile hücre dışına çıkmakta ve pasif veya aktif olarak hücreye girmektedir. AHL'nin hücre dışı yoğunluğu belli bir eşiğe ulaştığında, sitoplazmik LuxR tip reseptöre bağlanmakta ve aktif dimerlerin oluşmasına rehberlik etmektedir. Bu kompleks, LuxS kutuları olarak bilinen özel bölgelere bağlanmakta ve biyofilm oluşumu, virulans ve ilgili süreçlerden sorumlu QS genlerinin transkripsiyonunu aktive etmektedir (Dobretsov ve diğ., 2009). AHL bileşenleri, *Vibrio* türlerinde biyoluminesans, *Agrobacterium tumefaciens*'da Ti plazmidinin konjugal transferi, *P.aeruginosa* ve diğer bazı türlerde virulans faktörlerinin üretilmesi gibi geniş aralıkta hücre fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlamaktadır (Kolari, 2003).

Gram pozitif bakteriler haberleşmede sinyaller ve membrana bağlı sensörler ile reseptör olarak histidin kinaz olmak üzere, modifiye oligopeptidler kullanmaktadırlar. Sinyal sistemine, yanıt düzenleyici olarak isimlendirilen DNA'ya bağlı transkripsiyonel düzenleme proteininin aktivitesini etkileyen bir fosforilasyon basamağı aracılık etmektedir. Bu mekanizmanın benzeri Gram negatif bakterilerin kullandığı LuxR QS sistemidir. Her Gram pozitif bakteri, diğer bakteriler tarafından kullanılan sinyalden farklı bir sinyal kullanmakta ve aynı kökenden gelen reseptörler, bu sinyallerin yapısına karşı kuvvetle hassas bir yapı sergilemektedirler. Böylece LuxR sisteminde olduğu gibi

peptidler, türler arası iletişimde kullanılmaktadırlar. Peptid sinyalleri, membranın bir tarafından diğer tarafına difüze olmadığından dolayı sinyaller, bu iş için kullanılan olipeptid taşıyıcıları aracılığıyla salınmaktadırlar (Waters ve Bassler, 2005).

QS, çeşitli durumlar aracılığıyla inhibe edilebilmektedir. QS'i inhibe eden bir inhibitör, AHL biyosenteziyle ilgili olan enoyl-ACP redüktazın inhibitörü olan triklosandır. Bu molekül, AHLs üretimini azaltarak, bakteriyal QS'i bloke edilebileceği gibi bakteriyal AHL sinyalleri pH'ın 7'nin üzerine çıkarılmasıyla da inhibe edilebilmektedir. Bu uygulama, özellikle kısa zincirli AHLs'nin yıkımına sebep olmaktadır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda uygulanan alkali pH'ın, mikrobiyal AHLs konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Bunun dışında enzimler kullanılarak da AHLs inaktive edilebilmektedir. Bazı bakterilerden elde edilen AHL laktonaz ve AHL- açılaz adı verilen iki grup AHL yıkıcı enzim tanımlanmıştır (Dobretsov ve diğ., 2009).

2.4. SU SİSTEMLERİNDE BİYOFİLM TABAKASININ ÖNEMİ

Soğutma kuleleri, geçtiğimiz yüzyıldan bu yana proses sularının sıcaklığını düşürmek için kullanılan araçlardır. Soğutma kuleleri, endüstriyel sistemlerde soğutucu özelliğe sahip kimyasal maddeler kullanmadan, sudan ısıyı uzaklaştıran araçlar olarak tanımlanmaktadır. Soğutma kulelerinin temel fonksiyonu, sirküle edilen sudan buharlaşma yoluyla ısıнын atmosfere transfer edilmesidir. Soğutma kuleleri, mikrobiyal üreme ve yayılma için eşsiz bir ortam sağlamaktadırlar. Bu araçlar, genel olarak içinde sıcaklığın 25 °C ve 35 °C arasında korunduğu oldukça büyük su rezervuarlarıdır. *L. pneumophila*'nin makrofajlar ve amip içindeki hayat devirleri birbirine benzemektedir. Sistemde bulunan mikroorganizmalar ve mikrobiyal üreme için gerekli olan besinler, sisteme alınan suyun içinde bulunabilmekte veya atmosferden gelebilmektedirler. Kule içinde kullanılan Antiscalant adı verilen kireç önleyiciler veya çinko bağlı korozyon inhibitörü gibi pek çok maddenin, kule içerisinde mikroorganizmaların üremesini hızlandıran besinler sağladığı ortaya çıkmıştır (Mc Grane, 1994, Liu ve diğ., 2009).

Soğutma kulesi içindeki mikroorganizmalar ikiye ayrılmaktadırlar. İlk grup, geçici veya aktif olarak çoğalan planktonik fazda bulunan mikroorganizmalardan oluşmaktadır.

İkinci grup ise, biyofilm yapısında bulunan mikrobiyal floradır. Soğutma kulesi içinde bulunan biyofilmin oluşumu, yüzeydeki mikroorganizmaların devamlılığını sağlamakla birlikte biyofilimde bulunan organizmalar da, soğutma kulesindeki biyokütlenin çoğunluğunu oluşturmaktadırlar. Sisteme su girişinin hemen ardından organik moleküller gruplaşarak şartlanma faktörü adı altında yüzeye tutunmaktadırlar ve bu şartlanma faktörü yüzey yükünü nötralize ederek bakterinin yüzeye tutunmasına yardımcı olmaktadır. Başlangıç aşamasında, öncü bakteri, elektrostatik etkileşimler ve fiziksel güçlerle yüzeye tutunmakta, ardından kardeş hücrelerin yapıya eklenmesi ile EPS üretilerek olgun biyofilm meydana getirilmektedir (Critcheley ve Benthams, 2007, Tanji ve diğ., 2007).

Sistem içinde meydana gelen biyofilm tabakası, endüstriyel açıdan, boruda sıvı sürtünme direncinde artmaya, hidrolik sistemin tıkanmasından dolayı enerji veriminde azalmaya, kirlenen yüzeylerden dolayı ısı transfer direncinde artmaya, biyokorozyona ve su kalitesinde düşmeye neden olmaktadır (Macdonald ve diğ., 2000, Liu ve diğ., 2009). Soğutma kulelerinde patojen mikroorganizmaların bulunması önemli toplumsal sağlık risklerini ortaya çıkarmaktadır. Soğutma kulesi içinde sıcaklığı 25-35 °C arasında olan suyun bulunması, *Legionella* türleri gibi termotolerant mikroorganizmaların üremesi için uygun bir ortam sağlamaktadır. Soğutma kulesinin *Legionella* tarafından kolonizasyonunun ardından fan ile aerosollerin üretimi, *Legionella* salgınının başlıca kaynaklarından biri olarak tanımlanmaktadır. *Legionella* taşınması temel olarak mikroorganizma içeren aerosollerin tenefüs edilmesiyle ilişkilidir. Soğutma kuleleri Lejyoner hastalığı salgınının ve ilgili hastalıkların yayılmasında önemlidir. Zira bu araçlar, ürettikleri aerosollerle bakterilerin uzak mesafelere yayılmasına neden olmaktadır (Sabria ve diğ., 2006, Liu ve diğ., 2009). *Legionella* dışında patojenik *E.coli* ve gastrik ülser gibi pek çok hastalığın nedeni olan *Helicobacter pylori* de, yapılan çalışmalarda sistemlerden izole edilen bakterilerden bazılarıdır (Boe-Hansen, 2001).

Soğutma kuleleri dışında mikroorganizmalar, sıcak su sistemleri, kullanım suyu dağıtım sistemleri ve içme suyu şebekeleri gibi pek çok endüstriyel sistemde de bulunabilmektedir. Mikrobiyolojik olarak limitler altında bakteri taşıyan su, dağıtım sistemine girdiği zaman tüketici musluğuna ulaşmadan önce bozulmaya uğrayabilmekte

ve mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen kontaminasyon, hava vanası, su terazisi, güçlendirici pompa, servis kaynakları, çapraz bağlantı noktaları gibi bölgelerde oluşabilmektedir. Dağıtım sistemlerinde en fazla bulunan mikroorganizmalar; *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Listeria*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* ve *Plesiomonas* cinsleridir. Bu organizmalardan bazıları fırsatçı patojen olarak düşünülmektedir. Dağıtım sistemlerinde meydana gelen biyofilm yapısı da, soğutma kulelerinde olduğu gibi bakterilerin hayatta kalmalarını sağlamaktadır (Scvurppp-w2k, 1997).

Sıcak su sistemlerinde, bakterilerin bulunması ile ilgili olarak bazı problemler görülmektedir. Apartmanlarda meydana gelen problemler, deri alerjisi, suda kötü koku ve ısı transfer direncinin artması gibi problemleri kapsamakta olup yapılan çalışmaların sonucunda, sıcak sularda bulunan heterotrofik bakteri sayısının, soğuk sudaki seviyeden daha fazla olduğu görülmektedir. Farklı sıcak su sistemlerindeki bakteri seviyesi ölçümlerinde HBS, 37 °C ve 65 °C arasındaki sıcaklık değerlerindeki inkübasyonda 104 KOB (koloni oluşturan birim)/mL'nin üzerinde olarak gösterilmektedir. Sıcak su sistemlerindeki HBS ve koliformların sayısı, dağıtım sisteminde suyun uzun süre sistemde kalması, sistemdeki bakteri ölümleri, korozyon ve yüksek su sıcaklığından dolayıdır (Bagh ve diğ., 2003).

Bakteriyolojik açıdan güvenli içme suyu, hem içme suyu şirketleri hem de dünya genelinde hükümetlerin ulaşmaya çalıştığı temel amaçlardan biridir. Ancak, bakteriyal, viral, parazitik mikroorganizmaların neden olduğu su kaynaklı hastalıkların meydana gelme sıklığı, tüm dünyada hala ekonomik bir yük olmanın yanında sosyal bir sorumluluktur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre sanitasyon ve hijyenden dolayı, güvenli olmayan sulardan kaynaklanan hastalıklar nedeniyle her yıl tüm dünya genelinde 1.7 milyon kişi hayatının kaybetmektedir. İşlenmiş sulardaki mikroorganizmaların hayatta kalabilmesinin, boru materyali ile suyun kesişim noktalarında meydana gelen biyofilmle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Simones ve diğ., 2006). Dahası, içme suyundaki mikroorganizmaların hayatta kalabilmeleri ve üremelerini teşvik eden biyofilmlerde su kaynaklı patojen mikroorganizmaların birikmesi, içme suyu dağıtım sistemi uygulamaları ve toplum sağlığı için ana sorundur. Sistem içine mikroorganizmalar, çatlaklar, sızıntılar ve etkili olmayan uygulamalar

aracılığıyla girmektedirler. Su ve yüzey arasına ve boru duvarına tutunan mikroorganizmalar *Escherichia coli*, *Bacillus atrophaeus*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Cryptosporidium* ve çeşitli virüsler olarak belirtilmektedir (Paris ve diğ., 2008).

2.5. MODEL SİSTEMLER

İçme suyu ve endüstriyel su dağıtım sistemlerinin kapsamlı ve kompleks olmasından dolayı, biyofilmin üreme ve sayısal değerlerine ulaşmak için laboratuvar ölçekli model sistemler geliştirilmişlerdir. Çok fazla değişken ve algoritmaları kapsayan bu modeller, biyofilm hücreleri ve sucul çevreleri arasında bulunan etkileşimlere simülasyon yapmaktadırlar. Bu sistemlerin pek çoğu, yüzeyden toplanan hücrelerin ölçümü ile uygun besiyerleri veya direk mikroskopik sayım teknikleri kullanarak, biyofilm yapısını, oran veya büyüklüğünü hesaplamaya dayanmaktadır. Bu modeller kolay ve güvenli bir şekilde belirlenemeyen parametrelerin güvenli bir şekilde anlaşılmasına yol göstermektedirler (Butterfield ve diğ., 2002, Donlan ve diğ., 2004).

Bir çalışmada kullanılan model sistemin güvenilir olması için gerçeği mümkün olan en iyi derecede yansıtabilir olması gerekmektedir. Üzerinde çalışılan model sistemler statik ya da dinamik olabilir. Bir beher ya da Petri kutusundan bile oluşabilen statik sistemler, dinamik olanlara göre daha temel yaklaşımları izlemek için tercih edilmektedirler. Basit, hızlı ve fazla tekrar imkanı açısından avantajlı olsalar da bu sistemler, dinamik parametrelerin incelenmesinde yetersiz kalmaktadırlar. Bu nedenle dinamik sistemlerin deneysel kullanımı daha yaygındır (Lawrence ve diğ., 2002, Rayner ve Lappin-Scott, 2002). Dinamik sistemler, karmaşık çevresel koşullara adapte edilebilen reaktörleri kapsamaktadırlar. Bu amaçla; içine cam kuponlar yerleştirilerek biyofilm oluşumu sağlanan halka şeklinde reaktörler, sistem içindeki suyun belli bir kısmı sirküle edilirken bir kısmının sistemden sürekli olarak dışarı akıtıldığı boru sistemleri, buharlaşma ile kaybedilen suyun eklendiği suyun sirküle edildiği soğutma kulesi sistemleri dinamik sistemler olarak kullanılmaktadırlar (Man ve Franca, 1998, Ndiongue ve diğ., 2004, Türetgen, 2004, Liu ve diğ., 2006, Liu ve diğ., 2009).

Model sistemlerden yararlanılarak sıcaklık ve yüzey kompozisyonu gibi fiziksel etmenlerin, pH, madde yoğunluğu, çözünmüş oksijen miktarı gibi kimyasal etmenlerin

ve mikroorganizmaların tipi, mikroorganizma konsantrasyonu gibi biyolojik etmenlerin biyofilm oluşumu üzerine olan etkisi araştırılabilmektedir. Yine bu sistemler sayesinde, biyofilmin kalınlığı ve yapısı direkt olarak saptanabilirken, farklı yöntemler kullanılarak biyofilmin hidrodinamiği, içeriği ve içerisinde bulunan mikroorganizma miktarı da tespit edilebilmektedir (Rayner ve Lappin-Scott, 2002). İyi bir model sistemde mikrobiyal aktiviteyi etkileyen eylemsel ve çevresel parametreler ideal olarak kontrol edilebilmeli veya en azından izlenebilmelidir. Pratikte, en azından parametrelerin geniş bir aralığı gibi durumların kontrol edilebilmesi/izlenmesi mümkün olmalıdır. Su ve biyofilm örnekleri sistemden kolayca alınabilmeli, sistemin sıcaklığı ayarlanabilmeli, farklı biyofilm örnekleri elde edilebilmeli, hidrolik şartları belirli ve kontrol edilebilir olmalı, havalandırma oksijen yoğunluğunu arttırabileceğinden dolayı hava ve sıvı etkileşimi en az olmalı, sistemin çalışması güvenilir olmalı ve kapalı bir sistem olmalıdır (Boe-Hansen ve diğ., 2003).

2.6. ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL ŞARTLARIN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ

2.6.1. Sıcaklık

Yaşayan bütün canlı mikroorganizmalar çevresel değişimlere adapte olmak zorundadırlar. Çevresel streslere karşı adaptasyon organizmaların, soğuk şoku, sıcaklık şoku, asit şoku, basınç ve ozmotik stres gibi mikroorganizmalar için öldürücü olan dramatik değişimler karşısında hayatta kalabilmeleri için gereklidir (Ulus ve Tezcan, 2001). Her mikroorganizma türünün sıcaklığa cevabı kardinal sıcaklık değerleri tarafından karakterize edilmektedir. Kardinal değerler, üreme için sıcaklığın en yüksek ve en düşük limitleridir. Üreme için en uygun sıcaklık bu iki değer arasında yer almakta olup sıcaklık yükselmeleri, anahtar hücre bileşenlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Meydana gelen bozulma, eski haline gelebilme oranını aşmış ise bunun sonucunda hücre fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelmektedir. Düşük sıcaklıkta ise, özellikle zar aracılığıyla besinlerini aktif taşıma ile taşıyan bakteriyal hücreler daha sert bir hale gelmektedirler. Düşük sıcaklık besinlerin aktif taşınmasını azaltmakla beraber zar, düşük sıcaklık şartları altında daha az geçirgen hale gelmektedir. Sıcaklığa adaptasyonun bazı dereceleri, zar gibi anahtar yapıların veya hücresel işlemleri koruyan

sıcaklık şoku proteinlerinin üretilmesi gibi modifikasyonlar ile mümkün olabilmektedir (Nedwell, 1999, Boivin ve diğ., 2005).

2.6.1.1. Hücre zarının düşük sıcaklığa adapte olması

Yapılan pek çok çalışmada, zar yapısı veya kompozisyonunun, sıcaklığa cevap olarak nasıl değiştiği, farklı sıcaklık rejimlerinin tür içi veya türler arası adaptasyonu araştırılmıştır. Mikroorganizmalar (psikrofil ve psikrotolereant), düşük sıcaklıktaki çevrelere adapte olabilmektedirler. Zardaki doymamış yağ oranının artması ve dallanmış yağ zinciri oranının değişmesiyle türler orta (mezofil) ve yüksek derecedeki sıcaklıklara (termofil) adapte olabilmektedirler. Zar lipidlerinin değişimindeki benzer eğilimler, tek tür içinde sıcaklık aralığının dışında, üreme meydana geldiği zaman gözlemlenmektedir. Buna ilaveten, soğuk şoku proteinleri de, düşük sıcaklıkla mücadele edildiği durumlarda üretilmektedir. Bazen de sıcaklığa cevap olarak hücre zarı modifikasyonu ile ilişkili olan desaturaz gibi enzimler üretilir. Hücre zarları, normal şartlar altında akışkan fazda olup, fosfolipitlerin ve proteinlerin koloidal solüsyonlarıdır ve sadece bu akışkan fazda biyolojik olarak işlevseldirler. Sıcaklık düşmesi gibi durumlarda, zarlar akışkanlığın azalmasıyla birlikte gittikçe artarak yapışkan hale gelmekte ve bazı sıcaklıklarda biyolojik fonksiyonlarını kaybederek jel fazına geçmektedirler (Nedwell, 1999).

Zarın lipid kompozisyonunda meydana gelen değişimler, düşen çevresel sıcaklığa cevap olarak meydana gelmektedir. Bu durumda, biyolojik olarak fonksiyonel olan akışkan fazda, düşük sıcaklık koşulları altında dahi, hücre zarının devamlılığı sağlanır ve söz konusu olan bu değişimler homeoviskoz adaptasyon olarak adlandırılmaktadır. Doymamış lipidler, eşdeğer doymuş lipidlerden daha düşük erime sıcaklığına sahipken, dallanmış lipidler aynı derecede yüksek erime sıcaklığına sahiptirler. Zar yapısı değişirken, sıcaklık düşüşüne karşı zardaki doymamış yağ oranı artmakta ve bu sayede düşük sıcaklıkta fonksiyonel olan akışkan yapıda zarın devamlılığı sağlanmaktadır. Buna karşın, termofillerin zarında bulunan yüksek orandaki doymuş ve dallanmış lipidler, sıcaklıkla faz değişirken artmakta ve yüksek sıcaklık değerlerinde kararlılık sağlanmaktadır. Fakat zarın sertleştiği ve üreme için oldukça yüksek sıcaklık değerlerinin söz konusu olduğu şartlar altında hücre, biyolojik olarak fonksiyonunu kaybetmektedir. Zar içine gömülü halde bulunan solunum ve taşınma gibi anahtar proteinleri kapsayan proteinler, sadece zar akışkan fazda iken fonksiyoneldirler ve katı

faza geçişte aktivitelerini durdurmaktadırlar (Nedwell, 1999). Ekstrem sıcaklık koşulları ile mücadelede, zar kompozisyonunun ve fonksiyonun etkisine ek olarak, soğuk şoku proteinleri de önemli yer tutmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bazı bakterilerde düşük sıcaklıkta teşvik edilen bir grup protein, kimyasal olarak tanımlanmışlardır. Bu proteinler, CIP (soğukla teşvik edilen proteinler) veya CSP (soğuk şoku proteinleri) olarak adlandırılmakla birlikte düşük sıcaklıkta hücrelerin canlılıklarını muhafaza etmelerini sağlamaktadırlar (Ulus ve Tezcan, 2001).

2.7.2. pH

Bakteriyel reme üzerine düşük pH'ın zararlı etkileri daha önceden yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmış olmakla birlikte mekanizmanın içeriği tam olarak anlaşılamamıştır. Durumu açıklamak için geliştirilen ve kemiozmotik teori olarak adlandırılan teoriye göre, düşük pH'da üremenin engellenmesi, proton gradienti meydana getirme amacıyla, hücre zarının bir tarafından diğer tarafına taşınan protonların yetersiz enerjisinden kaynaklanmaktadır. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; zarlar, protonlar için geçirgen olamayabilir, üremenin kısmi olarak engellenmesi, zar potansiyelinin devamlılığı için gerekli olan enerjinin tasarrufundan kaynaklanmaktadır. Genel olarak nötre yakın olan hücre içi pH, bakterinin devamlılığını sağlamaktadır. Buna karşın hücre içi pH, hücrenin asidik ortamın hükmü altına girmesiyle epeyce azalabilmektedir. Bazı enzimler pH'a karşı belirgin şekilde hassas olmaları nedeniyle de, düşük pH'daki üreme engellenmeleri, hücresel bileşenlerdeki H^+ iyonlarının direkt etkisi tarafından meydana gelebilmektedir. Bununla birlikte benzer direk etkiler, zorunlu olarak üreme verimliliğinde azalmaya da sebebiyet vermeyebilirler (Russell ve Dombrowski, 1980).

Pek çok bakteri türünün metabolizması ve üremesi bakterinin içinde bulunduğu çevrenin pH'ından etkilenmektedir. Bu nedenle, dağıtım sistemlerinde bulunan suda meydana gelen pH değişimleri, bazı mikroorganizmaların kontrolü için etkili bir mekanizma olabilmektedir. Bakteri remelerinden dolayı meydana gelen biyofilmler, pH'daki küçük değişimlerden serbest halde bulunan mikroorganizmalara kıyasla daha az etkilenmektedirler. Ortam pH'ının biyofilm üzerine etkisinin araştırıldığı benzer bir çalışmada, dağıtım sistemlerindeki suyun pH'ının azaltılmasıyla birlikte, biyofilm yoğunluğunda anlamlı bir azalmaya neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma

sonuçları, düşük pH uygulamalarının, dağıtım sisteminin yüzeyindeki biyofilmi ortadan kaldırmada etkili bir yol olduğunu ileri sürmektedir (Tosun ve Aktuğ, 2005).

E.coli ile yapılan benzer çalışmalarda da, sabit fazdaki bakterilerin logaritmik fazdaki bakterilere göre, aside karşı oldukça dirençli olduğu gösterilmektedir. Sitoplazmanın tamponlama kapasitesi, düşük proton geçirgenliği ve protonların zara bağlı olarak proton pompası tarafından dışarı pompalanması, asit direnç mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Bu sistemler normalde, protein sentez inhibitörlerinin bulunduğu durumlarda fonksiyoneldirler. Ekstrem asidik stres ajanlarından korunmak için alternatif bir mekanizma ise pH homeostasi sistemi ATR (acid tolerance response) dir. *E. coli* üzerinde yapılan benzer bir çalışmada oksidatif veya fermentatif mekanizmaya bağlı olarak, glutamat dekarboksilaz, arginin dekarboksilaz ve asitle teşvik edilen oksidatif sistem olarak adlandırılan, farklı asit direnç sistemleri ortaya çıkarılmıştır (Lin ve diğ.,1996).

Foster ve Hall (1990) tarafından, *S. typhimurium* üzerinde yapılmış olan benzer bir çalışmada da, bu bakterinin pH 3-4 gibi asidik pH'da hayatta kalabilme yeteneğine sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu ve benzeri asit direnç mekanizmalarının sonucunda üretimi gerçekleştirilen proteinlerin, hücreleri asit zararlarından koruduğu ve iyileştirilmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Hücrelerin asit stresine maruz bırakıldığı şartlar altında üretilen asit şoku proteinlerinin üretilmesinin sonucunu olarak, *E. coli*'nin pH 4.5'de 2 saat içinde asit toleransında maksimum artış gösterdiği ortaya çıkmıştır. Heyde ve Portalier (1990) tarafından asit şoku proteinleri ile ilgili benzer bir çalışmada, pH 6.9'dan pH 4.3'e düşüş sonucunda, en az 16 tane polipeptit üretiminin teşvik edildiği bulunmuştur. Aside karşı adaptasyona rağmen, aside adapte olmuş veya asit şokuna uğramış hücreler, pH 2.5'i tolere edememektedirler. Asit toleransından sorumlu sistemlerin optimum, pH 3'te etkili oldukları, pH 2.5'te etkilerini kaybettikleri ortaya çıkmıştır (Tosun ve Aktuğ, 2005).

2.6.3. Ozmotik şok

Biyofilmin mikroorganizmaları koruduğu diğer bir önemli stres faktörü ise ozmotik şoktur. Biyofilm organizasyonu çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı bakteri direncinin artmasını sağlamakla birlikte, biyofilm içinde üremenin, çevresel streslerden hücreyi

koruyan genel stres direncini teşvik ettiği görülmektedir. Mikroorganizmalar, ozmo-koruyucular gibi uygun çözünen maddelerin hücre içi akümüasyonu aracılığıyla hiperozmotik şok ile baş edebilmektedirler. Hiperozmotik şok ile mücadelenin başrol oyuncusu, mikroorganizmaların ozmotoleransını oldukça arttıran, çevresel ortamdan akümüle olmuş uygun koruyuculardır. Glisin betain çeşitli bakteriler tarafından kullanılan en etkili ozmo-koruyucudur (Fare's, 2007).

Ozmotik şok ile karşılaşan hücrelerin gösterdiği direnç ile ilgili olarak yapılan benzer bir çalışmada, 0.5 M tuz çözeltisi ile 24 saat inkübasyona bırakılmış örneklerde biyofilm miktarının 2-3 kat azaldığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmada stres yokluğunda, biyofilm çapı 12 mm iken, hiperozmotik şok uygulaması sonucunda çapın %50 oranında azaldığı ortaya çıkmıştır. Hücrelerin ozmotik şoka maruz bırakıldığı koşullarda ortama dışarıdan ilave edilen ve bir ozmo-koruyucu olan glisin betain'in, biyofilm yapısını kısmen yenilediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Normal şartlarda 12 mm olan biyofilm kalınlığı, ozmotik şok ile 6 mm'ye kadar düşürülmüştür. Bu muamelenin ardından Glisin betain'nin ortama eklenmesi ile yapılan ozmotik şok çalışmasının sonucunda ise çapta 10 mm'ye kadar artış olduğu gözlenmiştir (Fare's, 2007).

Yapılan diğer benzer bir çalışmanın sonucunda ise, ozmotik şok meydana geldiği zaman biyofilm yapısının değiştiği fakat tamamen inhibe olmadığı görülmüştür. Biyofilm gelişiminin yüksek tuzluluğa rağmen daha yavaş olmakla birlikte, hala devam ettiği tahmin edilmektedir. Ozmotik şok uygulaması esnasında uygun fizyolojik faz olan eksponansiyal fazdan alınan hücrelerin, yüksek tuzluluğa karşı daha iyi bir dirençle cevap verdikleri ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmada ozmo-koruyucuların, yüksek ozmotik şok uygulamalarında iyi bir koruyucu etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Benzer çalışmalar göstermektedir, yüksek ozmo-koruyucu yoğunluğu, hücreleri tuzluluk veya diğer yıkıcı ajanların engelleyici etkisinden korumada önemli rol oynamaktadır (Fare's, 2007).

Hiperozmotik strese cevapta hücre hassasiyeti yüksek oranda üreme fazına bağlıdır. Maksimum duyarlılık eksponansiyal fazda görülürken, durağan fazda duyarlılık en az seviyeye düşmektedir. Hiperozmotik şokun hücrelerin metabolik aktivitelerinin

yavaşlatılmasına neden olmasından dolayı bu evrede mikroorganizmalar, enerji yükünü daha hızlı olarak parçalamakta ve besin taşıma kapasitesini azaltmaktadırlar (Troussellier ve diğ., 1998). Eisenstark ve diğ., (1996) tarafından daha önceden yapılan benzer çalışmalar, *E. coli* gibi bakterilerin olumsuz koşullarda direnç mekanizması geliştirebildiklerini ortaya koymuştur. Bakteri genetiği üzerine yapılmış çalışmalar da bu bakterilerin besin azlığı, hiperozmotik veya asidik stres gibi farklı çevresel stres şartlarında anti-stres cevap üretebildikleri gözlenmiştir. *E. coli*'de bu anti-stres cevap, *RpoS* geni tarafından kodlanan sigma faktörü aracılığıyla gerçekleşmektedir. Munro ve diğ., (1995) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, söz konusu *RpoS* geninin koruyucu etkisi, durağan fazdaki *E. coli* ve *Salmonella typhimurium* hücrelerinde gösterilmiştir. Yapılan tüm bu sonuçlarda ortaya çıkan ortak sonuç, 'bu geni taşıyan mikroorganizmalar, hiperozmotik şoka daha hassastırlar ve bu gen ozmotik şoktan korunmadan sorumludur' şeklindedir. Benzer bir başka çalışmaya göre, ozmotik stres şartları altında ozmo-koruyucu olan glisin betain'in taşınması için kodlanan *RpoP* ve *RpoU* ozmoregülasyon genlerinin anlatımı teşvik edilmekte ve bu teşvik ozmolaritenin artmasıyla gerçekleşmektedir (Troussellier ve diğ., 1998).

2.6.4. Dezenfeksiyon

Biyofilm yapısında bulunan ekzopolimer matriks içine gömülü halde bulunan hücreler, antimikrobiyal ajanlardan söz konusu matriks aracılığıyla kısmen korunmaktadırlar. Matriks tarafından sağlanan fiziksel direncin dışında, bu hücreler gerekli besin ve oksijene ulaşma imkanları az olduğundan dolayı, büyük olasılıkla daha düşük metabolik aktivite göstermektedirler. Biyofilm hücreleri açlıkta veya uyku fazında olduğunda diğer hücrelerden daha küçüktürler. Bu spesifik çevrenin sonucunda hücreler madde transportunu azaltmakla birlikte hücre fenotipinde, enzimatik aktivitesinde, duvar kompozisyonunda ve yüzey yapısında önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Dahası, bu hücre değişkenlikleri biyosit, antibiyotik ve antikor hedeflerini değiştirmektedir. Bu değişim sonucunda dezenfekte edici ajanların, bakteride bulunan hedeflere ulaşması kontrol edilmektedir. Bu nedenle biyofilm yapısında bulunan hücreler, süspanse halde bulunan planktonik hücrelere kıyasla çoğu antimikrobiyal ajana karşı oldukça dirençlidirler (Cochran ve diğ., 2000, Donlan ve diğ., 2003, Codony ve diğ., 2005, Sardeau ve diğ., 2006).

Biyofilm yapısında bulunan bakterilerin, sürfaktan, biyosit ve antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç kısaca 3 mekanizma ile mümkün olmaktadır.

- 1- Biyofilm yapısında bulunan bazı hücreler besin sıkıntısını yaşamalarının ardından yavaş üreme veya açlık durumuna geçerler. Yavaş üreyen veya hiç üremeyen bu hücreler, pek çok antimikrobiyal ajan karşısında daha dirençli hale geçmektedirler.
- 2- Biyofilm'in kuru ağırlığının %90'ından fazlasını meydana getiren polimer-eksopolisakkarit üretimi, pek çok ajanın biyofilmin dip kısımlarına kadar ulaşmasını engellemektedir.
- 3- Biyofilimde bulunan bazı hücreler farklı ve koruyucu biyofilm fenotipi üstlenmektedirler. Bu fenotip, yüzeyde biyolojik olarak programlanmış üreme yanıtıdır. Yüzeyde bulunan hücreler, bazı dezenfektanların etkinliğini azaltabilirler veya anyonik ve hidrofobik yapıda olan içeriklere karşı daha alt kısımda bulunan hücreler için koruyucu bir bariyer olarak iş görebilmektedirler. Söz konusu bu direnç mekanizmasında, bazı dezenfektanlara karşı dirençte, yüzeyde bulunan bakterilerin dezenfektan ile temas etmesiyle dezenfektanı etkisiz hale getirmesinin yanında, bu işlevi gerçekleştiremeyen hücreler, dezenfektanla karşılaşmaları sonucunda ölürek bir katman meydana getirirler ve bu katman sayede dezenfektanın daha alt kısımda bulunan hücrelerle teması engellenmektedir (Donlan ve diğ., 2002, Szymanska, 2003).

Biyofilmle mücadelede kullanılan farklı yapıdaki dezenfektanlarda biri de monokloramindir. Monokloramin, 1916 yılından beri içme suyu dezenfeksiyonunda kullanılan, amonyak ve serbest klorun sudaki reaksiyonu sonucu meydana gelen bir dezenfektan türüdür. Dezenfeksiyon aktivitesi serbest yaygın olarak kullanılan klorla oranla daha yavaştır ve bu sebeple de başlangıç dezenfektanı olarak daha az kullanılmaktadır. Diğer taraftan monokloramin, yüksek sıcaklık ve pH'da değişimin meydana geldiği koşullarda bile klordan daha kararlı bir yapıda olması sebebiyle sistemde uzun süreli olarak kalabilmektedir. Bunun sonucunda da rezidual dezenfektan olarak kullanılmakta ve dağıtım sisteminin uzun süreli olarak dezenfekte edilmesini sağlamaktadır. Monokloraminin diğer önemli bir özelliği ise, serbest klordan daha kolay olarak biyofilm içine girebilmesi ve böylece biyofilmle mücadelede daha olumlu sonuçlar vermesidir (Kool ve diğ., 1999). Türetgen (2004) tarafından yapılan monokloraminin soğutma kulesindeki biyofilm üzerine etkinliğinin incelendiği

çalışmada 1.5 ppm monokloraminin 180 d muamelesi sonucunda HBS bakteri sayısında 3 log azalma gözlenmiştir. Yapılan çalışmada klorun monokloramine oranla biyofilm bakterileri üzerinde daha az etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca çalışmada elde edilen diğer bir sonuç ise monokloraminin bakteriyal üremeyi etkili olarak kontrol etmede hem laboratuvar hem de gerçek sistemlerde kullanılabileceğidir (Türetgen, 2004). Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA), dezenfektanlar ve dezenfeksiyon yan ürünleri ile ilişkili olarak, kanserin de dahil olduğu pek çok sağlık problemini azaltmaya yönelik olarak hazırladığı yönetmelikte, pek çok arıtım tesisinde kalıntı dezenfektan olarak serbest klorun yerine monokloramin kullanılmasını önermektedir. Bu önerinin sebebi olarak da, monokloramin kullanımının, trihalometan ve haloasetik asit gibi sağlık açısından ciddi tehditler oluşturan yan ürünlerin oluşumunu minimuma indirmesidir (Kool ve diğ., 1999).

Biyofilmin her açıdan iyi tanınması, biyofilmlerle mücadelede üzerinde durulması gereken önemli bir konudur. Bu konuda Jacangelo ve Olivieri (1985) tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda monokloraminin, nükleik asit, triptofan ve sülfür içeren amino asitlerle reaksiyona girdiklerini gösterilmekle beraber, riboz gibi şekerlere etkili olmadığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışma sonucu da, aynı şekilde monokloraminin ekstrasellüler polisakkaritlerle reaksiyona girmediğini gösterilmektedir. Serbest klorun ise geniş çeşitlilikteki bileşenlerle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Bu farklılıklar, monokloraminin biyofilm yapısında bulunan şeker ve amino asitlerle reaksiyona girmediğini ve bunun sonucunda da etkinliği kaybetmeden biyofilm içine girebildiğini ve mikroorganizmalarla reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirdiği sonucuna ulaşılmaktadır. Fakat serbest klorun ise, biyofilme tamamen girmeden önce yapıda bulunan çeşitli bileşenlerle girdiği reaksiyona sonucunda tükendiği ve bunun sonucu olarak da, biyofilm bakterileri üzerinde etkinliğinin kısıtlı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir (Lechevallier, 1988).

Model sistemde meydana getirilen *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine serbest klor ve monokloraminin etkisini incelemek için yapılan çalışmada, biyofilm inaktivasyonunda, 4 ppm monokloraminin, 10.8 ppm serbest klordan daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışma sonucunda biyofilmdeki toplam ve kültüre edilebilen hücre yoğunluğunun, monokloraminin yapıda uzun süreli olarak aktivitesini korumasına

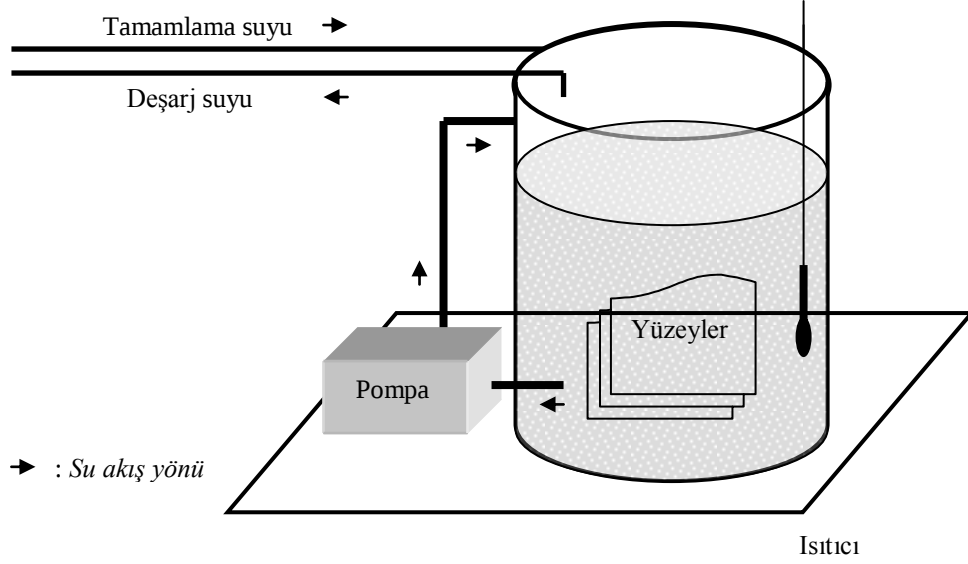
paralel olarak, rezidual konsantrasyonunun artmasıyla beraber azaldığı ortaya çıkmıştır. Biyofilmdeki bakteri seviyesindeki değişim, rezidual monokloraminin önemli ölçüde yüksek olmasından etkilenmektedir. Yapılan çalışma sonucunda, biyofilmdeki HBS konsantrasyonunun rezidual monokloramin arttıkça kademeli olarak azaldığı görülmüştür (Park ve Kim, 2008).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. SU SİRKÜLASYON TANKI VE İŞLETİM KOŞULLARI

Deneyde 100 cm yüksekliğinde, 45 cm çapında 100 litre hacimli PE100'den (yüksek yoğunluklu polietilen) imal edilmiş kapalı devre su sirkülasyon sistemi kullanılmıştır. Deney tankına su sirkülasyonu sağlayacak pompa eklenmiş (550 W, 40 l/d) ve su sıcaklığını 32°C'de sabit tutacak bir ısıtıcı yerleştirilerek sistem, 6 aylık deney süresince kesintisiz olarak çalıştırılmıştır. Deneyde, biyofilm oluşturulacak yüzey olarak, 2 mm kalınlığında 18 cm² (9x2) alana sahip mikroskop lamaları kullanılmıştır. Kuponların sistem içinde herhangi bir yüzeye ve birbirlerine değmeden sabit bir şekilde durabilmeleri için kupon tutucular kullanılmıştır. Kuponlar su tankına konmadan önce deterjanla çeşme suyunda yıkanmış, distile su ile durulandıktan sonra sterilizasyon amacıyla %70'lik etanole daldırıldıktan sonra alevden geçirilmek suretiyle steril edilmiştir. Aynı yöntemle steril edilen kupon tutucular ile birlikte cam kuponlar sisteme yerleştirildikten sonra 100 l şebeke suyuna deneysel olarak Mac Farland 4'e göre ayarlanmış *L. pneumophila* Serogrup 1 suşu (ATCC 33152) eklenmiştir. Su sisteminde 'blowdown' olarak adlandırılan, sirkülasyon ve deşarj ile sistemdeki suyun azalmasına bağlı olarak, kontaminantların sistemde birikmesi sürecini önlemek amacıyla, azalan su miktarı çeşme suyu ile tamamlanmıştır. 'Make-up' olarak bilinen bu işlem sayesinde buharlaşma veya blowdown ile uzaklaşan suyun, sistemdeki suda bulunan toplam çözünmüş madde (TÇM) miktarını artırması önlenmektedir. Zira engellenmediği takdirde bu artış, suyun pH değerinin, konsantrasyonunun ve elektrolitik özelliğinin yükselmesine yol açar ki, bu istenmeyen bir durumdur (Gleeson ve Gray, 1997). Sisteme, buharlaşan suyun yerini tamamlamak amacıyla eklenen şebeke suyu ile sisteminde bulunan partikül, erimiş mineral ve bakterilerin kontrolsüz olarak artışı önlenmiştir. Su sirkülasyon sistemi çalıştırıldıktan sonraki 6 aylık deney süresi boyunca, birer aylık aralıklarla sudan çıkarılan toplam 22 adet kupondan 2 tanesi kontrol amacıyla kullanılarak herhangi bir parametreye maruz bırakılmamakla birlikte diğer 20 adet kupon ise her bir parametre için 2 adet olmak üzere, çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelere maruz bırakılmıştır. Parametrelerle muamalenin ardından kuponların yüzeylerine tutunmuş biyofilm örneklerindeki aktif olarak solunum yapan bakteriler, toplam bakteri sayıları, aerobik heterotrofik bakteri sayıları ve *L. pneumophila* sayıları

kaydedilmiştir. Ayrıca aylık olarak yüzeylerdeki karbonhidrat miktarları, pH, çözünmüş oksijen, toplam çözünmüş madde ve sıcaklık değerleri ölçülmüştür. Su sıcaklığı ölçümleri sabit sıcaklığın kontrolü amacıyla yapılmıştır.



Şekil 3.1: Model su sirkülasyon sisteminin şematik diyagramı

3.2. BAKTERİYOLOJİK ANALİZ

Biyofilm örneklerinin bakteriyolojik açıdan incelenmesi amacıyla 6 aylık süre ile aylık olarak sistemden çıkarılan her bir kupondan, steril eküvyonlar kullanılarak toplanan örnekler, içinde 20 ml fosfat tamponu (PBS) bulunan steril poşetler içine alınarak stomacher cihazı (UIL Instruments, 200 vuruş/d) ile 90 s süre boyunca homojenize edilmiştir. Her analiz için 2 farklı cam kupondan alınan sürüntüden 3 tekrarlı ekimler yapılmıştır. Aerobik heterotrofik bakterilerin üretimi ve sayısının tespit edilmesi amacıyla selektif olmayan R2A agar besiyerine biyofilm süspansiyonlarından hazırlanan sulandırım serilerinden (direk ekimden 10^{-2} 'ye kadar) 100 µl ekim yapılmış ve 27 °C' de 10 gün inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmıştır.

Toplanan biyofilm yapısında bulunan *L. pneumophila* sayısının belirlenmesi için, fosfat tamponu ile hazırlanan direkt süspansiyondan alınan 100 µl örnek BCYE (buffer chorcoal yeast extract) agara yayma metoduyla ekilmiş ve 37 °C de 14 günlük inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayılmıştır.

3.3. PARAMETRELERİN UYGULANMASI

Parametrelerin uygulanması amacıyla aylık olarak sistem içinden 22 adet kupon çıkarılmıştır.

3.3.1. pH Uygulaması

Kuponlardan her ay 6 tanesi farklı pH değerleri karşısında aerobik heterotrofik bakteriler ve *L. pneumophila* sayısında değişimleri gözlemek amacıyla 3 farklı pH değerine maruz bırakılmıştır. İşlemden pH 3, 5 ve 11 olmak üzere 3 farklı değer kullanılmıştır. Deneyde istenen pH değerine getirilerek steril edilen fosfat tamponları kullanılmıştır. Hazırlanan pH çözeltileri, steril şalelere aseptik şartlarda konulmuştur. Ardından her bir pH çözeltisinin içine sistemden çıkarılan iki adet cam kupon koyularak oda sıcaklığında 24 saat süreyle beklenmiştir. Sürenin sonunda çıkarılan her iki kupondan steril eküvyonlar kullanılarak toplanan örnekler içinde 20 ml fosfat tamponu (PBS) bulunan steril poşetler içine alınarak stomacher cihazı ile 90 s süre boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen biyofilm süspansiyonlarından 10^{-2} 'ye kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır.

3.3.2. Sıcaklık Uygulaması

HB ve *L. pneumophila*'nın farklı sıcaklık değerlerindeki sayısal değişimini gözlemlemek amacıyla 4 °C ve 60 °C'lik sıcaklıklar kullanılmıştır. Steril şalelerden ilkinde model sistem içinde sirküle olan su ile beraber iki adet kupon yerleştirilmiş ve 24 saatlik bekleme süresi için 4 °C'ye konmuştur. Diğer şaleye ise aynı şekilde sirkülasyon suyu ile birlikte iki adet kupon yerleştirilerek 60 °C'lik su banyosunda iki saat beklenmiştir. Sürenin sonunda her iki kupondan steril eküvyonlar kullanılarak toplanan örnekler içinde 20 ml fosfat tamponu (PBS) bulunan steril poşetler içine alınarak stomacher cihazı ile 90 s süre boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen biyofilm süspansiyonlarından 10^{-2} 'ye kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır.

3.3.3. Ozmotik Şok Uygulaması

Farklı ozmotik konsantrasyon değerlerinin HB ve *L. pneumophila* sayısında neden olduğu değişimleri gözlemek amacıyla 3M tuz çözeltisi ve saf suyu temsilen filtre edilmiş steril bidistile su kullanılmıştır. Steril sıvıların şalelere eklenmesinin ardından kuponlar yerleştirilerek oda sıcaklığında 24 saat süre ile beklenmiştir. Sürenin sonunda

iki farklı konsantrasyona sahip sıvı içinden alınan her iki kupondan steril eküvyonlar kullanılarak toplanan örnekler içinde 20 ml fosfat tamponu (PBS) bulunan steril poşetler içine alınarak stomacher cihazı ile 90 s süre boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen biyofilm süspansiyonlarından 10^{-2} 'ye kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır.

3.3.4. Dezenfektan Uygulaması

Şok dezenfeksiyon amacıyla 500 ve 1000 ppm 'lik monokloramin çözeltisi ile su sistemlerinin dezenfeksiyonu için uygun olarak kabul edilen 2 ppm'lik monokloraminin aerobik heterotrofik bakteriler ve *L. pneumophila* üzerine etkinliğini görmek amacıyla hazırlanan monokloramin çözeltileri şalelerde kuponlarla bir araya getirilmiş ve oda sıcaklığında 24 saat süreyle beklenmiştir. İşlemin ardından monokloramin çözeltileri şalelerden uzaklaştırılmış ve dezenfektanın nötralizasyonu amacıyla ortama % 0.5 sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenerek 20 d süre ile beklenmiştir.

Sürenin sonunda her bir şaleden çıkarılan her iki kupondan steril eküvyonlar kullanılarak toplanan örnekler içinde 20 ml fosfat tamponu (PBS) bulunan steril poşetler içine alınarak stomacher cihazı ile 90 s süre boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen biyofilm süspansiyonlarından 10^{-2} 'ye kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır.

3.4. EPS ELDESİ VE ÖLÇÜMÜ

3.4.1. EPS eldesi

Biyofilmden EPS eldesi için her ay sistemden 2 adet cam kupon alınmıştır. EPS eldesi 4 basamakta gerçekleştirilmiştir (Zhang ve diğ., 1999).

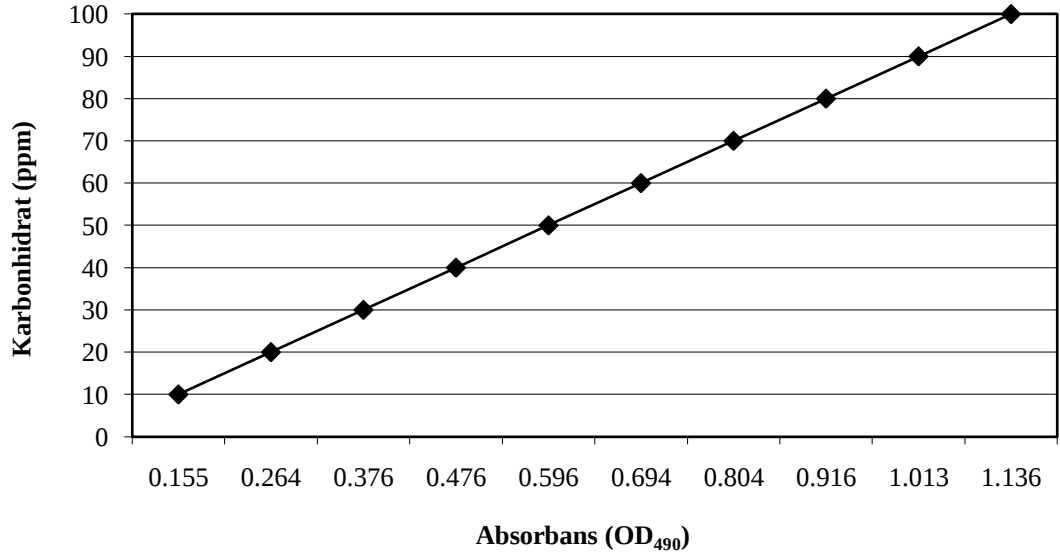
1. Yıkama : Cam kupon yüzeyinde oluşan biyofilm steril eküvyon yardımı ile toplanmış ve 10 ml steril distile su içeren santrifüj tüplerinde 60 s süre ile vortekslenerek süspanse edilmiştir. Biyofilm süspansiyonu 6000 devir/dakika'da 10 d santrifüj edilmiş ve üst sıvı fazı başka bir steril santrifüj tüpüne aktararak saklanmıştır.
2. Ayırma: Yıkama işleminden arda kalan biyofilm peleti üzerine 10 ml % 8.5 NaCl ve % 0.22 formaldehit içeren çözeltilerden konulmuş ve 1 dk süre ile vortekslenmiştir. Karıştırma işleminden sonra 1. ve 2. basamaktaki örnekler birleştirilmiştir.

3. Ekstraksiyon: Birleştirilmiş örnek 11227 devir/dk'da 30 d süre ile santrifüj edilmiştir.
4. Filtrasyon ve toplama: Santrifüj sonunda üst sıvı fazı 0.22 µm por çaplı steril membran filtreden geçirilerek steril edilmiş ve karbonhidrat tayini için kullanılmıştır.

3.4.2. EPS ölçümü

Biyofilmdeki toplam karbonhidrat miktarının tayini fenol-sülfürik asit yöntemine göre yapılmıştır. Fenol sülfürik asit metodu, çok küçük düzeydeki şekerlerin ve ilişkili maddelerin miktarını tanımlayan bir metottur. Oligosakkarit ve polisakkaritler gibi serbest veya kısmen serbest metil grubu içeren şekerler, fenol ve konsantre sülfürik asit içeren çözelti ile muamele edildiğinde sarı portakal rengi renk vermektedirler. Gerçekleşen bu reaksiyon çok hassastır ve reaksiyon sonucu oluşan renkler kararlardır (Dubois ve diğ., 1956).

Ölçüm işleminden önce, deney tüplerine 1 ml örnek konularak üzerlerine örnekte bulunan polisakkaritleri monomerlerine ayırmak amacıyla 1 ml % 5'lik fenol solüsyonundan eklenmiş ve hemen ardından 5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilerek 10 d süre ile bekletilerek sarı-portakal rengi halinde renk değişimi gözlenmiştir. Süre sonunda tüpler vortekslenerek karıştırılmış ve 25–30 °C'lik su banyosunda 10–20 dk soğumaya bırakılmıştır. Bu aşamalarda kullanılan tüp ve cam pipetler karbonhidrattan arındırılmak amacı ile kullanım öncesi 24 saat süre ile %10'luk HCl içinde bekletilmiştir. Deney sonucunda oluşan renk spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV 150–02) 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Karbonhidrat miktarı, spektrofotometredeki ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerinin standart glikoz çözeltilerinden hazırlanmış eğriye ait denklemde yerine konmasıyla hesaplanmıştır. Ölçümler dört tekrarlı yapılmıştır. Standart eğri elde etmek için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm/ml'lik glikoz çözeltileri hazırlanarak metot uygulanmış ve grafik çizilmiştir.



Şekil 3.2: Fenol- sülfürik asit yönteminde karbonhidrat miktarı ölçümü için hazırlanan standart eğri. Standart eğriyi hazırlamak için karbonhidrat olarak glikoz kullanılmıştır

3.5. EPİFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME

Redüklenmiş CTC boyası, çevresel örneklerdeki aktif olarak solunum yapan bakterilerin epifloresan mikroskopta sayılmasını sağlamaktadır. Okside CTC boyası renksizdir ve floresan ışığa yapacak özellikte değildir. Bileşik kolayca elektron transport sisteminde redüklenerek floresan ışığa yapacak hale gelmekte ve çözülmeyen CTC bileşiği hücre içinde birirmektedir. Böylece CTC boyası içeren hücreler, epifloresan mikroskopu ile polikarbonat membran filtre yüzeyinde görünür hale gelmektedir. CTC ile boyama işleminin ardından mikroskopta gözüken kırmızı renkli sinyaller aktif solunum yapan hücreleri, canlı olmayan partiküller ve arka taraftaki diğer bileşiklerden kolayca ayırmaktadır. CTC kullanımı, solunum gibi metabolik olarak aktif olan mikrobik canlıların keşfedilmesi ve sayılmasını kolaylaştırmaktadır (Rodriguez ve diğ., 1992). CTC uygulanmış örneklerde DNA'ya özgü DAPI boyasının da eklenmesiyle, benzer preparatlarda aktif ve toplam bakteri alt populasyonları sayılabilir. Hücrelerin CTC'yi takiben DAPI ile boyanmalarının ardından 0.2 mm por çaplı filtreden geçirilmesi ile hem toplam hemde canlı bakteri sayımı yapılabilmektedir (Trouessellier ve diğ., 1998).

Çalışmada, aktif olarak solunum yapan bakterilerin tespit etmek üzere 100 µl CTC boyası ile 20 ml fosfat tamponu ile hazırlanan süspansiyondan alınan 900 ml biyofilm homojenatı steril koşullarda karıştırılmış ve 28 °C’de 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda karışıma 110 µl DAPI boyası eklenerek 28 °C’de 1 saat beklenmiştir. Bekleme işleminin ardından örnek üzerine reaksiyonu durdurmak ve homojenizasyonu sağlamak amacı ile filtreden geçirilerek steril edilmiş 3 ml bidistile su eklenip karıştırılmış ve örnek 0.2 mm por çaplı siyah polikarbonat filtreden geçirilmiştir. Filtre havada kurutulmuş ve işlemin ardından lam üzerine yerleştirilerek üzerine immersiyon yağı eklenmiştir. Yağın koyulmasının ardından 100’lük objektifte inceleme yapılmıştır (Trouessellier ve diğ., 1998).

Polikarbonat membran filtre epifloresan mikroskopta incelenip 10 farklı alandan fotoğraflar çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan alınan kırmızı (CTC) ve mavi (DAPI) renkli sinyaller sayılarak ortalamaları alınmıştır. Daha sonra toplam yüzeye ulaşmak amacıyla ortalamalar katsayılarla çarpılarak santimetrekaredeki mikroorganizma sayısı tespit edilmiştir.

3.6. BAKTERİYOLOJİK ANALİZ

Biyofilm süspansiyonlarından hazırlanan sulandırım serilerinden aerobik heterotrofik bakteri ve *L. pneumophila* sayımı bölüm 3.2.’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7. EPİFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME

Farklı etkenlere maruz bırakılan biyofilm örneklerindeki canlı ve toplam bakteri sayısının tespiti bölüm 3.5.’te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8. ÇÖZÜNMÜŞ OKSİJEN ÖLÇÜMÜ

Su sirkülasyonunun sürekli olarak gerçekleştiği model sistemdeki çözünmüş oksijen miktarı oksimetre cihazı (WTW - Oxi 330) ile ölçülmüştür. Cihaz her kullanımdan önce distile su kullanılarak kalibre edilmiştir. Sistemdeki çözünmüş oksijenin ölçümü aylık periyotlar halinde gerçekleştirilmiştir.

3.9. TOPLAM ÇÖZÜNMÜŞ MADDE MİKTARI ÖLÇÜMÜ

Sirkülasyon sistemlerinde su saf olarak buharlaşırken, mineraller gibi çözünmeyen bileşikler su haznesinde çözünmüş olarak artmaya başlarlar. Çalışma sırasında aylık olarak kondüktivitemetre cihazının (WTW LF 95 Conductivity Meter) ölçtüğü spesifik iletkenlik ile su içerisindeki toplam çözünmüş madde (TÇM) analizi yapılmıştır. Alınan sonuçlar μS (mikroSiemens) biriminden ppm (part per million) birimine çevrilmiştir. Ölçüm yapılmadan önce cihaz distile su ile kalibre edilmiştir. Soğutma kuleleri için yapılması gereken deşarj rejimi, konsantrasyon oranı hesabı ile belirlenir. Sistemden deşarj olan suyun kalitesi ve kaybolan suyun yerini tamamlamak için eklenen suyun kalitesi arasındaki ilişki ‘konsantrasyon oran’ı veya ‘konsantrasyon devri’ olarak tanımlanmaktadır. Deşarj suyunun TÇM değerinin şebeke suyu TÇM değerine oranı tank suyunun konsantrasyon oranını vermektedir. En etkili kullanım, konsantrasyon oranı artıp sistemden uzaklaşan su oranı azaldığında gerçekleşmektedir (Gleeson ve Gray, 1997).

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Farklı parametrelere maruz bırakılan örneklerdeki HBS, toplam ve canlı bakteri sayıları açısından farklar olup olmadığı istatistiksel olarak analiz edilmiştir. 6 aylık deney süresi kapsamında parametreler açısından mikroorganizma sayılarının farklılaşıp farklılaşmadığı, toplanan örneklerin parametrelere maruz bırakılmalarının ardından elde edilen bakteri sayılarının ortalamaları baz alınarak, tek yönlü varyans analiziyle incelenmiştir. Tek yönlü varyans analizi sonucunda ortalamaların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durumda hangi parametrelere ait ortalamaların anlamlı farklar gösterdiğini saptamak için Post-Hoc (çoklu karşılaştırma) analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan Post-Hoc analiziyle hangi parametrelerin birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı **Least Significant Difference (LSD)** testi ile incelenmiştir.

Her bir parametre için ayrı olmak üzere, aylar ile deney ve kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarının farklılaşıp farklılaşmadığı iki yönlü varyans analiziyle incelenmiştir. Devamında gerçekleştirilen Post-Hoc analiziyle de hangi ayların birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı LSD testi aracılığıyla incelenmiştir.

Yukarıda sözü edilen analizler, klasik kültür metodu sonucunda elde edilen HBS ve epifloresan tekniği kullanılarak elde edilen fotoğraflar sonuçları için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

L. pneumophila sonuçları örnek sayısının istatistiksel analiz için az ($n < 12$) olması nedeniyle analiz uygulanmamış olup elde edilen verilerin ortalamaları karşılaştırılmıştır.

3.11. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.11.1. R2A agar

Aerobik heterotrofik canlı bakteri sayısının tespiti için kullanılan besiyerinin bileşimi;

Maya özütü	0.5 g
Tripton	0.25 g
Pepton	0.75 g
Glikoz	0.5 g
Nişasta	0.5 g
Dipotasyum fosfat	0.3 g
Magnezyum sülfat	0.024 g
Sodyum piruvat	0.3 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

121 °C’de 25 dk. steril edilir.

3.11.2. Charcoal yeast extract (CYE) agar

Legionellaceae familyasında bulunan bakterilerin izolasyonu için kullanılan besiyerinin bileşimi;

Aktif kömür	2.0 g
Maya özütü	10.0 g
Agar	13.0 g
Distile su	1000 ml

121 °C’de 25 dk. steril edilir. 45-50°C’ ye soğutulmasının ardından BCYE besiyeri katkı maddesi ilave edilmiştir.

3.11.3. BCYE besiyeri katkısı

Legionellaceae familyasında bulunan bakterilerin üremesini sağlayan bu katkı maddesi 500 ml besiyeri için kullanılmıştır.

ACES tampon/Potasyum hidroksit	5.0 g
Ferrik pirofosfat	0.125 g
L-sistein HCL	0.20 g
α- ketoglutarat	0.50 g
Distile su	50 ml

3.11.4. Fosfat tamponu (PBS)

Sulandırım sırasında hücreler için izotonik ortam sağlaması amacıyla kullanılan solusyonun bileşimi;

Sodyum klorür	8.0 g
Potasyum klorür	0.2 g
Disodyum hidrojen fosfat	1.15 g
Potasyum dihidrojen fosfat	0.2 g
Distile su	1000 ml
pH	7.4

121 °C’de 15 dakika steril edilir.

3.11.5. NaCl-Formaldehit çözeltisi

Sodyum klorür	8.5 g
Formaldehit	0.22 ml
Distile su	100 ml

3.11.6. Fenol çözeltisi

EPS yapısında bulunan polisakkaritleri, monomerlerine ayırmak için kullanılmıştır.

Fenol	10 ml
Distile su	90 ml

3.11.7. 5-Cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)

Aktif olarak solunum yapan hücrelerin epifloresan mikroskopta görünerek sayılabilmesi için kullanılmaktadır.

50 mM stok solusyon için 50 mg tüpe 3209 µl filtre edilmiş bidistile su eklenerek 100 µl hacimlerde Eppendorf tüplerine paylaştırılarak -20°C’de saklanmıştır.

3.11.8. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)

DNA’ya bağlanma özelliğinde olan bu boya ile toplam hücre sayısının epifloresan mikroskopta tespit edilmesi sağlanmıştır.

1 mg/ml stok solusyon için 50 mg DAPI, 50 ml filtre edilmiş bidistile su içinde çözülmüş ve işlemin ardından filtre edilmiş bidistile su ile 50 kat sulandırarak 20 mg/l’lik çalışma süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen bu süspansiyon Eppendorf tüplerine bölünerek -20 °C’de saklanmıştır.

3.11.9. pH parametrelerinin hazırlanışı

Çalışmada kullanılacak pH 3, 5 ve 11’lik süspansiyonlar için 3.12.4. no’lu başlıkta belirtildiği gibi fosfat tamponu hazırlanmıştır. İşlemin ardından hazırlanan 1 ve 5M’lık KOH ve HCl çözeltilerinin eklenmesiyle uygun pH değerleri elde edilmiştir.

3.11.9.1. 1M KOH çözeltisi

KOH	56.1 g
Distile su	1000 ml

3.11.9.2. 5M KOH çözeltisi

KOH	280.55 g
Distile su	1000 ml

3.11.9.3. 1M HCl çözeltisi

HCl	36.46 g
Distile su	1000 ml

3.11.9.4. 5M HCl çözeltisi

HCl	182.3 g
Distile su	1000 ml

3.11.10. 3M Tuz çözeltisi

NaCl	175.2 g
Distile su	1000 ml

3.11.11. Monokloramin çözeltisi

3.11.11.1. 2 ppm monokloramin çözeltisi

Amonyum klorür	0.004g
Sodyum karbonat	0.0016 g
%6'lık NaOCl	0.016 ml
Distile su	200 ml

3.11.11.2. 500 ppm monokloramin çözeltisi

Amonyum klorür	0.5g
Sodyum karbonat	0.416 g
%6'lık NaOCl	4.0 ml
Distile su	200 ml

3.11.11.3. 1000 ppm monokloramin çözeltisi

Amonyum klorür	1.0g
Sodyum karbonat	0.832 g
%6'lık NaOCl	8.0 ml
Distile su	200 ml

3.11.12. %6'lık NaOCl (çamaşır suyu) çözeltisi

Çamaşır suyu	6 ml
Distile su	94 ml

3.11.13. %0.5'lik Sodyum tiyosülfat çözeltisi

Monokloramin nötralizasyonu için kullanılmıştır.

Sodyum tiyosülfat	2.5 g
Distile su	500 ml

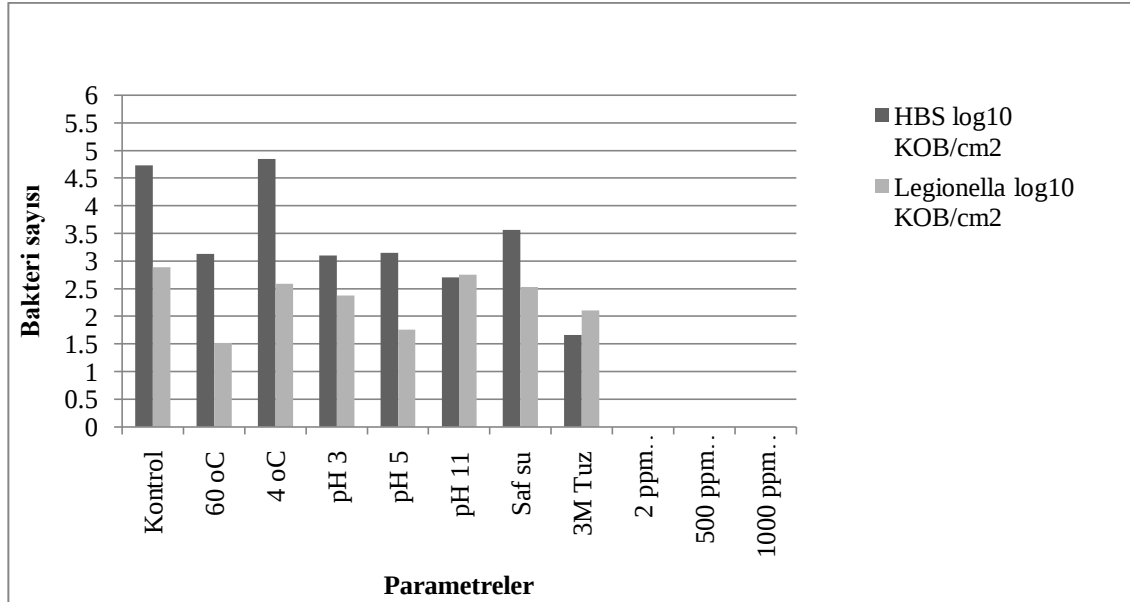
4. BULGULAR

4.1. AYLAR

Altı aylık deney süresinde, sistemden aylık olarak alınan kuponların, farklı parametrelerle 24 saat süreyle muamele edilmesi sonucunda ay bazında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

4.1.1. 1. Ay

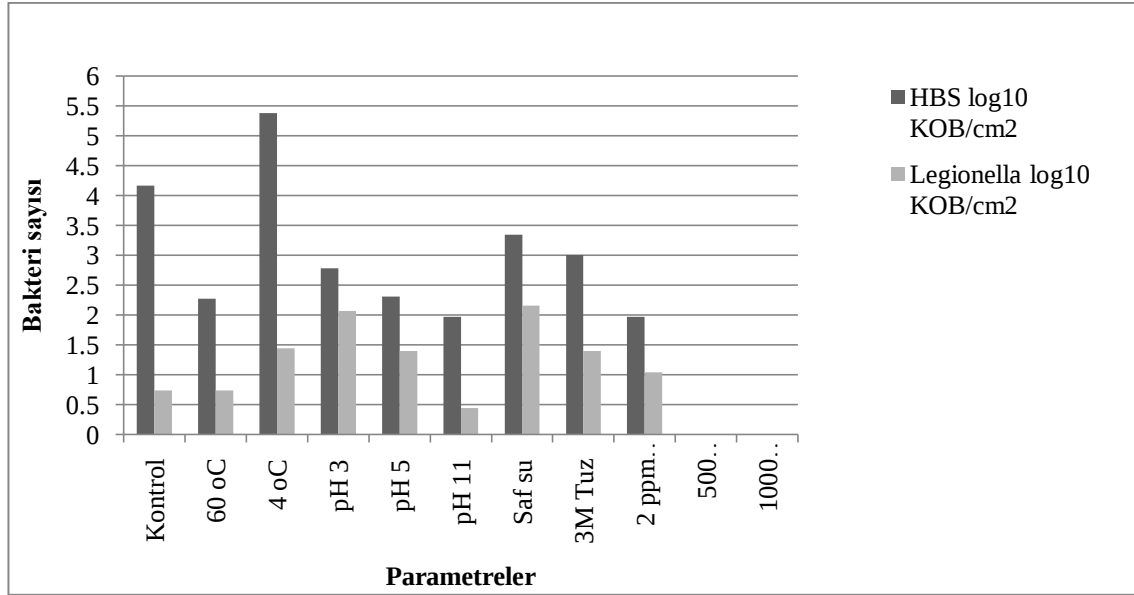
Birinci ayın sonunda kontrole kıyasla HBS’da, en belirgin azalma 4.73’ten 1.66’ya düşüşle 3M tuz çözeltisi ile muamele sonucunda elde edilirken; 4 °C ile muamelenin, HBS’da artışa neden olduğu gözlenmiştir. HBS üzerinde, saf su ile muamelenin, üremede artışa neden olan 4 °C’nin dışında, diğer parametrelere kıyasla etkisinin, en az olduğu gözlenmiştir. *L. pneumophila* sayısı açısından ise, en belirgin azalma 2.9’ dan 1.5’e düşüşle 60 °C ile muamele sonucunda gerçekleşmiş olup; 4 °C ile muamele sonucunda ise kontrole kıyasla en düşük oranda azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlarla beraber 2 ppm monokloraminle muameleden sonuç elde edilememekle birlikte; 500 ppm ve 1000 ppm’lik monokloramin uygulamalarının sonucunda HBS ve *L. pneumophila*’da üreme meydana gelmemiştir. 3M tuz ile muamele sonucunda ise hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında kontrole kıyasla önemli ölçüde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: 1.ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve *L. pneumophila* sayıları. **KOB**: Koloni oluşturan birim (Colony Forming Unit), **HBS**: Heterotrofik bakteri sayısı (Heterotrophic Plate Count)

4.1.2. 2. Ay

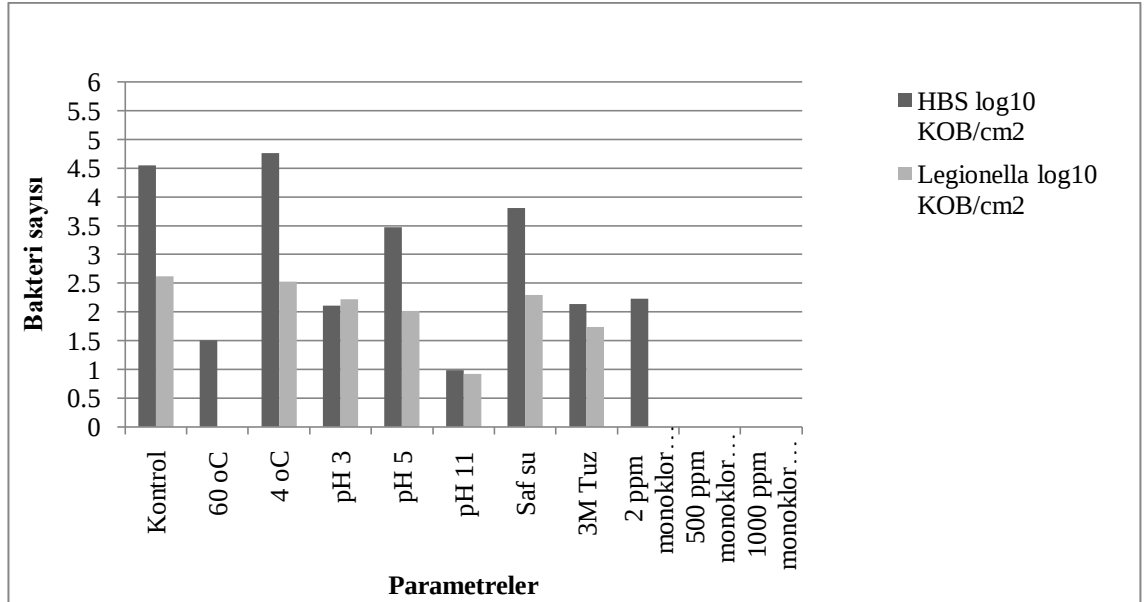
Çalışmanın 2. ayında kontrol ekimlerinde hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında 1. aya kıyasla azalma meydana gelmişken yüzeydeki karbonhidrat miktarında, 1. aya kıyasla artış meydana gelmiştir. İkinci ayın sonunda kontrole kıyasla HBS’da, en belirgin azalma pH 11 ve 2 ppm monokloramin ile muamele sonucunda elde edilmiştir. Birinci ayda olduğu gibi ikinci ayda da 4 °C ile muamele, kontrole kıyasla bakteri sayısında artışa neden olmuştur. Diğer parametrelere kıyasla HBS üzerinde en az etkili olan parametrenin ise saf su olduğu gözlenmiştir. *L. pneumophila* sayısı açısından ise en belirgin azalma, 0.74’ten 0.44’e düşüşle pH 11 ile muamele sonucunda gerçekleşirken; saf su ile muamele sonucunda ise kontrole kıyasla en düşük oranda azalma meydana gelmiştir. İkinci ayda da 500 ve 1000 ppm monokloraminle muamele sonucunda HBS ve *L. pneumophila*’da üreme gözlenmemiştir (Şekil4.2).



Şekil 4.2: 2.ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve *L. pneumophila* sayıları

4.1.3. 3. Ay

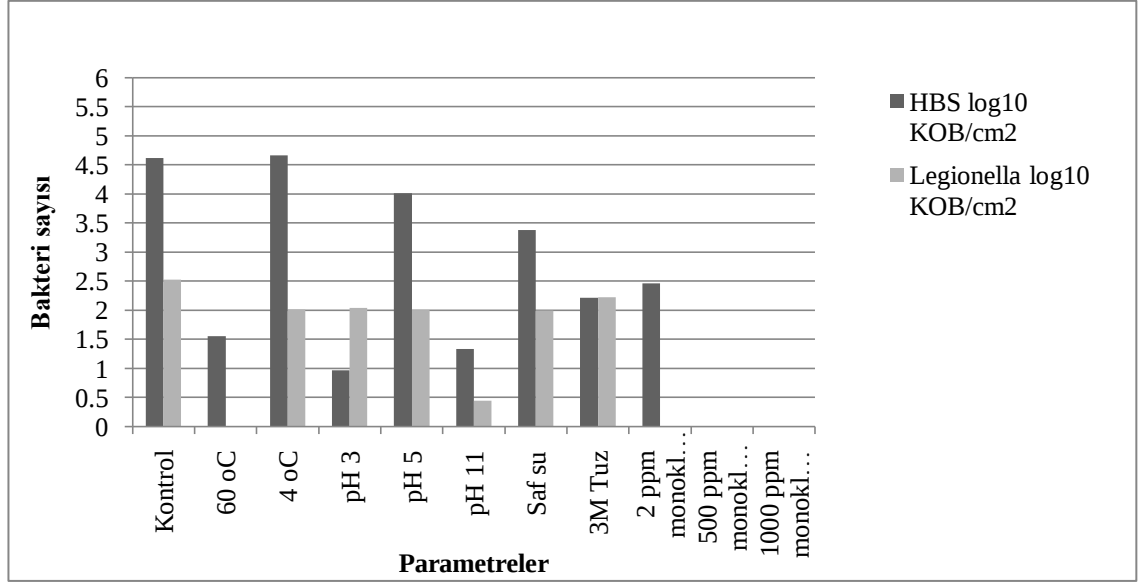
Üçüncü ayın sonunda, hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında, herhangi bir parametreye maruz bırakılmadan gerçekleştirilen kontrol ekimleri sonucunda 2. aya kıyasla artış gözlenmiştir. Bunun yanı sıra yüzeyden alınan biyofilm örneklerindeki karbonhidrat miktarında da, bakteri sayıları ile doğru orantılı olarak, 2. aya kıyasla artış gözlenmiştir. Üçüncü ayda da 4 °C ile muamele sonucunda HBS’da artış olurken, *L. pneumophila* sayısında çok düşük bir oranda azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda HBS ve *L. pneumophila* sayıları açısından en etkili azalma pH 11 ile muamele sonucunda elde edilmiştir. HPS’da, saf su ve pH 5 ile muamele sonucunda diğer parametrelere oranla daha az oranda azalma meydana gelmiştir. pH 11’in ardından HBS’ndaki en belirgin azalma 60 °C ile muamele sonucunda gözlenmiştir. *L. pneumophila* açısından bakıldığında ise HBS’da olduğu gibi 500 ve 1000 ppm’lik muamele sonucunda üremeye rastlanmazken, bunların dışında 2 ppm monokloramin ve 60 °C ile muamele sonucunda da üreme gözlenmemiştir. Bunlarla beraber saf su, pH 5 ve pH 3’ün *L. pneumophila* üremesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: 3.ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve *L. pneumophila* sayıları

4.1.4. 4. Ay

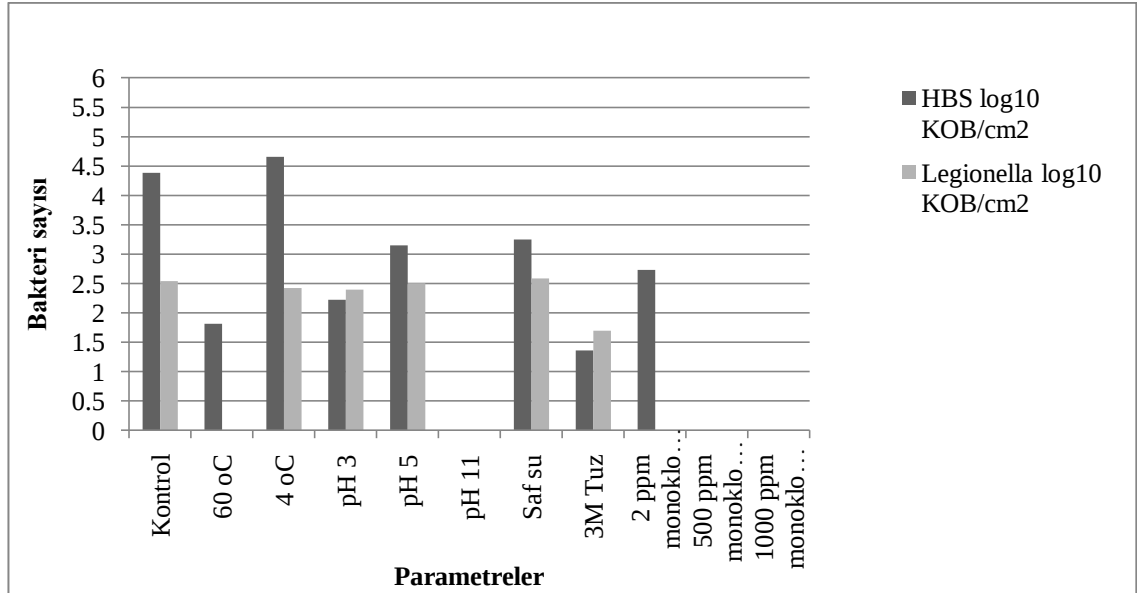
Çalışmanın 4. ayında, 3. aya kıyasla HBS’nda artış gözlenirken, *L. pneumophila* sayısında ufak bir oranda azalma meydana gelmiştir. Yüzeydeki karbonhidrat miktarı ise 4. ayda artış göstermiştir. Dördüncü ayda HBS açısından en etkili parametrenin, 4.62’den 0.96’ya düşüşle pH 3 olduğu gözlenmiştir. Üremeyi azaltma açısından pH 3’ü, pH 11 ve 60 °C izlemiş olup 500 ve 1000 ppm’lik monokloraminle muamele sonucunda üreme gözlenmemiştir. Diğer aylarda olduğu gibi bu ayda da HBS üzerinde saf su ve pH 5, diğer parametrelere kıyasla etkisi en az olan parametreler olarak belirlenmiştir. *L. pneumophila* sayısında ise 60 °C, 2 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm’lik monokloraminle muamele sonucunda üreme gözlenmezken, diğer aylarda olduğu gibi pH 11’in 2.53’den 0.44’e olan düşüş ile üremeyi azaltmada oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. HBS’nda olduğu gibi *L. pneumophila* sayısı üzerinde de en etkisiz parametrelerin saf su ve pH 5 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4. 4).



Şekil 4.4: 4.ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve *L. pneumophila* sayıları

4.1.5. 5. Ay

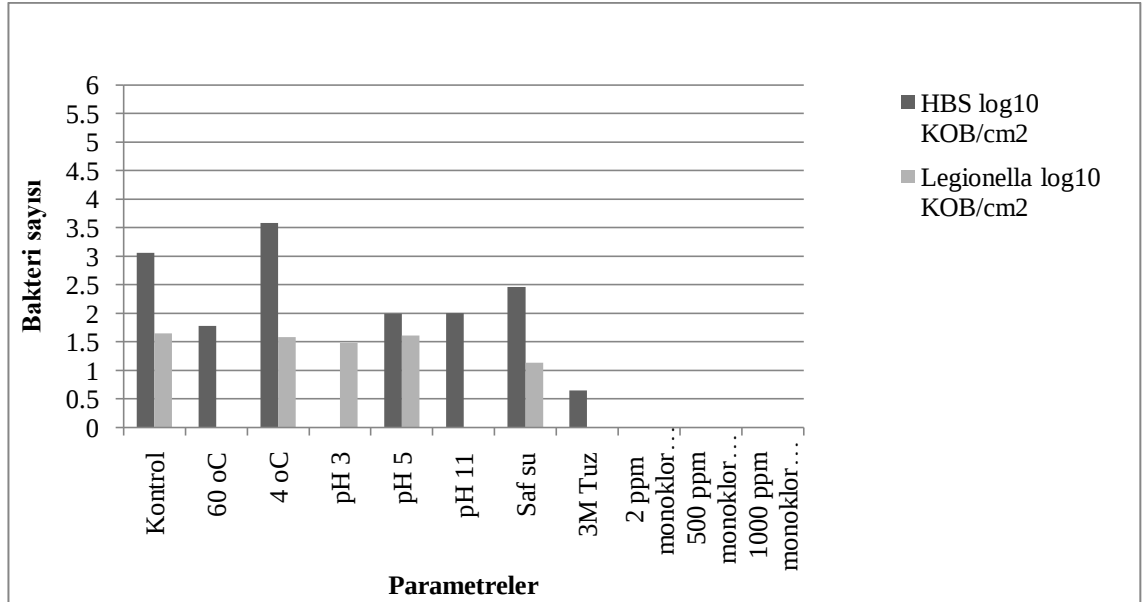
Beşinci ayın sonunda HBS’nda azalma gözlenirken, *L. pneumophila* sayısında ufak bir artış gözlenmiştir. Beşinci ayın sonunda gerçekleştirilen karbonhidrat ölçümleri sonucunda da, 4 ay boyunca artış gösteren karbonhidrat miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. Beşinci ayın sonunda pH 11 ile muamele edilen biyofilm örneklerinde HBS ve *L. pneumophila* üremediği tespit edilmiştir. 60 °C ve 2 ppm monokloraminle muamelenin HPC sayısında azalmaya neden olmakla beraber *L. pneumophila* de üreme gözlenmemiştir. İlk 4 ayda olduğu gibi 4 °C ile muamele, bu ayda da HBS’nda ufak bir artışa neden olmuştur. *L. pneumophila* sayısı açısından ise 3. ve 4. aylarda olduğu gibi 5. ayda da, kontrole kıyasla çok düşük bir oranda azalma meydana gelmiştir. HBS açısından üremenin gözlenmediği pH 11, 500 ve 1000 ppm monokloraminin dışında, 60 °C ve 3M tuz çözeltisinin de üremeyi önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. 3M tuz çözeltisi ile muamelenin ise diğer aylarda olduğu gibi hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısı üzerinde önemli bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. İlk 4 ayda olduğu gibi bu ayda da hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısı üzerinde en az etkiye sahip olan parametrelerin saf su ve pH 5 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4. 5).



Şekil 4.5: 5.ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve *L. pneumophila* sayıları

4.1.6. 6. Ay

Çalışmanın son ayı olan 6.ayda, hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısı üzerinde önemli bir azalma meydana gelmiştir. Bununla paralel olarak yüzeydeki karbonhidrat miktarı da önemli ölçüde azalmıştır. Diğer aylarda olduğu gibi 4 °C ile muamele sonucu bu ayda da kontrole kıyasla hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında artış meydana geldiği gözlenmiştir. Altıncı ayın sonunda her 3 doz monokloraminle muamele sonucunda da, gerek HBS gerekse *L. pneumophila*'da üreme gözlenmemiştir. pH 3 ile muamele de, HBS de üreme gözlenmemekle beraber, 3M tuz ve 60 °C ile muamele sonucunda da üremenin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. *L. pneumophila* de, monokloramin uygulamaları dışında 60 °C, pH 11 ve 3M tuz çözeltisi ile muamele sonucunda da üreme gözlenmezken, pH 3 ve pH 5'in üreme üzerine etkisinin diğer parametrelere kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 6).



Şekil 4.6: 6.ayın sonunda tüm parametrelerle muamele sonucunda biyofilm örneklerindeki HBS ve *L. pneumophila* sayıları

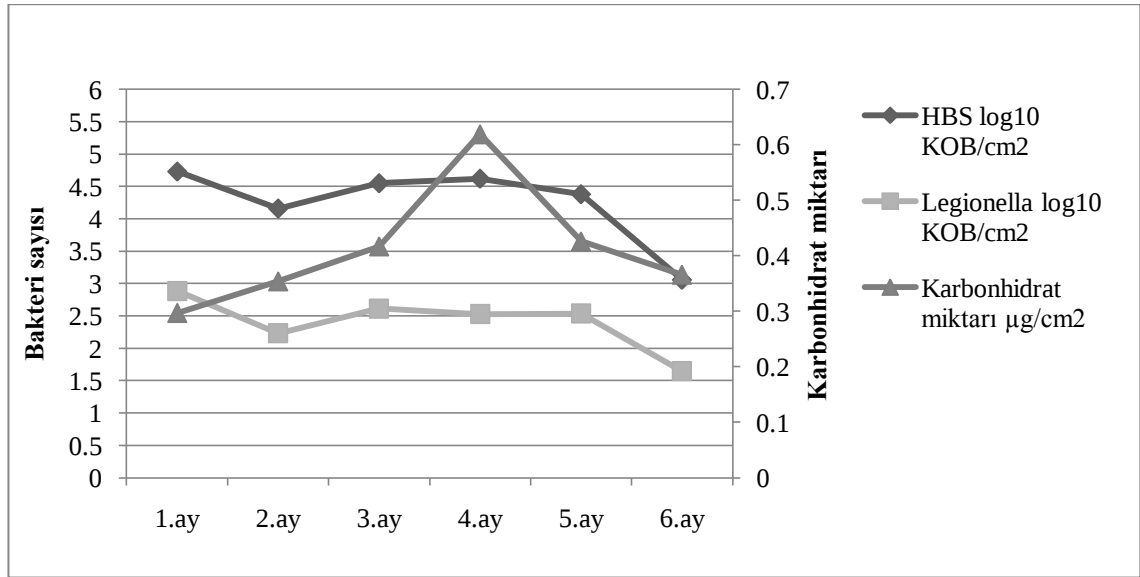
4.2. PARAMETRELER

Altı aylık deney süresinde, sistemden aylık olarak alınan kuponların, farklı parametrelerle 24 saat süreyle muamele edilmesi sonucunda parametre bazında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

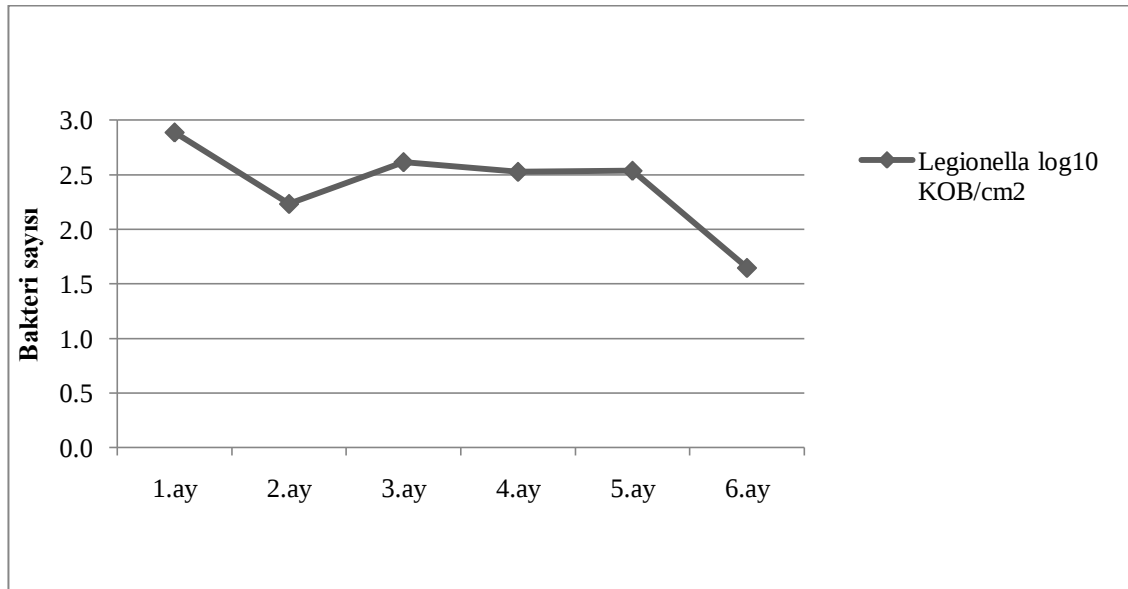
4.2.1. Kontrol

Altı aylık deney süresi boyunca herhangi bir parametreye maruz bırakılmadan gerçekleştirilen kontrol ekimlerinde, yüzeydeki karbonhidrat miktarı birinci aydan başlayarak yükselmiş ve 4. ayda 0.619'luk değer ile en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra 5. ve 6. aylarda düşüş meydana geldiği gözlenmiştir. Bunu karşın HBS ve *L. pneumophila* sayısında 2. ayda düşüş gözlenmiştir. Üçüncü ayda ise karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında artış tespit edilmiştir. 4. ayın sonunda HBS karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak artarken, *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. Beşinci ayın sonunda da, 4. ayda olduğu gibi yine HBS karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak azalırken *L. pneumophila* sayısında ufak bir artış gözlenmiştir. Altıncı ayın sonunda ise her üç değer de birbiriyle uyumlu olarak azalma gözlenmiştir. Kontrol ekiminde, HBS 4.73; *L. pneumophila* ise 2.89 değeri ile 1. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS 3.06; *L.*

pneumophila ise 1.95 değeri ile 6. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4. 7, Şekil 4.8).



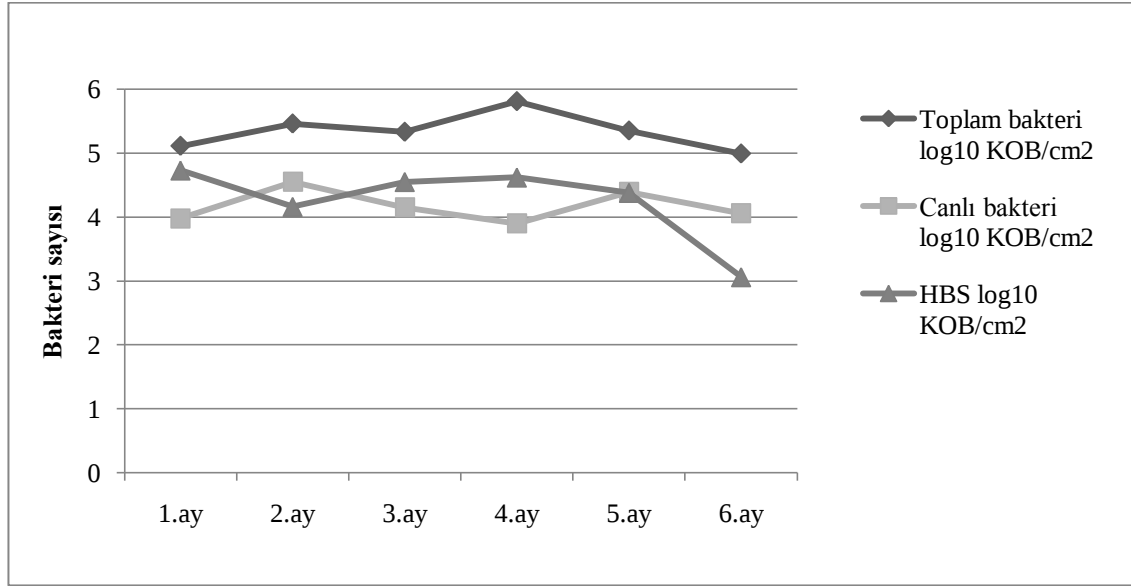
Şekil 4.7: Kontrol örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.8: Kontrol örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı.

Epifloresan mikroskopi tekniği aracılığıyla, toplam hücre sayısını anlamak için kullanılan DAPI ve canlı bakteri sayısını tespit etmek amacıyla kullanılan CTC boyası ile muamele sonucunda, 2. ayda, 1. aya kıyasla artan karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak toplam ve canlı bakteri sayısında da artış gözlenmiş olup, HBS'nda ise azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise toplam ve canlı bakteri sayısında artış meydana

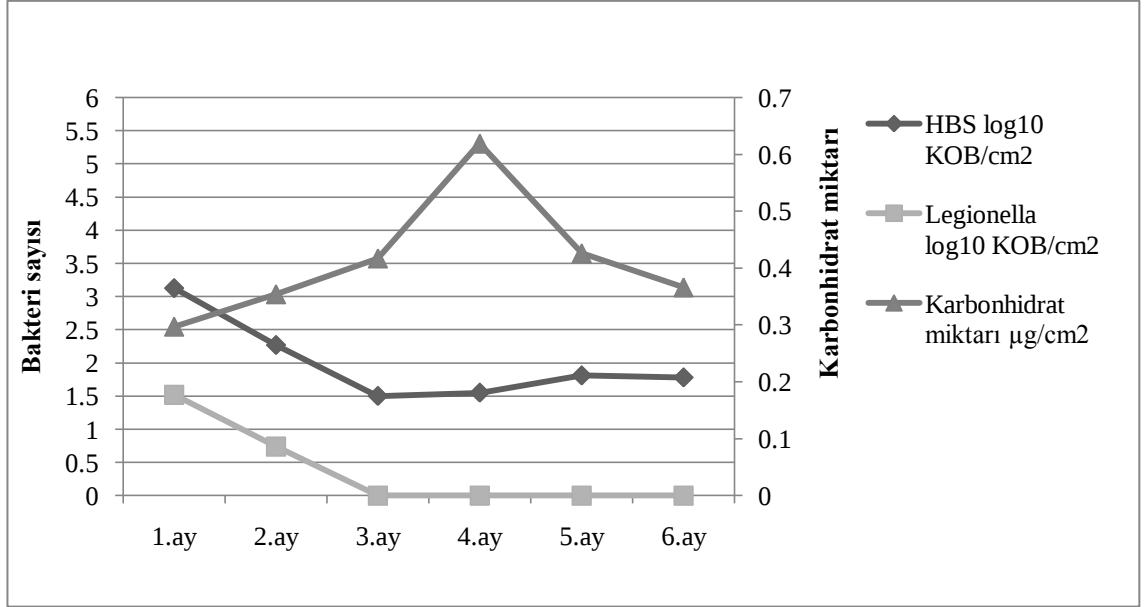
gelirken, HBS’nda azalma meydana gelmiştir. Dördüncü ayda 3. aya kıyasla toplam bakteri sayısında artış meydana gelirken canlı bakteri ve HBS’nda azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda toplam ve canlı bakteri sayısı artarken, HBS sabit kalmıştır. Altıncı ayda ise toplam, canlı ve HBS’nda düşme meydana gelmiştir (Şekil 4. 9).



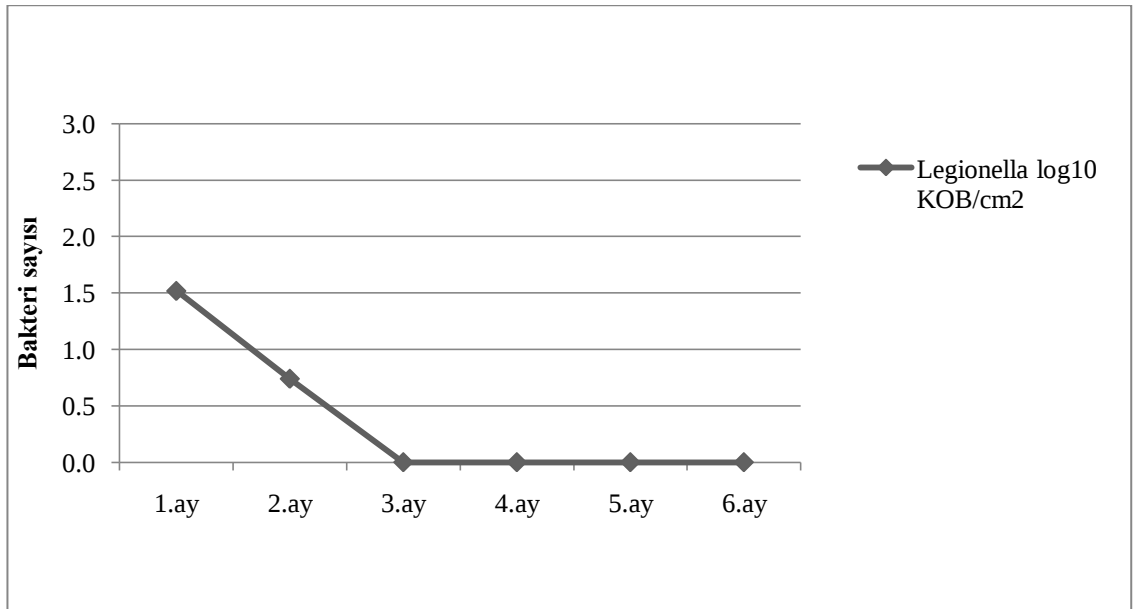
Şekil 4.9: Kontrol örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları.

4.2.2. 60 °C

Aylık olarak 2 saat süreyle 60 °C ye maruz bırakılan biyofilm örneklerinde 2. ve 3. ayın sonunda artan karbonhidrat miktarına karşın HBS ve *L. pneumophila* sayısında düşüş meydana geldiği gözlenmiştir. Üçüncü ay itibariyle üreme gözlenmeyen *L. pneumophila* da çalışma sonucuna kadar üreme gözlenmemiştir. Dördüncü ayın sonunda artan karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak HBS’nda artış gözlenmiştir. Bu artış 5. ayda da devam etmekle birlikte 6. ayda karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak HBS’nda düşüş gözlenmiştir. 60 °C ile muamele sonucunda, HBS 3.13; *L. pneumophila* ise 1.52 değeri ile 1. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS 1.55 ile 3. ayda; *L. pneumophila* ise 0 değeri ile 2. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.10, Şekil 4. 11).



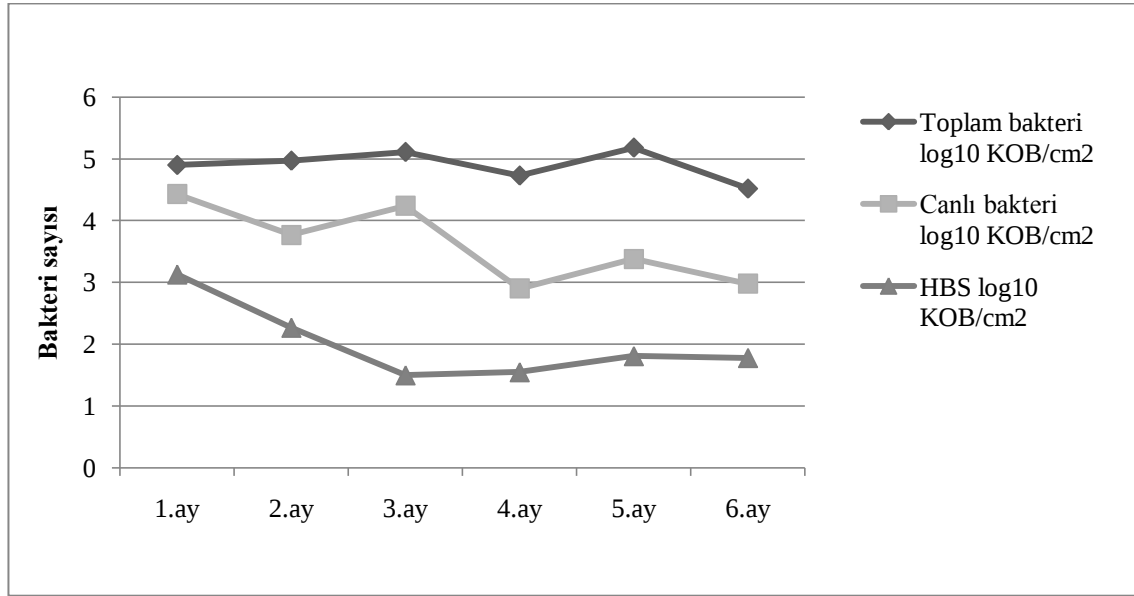
Şekil 4.10: Aylık olarak 2 saat süreyle 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.11: Aylık olarak 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

60 °C ye maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 2. ayda, 1. aya kıyasla toplam bakteri sayısında da artış gözlenmiş olup, HBS'nda olduğu gibi canlı bakteri sayısında da azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise toplam ve canlı bakteri sayısında artış meydana gelirken, HBS'nda azalma meydana gelmiştir. Dördüncü ayda 3. aya kıyasla

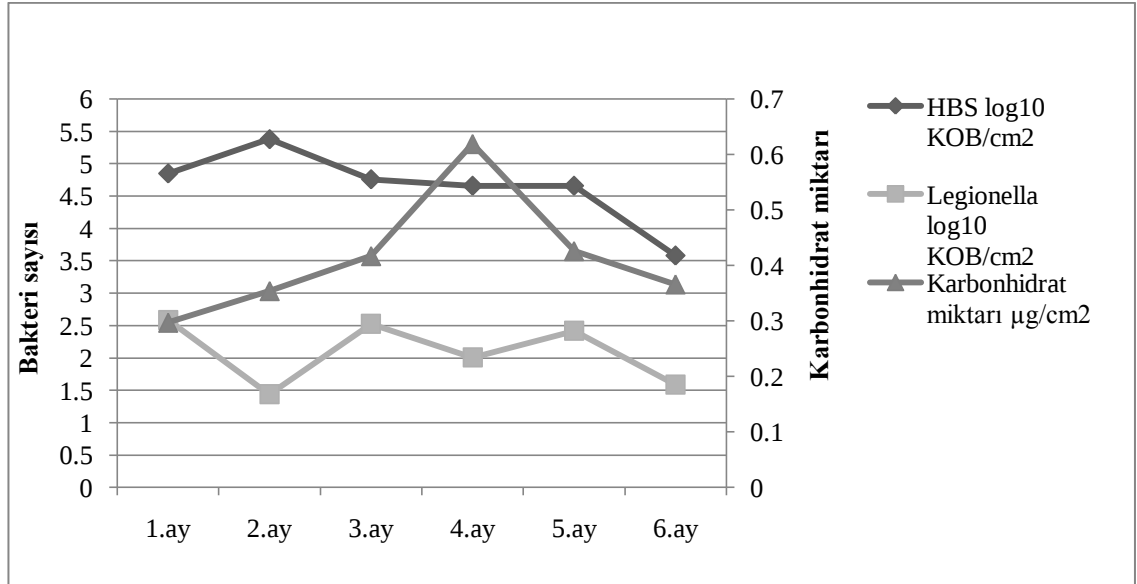
toplam HBS'nda artış meydana gelirken canlı ve toplam bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda toplam, canlı ve HBS'nda artış gözlenmiştir. Altıncı ayda ise toplam, canlı ve HBS'nda düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.12).



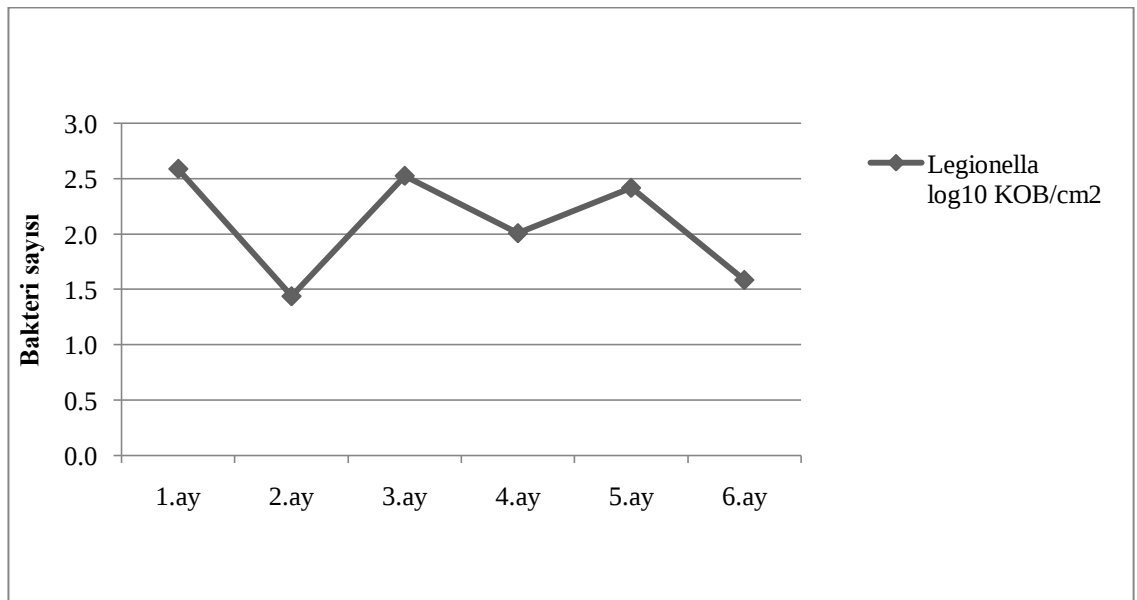
Şekil 4.12: Aylık olarak 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.3. 4 °C

Aylık olarak 24 saat süreyle 4 °C'ye maruz bırakılan biyofilm örneklerinde 2. ayın sonunda karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak HBS2nda artış meydana gelirken, *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. Üçüncü ayın sonunda ise *L. pneumophila* sayısında karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak gözlenen artışa rağmen, HBS'nda azalma gözlenmiştir. Dördüncü ayın sonunda hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda HBS'nda ufak bir azalma gözlenmekle birlikte *L. pneumophila* sayısında artış kaydedilmiş olup, 6. ayın sonunda düşen karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. 4 °C ile muamele sonucunda, HBS 5.38 ile 2.ayda; *L. pneumophila* ise 2.59 değeri ile 1. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS 3.58 ile 3. ayda; *L. pneumophila* ise 1.44 değeri ile 2. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.13, Şekil 4.14).



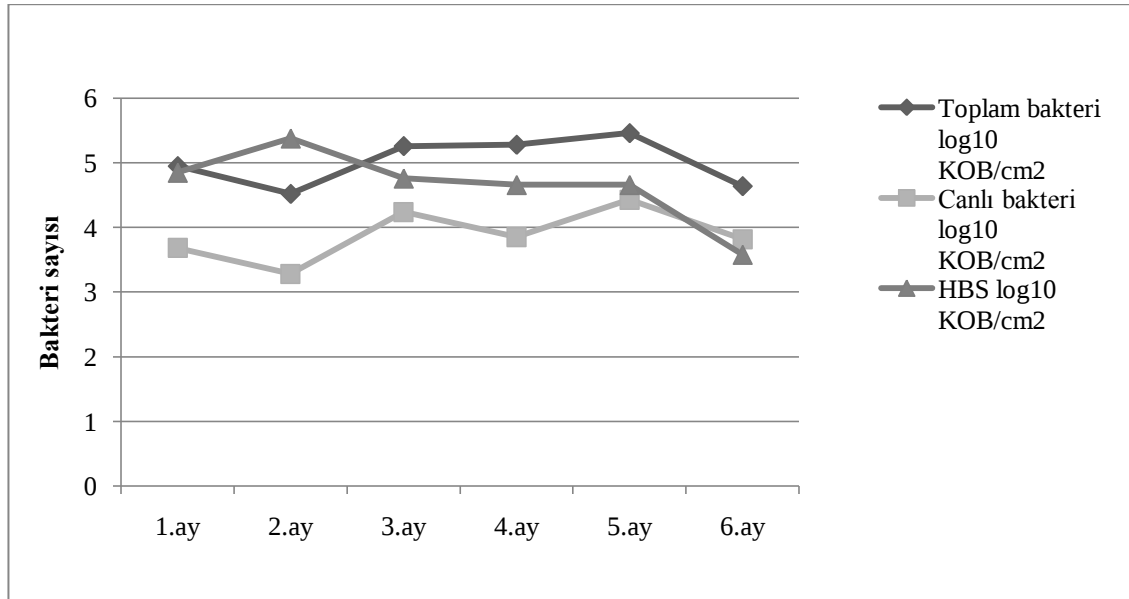
Şekil 4.13: Aylık olarak 24 saat süreyle 4 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.14: Aylık olarak +4 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

4 °C ye maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boya ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 2. ayda, 1. aya kıyasla HBS’nde artış gözlenmiş olup, toplam ve canlı bakteri sayısında da azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise toplam ve canlı bakteri sayısında artış meydana gelirken, HBS’nde azalma meydana gelmiştir. Dördüncü ayda 3. aya kıyasla toplam bakteri sayısında artış meydana gelirken canlı ve HBS’nde azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda toplam, canlı bakteri sayısı artarken,

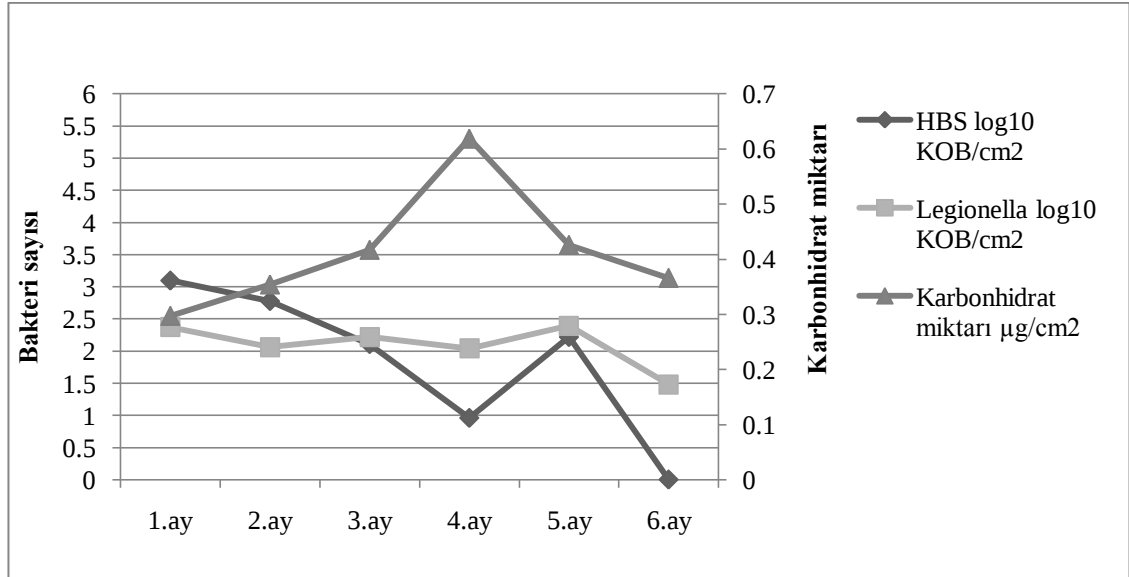
HPC sabit kalmıştır. Altıncı ayda ise toplam, canlı ve HBS’nda düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.15).



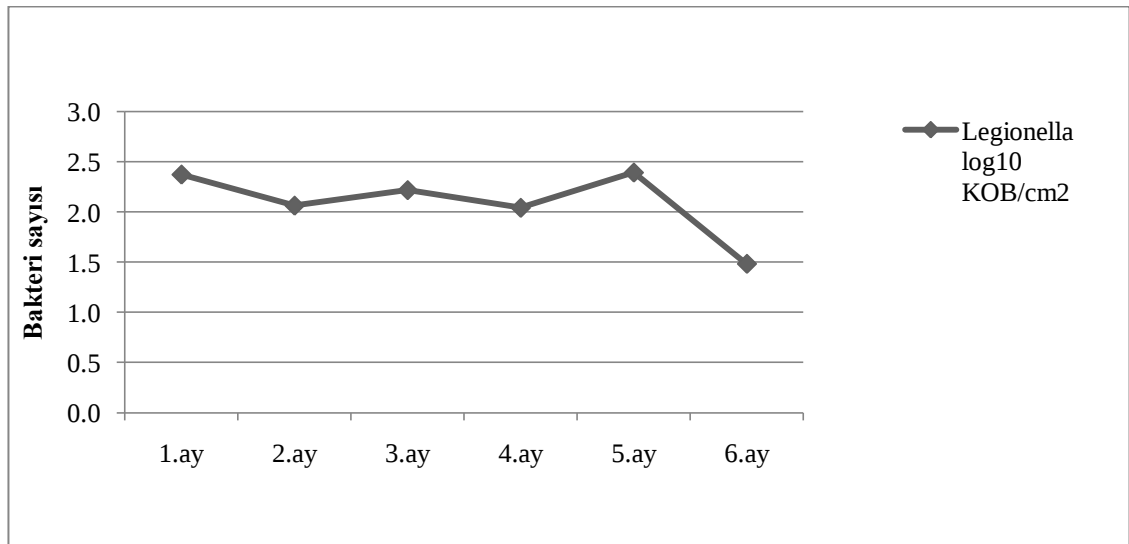
Şekil 4.15: Aylık olarak 4 °C sıcaklığa maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.4. pH 3

24 saat süreyle pH 3’e maruz bırakılan biyofilm örneklerinde 2. ayın sonunda artan karbonhidrat miktarına karşın, HBS ve *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. Üçüncü ayın sonunda ise *L. pneumophila* sayısında karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak gözlenen artışa rağmen, HBS’nda azalma gözlenmiştir. Dördüncü ayın sonunda hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda ise azalan karbonhidrat miktarına karşın HBS ve *L. pneumophila* sayısında artış kaydedilmiş olup, 6. ayın sonunda düşen karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. pH3 ile muamele sonucunda, HBS 3.1 ile 1. ayda; *L. pneumophila* ise 3.59 değeri ile 5. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS 0 ile 6. ayda; *L. pneumophila* ise 1.48 değeri ile 6. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.16, Şekil 4. 17).



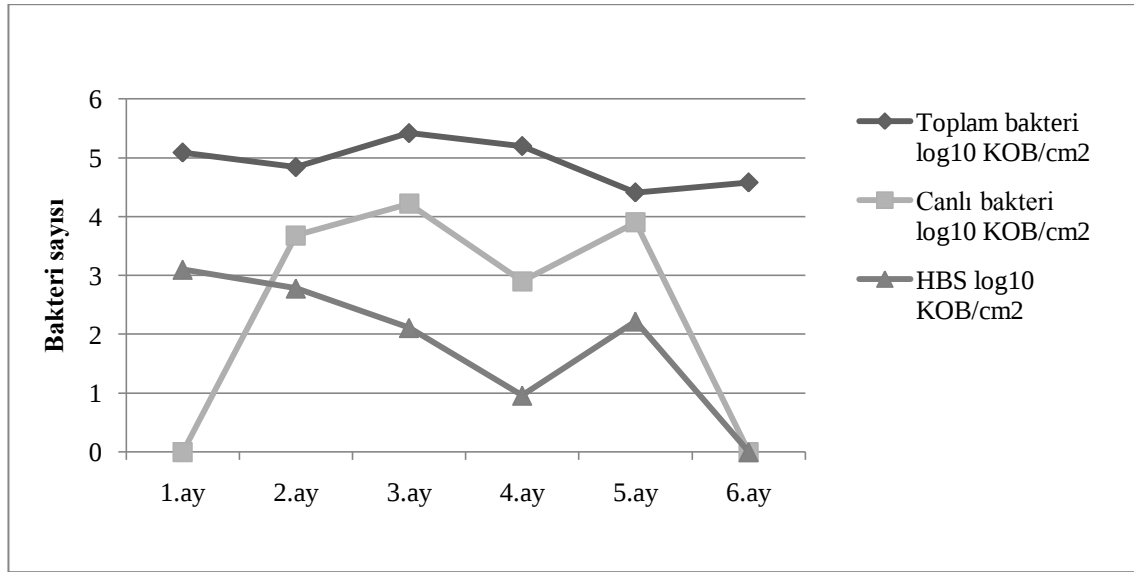
Şekil 4.16: Aylık olarak 24 saat süreyle pH 3'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.17: Aylık olarak pH 3'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

pH 3'e maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 1. ayın onunda canlı bakteri gözlememiş olup, 2. ayda, 1. aya kıyasla canlı bakteri sayısında artış gözlenmiş olup, toplam bakteri ve HBS'nda da azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise toplam ve canlı bakteri sayısında artış meydana gelirken, HBS'nda azalma meydana gelmiştir. Dördüncü ayda, HBS, toplam ve canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda HBS ve canlı bakteri

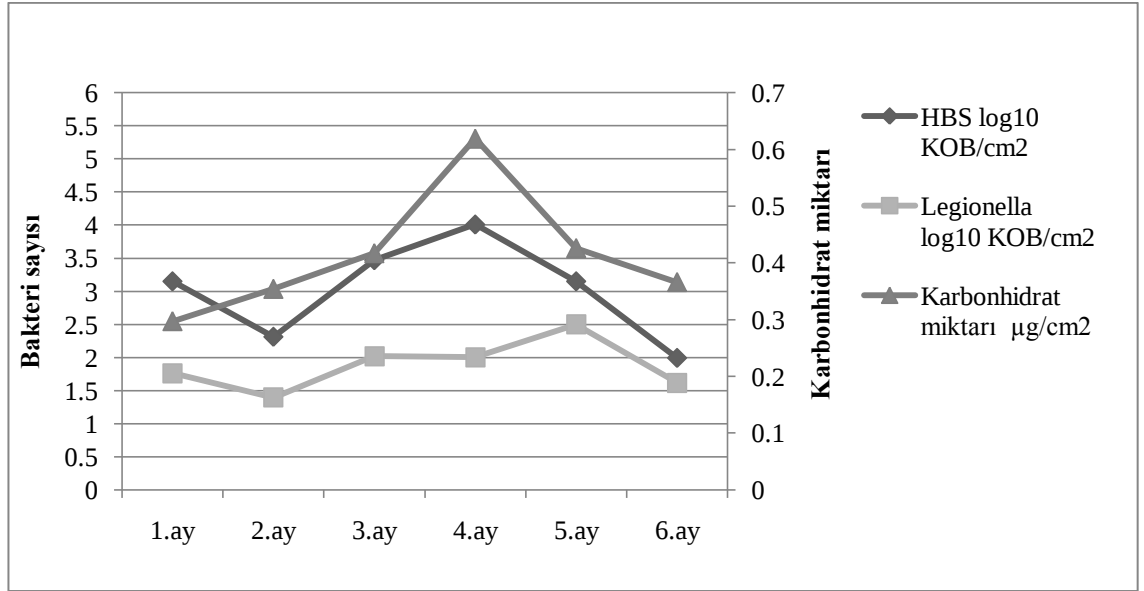
sayısı artarken, toplam bakteri sayısında düşüş gözlenmiştir. Altıncı ayda ise toplam bakteri sayısı artarken, canlı ve HBS’nda düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.18).



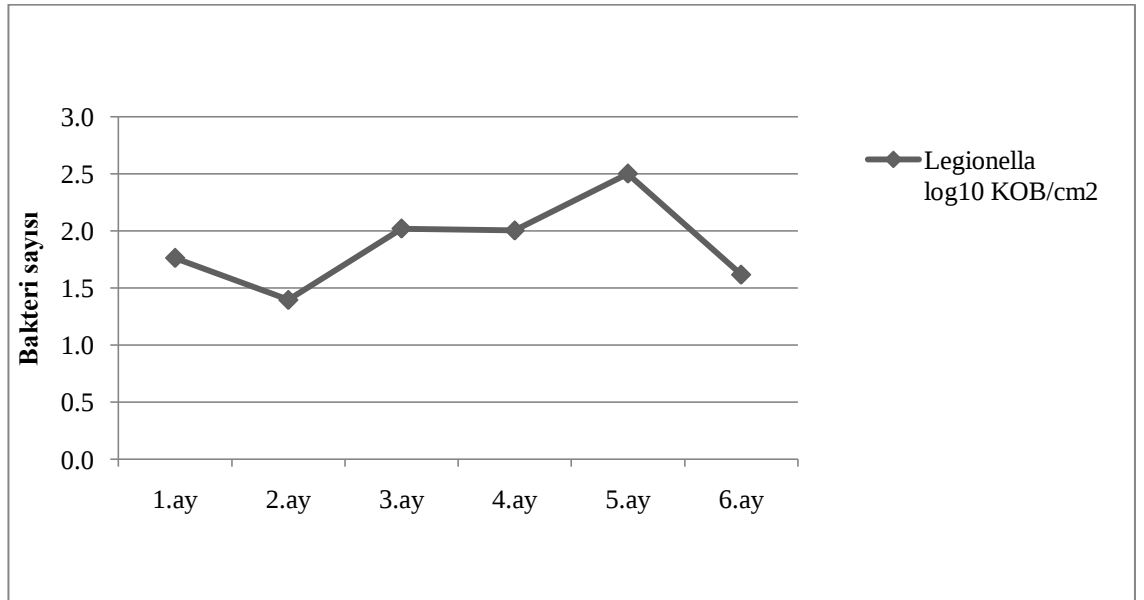
Şekil 4.18: Aylık olarak pH 3’e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.5. pH 5

Aylık ölçümler sırasında 24 saat süreyle pH 5’e maruz bırakılan biyofilm örneklerinde 2. ayın sonunda artan karbonhidrat miktarına karşın, HBS ve *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. Üçüncü ayın sonunda ise HBS ve *L. pneumophila* sayısında karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak artış gözlenmiştir. Dördüncü ayın sonunda HBS’nda artış meydana gelirken *L. pneumophila* sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda ise azalan karbonhidrat miktarına karşın *L. pneumophila* sayısında artış kaydedilmiş olmakla birlikte, HBS’nda karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak azalma meydana gelmiştir. Altıncı ayın sonunda düşen karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. pH5 ile muamele sonucunda, HPC 4.01 ile 4. ayda; *L. pneumophila* ise 2.01 değeri ile 2. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HPC 1.99 ile 6. ayda; *L. pneumophila* ise 1.39 değeri ile 2. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.19, Şekil 4. 20).



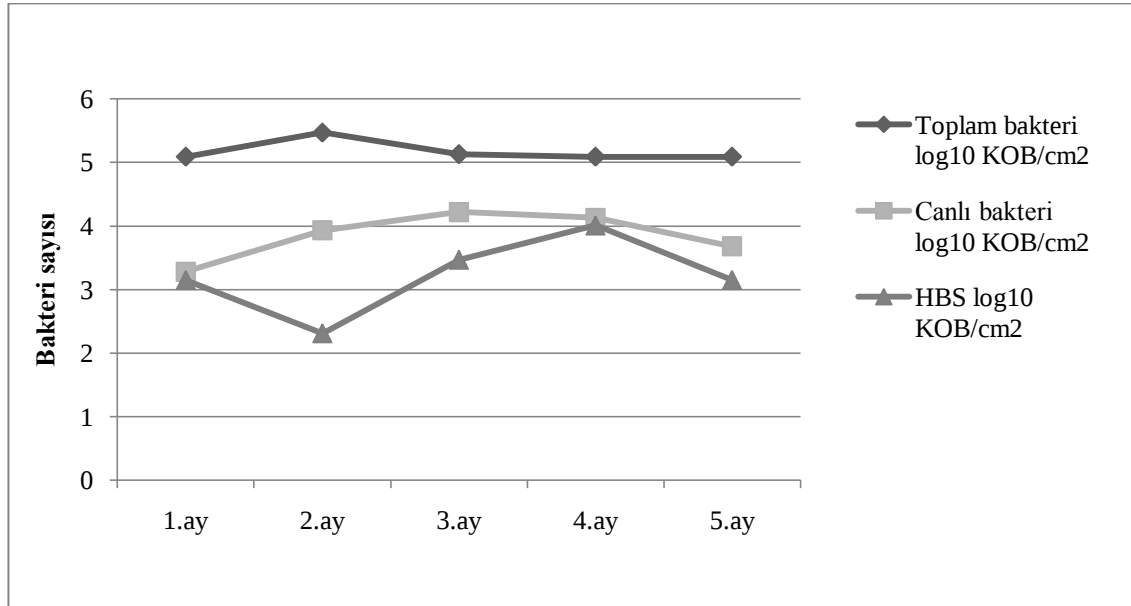
Şekil 4.19: Aylık olarak pH 5'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.20: Aylık olarak pH 5'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

pH 5'e maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 2. ayda, 1. aya kıyasla toplam ve canlı bakteri sayısında artış gözlenmiş olup, HBS'nda da azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise HBS ve canlı bakteri sayısında artış meydana gelirken, toplam bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. Dördüncü ayda, HBS artarken, toplam ve canlı bakteri sayısında

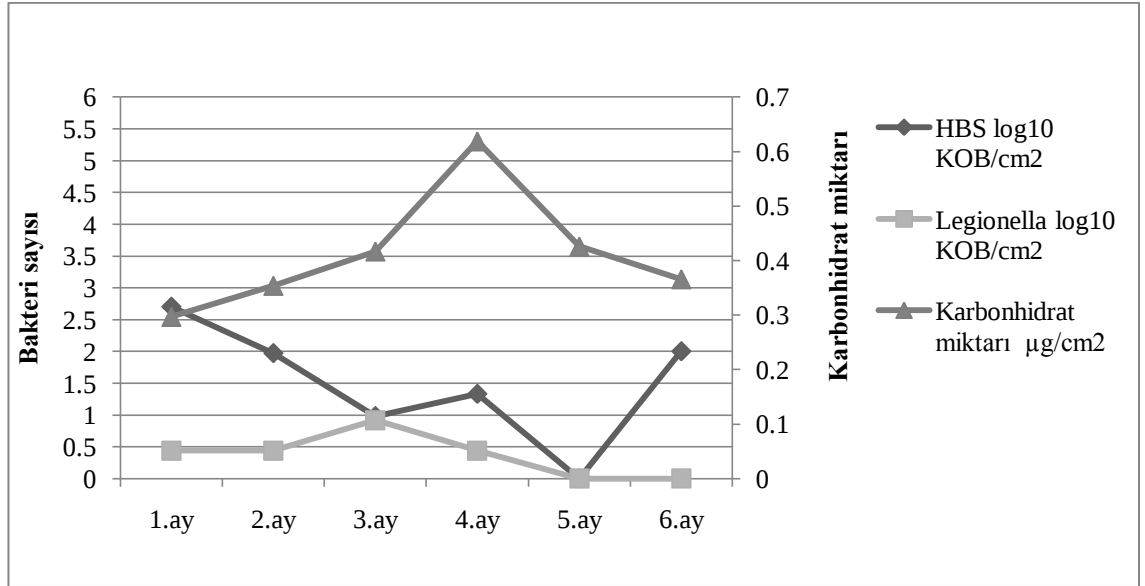
azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda HBS ve canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiş olup, toplam bakteri sayısı sabit kalmıştır. Altıncı ayda ise HBS, canlı ve toplam bakteri sayısında düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.21).



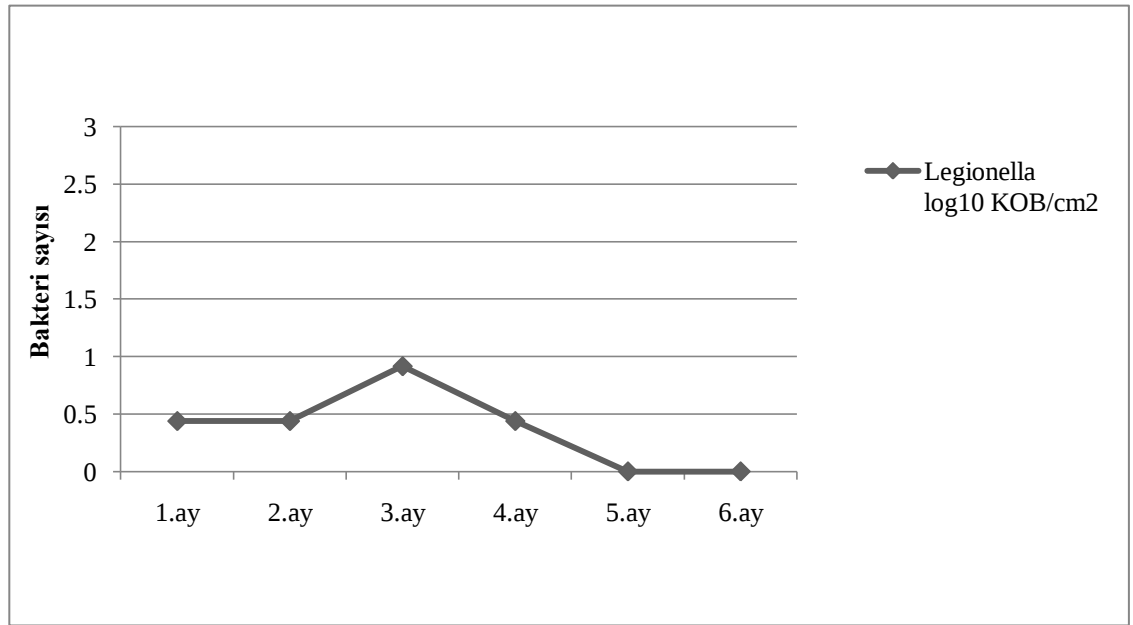
Şekil 4.21: Aylık olarak pH 5'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.6. pH 11

Çalışma boyunca 24 saat süreyle pH 11'e maruz bırakılan biyofilm örneklerinde ikinci ayın sonunda artan karbonhidrat miktarına karşın, HBS'nda düşüş gözlenirken *L. pneumophila* sayısı değerini korumuştur. Üçüncü ayın sonunda ise HBS azalırken *L. pneumophila* sayısında artan karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak artış gözlenmiştir. Dördüncü ayın sonunda HBS'nda artış meydana gelirken, *L. pneumophila* sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda ise azalan karbonhidrat miktarı ile uyumlu olarak *L. pneumophila* üreme gözlenmezken HBS'nda da azalma meydana gelmiştir. Altıncı ayın sonunda ise düşen karbonhidrat miktarına karşın HBS'nda artış gözlenmiştir. pH11 ile muamele sonucunda, HPC 2.7 ile 1.ayda; *L. pneumophila* ise 0.92 değeri ile 4. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS ve *L. pneumophila* ise 0 değeri ile 5. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.22, Şekil 4.23).



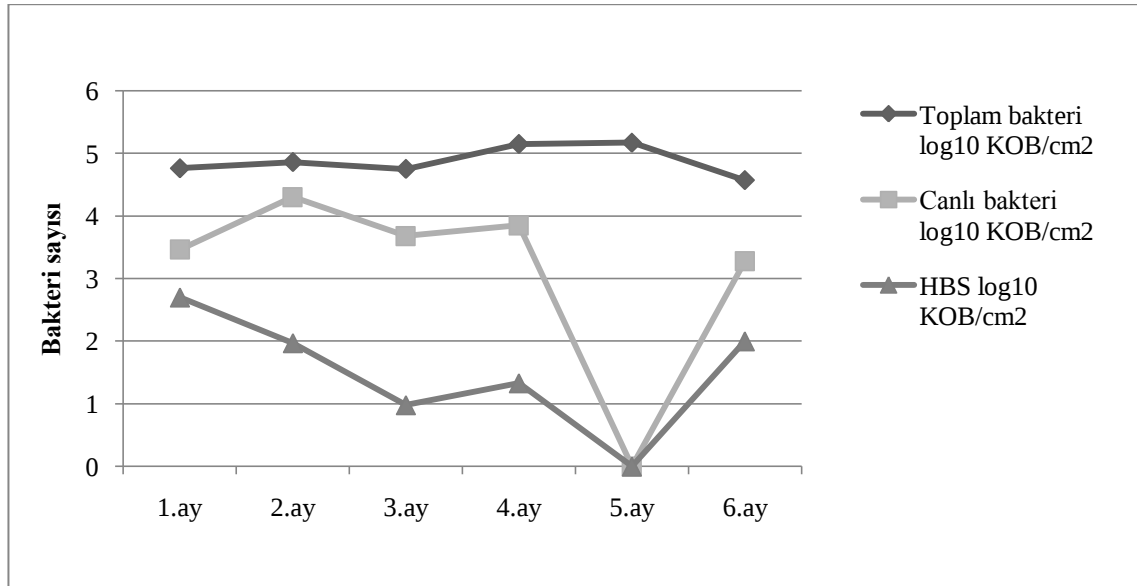
Şekil 4.22: Aylık olarak pH 11'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.23: Aylık olarak pH 11'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

pH 11'e maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 2. ayda, 1. aya kıyasla toplam ve canlı bakteri sayısında artış gözlenmiş olup, HBS'nda da azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise hem HBS hem de toplam ve canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. Dördüncü ayda, HBS, toplam ve canlı bakteri sayısında artış meydana gelmiştir. Beşinci ayda HBS ve canlı bakteri sayısı saptanmazken, toplam bakteri sayısında küçük bir artış

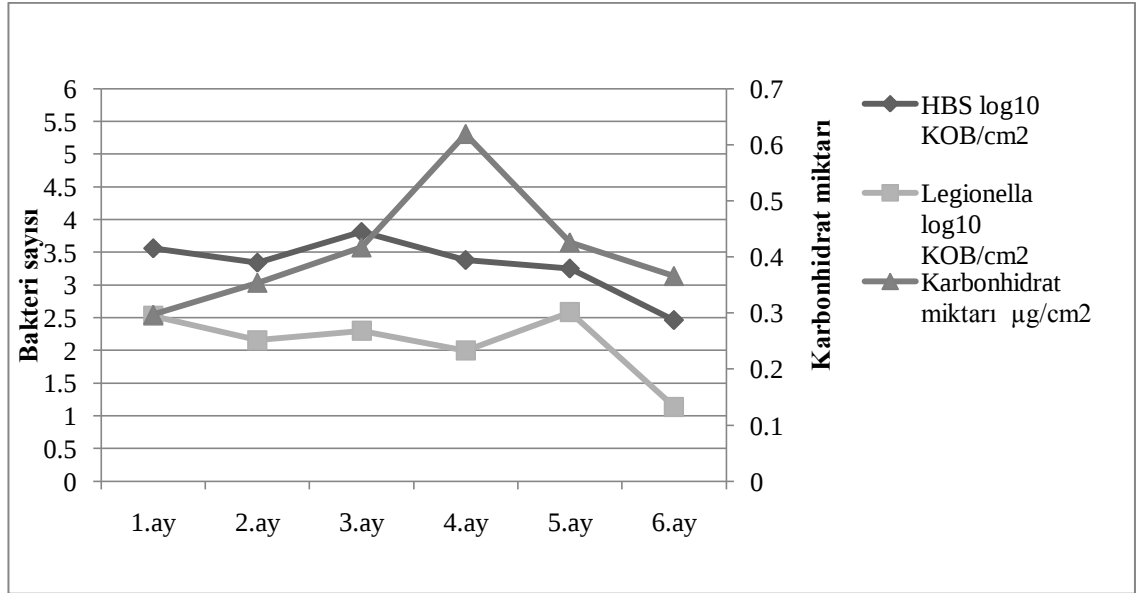
gözlenmiştir. Altıncı ayda ise HBS ve canlı bakteri sayısı artmış olup, toplam bakteri sayısında düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.24).



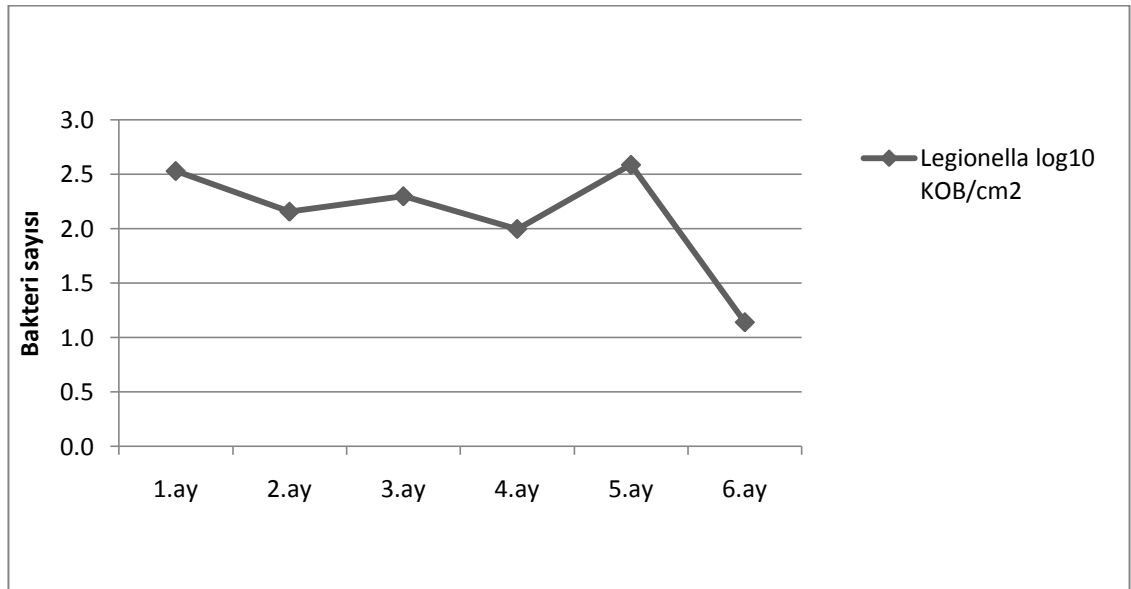
Şekil 4.24: Aylık olarak pH 11'e maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.7. Saf Su

Aylık olarak 24 saat süreyle saf suya maruz bırakılan biyofilm örneklerinde 2. ayın sonunda artan karbonhidrat miktarına karşın, HBS ve *L. pneumophila* sayısında azalma meydana gelirken gelmiştir. Üçüncü ayın sonunda ise hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak artış gözlenmiştir. Dördüncü ayın sonunda hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda HBS'nda ufak bir azalma gözlenmekle birlikte, *L. pneumophila* sayısında artış kaydedilmiş olup, 6. ayın sonunda düşen karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. Saf su ile muamele sonucunda, HBS 3.81 ile 3.ayda; *L. pneumophila* ise 2.59 değeri ile 5. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS 2.46 ile; *L. pneumophila* ise 1.14 değeri ile 6. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.25, Şekil 4.26).



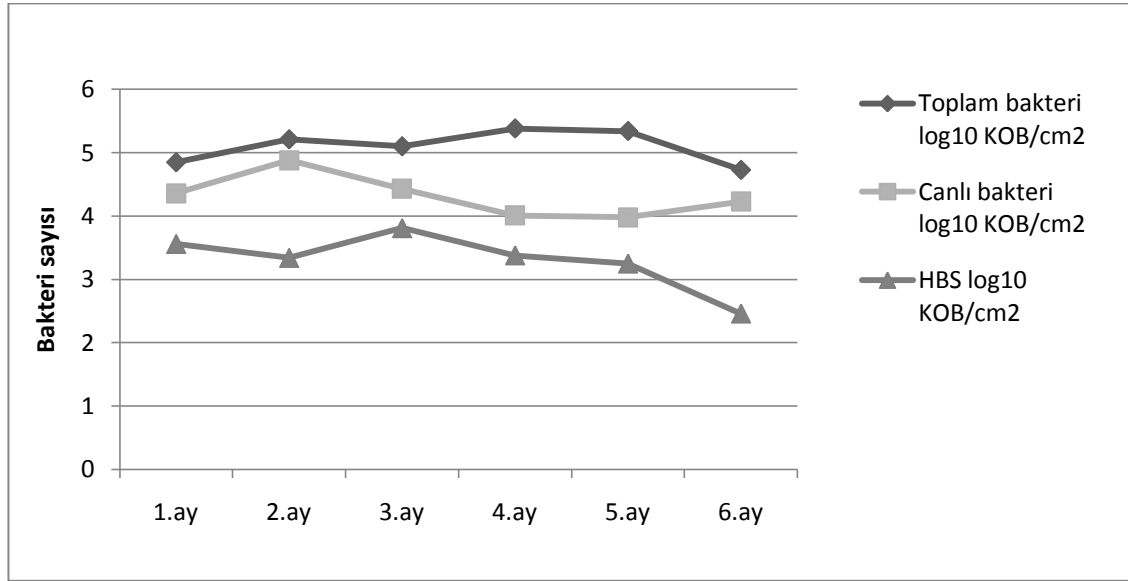
Şekil 4.25: Aylık olarak saf suya maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.26: Aylık olarak saf suya maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

Saf su ile muamele edilen biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 2. ayda, 1. aya kıyasla toplam ve canlı bakteri sayısında artış gözlenmiş olup, HBS’nda da azalma meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise toplam ve canlı bakteri sayısında azalma meydana gelirken, HBS’nda artış meydana gelmiştir. Dördüncü ayda, HBS ve canlı bakteri sayısında azalma meydana gelirken, toplam bakteri sayısında artış gözlenmiştir. Beşinci ayda HBS, canlı ve toplam

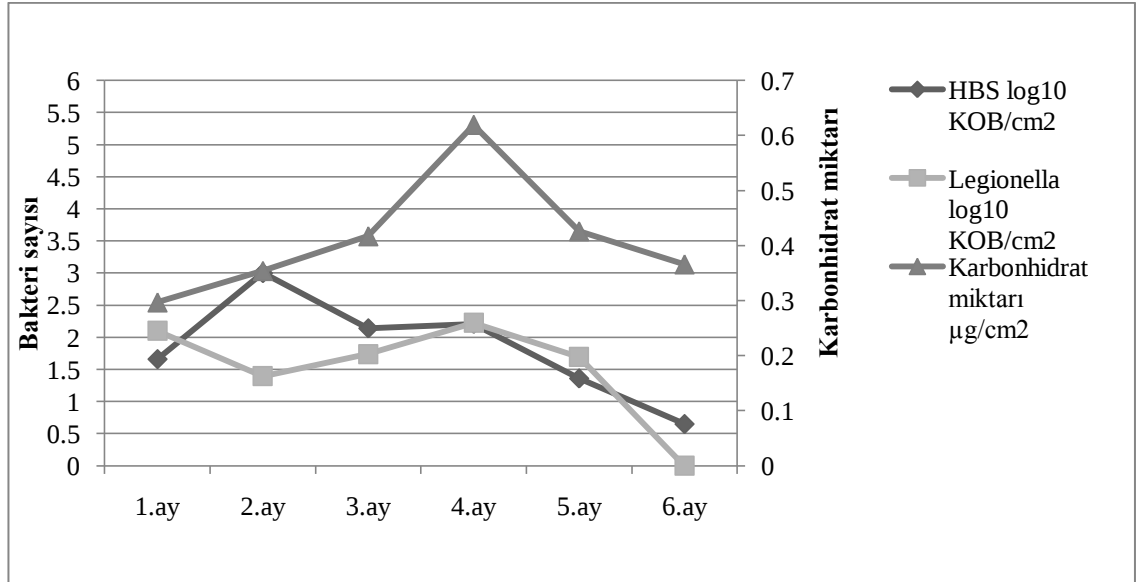
bakteri sayısında azalma meydana gelmiş olup, 6. ayda ise HBS ve toplam bakteri sayısında düşme meydana gelirken, canlı bakteri sayısında artış gözlenmiştir (Şekil 4.27).



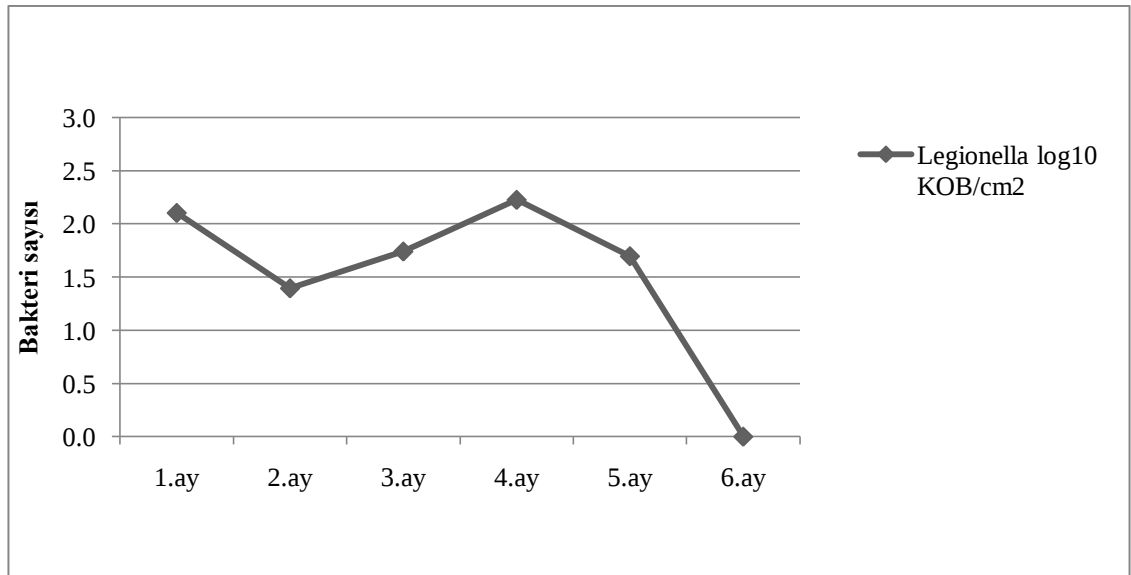
Şekil 4.27: Aylık olarak saf suya maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.8. 3M Tuz Çözeltisi

Yirmi dört saat süreyle 3M tuz çözeltisine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde 2. ayın sonunda artan karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak HBS’nda artış gözlenirken, *L. pneumophila* sayısında azalma meydana gelirken gelmiştir. Üçüncü ayın sonunda ise HBS azalırken, *L. pneumophila* sayısında karbonhidrat miktarı ile uyumlu olarak artış gözlenmiştir. Dördüncü ayın sonunda hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında karbonhidrat miktarı ile uyumlu olarak artış meydana gelmiştir. Beşinci ayda da yine karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında düşüş kaydedilmiş olup, 6. ayın sonunda düşen karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak HBS ve *L. pneumophila* sayısında düşüş gözlenmiştir. 3M tuz çözeltisi ile muamele sonucunda, HBS 2.21; *L. pneumophila* ise 2.23 değeri ile 4. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS 0.65 ile; *L. pneumophila* ise 0 değeri ile 6. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.28, Şekil 4.29)



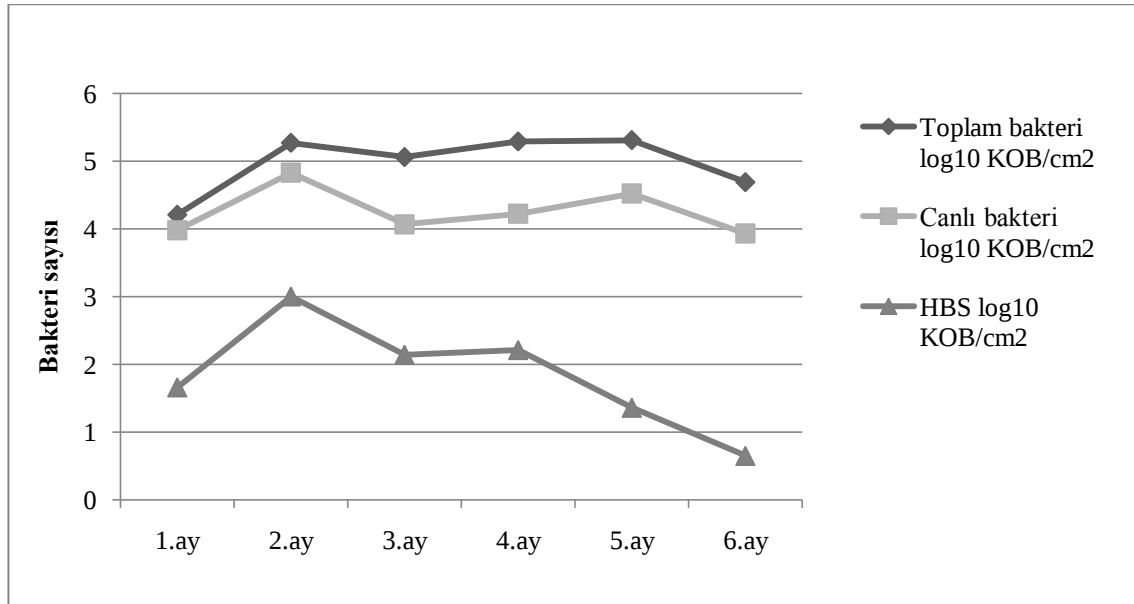
Şekil 4.28: Aylık olarak 3M tuz çözeltisine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.29: Aylık olarak 3M tuz çözeltisine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

3M tuz çözeltisine maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 2. ayda, 1. aya kıyasla toplam, canlı bakteri ve HBS'nda artış gözlenmiştir. Üçüncü ayda ise her üç türde de düşüş gözlenmiştir. Bu durumu 4. ayda yine 3 türde de gözlenen artış takip etmiştir. Beşinci ayda ise, HBS'nda azalma meydana gelmiş olup, toplam ve canlı bakteri sayısında artış

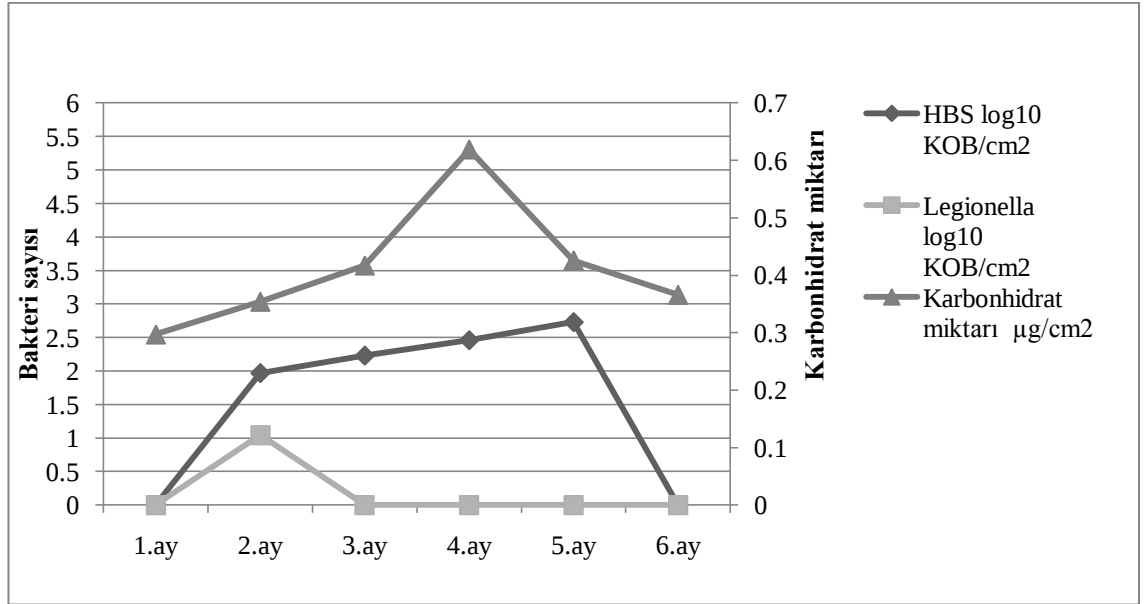
gözlenmiştir. Altıncı ayda ise HBS, canlı ve toplam bakteri sayısında düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.30).



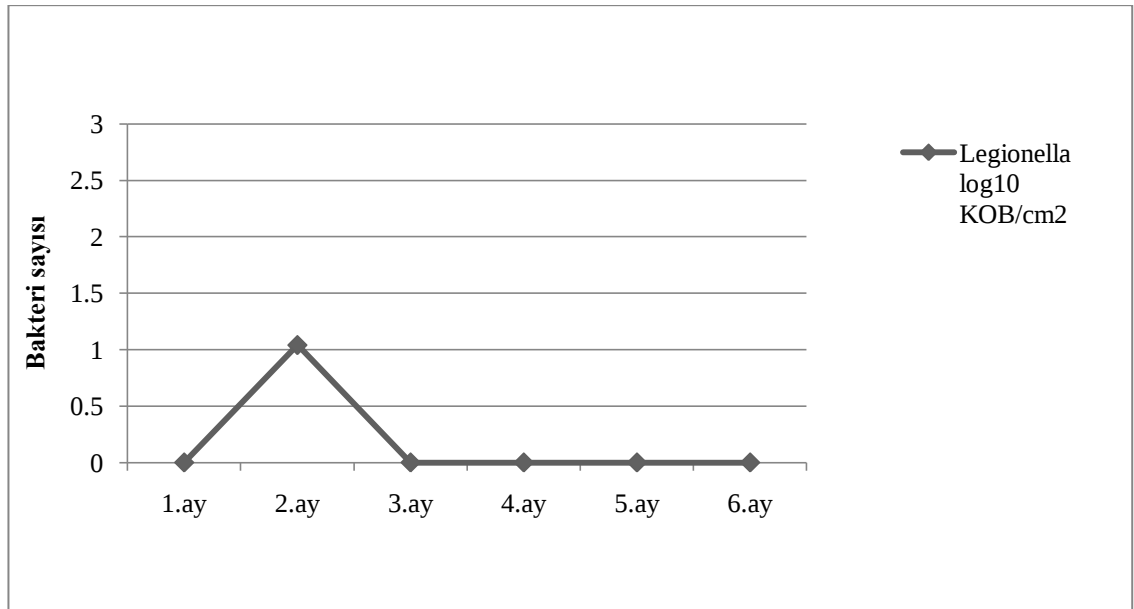
Şekil 4.30: Aylık olarak 3M tuz çözeltisine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.9. 2 ppm Monokloramin

Dezenfeksiyon amacıyla aylık olarak 24 saat süreyle 2 ppm monokloramine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde, 2. ayın sonunda artan karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak HBS ve *L. pneumophila* sayısında artış meydana gelmiştir. Üçüncü ayın sonunda HBS karbonhidrat miktarıyla uyumlu olarak artarken, *L. pneumophila*'da üreme gözlenmemiştir. Dördüncü ve 5. ayın sonunda HBS'nda artış gözlenmekle beraber, 6. ayın sonunda düşüş gözlenmiş olup, 6. ayın sonuna kadar *L. pneumophila*'da üreme gözlenmemiştir. 2 ppm monokloramin ile muamele sonucunda, HBS 2.73 ile 4.ayda; *L. pneumophila* ise 1.04 değeri ile 2. ayda en yüksek seviyeye ulaşmış olup; HBS 0 ile 6. ayda; *L. pneumophila* ise 0 değeri ile 2. ayda en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.31, Şekil 4.32).



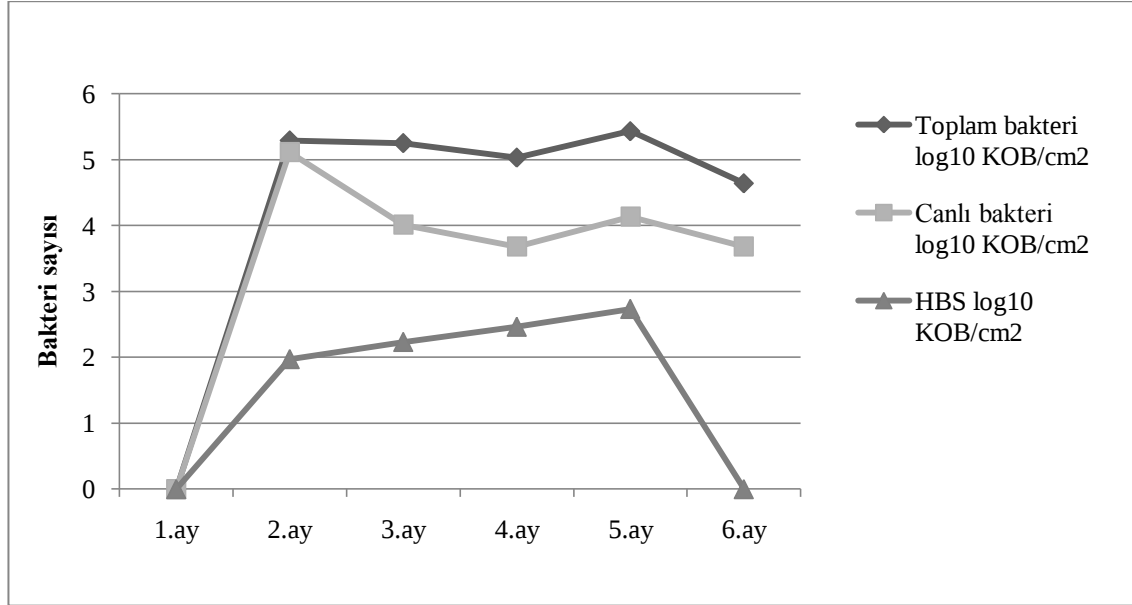
Şekil 4.31: Aylık olarak 2 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.32: Aylık olarak 2 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

2 ppm monokloramin'e maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 1. ayda sonuç elde edilememiştir. Üçüncü ayda ise 2. aya kıyasla, HBS'nda artış meydana gelirken, toplam ve canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. Dördüncü ayda, HBS artarken, toplam ve canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. Beşinci ayda HBS, toplam ve canlı

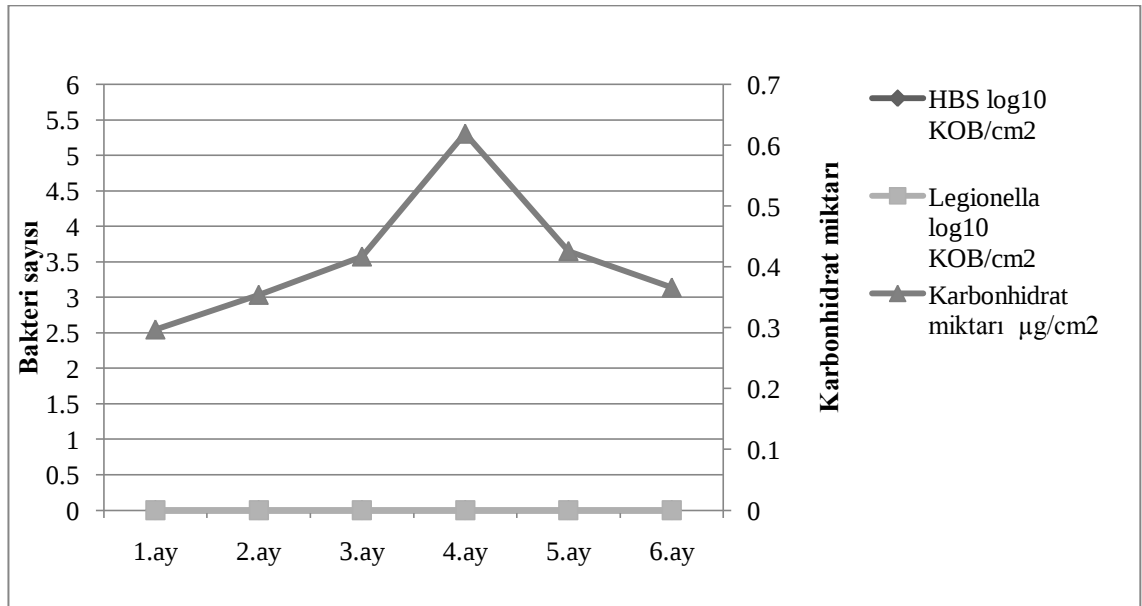
bakteri sayısında artış meydana gelmiş olup, 6. ayda ise her 3 türde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.33).



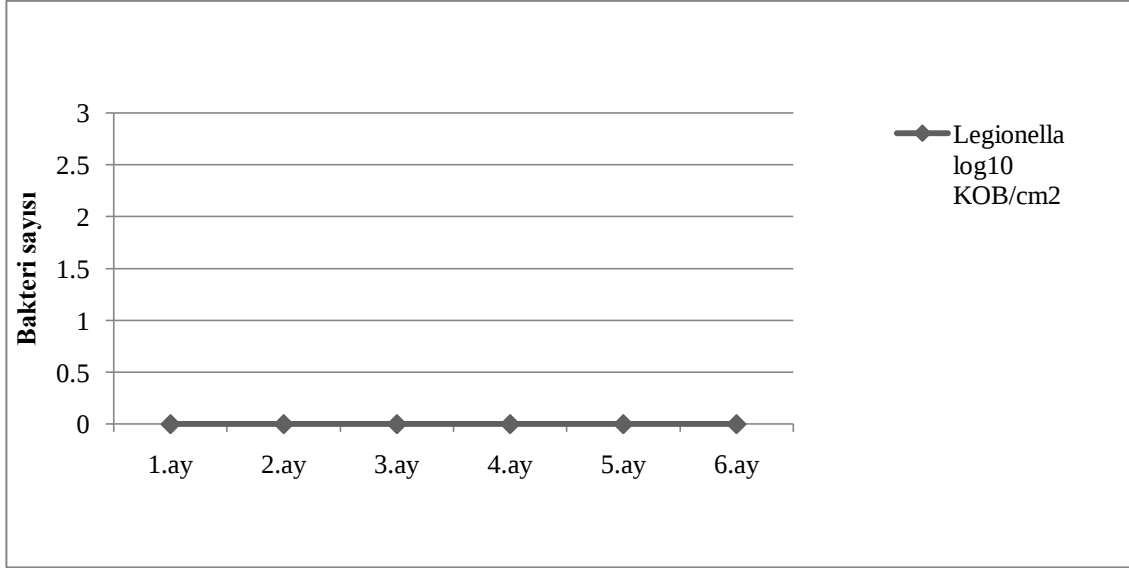
Şekil 4.33: Aylık olarak 2 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.10. 500 ppm Monokloramin

Aylık olarak 24 saat sürekle 500 ppm monokloramine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde HBS ve *L. pneumophila*'da hiçbir ayda üreme gözlenmemiştir (Şekil4.34, Şekil 4.35).

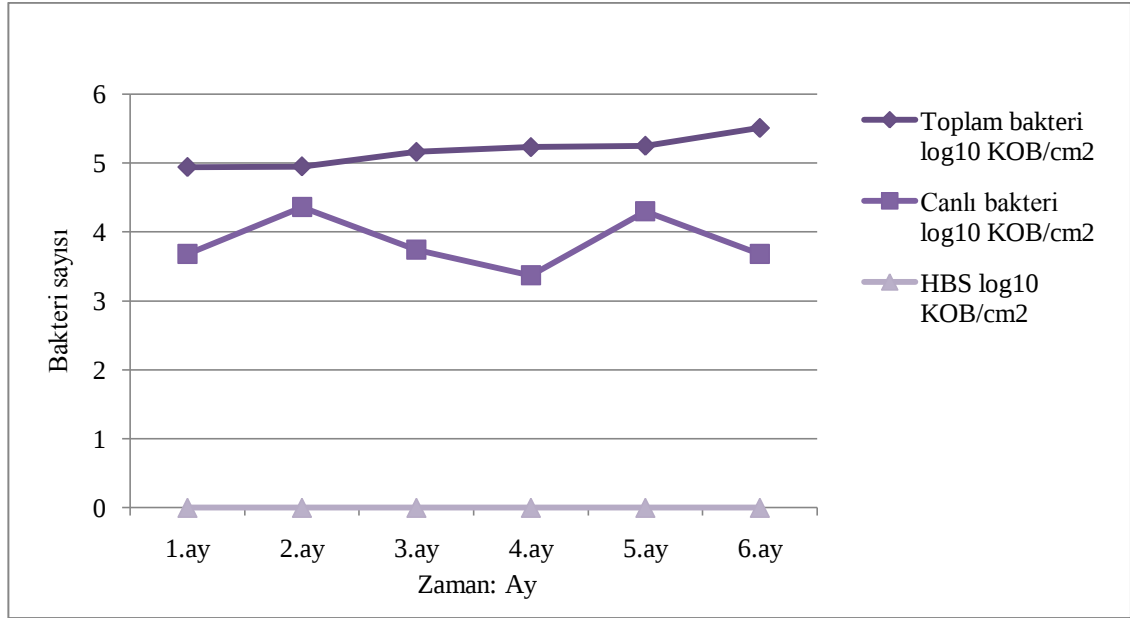


Şekil 4.34: Aylık olarak 500 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.35: Aylık olarak 500 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

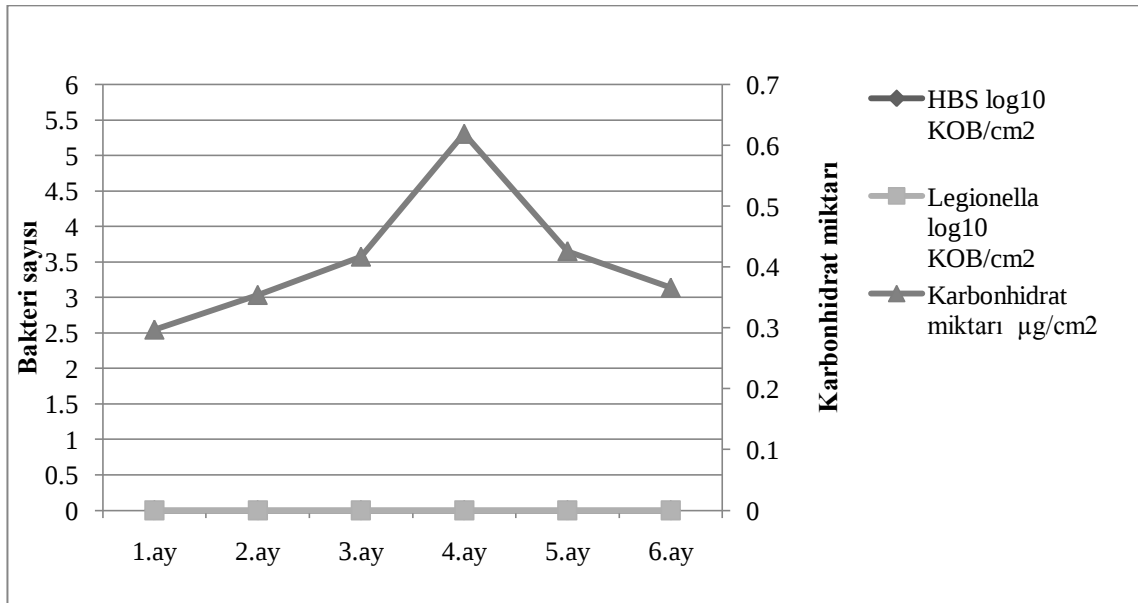
500 ppm monokloramin'e maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 6 aylık periyot boyunca HBS'nda üreme gözlenmemiştir. Bununla birlikte 2. ayda, 1. aya kıyasla toplam ve canlı bakteri sayısında artış gözlenmiştir. Üçüncü ayda ise canlı bakteri sayısında düşüş meydana gelirken, toplam bakteri sayısında artış meydana gelmiştir. Dördüncü ayda da 3. ayda olduğu gibi canlı bakteri sayısında düşüş meydana gelmiş olup, toplam bakteri sayısı artmıştır. Beşinci ayda toplam ve canlı bakteri sayısında artış meydana gelmiş olup, 6. ayda ise toplam bakteri sayısı artarken, canlı bakteri sayısında düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.36).



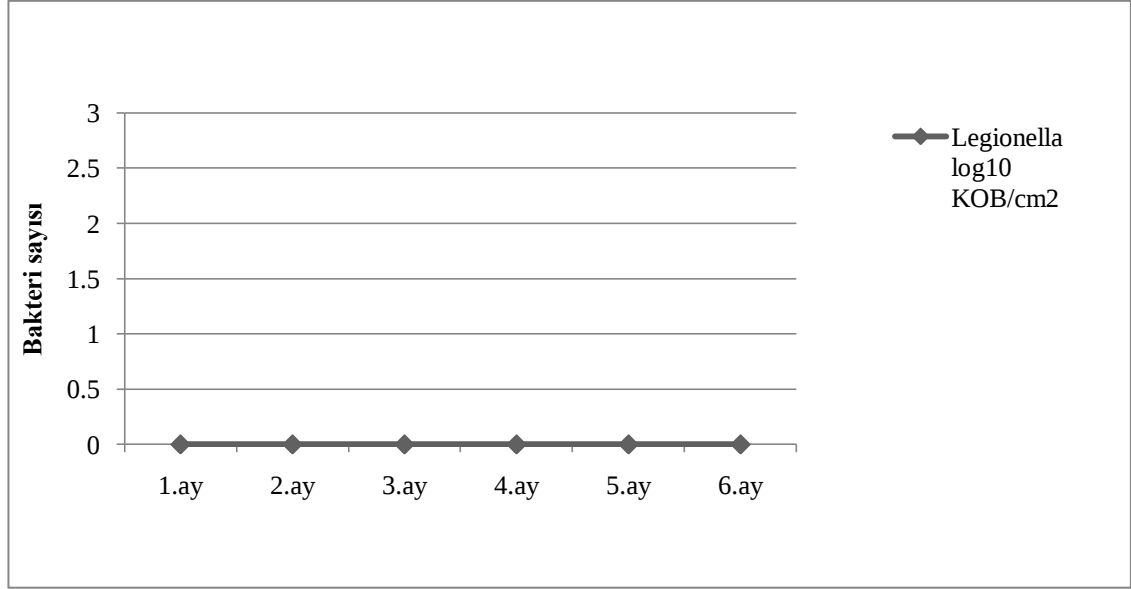
Şekil 4.36: Aylık olarak 500 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HB sayıları

4.2.10. 1000 ppm Monokloramin

Aylık olarak 24 saat süreyle 1000 ppm monokloramine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde 500 ppm monokloraminle muamele sonucunda olduğu gibi HBS ve *L. pneumophila*'da hiçbir ayda üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.37, Şekil 4.38).

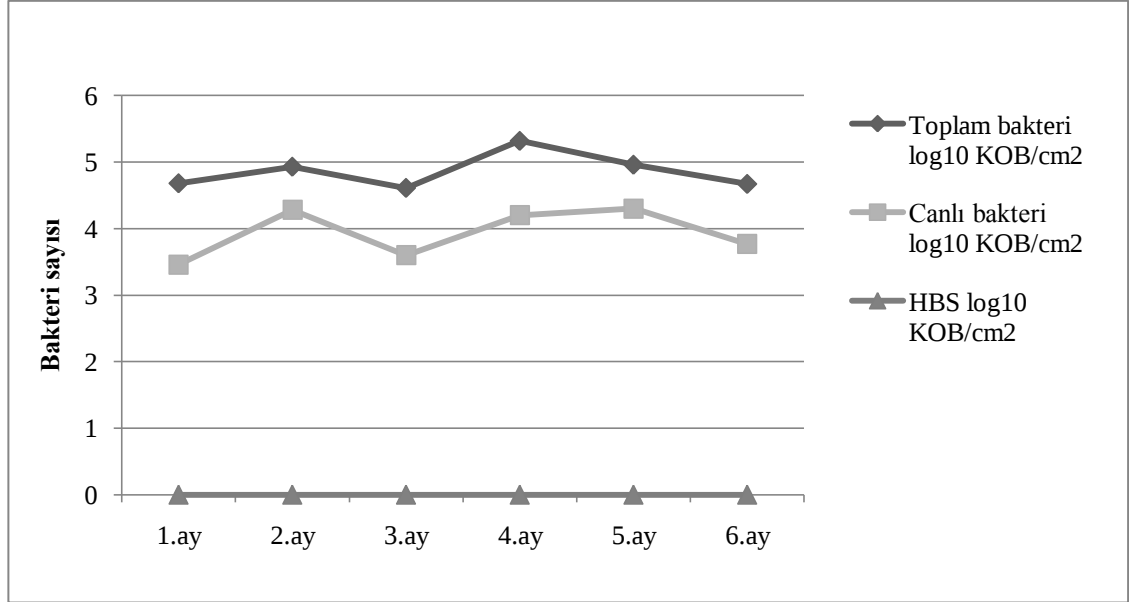


Şekil 4.37: Aylık olarak 1000 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan HBS, *L. pneumophila* ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.38: Aylık olarak 1000 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayısı

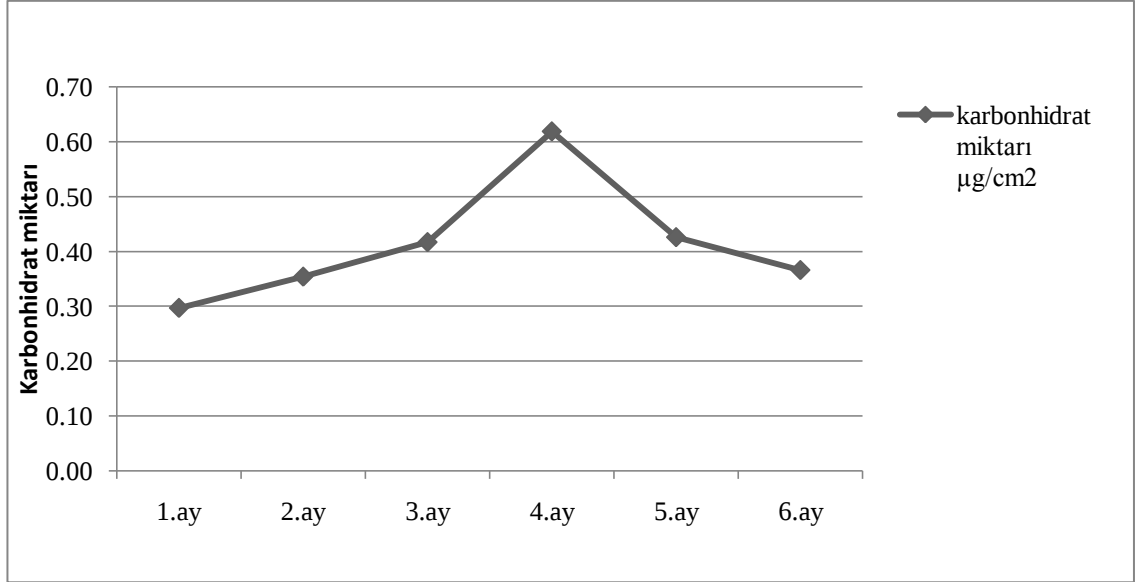
1000 ppm monokloramin'e maruz bırakılan biyofilm örneklerinin, DAPI ve CTC boyaları ile boyanmasının ardından yapılan incelemelerde, 6 aylık periyot boyunca HBS'nda üreme gözlenmemiştir. Bununla birlikte 2. ayda, 1. aya kıyasla toplam ve canlı bakteri sayısında artış gözlenmiştir. Üçüncü ayda ise canlı ve toplam bakteri sayısında düşüş meydana gelmiştir. Dördüncü ayda ise canlı ve toplam bakteri sayısında artış meydana gelmiştir. Beşinci ayda canlı bakteri sayısında artış meydana gelirken, toplam bakteri sayısında düşüş gözlenmiştir. Altıncı ayda ise her iki bakteri sayısında da düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.39).



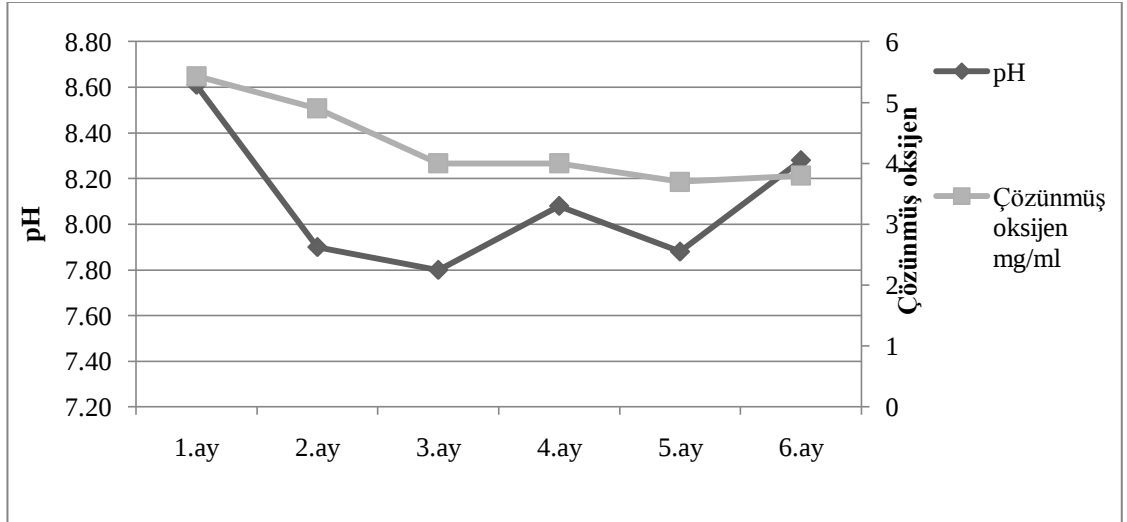
Şekil 4.39: Aylık olarak 1000 ppm monokloramine maruz bırakılmış biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri, canlı bakteri ve HBS sayıları

Tablo 4.1. Altı aylık deney süresince aylara göre ölçülen pH, çözünmüş oksijen, TÇM ve karbonhidrat miktarları

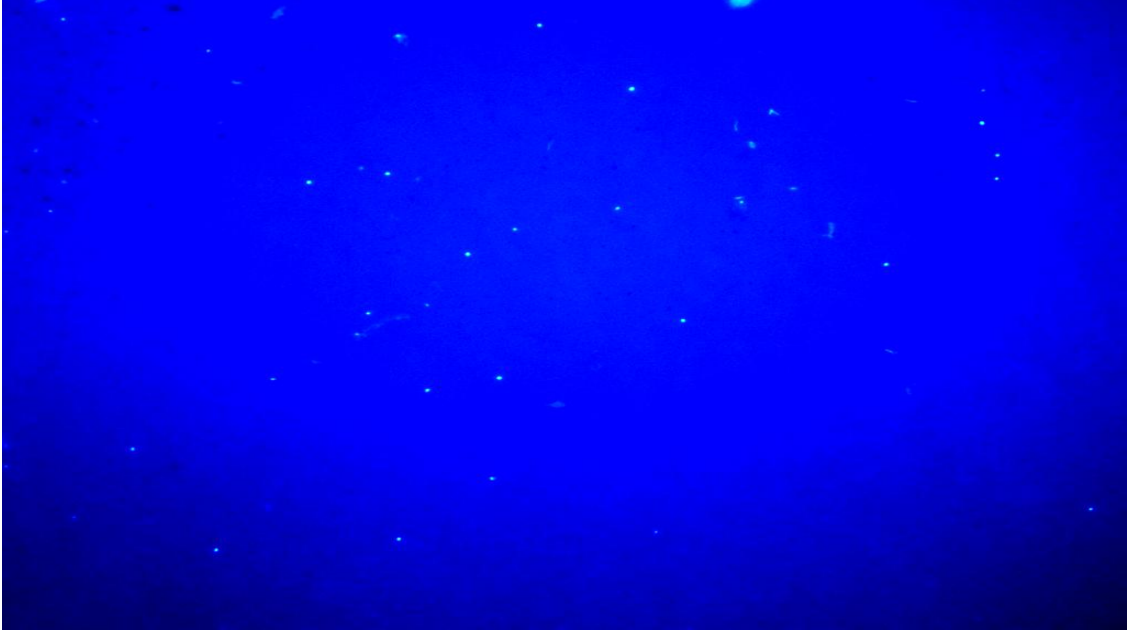
Aylar	Ph	Çözünmüş (mg/l)	oksijen TÇM (ppm)	Karbonhidrat miktarı (µg/cm2)
1	8.61	5.43	780	0.297
2	7.90	4.9	774	0.354
3	7.80	4.0	727	0.417
4	8.08	4.0	720	0.619
5	7.88	3.7	889	0.426
6	8.28	3.8	857	0.366



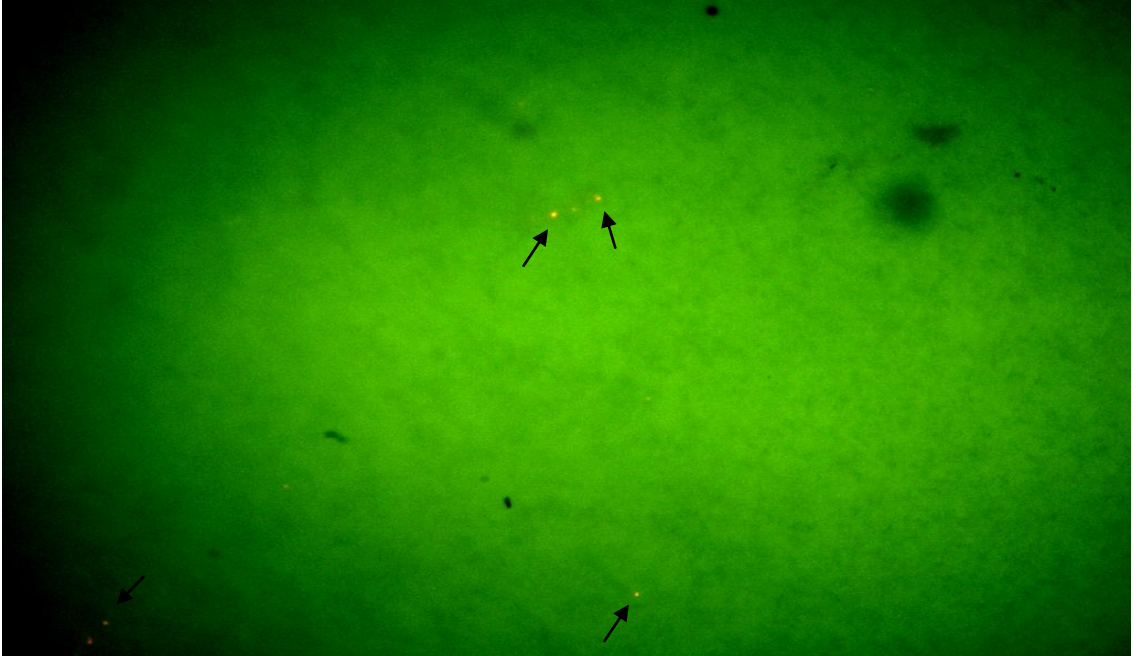
Şekil 4.40: Altı aylık deney süresinde aylık olarak alınan biyofilm örneklerinde ölçülen karbonhidrat miktarı



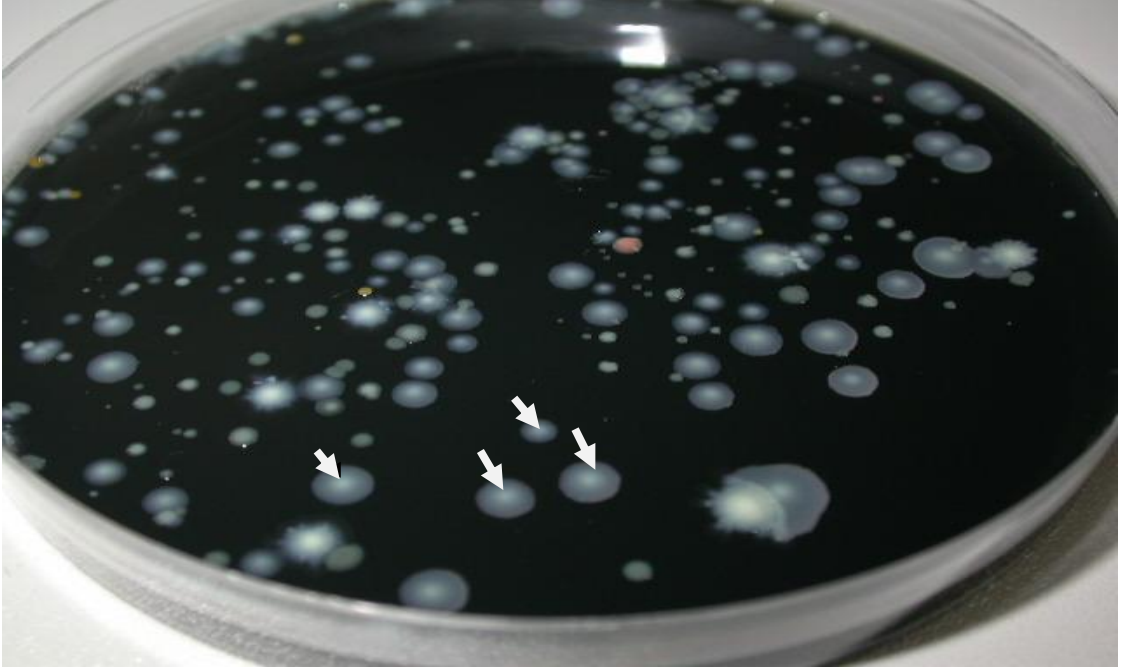
Şekil 4.41: Altı aylık deney süresinde aylık olarak ölçülen pH ve oksijen miktarları



Şekil 4.42: Epifloresan mikroskopta DAPI ile boyanmış bakteri hücreleri (mavi sinyaller)



Şekil 4. 43: Epifloresan mikroskopta görüntülenen canlı bakteri hücreleri (kırmızı sinyaller)



Şekil 4.44: BCYE agarda üremiş *L. pneumophila* kolonileri

4.3.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

4.3.1. HBS sonuçları

4.3.1.1. 1.Parametre: 60 °C

60°C parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.2. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 8.427, p<.0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 118.947, p<.0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 7.888, p<.0001$).

Tablo 4.2: 60 °C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma Sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	1342.542	2071.352	12
	Kontrol	53886	51240.3	12
	Toplam	27614.27	44474.39	24
2	Deney	185.1667	641.4361	12
	Kontrol	19443.54	9619.611	12
	Toplam	9814.354	11883.02	24
3	Deney	32.375	83.52983	12
	Kontrol	35760.63	7902.851	12
	Toplam	17896.5	19049.28	24
4	Deney	50.875	98.88104	12
	Kontrol	44144.79	8777.686	12
	Toplam	22097.83	23324.99	24
5	Deney	64.75	113.0827	12
	Kontrol	23694.58	16726.23	12
	Toplam	11879.67	16717.33	24
6	Deney	60.04167	76.40605	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	675.4583	683.6351	24
Toplam	Deney	289.2917	980.5325	72
	Kontrol	29703.4	28048.48	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.3: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	17799.92	.000
	3	9717.77	.039
	5	15734.60	.001
	6	26938.81	.000
2	1	-17799.92	.000
	4	-12283.48	.001
3	1	-9717.77	.039
	6	4671.32	.000
4	2	12283.48	.001
	5	10218.17	.003
	6	21422.38	.000
5	1	-15734.60	.000
	4	-10218.17	.003
	6	11204.21	.018
6	1	-26938.81	.000
	3	-17221.04	.000
	4	-21422.38	.000
	5	-11204.21	.018

4.3.1.2. 2. Parametre: 4 °C

4°C parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.4. 'te sunulmuş olup, bu değişkenler açısından mikroorganizma sayılarının farklılaşıp farklılaşmadığı iki yönlü varyans analiziyle incelenmiştir. Sonuçlar hem aylar ($F(5,132) = 8.294, p<.0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 4.469, p<.05$) arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermekle birlikte, aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 2.312, p<.05$).

Tablo 4.4: 4°C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	144068.5	184149.4	12
	Kontrol	53886	51240.3	12
	Toplam	98977.25	139984.4	24
2	Deney	24952.29	11289.64	12
	Kontrol	19443.54	9619.611	12
	Toplam	22197.92	10636.28	24
3	Deney	58043.29	29562.95	12
	Kontrol	35760.63	7902.851	12
	Toplam	46901.96	24028.75	24
4	Deney	45825.67	3667.048	12
	Kontrol	44144.79	8777.686	12
	Toplam	44985.23	6634.551	24
5	Deney	24071.5	18219.5	12
	Kontrol	23694.58	16726.23	12
	Toplam	23883.04	17105.48	24
6	Deney	3803.792	2833.599	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	2547.333	2357.282	24
Toplam	Deney	50127.51	86911.01	72
	Kontrol	29703.4	28048.48	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.5: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	76779.33	.000
	3	52075.29	.002
	4	53992.02	.001
	5	75094.2	.000
	6	26938.81	.000
2	1	96429.92	.000
3	1	-52075.29	.002
	6	44354.63	.007
4	1	-53992.02	.001
	6	42437.9	.001
5	1	-75094.21	.000
6	1	-96429.92	.000
	3	-44354.63	.007
	4	-42437.9	.01

4.3.1.3. 3.Parametre: pH 3

pH 3 parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.6. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 8.410$, $p<.0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 118.862$, $p<.0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 7.884$, $p<.0001$).

Tablo 4.6: pH 3 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	1249.917	2882.884	12
	Kontrol	53886	51240.3	12
	Toplam	27567.96	44524.55	24
2	Deney	138.875	251.2343	12
	Kontrol	19443.54	9619.611	12
	Toplam	9791.208	11895.6	24
3	Deney	129.5833	209.6369	12
	Kontrol	35760.63	7902.851	12
	Toplam	17945.1	19002.19	24
4	Deney	9.25	21.60335	12
	Kontrol	44144.79	8777.686	12
	Toplam	22077.02	23345.43	24
5	Deney	166.5833	211.8356	12
	Kontrol	23694.58	16726.23	12
	Toplam	11930.58	16680.28	24
6	Deney	0	0	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	645.4375	709.9736	24
Toplam	Deney	282.3681	1226.879	72
	Kontrol	29703.4	28048.48	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.7: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	17776.75	.000
	3	9622.85	.004
	5	15637.38	0.001
	6	26922.52	.000
2	1	-17776.75	.000
	4	-12285.81	.001
3	1	-9622.85	.041
	6	17299.67	.000
4	2	12285.81	.001
	5	10146.44	.032
	6	21431.58	.000
5	1	-15637.38	.001
	4	-10146.44	.032
	6	11285.15	.017
6	1	-26922.52	.000
	3	-17299.67	.000
	4	-21431.58	.000
	5	-11285.15	.017

4.3.1.4. 4. Parametre: pH 5

pH 5 parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.8. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 10.583$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 96.788$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 6.735$, $p < .0001$).

Tablo 4.8: pH 5 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	833.29167	1649.7109	12
	Kontrol	53886	51240.304	12
	Toplam	27359.646	44623.416	24
2	Deney	277.75	803.25167	12
	Kontrol	19443.542	9619.6106	12
	Toplam	9860.6458	11848.626	24
3	Deney	2961.4583	1461.7248	12
	Kontrol	35760.625	7902.8505	12
	Toplam	19361.042	17650.25	24
4	Deney	12961.333	4092.48	12
	Kontrol	44144.792	8777.6855	12
	Toplam	28553.063	17278.041	24
5	Deney	1406.25	1264.3963	12
	Kontrol	23694.583	16726.233	12
	Toplam	12550.417	16252.946	24
6	Deney	97.166667	172.60956	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	694.02083	674.78373	24
Toplam	Deney	3089.5417	4935.8171	72
	Kontrol	29703.403	28048.482	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.9: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	17499	.000
	5	14809.23	.002
	6	26665.63	.000
2	1	-17499	.000
	3	-9500.4	.045
	4	-18692.42	.000
3	2	9500.4	.045
	6	18667.02	.000
4	2	18692.42	.000
	5	16002.65	.001
	6	27859.04	.000
5	2	-15734.6	.002
	4	-16002.65	.013
	6	11856.4	.001
6	1	-26665.63	.000
	3	-18667.02	.000
	4	-27859.04	.000
	5	-11856.4	.013

4.3.1.5. 5. Parametre: pH 11

pH 11 parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.10. 'da sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 10.583$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 96.788$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 6.735$, $p < .0001$).

Tablo 4.10: pH 11 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	92.583333	216.22808	12
	Kontrol	53886	51240.304	12
	Toplam	26989.292	44839.889	24
2	Deney	92.583333	320.71807	12
	Kontrol	19443.542	9619.6106	12
	Toplam	9768.0625	11916.001	24
3	Deney	9.25	21.603346	12
	Kontrol	35760.625	7902.8505	12
	Toplam	17884.938	19060.516	24
4	Deney	32.375	68.826239	12
	Kontrol	44144.792	8777.6855	12
	Toplam	22088.583	23334.067	24
5	Deney	0	0	12
	Kontrol	23694.583	16726.233	12
	Toplam	11847.292	16741.04	24
6	Deney	101.83333	319.40309	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	696.35417	697.8355	24
Toplam	Deney	54.770833	203.93939	72
	Kontrol	29703.403	28048.482	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.11: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	17499	.000
	5	14809.23	.002
	6	26665.63	.000
2	1	-17499	.000
	3	-9500.4	.045
	4	-18692.42	.000
3	2	9500.4	.045
	6	18667.02	.000
4	2	18692.42	.000
	5	16002.65	.001
	6	27859.04	.000
5	2	-15734.6	.002
	4	-16002.65	.013
	6	11856.4	.001
6	1	-26665.63	.000
	3	-18667.02	.000
	4	-27859.04	.000
	5	-11856.4	.013

4.3.1.6. 6. Parametre: Saf Su

Saf su parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.12. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 9.020$, $p<.0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 75.786$, $p<.0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 7.142$, $p<.0001$).

Tablo 4.12: Saf Su Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	3657.3333	4099.3277	12
	Kontrol	53886	51240.304	12
	Toplam	28771.667	43839.44	24
2	Deney	3425.75	5046.4196	12
	Kontrol	19443.542	9619.6106	12
	Toplam	11434.646	11107.095	24
3	Deney	6519.9583	4824.5554	12
	Kontrol	35760.625	7902.8505	12
	Toplam	21140.292	16249.608	24
4	Deney	2424.375	767.14587	12
	Kontrol	44144.792	8777.6855	12
	Toplam	23284.583	22162.991	24
5	Deney	1725.25	1775.0362	12
	Kontrol	23694.583	16726.233	12
	Toplam	12709.917	16162.226	24
6	Deney	453.25	957.7375	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	872.0625	831.3126	24
Toplam	Deney	3034.3194	3807.895	72
	Kontrol	29703.403	28048.482	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.13: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	17337.02	.000
	5	16061.75	.001
	6	27899.6	.000
2	1	-17337.02	.000
	3	-9705.65	.042
	4	-11849.94	.013
	6	10562.58	.027
3	2	9705.65	.042
	6	20268.23	.000
4	2	11849.94	.013
	5	10574.67	.027
	6	22412.52	.000
5	1	-16061.75	.001
	4	-10574.67	.027
	6	11837.85	.013
6	1	-27899.6	.000
	2	-10562.58	.027
	3		.000
	4	-22412.52	.000
	5	-11837.85	.013

4.3.1.7. 7. Parametre: 3M Tuz çözeltisi

3M Tuz çözeltisi parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.14. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 8.103$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 119.240$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 8.207$, $p < .0001$).

Tablo 4.14: 3M Tuz Çözeltisi Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	46.291667	160.35904	12
	Kontrol	53886	51240.304	12
	Toplam	26966.146	44854.268	24
2	Deney	1018.5	2129.7933	12
	Kontrol	19443.542	9619.6106	12
	Toplam	10231.021	11618.38	24
3	Deney	263.625	288.0221	12
	Kontrol	35760.625	7902.8505	12
	Toplam	18012.125	18937.127	24
4	Deney	161.95833	314.63814	12
	Kontrol	44144.792	8777.6855	12
	Toplam	22153.375	23271.135	24
5	Deney	23.125	37.104965	12
	Kontrol	23694.583	16726.233	12
	Toplam	11858.854	16732.523	24
6	Deney	4.625	16.02147	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	647.75	707.86717	24
Toplam	Deney	253.02083	928.56373	72
	Kontrol	29703.403	28048.482	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.15: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	16735.13	.000
	5	15107.29	.002
	6	26318.4	.000
2	1	-16735.13	.000
	4	-11922.35	.012
	6	9583.27	.042
3	6	17364.38	.000
4	2	11922.35	.012
	5	10294.52	.029
	6	21505.63	.000
5	1	-15107.29	.002
	4	-10294.52	.029
	6	11211.1	.018
6	1	-26318.4	.00
	2	-9583.27	.042
	3	-17364.38	.000
	4	-21505.63	.000
	5	-11211.1	.018

4.3.1.8. 8. Parametre: 2 ppm Monokloramin

2 ppm monokloramin parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.16. 'da sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 8.103$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 119.240$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 8.207$, $p < .0001$).

Tablo 4.16: 2 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	0	0	0
	Kontrol	0	0	0
	Toplam	0	0	0
2	Deney	92.583333	320.71807	12
	Kontrol	19443.542	9619.6106	12
	Toplam	9768.0625	11916.001	24
3	Deney	171.20833	313.74421	12
	Kontrol	35760.625	7902.8505	12
	Toplam	17965.917	18982.518	24
4	Deney	208.16667	209.24891	12
	Kontrol	44144.792	8777.6855	12
	Toplam	22176.479	23247.785	24
5	Deney	536.75	440.76687	12
	Kontrol	23694.583	16726.233	12
	Toplam	12115.667	16546.751	24
6	Deney	0	0	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	645.4375	709.97361	24
Toplam	Deney	201.74167	340.05855	60
	Kontrol	24866.883	17733.711	60

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.17: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	16735.13	.000
	5	15107.29	.002
	6	26318.4	.000
2	1	-16735.13	.000
	4	-11922.35	.012
	6	9583.27	.042
3	6	17364.38	.000
4	2	11922.35	.012
	5	10294.52	.029
	6	21505.63	.000
5	1	-15107.29	.002
	4	-10294.52	.029
	6	11211.1	.018
6	1	-26318.4	.00
	2	-9583.27	.042
	3	-17364.38	.000
	4	-21505.63	.000
	5	-11211.1	.018

4.3.1.9. 9. Parametre: 500 ppm Monokloramin

500 ppm monokloramin parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.18. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 8.169$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 121.353$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 8.157$, $p < .0001$).

Tablo 4.18: 500 ppm Monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	46.291667	160.35904	12
	Kontrol	53886	51240.304	12
	Toplam	26966.146	44854.268	24
2	Deney	46.291667	160.35904	12
	Kontrol	19443.542	9619.6106	12
	Toplam	9744.9167	11934.074	24
3	Deney	0	0	12
	Kontrol	35760.625	7902.8505	12
	Toplam	17880.313	19065.037	24
4	Deney	0	0	12
	Kontrol	44144.792	8777.6855	12
	Toplam	22072.396	23349.985	24
5	Deney	0	0	12
	Kontrol	23694.583	16726.233	12
	Toplam	11847.292	16741.04	24
6	Deney	0	0	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	645.4375	709.97361	24
Toplam	Deney	15.430556	91.929026	72
	Kontrol	29703.403	28048.482	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.19: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	17221.23	.000
	5	15118.85	.002
	6	26320.71	.000
2	1	-17221.23	.000
	4	-12327.48	.009
3	6	17234.88	.000
4	2	12327.48	.009
	5	10225.1	.003
	6	21426.96	.000
5	1	-15118.85	.002
	4	-10225.1	.003
	6	11201.85	.018
6	1	-26320.71	.000
	3	-17234.88	.000
	4	-21426.96	.000
	5	-11201.85	.001

4.3.1.10. 10. Parametre: 1000 ppm Monokloramin

1000 ppm monokloramin parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.20. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,132) = 8.163$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,132) = 121.481$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,132) = 8.163$, $p < .0001$).

Tablo 4.20: 1000 ppm Monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	0	0	12
	Kontrol	53886	51240.304	12
	Toplam	26943	44868.63	24
2	Deney	0	0	12
	Kontrol	19443.542	9619.6106	12
	Toplam	9721.7708	11953.195	24
3	Deney	0	0	12
	Kontrol	35760.625	7902.8505	12
	Toplam	17880.313	19065.037	24
4	Deney	0	0	12
	Kontrol	44144.792	8777.6855	12
	Toplam	22072.396	23349.985	24
5	Deney	0	0	12
	Kontrol	23694.583	16726.233	12
	Toplam	11847.292	16741.04	24
6	Deney	0	0	12
	Kontrol	1290.875	380.8231	12
	Toplam	645.4375	709.97361	24
Toplam	Deney	0	0	72
	Kontrol	29703.403	28048.482	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.21: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	17221.23	.000
	5	15095.71	.002
	6	26297.56	.000
2	1	-17221.23	.000
	4	-12350.63	.009
3	6	17234.88	.000
4	2	12350.63	.009
	5	10225.1	.003
	6	21426.96	.000
5	1	-15095.71	.002
	4	-10225.1	.003
	6	11201.85	.018
6	1	-26938.81	.000
	3	-17234.88	.000
	4	-21426.96	.000
	5	-11201.85	.018

4.3.1.11. Parametreler Arası Farkların İncelenmesi

Parametrelere göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.22. 'de sunulmuş olup, parametreler açısından mikroorganizma sayılarının farklılaşıp farklılaşmadığı tek yönlü varyans analiziyle incelenmiş ve bu değişken açısından anlamlı bir farklılaşma tespit edilmiştir ($F(9,698) = 22.775, p < .05$).

Tablo 4.22: Parametrelere Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Parametre	N	Ort.	Std
60 °C	72	289.2917	980.53251
4 °C	72	50127.51	86911.01396
pH 3	72	282.3981	1226.87893
pH 5	72	3089.5417	4935.8171
pH 11	72	54.7708	203.93939
Saf su	72	3034.3194	3807.89504
3M Tuz çözeltisi	72	253.0208	928.56373
2 ppm monokloramin	72	201.7417	340.05855
500 ppm monokloramin	72	15.4306	91.92903
1000 ppm monokloramin	72	0	0

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi parametrelerin mikroorganizma sayıları açısından birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.23. 'te ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları sadece anlamlı fark olan parametreler için verilmiştir.

Tablo 4.23: Parametreler Arasındaki Anlamlı Farklılaşmaları Gösteren Post-Hoc Analiz Sonuçları

Parametre	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Parametre	Ortalama Farkı	Anlamlılık Değeri
60 °C	4 °C	-49838.215	.000
4 °C	60 °C	49838.2153	.000
	pH=3	49845.1389	.000
	pH=5	47037.9653	.000
	pH=11	50072.7361	.000
	Saf su	47093.1875	.000
	3M Tuz çözeltisi	49874.4861	.000
	2 ppm monokloramin	49925.7653	.000
	500 ppm monokloramin	50112.0764	.000
	1000 ppm monokloramin	50127.5069	.000
pH 3	4 °C	-49845.139	.000
pH 5	4 °C	-47037.965	.000
pH 11	4 °C	-50072.736	.000
Saf su	4 °C	-47093.188	.000
3M Tuz Çözeltisi	4 °C	-47874.486	.000
2 ppm monokloramin	4 °C	-49925.765	.000
500 ppm monokloramin	4 °C	-50112.076	.000
1000 ppm monokloramin	4 °C	-50127.507	.000

4.3.2. Epifloresan Sonuçları

4.3.2.1. 1.Parametre: Kontrol

Direkt parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.24.'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 5.984$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 68.330$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 6.221$, $p < .0001$).

Tablo 4.24: Direkt Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	9504.94	21825.642	12
	Kontrol	129900.89	83782.168	12
	Toplam	69702.915	85827.183	24
2	Deney	34851.28	29319.408	12
	Kontrol	287524.44	163836.5	12
	Toplam	161187.86	172926.81	24
3	Deney	14257.41	14329.236	12
	Kontrol	499653.22	654429.05	12
	Toplam	256955.32	516129.59	24
4	Deney	7920.7833	14519.036	12
	Kontrol	652673.3	303680.23	12
	Toplam	330297.04	390706.84	24
5	Deney	25346.507	24763.75	12
	Kontrol	224950.25	50349.818	12
	Toplam	125148.38	109083.48	24
6	Deney	11881.175	9175.188	12
	Kontrol	99009.792	57668.129	12
	Toplam	55445.483	60092.734	24
Toplam	Deney	17293.683	21775.662	72
	Kontrol	315618.65	356374.13	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.25: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	3	-187252.4	.003
	4	-260594.13	.000
2	4	-169109.18	.008
3	1	187252.4	.003
	5	131806.94	.037
	6	201509.83	.002
4	1	260594.13	.008
	2	169109.18	.000
	5	205148.66	.001
	6	274851.55	.000
5	3	-131806.94	.037
	4	-205148.66	.000
6	3	-201509.83	.002
	4	-274851.56	.000

4.3.2.2. 2.Parametre: 60 °C

60°C parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.26. 'da sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 6.710$, $p<.0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 119.269$, $p<.0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 5.683$, $p<.0001$).

Tablo 4.26: 60 °C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	22178.193	33989.802	12
	Kontrol	79999.912	35206.402	12
	Toplam	51089.053	44916.772	24
2	Deney	5544.5483	6354.6029	12
	Kontrol	94257.322	85348.216	12
	Toplam	49900.935	74539.579	24
3	Deney	17425.723	22504.961	12
	Kontrol	128400.02	113186.56	12
	Toplam	72912.873	97887.723	24
4	Deney	792.07833	2743.8398	12
	Kontrol	53861.327	27288.324	12
	Toplam	27326.703	33082.285	24
5	Deney	2376.235	5908.0954	12
	Kontrol	152871.12	17878.079	12
	Toplam	77623.677	77961	24
6	Deney	2376.235	4298.7709	12
	Kontrol	33267.29	13744.121	12
	Toplam	17821.763	18657.935	24
Toplam	Deney	8448.8356	18504.869	72
	Kontrol	90442.832	72120.474	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.27: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	5	-26534.62	.043
	6	33267.29	.012
2	5	-27722.74	.035
	6	32079.17	.015
3	4	45586.17	.001
	6	55091.11	.000
4	3	-45586.17	.001
	5	-50296.97	.000
5	1	26534.62	.043
	2	27722.74	.035
	4	50296.97	.000
	6	59801.91	.000
6	1	-33267.29	.000
	2	-32079.17	.015
	3	-55091.11	.000
	5	-59801.91	.000

4.3.2.3. 3. Parametre: 4 °C

4°C parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.28. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 6.710$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 119.269$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 5.683$, $p < .0001$).

Tablo 4.28: 4 °C Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	4752.47	8597.5417	12
	Kontrol	88671.518	38992.435	12
	Toplam	46711.994	50986.803	24
2	Deney	2376.235	8231.5195	12
	Kontrol	33267.29	28514.82	12
	Toplam	17821.763	25888.494	24
3	Deney	17425.723	18049.53	12
	Kontrol	175841.39	27036.349	12
	Toplam	96633.557	83976.546	24
4	Deney	9504.94	7185.0593	8
	Kontrol	191682.96	55398.144	12
	Toplam	118811.75	100897.62	20
5	Deney	26930.663	30821.74	12
	Kontrol	363563.96	102220.8	12
	Toplam	195247.31	187120.24	24
6	Deney	7128.705	10818.336	12
	Kontrol	43564.308	41024.347	12
	Toplam	25346.507	34744.838	24
Toplam	Deney	11461.839	18254.244	68
	Kontrol	149431.9	125690.78	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.29: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	5	-26534.62	.043
	6	33267.29	.012
2	5	-27722.74	.035
	6	32079.17	.015
3	4	45586.17	.001
	6	55091.11	.000
4	3	-45586.17	.001
	5	-50296.97	.000
5	1	26534.62	.043
	2	27722.74	.035
	4	50296.97	.000
	6	59801.91	.000
6	1	-33267.29	.000
	2	-32079.17	.015
	3	-55091.11	.000
	5	-59801.91	.000

4.3.2.4. 4. Parametre: pH 3

pH 3 parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.30. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 6.710$, $p<.0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 119.269$, $p<.0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 5.683$, $p<.0001$).

Tablo 4.30: pH 3 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	0	0	12
	Kontrol	121980.06	48267.765	12
	Toplam	60990.032	70680.655	24
2	Deney	4752.47	4963.793	12
	Kontrol	68910.815	64354.066	12
	Toplam	36831.643	55374.101	24
3	Deney	16633.645	19489.868	12
	Kontrol	163960.22	37830.269	12
	Toplam	90296.93	80798.067	24
4	Deney	792.07833	2743.8398	12
	Kontrol	159999.82	61710.061	12
	Toplam	80395.951	91854.067	24
5	Deney	792.07833	2743.8398	12
	Kontrol	259801.69	39154.927	12
	Toplam	130296.89	135046.35	24
6	Deney	0	0	12
	Kontrol	38019.76	11463.389	12
	Toplam	19009.88	20974.638	24
Toplam	Deney	3828.3786	10046.39	72
	Kontrol	135445.4	85488.662	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.31: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	5	-26534.62	.043
	6	33267.29	.012
2	5	-27722.74	.035
	6	32079.17	.015
3	4	45586.17	.001
	6	55091.11	.000
4	3	-45586.17	.001
	5	-50296.97	.000
5	1	26534.62	.043
	2	27722.74	.035
	4	50296.97	.000
	6	59801.91	.000
6	1	-33267.29	.000
	2	-32079.17	.015
	3	-55091.11	.000
	5	-59801.91	.000

4.3.2.5. 5. Parametre: pH 5

pH 5 parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.32. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 7.349$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 338.195$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 6.493$, $p < .0001$).

Tablo 4.32: pH 5 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	2376.235	4298.7709	12
	Kontrol	122730.89	36329.871	12
	Toplam	62553.561	66474.311	24
2	Deney	8712.8617	20449.515	12
	Kontrol	135445.4	66116.655	12
	Toplam	72079.128	80501.783	24
3	Deney	16633.645	31164.03	12
	Kontrol	125148.38	34825.252	12
	Toplam	70891.011	64158.983	24
4	Deney	13465.332	11787.194	12
	Kontrol	76039.52	24317.52	12
	Toplam	44752.426	37023.055	24
5	Deney	4752.47	8597.5417	12
	Kontrol	122772.14	48543.482	12
	Toplam	63762.306	69252.568	24
6	Deney	2376.235	5908.0954	12
	Kontrol	51485.092	25458.769	12
	Toplam	26930.663	30916.211	24
Toplam	Deney	8052.7964	16932.44	72
	Kontrol	105603.57	50832.798	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.33: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	6	35622.9	.000
2	4	27326.7	.004
	6	45148.47	.000
3	4	26138.59	.005
	6	43960.35	.000
4	2	-27326.7	.004
	3	-26138.59	.005
	5	-19009.88	.041
5	4	19009.88	.041
	6	36831.65	.000
6	1	-35622.9	.000
	2	-45148.47	.000
	3	-43960.35	.000
	5	-36831.65	.000

4.3.2.6. 6. Parametre: pH 11

pH 11 parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.34. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 10.851$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 174.986$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 11.591$, $p < .0001$).

Tablo 4.34: pH 11 Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	3168.3133	6190.9376	12
	Kontrol	57821.718	28789.524	12
	Toplam	30495.016	34553.535	24
2	Deney	19801.958	54142.269	12
	Kontrol	72079.128	48373.996	12
	Toplam	45940.543	56868.701	24
3	Deney	4752.47	13744.121	12
	Kontrol	53069.248	19206.879	12
	Toplam	28910.859	29593.567	24
4	Deney	7128.705	11552.6	12
	Kontrol	142574.1	66101.125	12
	Toplam	74851.403	83302.426	24
5	Deney	0	0	12
	Kontrol	148118.65	62322.569	12
	Toplam	74059.324	87068.172	24
6	Deney	2376.235	5908.0954	12
	Kontrol	35643.525	12896.313	12
	Toplam	19009.88	19619.977	24
Toplam	Deney	6204.6136	23616.502	72
	Kontrol	84884.395	61832.578	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.35: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	4	-44356.39	.000
	5	-43564.31	.000
2	4	-28910.86	.006
	5	-28118.78	.007
	6	26930.66	.010
3	4	-45940.54	.000
	5	-45148.47	.000
4	1	44356.39	.000
	2	28910.86	.006
	3	45940.54	.000
	6	55841.52	.000
5	1	43564.31	.000
	2	28118.78	.007
	3	45148.47	.000
	6	55049.44	.000
6	2	-26930.66	.010
	4	-55841.52	.000
	5	-55049.44	.000

4.3.2.7. 7. Parametre: Saf Su

Saf su parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.26. 'da sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 13.784$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 190.348$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 14.881$, $p < .0001$).

Tablo 4.36: Saf Su Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	23762.35	47524.7	12
	Kontrol	71287.05	67393.126	12
	Toplam	47524.7	61980.473	24
2	Deney	75247.442	63497.544	12
	Kontrol	163243.14	60680.057	12
	Toplam	119245.29	75559.805	24
3	Deney	26930.663	62371.968	12
	Kontrol	127524.61	36803.177	12
	Toplam	77227.638	71750.459	24
4	Deney	12356.422	16795.049	10
	Kontrol	239999.74	62410.363	12
	Toplam	136525.5	124985.11	22
5	Deney	8712.8617	21620.85	12
	Kontrol	217821.54	69900.632	12
	Toplam	113267.2	118183.31	24
6	Deney	17425.723	19366.569	12
	Kontrol	53069.248	32285.86	12
	Toplam	35247.486	31769.971	24
Toplam	Deney	27835.896	48013.18	70
	Kontrol	145490.89	88780.112	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.37: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	4	-44356.39	.000
	5	-43564.31	.000
2	4	-28910.86	.006
	5	-28118.78	.007
	6	26930.66	.010
3	4	-45940.54	.000
	5	-45148.47	.000
4	1	44356.39	.000
	2	28910.86	.006
	3	45940.54	.000
	6	55841.52	.000
5	1	43564.31	.000
	2	28118.78	.007
	3	45148.47	.000
	6	55049.44	.000
6	2	-26930.66	.010
	4	-55841.52	.000
	5	-55049.44	.000

4.3.2.8. 8. Parametre: 3M Tuz çözeltisi

3M Tuz çözeltisi parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.38. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 29.597$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 238.484$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 17.099$, $p < .0001$).

Tablo 4.38: 3M Tuz Çözeltisi Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	9504.94	24317.52	12
	Kontrol	15841.576	10199.628	12
	Toplam	12673.258	18521.473	24
2	Deney	58613.797	61443.301	12
	Kontrol	190098.8	68780.334	12
	Toplam	124356.3	92617.959	24
3	Deney	11881.175	21872.63	12
	Kontrol	127524.61	55342.52	12
	Toplam	69702.893	71988.435	24
4	Deney	16633.645	20715.536	12
	Kontrol	190098.8	57887.277	12
	Toplam	103366.22	98272.41	24
5	Deney	23762.35	27932.824	12
	Kontrol	201979.98	55441.368	12
	Toplam	112871.16	100642.07	24
6	Deney	8712.8617	11068.504	12
	Kontrol	48316.778	20449.515	12
	Toplam	28514.82	25841.036	24
Toplam	Deney	21518.128	35528.183	72
	Kontrol	128976.76	87810.018	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.39: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	-111683.04	.000
	3	-57029.64	.000
	4	-90692.97	.000
	5	-100197.91	.000
2	1	111683.04	.000
	3	54653.41	.000
	6	95841.48	.000
3	1	57029.64	.000
	2	-54653.41	.000
	4	-33663.33	.006
	5	-43168.27	.001
	6	41188.07	.001
4	1	90692.97	.000
	3	33663.33	.006
	6	74851.4	.000
5	1	100197.91	.000
	3	43168.27	.001
	6	84356.34	.000
6	2	-95841.48	.000
	3	-41188.07	.001
	4	-74851.4	.000
	5	-84356.34	.000

4.3.2.9. 9. Parametre: 2 ppm Monokloramin

2 ppm monokloramin parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.40. 'da sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 81.906$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 282.552$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 40.168$, $p < .0001$).

Tablo 4.40: 2 ppm Monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	0	0	0
	Kontrol	0	0	0
	Toplam	0	0	0
2	Deney	128316.69	46476.232	12
	Kontrol	195643.35	43737.436	12
	Toplam	161980.02	55950.41	24
3	Deney	10297.018	21620.85	12
	Kontrol	158411.17	46088.383	12
	Toplam	84354.093	83440.791	24
4	Deney	4752.47	6408.2292	12
	Kontrol	86305.987	22453.93	12
	Toplam	45529.228	44674.448	24
5	Deney	13465.332	25458.769	12
	Kontrol	267722.48	74933.366	12
	Toplam	140593.9	140924.73	24
6	Deney	4759.97	7597.7326	12
	Kontrol	43564.308	35438.918	12
	Toplam	24162.139	31954.265	24
Toplam	Deney	26931.913	51247.585	72
	Kontrol	125274.55	101280.17	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.41: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	-161980.02	.000
	3	-84354.09	.000
	4	-45529.23	.000
	5	-140593.9	.000
	6	-24162.14	.019
2	1	161980.02	.000
	3	77625.93	.000
	4	116450.79	.000
	5	21386.12	.037
	6	137817.88	.000
3	1	84354.09	.000
	2	-77625.93	.000
	4	38824.86	.000
	5	-56239.81	.000
	6	60191.95	.000
4	1	45529.23	.000
	2	-116450.79	.000
	3	-38824.86	.000
	5	-95064.68	.000
	6	21367.09	.037
5	1	140593.9	.000
	2	-21386.12	.037
	3	56239.81	.000
	4	95064.68	.000
	6	116431.77	.000
6	1	24162.14	.019
	2	-137817.88	.000
	3	-60191.95	.000
	4	-21367.09	.037
	5	-116431.77	.000

4.3.2.10. 10. Parametre: 500 ppm Monokloramin

500 ppm monokloramin parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.42. 'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 81.906$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 282.552$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 40.168$, $p < .0001$).

Tablo 4.42: 500 ppm Monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	4752.47	11099.379	12
	Kontrol	87128.617	59680.308	12
	Toplam	45940.543	59435.484	24
2	Deney	23762.35	27036.349	12
	Kontrol	88712.773	37658.003	12
	Toplam	56237.562	46133.704	24
3	Deney	5544.5483	11787.194	12
	Kontrol	141504.75	52710.943	12
	Toplam	73524.65	78851.059	24
4	Deney	2376.235	8231.5195	12
	Kontrol	171881	63238.325	12
	Toplam	87128.617	97161.11	24
5	Deney	19801.958	20043.865	12
	Kontrol	179801.78	51816.917	12
	Toplam	99801.87	90302.367	24
6	Deney	4752.47	7582.3191	12
	Kontrol	32475.212	13719.199	12
	Toplam	18613.841	17832.665	24
Toplam	Deney	10165.005	17499.097	72
	Kontrol	116917.36	70974.769	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.43: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	2	-161980.02	.000
	3	-84354.09	.000
	4	-45529.23	.000
	5	-140593.9	.000
	6	-24162.14	.019
2	1	161980.02	.000
	3	77625.93	.000
	4	116450.79	.000
	5	21386.12	.037
	6	137817.88	.000
3	1	84354.09	.000
	2	-77625.93	.000
	4	38824.86	.000
	5	-56239.81	.000
	6	60191.95	.000
4	1	45529.23	.000
	2	-116450.79	.000
	3	-38824.86	.000
	5	-95064.68	.000
	6	21367.09	.037
5	1	140593.9	.000
	2	-21386.12	.037
	3	56239.81	.000
	4	95064.68	.000
	6	116431.77	.000
6	1	24162.14	.019
	2	-137817.88	.000
	3	-60191.95	.000
	4	-21367.09	.037
	5	-116431.77	.000

4.3.2.11. 11. Parametre: 1000 ppm Monokloramin

1000 ppm monokloramin parametresinde aylar ve deney/kontrol grubu açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.44.'de sunulmuştur. İki yönlü varyans analizi sonuçları, mikroorganizma sayılarının hem aylar ($F(5,144) = 40.168$, $p < .0001$) hem de gruplar ($F(1,144) = 223.137$, $p < .0001$) arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. Aynı zamanda aylar ve gruplar arasındaki etkileşim etkisi de yine anlamlıdır ($F(5,144) = 19.751$, $p < .0001$).

Tablo 4.44: 1000 ppm monokloramin Parametresinde Ay ve Grup Değişkenlerine Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

Aylar	Gruplar	Mikroorganizma sayıları		N
		Ort.	Std.	
1	Deney	3168.3133	6190.9376	12
	Kontrol	79999.912	77373.453	12
	Toplam	41584.113	66493.98	24
2	Deney	19009.88	18125.209	12
	Kontrol	84752.382	38333.497	12
	Toplam	51881.131	44580.285	24
3	Deney	3960.3917	11068.504	12
	Kontrol	41188.073	10975.359	12
	Toplam	22574.233	21857.319	24
4	Deney	1584.1567	3699.7929	12
	Kontrol	210692.84	74051.334	12
	Toplam	106138.5	118473.78	24
5	Deney	2376.235	8231.5195	12
	Kontrol	91881.087	25418.412	12
	Toplam	47128.661	49307.862	24
6	Deney	5544.5483	11068.504	12
	Kontrol	47524.7	12816.458	12
	Toplam	26534.624	24431.364	24
Toplam	Deney	5940.5875	11984.477	72
	Kontrol	92673.165	73030.612	72

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi aylardaki mikroorganizma sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 4.45: Aylara Göre Deney ve Kontrol Grubunda Ölçülen Mikroorganizma Sayı Dağılımları (Sadece Anlamlı Fark Olan Aylar)

Aylar	Anlamlı Olarak Farklılaştığı Aylar	Ortalama Farkları	Anlamlılık Değeri
1	4	-64554.38	.000
2	3	29306.9	.004
	4	-54257.37	.000
	6	25346.51	.013
3	2	-29306.9	.004
	4	-83564.26	.000
	5	-24554.43	.016
4	1	64554.38	.000
	2	54257.37	.000
	3	83564.26	.000
	5	59009.84	.000
	6	79603.87	.000
5	3	24554.43	.016
	4	-59009.84	.000
	6	20594.04	.044
6	2	-25346.51	.013
	4	-79603.87	.000
	5	-20594.04	.043

4.3.2.12. Parametreler Arası Farkların İncelenmesi

Parametrelere göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Tablo 4.46. 'da sunulmuş olup, parametreler açısından mikroorganizma sayılarının farklılaşıp farklılaşmadığı tek yönlü varyans analiziyle incelenmiş ve bu değişken açısından anlamlı bir farklılaşma tespit edilmiştir ($F(10,775) = 6.655$, $P < .05$).

Tablo 4.46: Parametrelere Göre Mikroorganizma Sayılarına Yönelik Tanımlayıcı İstatistikler

parametre adı	vaka sayısı	ortalama	standart sapma
Direkt	72	17293.68	21775.66
60 °C	72	8448.84	18504.87
4 °C	68	11461.84	18254.24
pH 3	72	3828.38	10046.39
pH 5	72	8052.8	16932.44
pH 11	72	6204.61	23616.5
Saf su	70	27835.9	48013.18
3M Tuz çözeltisi	72	21518.13	35528.18
2 ppm monokloramin	72	26931.91	51247.59
500 ppm monokloramin	72	10165.01	17499.1
1000 ppm monokloramin	72	5940.59	11984.48

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi parametrelerin mikroorganizma sayıları açısından birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır. Tablo 4.47. 'de ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları sadece anlamlı fark olan parametreler için verilmiştir.

Tablo 4.47: Parametreler Arasındaki Anlamlı Farklılaşmaları Gösteren Post-Hoc Analiz Sonuçları

parametre adı	anlamlı olduğu parametre	değer	anlamlılık değeri
Direkt	pH 3	13465.3	.004
	pH 5	9240.89	.049
	pH 11	11089.07	.018
	Saf su	-10542.21	.026
	2 ppm monokloramin	-9638.23	.04
	1000 ppm monokloramin	11353.1	.016
60 °C	Saf su	-19387.06	.000
	3M Tuz çözeltisi	-13069.29	.006
	2 ppm monokloramin	-18483.08	.000
4 °C	Saf su	-16374.06	.001
	3M Tuz çözeltisi	-10056.29	.035
	2 ppm monokloramin	-15470.07	.001
pH 3	Saf su	-24007.52	.000
	3M Tuz çözeltisi	-17689.75	.000
	2 ppm monokloramin	-23103.54	.000
pH 5	Direkt	-9240.89	.049
	Saf su	-19783.1	.000
	3M Tuz çözeltisi	-13465.33	.004
	2 ppm monokloramin	-18879.12	.000
pH 11	Direkt	-11089.07	.018
	Saf su	-21631.28	.000
	3M Tuz Çözeltisi	-15313.51	.001
	2 ppm monokloramin	-20727.3	.000
Saf su	Direkt	10542.21	.026
	60 °C	19387.06	.000
	4 °C	16374.06	.001
	pH 3	24007.52	.000
	pH 5	19783.1	.000
	pH 11	21631.28	.000
	500 ppm monokloramin	17670.89	.000
	1000 ppm monokloramin	21895.31	.000
	60 °C	13069.29	.005
	4 °C	10056.29	.035
3M Tuz çözeltisi	pH 3	17689.75	.000
	pH 5	13465.33	.004

	pH 11	15313.51	.001
	500 ppm monokloramin	11353.12	.016
	1000 ppm monokloramin	15577.54	.001
2 ppm monokloramin	Direkt	9638.23	.040
	60 °C	18483.08	.000
	4 °C	15470.07	.001
	pH 3	23103.54	.000
	pH 5	18879.12	.000
	pH 11	20727.3	.000
	500 ppm monokloramin	16766.91	.000
	1000 ppm monokloramin	20991.33	.000
500 ppm	Saf su	-17670.89	.000
	3M Tuz çözeltisi	-11353.12	.016
	500 ppm monokloramin	-16766.91	.000
1000 ppm	Direkt	-11353.1	.016
	Saf su	-21895.31	.000
	3M Tuz çözeltisi	-15577.54	.001
	2 ppm monokloramin	-20991.33	.000

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyofilm içinde bulunan mikroorganizmaların çevresel şartlardaki değişimler karşısında planktonik olan türlerine göre dirençli oldukları kabul görmüş bir gerçektir. Bu sebeple de 6 aylık çalışmamız kapsamında, biyofilm bakterilerinin çevresel şartlardaki değişimler karşısında sergiledikleri direnci gözlemlemek amacıyla meydana getirilen biyofilm örnekleri farklı parametrelere maruz bırakılmıştır. Bu amaçla uygulanan ilk parametre farklı sıcaklık değerleridir. Sıcaklık, biyolojik membranın kompozisyon, organizasyon ve fonksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Tüm organizmalar üreme sıcaklığının geniş aralığında hayatta kalabilmek için çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Mikroorganizmaların karşılaştıkları çevresel streslerden biri olan soğuğa karşı adaptasyon mekanizmasının en önemli kısmı, sitoplazmik membran seviyesinde meydana gelmektedir. Soğuk şoku, membran kompozisyonunu ve fonksiyonunun devamlılığını etkilemektedir. Logaritmik faz boyunca organizmalar sitoplazmik membran kompozisyonlarını ve soğuk şok proteinleri olarak adlandırılan özel protein gruplarının sentezini değiştirmektedirler. Soğuk şoku ve sıcaklık şoku yanıtları geri dönüşümlü ilişkiler olabilir. Soğuk şokunu ardından soğuk şok proteinleri artarken sıcaklık şoku proteinlerinde azalma gözlenmektedir (Usulu ve Tezcan, 2001). Soğuk şoku yanıtının ürünleri, düşük sıcaklık varlığında tehlikeye giren translasyonda görevli hücresel yapıların yeniden iyileştirilmesini sağlamak ve düşük sıcaklık aracılı mRNA'nın ikincil yapısını iyi yönde değiştirmektedir. Aksi takdirde bu durum translasyon sistemine ket vurmaktadır (Anderson ve diğ., 2006). Bu çalışma kapsamında 24 saat süreyle 4 °C'ye maruz bırakılan biyofilm örnekleri sonucunda HPC sayısında önemli sayıda bakteri elde edilmiştir. Bununla birlikte *L. pneumophila* sayısında azalma saptanmakla birlikte gerek kültür gerekse epifloresan tekniği ile canlı mikroorganizmaların varlığı tespit edilmiştir. Bu durumun biyofilmin sağladığı fiziksel koruyuculuğun yanında mikroorganizmalar tarafından geliştiren dirençten kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikroorganizmalara düşük sıcaklık varlığında olduğu gibi yüksek sıcaklık şartları altında da sıcaklık şoku faktörleri üretirler ve bu faktörler yüksek sıcaklık ile denature olan proteinleri ve kromozom topolojisindeki sıcaklığın yaptığı değişimleri onarmaktadır. Bu duruma en iyi örnek *E. coli*'deki soğuk şoku proteinlerinin üretimidir. *E. coli*'deki cspA olarak adlandırılan bu soğuk şok proteini RNA yapısını çözen bir proteindir ve düşük sıcaklık şartları altında toplam hücresel

proteinin %13'ünü oluşturmaktadır. Soğuk şoku altında CspA, transkript sentezindeki değişimlere karşı olarak, mRNA'nın kararlılığını arttırmaktadır. *S. aureus* ile yapılan çalışmalar sonucunda 10 °C 30 dakika inkübasyon sonucunda soğuk şok proteinlerinin üretiminin gerçekleştiği gözlenmiştir. Soğuk şokuna maruz bırakılan hücrelerinin 46 geninin mRNA titresinde yükselme saptanmıştır. *S. aureus*'unun soğuk şoku proteini olan CspB'nin transkripsiyonunun düşük sıcaklık şartları altında 9.3 kat arttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında yine *S. aureus*'un sıcaklık şoku proteinleri ile ilgili yapılan çalışmada 42 °C 30 dk. bekletilmiş türlerde sıcaklık şoku yanıtının meydana geldiği ve 98 genin transkripsiyonunun teşvik edildiği gözlenmiştir. Real time PCR analizleri sonucunda *S. aureus* clpC genin 65 kat ve ctsR'nin 95 kat arttığı tespit edilmiştir (Anderson ve diğ., 2006). Bu çalışma kapsamında uygulanan 60 °C'lik sıcaklık sonunda ilk üç ayda HPC sayısında azalma meydana gelmiş olup 3. aydan itibaren sayıda hafif bir artış gözlenmiştir. Bu durumun bakteriler tarafından geliştiren direnç mekanizmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Bununla birlikte *L. pneumophila* sayısı ise 3. aya kadar azalmış olup bu aydan itibaren kültürde üreme gözlenmemiştir. Fakat epifloresan mikroskopi sonuçlarına göre ise aylar içinde değişken olmakla birlikte canlı mikroorganizmaların varlığı saptanmıştır. Gerek HBS gerekse canlı mikroorganizma sayılarında deneyin son ayı olan 6. ayda biyofilm yoğunluğundaki azalmayla paralel olarak azalma gözlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında uygulanan parametrelerden bir kısmı ise farklı değerdeki pH uygulamaları olmuştur. Hücre içi pH, hücrenin fizyolojisini ve bakteri üremesini etkileyen önemli bir faktördür. Mikroorganizmalar çevresel pH değişimleriyle yaygın olarak karşılaşılır ve sonuç olarak alkali ya da asidin sebep olacağı zararlara en aza indirmek amacıyla çeşitli adaptif stratejiler geliştirirler. Yaygın olarak *E. coli*'de araştırılan Gram negatif bakterilerin başlangıç yanıtı, ciddi sitoplazmik asidifikasyon için K⁺ proton pompaları gibi H⁺ pompalarının dışarıya doğru çalıştırmasıdır. Hücreler uzun süreli olarak aside maruz kaldıklarında ise gen anlatımında ileri boyutlu değişimlere ihtiyaç gösterirler. *E. coli*'deki asit tolerans veya direncinden sorumlu mekanizma, arjinin ve glutamat dekarboksilaz pompasını içermektedir. Bu pompa dış ortamın asidifikasyonunu hücre içi protonların yok edilmesi ve alkalik aminlerin üretilmesiyle etkisiz hale getirmektedir. Asit tolerans yanıtı ek olarak iç membrandaki

lipit kompozisyonunu değiştiren proteinlerin tetiklenmesini içermektedir ve sonuç olarak proton geçirgenliği değişmektedir (Leaphart ve diğ., 2006).

Pek çok bakteri, bazı genlerini düzenleyerek asit stresine yanıt verirler. Örneğin Sauer ve diğ., (2002) tarafından yapılan çalışmada *Staphylococcus salivarius*'da düşük pH'da üreaz üretiminin arttırıldığı tespit edilmiştir. Üreaz, üreyi amonyak ve karbondioksite dönüştürmekte ve sonuç olarak ortamın pH'ını yükseltmektedir. Asit tolerans yanıtı, canlılığı sağlayabilecek değerin altındaki pH değerlerine maruz kalan hücreler tarafından geliştirilen fiziksel bir yanıttır. Bu yanıt, düşük pH değerlerinde hayatta kalabilme şansının arttırılmasına rehberlik etmektedir. Neilands, (2007) tarafından yapılan benzer bir çalışma sonucunda asit toleransında olgun biyofilm hücrelerinin genç biyofilm hücrelerine oranla daha dirençli olmakla birlikte her iki tür biyofilm hücresinin de planktonik olan türlerine oranla önemli ölçüde asidi tolere edebildiklerini göstermiştir.  günlük biyofilm hücreleriyle gerçekleştirilen çalışmada biyofilm yapısındaki hücrelerin üremesi sırasında metabolik aktivitelere bağlı olarak pH'daki lokalize düşmelerden dolayı asit şokunu tecrübe ettikleri gözlenmiştir. Bu durumun sonucunda glikolitik enzimleri ve artan ATPaz aktivitesini kapsayan asit tolerans yanıtı teşvik edilmiştir. Yapılan çalışmada asit stresine maruz kalmayanlara kıyasla asit stresine maruz kalan hücrelerde protein anlatımının değiştiği ve glikolitik enzimlerin pH 5.5 'e maruz kalan hücrelerde hafifçe yükseldiği gözlenmiştir. pH i dengesinin sağlanması anahtar enzimlerden biri olan laktat dehidrogenaz seviyesinin pH 5.5'e maruz kalan hücrelerde önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Bunların dışında *S. mutans*'ta asit tolerans yanıtında görevli başka proteinler ve genler de tespit edilmiştir. Biyofilmin etrafında bulunan çevrenin pH'ın gözlenen değişimler, pH 3'lk bir solüsyon söz konusu olduğunda biyofilm kalınlığı, nötral pH'a oranla %30 oranında azalmaktadır. Bu durumun elektrostatik etkileşimlere bağlı olan ve iyonize olabilen matriks polimerleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Stoodley ve diğ., 1997). Yaptığımız alışma kapsamında asidik pH uygulamaları sonucunda HBS'nda önemli bir azalma meydana gelmekle birlikte *L. pneumophila* sayısında önemli bir azalma meydana gelmemiştir. *L. pneumophila*'nın asidik şartlardan etkilenmemesinin sebebi olarak bakterinin yapısı gereği asidik ortamda canlılığını muhafaza edebildiği söylenilmektedir. Fakat HBS'nda azalma görülmekle birlikte canlılık için risk teşkil eden bu düşük pH'da dahi canlı hücrelere rastlanmıştır. Elde edilen bu sonucun

biyofilm içindeki bakterilerin planktonik türlerine göre farklı fenotipe sahip olmasına bağlı olarak gösterdikleri dirençten kaynaklanabileceği gibi biyofilmin sağladığı fiziksel bariyerden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yüksek pH'da bakterilerin direnç gelişine sebep olan diğer bir ekstrem koşuldur. Her sodyum iyonuna karşılık 2 adet H alan proton pompaları, iç denge mekanizmasında bakterinin sodyum varlığında alkali pH'ya adapte olmasını sağlamada önemli rol oynar. 2 boyutlu jel elektroforezinin kullanıldığı proteomik çalışmaları, yüksek pH'ın triptofan diaminaz gibi aminoasit metabolik enzimlerinin teşvik edildiğini göstermiştir. Bu enzimler *E. coli*'de aminoasitlerin ürettiği asidik ürünlerin metabolizasyonu aracılığıyla alkalinizasyon ters çevrilmektedir (Leaphart ve diğ., 2006). Bu çalışmada uygulanan bazik pH uygulaması sonucunda ise deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Fakat anlamlı bir azalmaya rağmen canlılığını koruyabilen bakterilerin tespit edilmesinde biyofilm varlığının sağladığı fiziksel korumanın dışında geliştirilen direncin de etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışma sonucunda *L.pneumophila* sayısında da anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Asidik ortamda üreyebilme yeteneğine sahip olan *L. pneumophila*'nın aynı yeteneğini pH 11'de sergileyememesi nedeniyle sayıda önemli azalmalar gözlenmiştir. Lapaglia ve Hartzell, (1997) tarafından bir arkeon olan *Archaeoglobus fulgidus* üzerinde yapılan çalışmalarda ise ekstrem pH ve sıcaklık değerlerinin biyofilm üretimini teşvik ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar, koruyucu bir bariyer olarak hücrelerin biyofilm üretebileceğini ortaya koymuştur. Çünkü *Archaeoglobus profundus*, *Methanococcus jannaschii* ve *Methanobacterium thermoautotrophicum* tarafından benzer biyofilmler meydana getirilmiştir. Buradan biyofilm yapısının arkeler için de ortak bir stres yanıtı olduğu sonucuna varılabilir. Yapılan deney sonucunda ekstrem koşullara maruz bırakılan bakterinin durağan fazda deney tüplerinin içinde ince bir tabaka biyofilm meydana getirmesiyle desteklenmiştir. Biyofilmler liflerden, tabakalardan veya her iki yapının kombinasyonundan meydana gelebilmektedir. Biyofilimde gözlenen bu farklı yapısal formlar, maruz kaldıkları şartların yoğunluğundan etkilenmektedir. Lifli yapı, üreyen kültürlerle dereceli olarak stres uygulandığında meydana gelmiştir. Yoğun tabakalar halinde bulunan biyofilm yapısı ise yoğun bir şekilde stres uygulandığında meydana gelmiştir. James ve diğ., (1997) tarafından karışık kültürlerle yapılan çalışmada da benzer sonuçlar gösterilmiştir. Yapılan çalışmada pH

ve tuzluluktaki artışın biyofilm oluşumunu teşvik ettiği fakat pH 5'in altındaki düşüşlerde biyofilm oluşumunun gözlenmediği ortaya çıkmıştır. Çalışmada sıcak şokuna maruz bırakılan hücrelerde de biyofilm oluşumunun teşvik edildiği gözlenmiştir. Biyofilm oluşumunun varlığını ispatlamak için asidik ekzopolisakkaritlere bağlanarak biyofilm ve mikroorganizmaların karbonhidratlarının ölçümünde kullanılan Kongo kırmızısı boyası kullanılmıştır. Sıcak stresine maruz bırakılan hücreler ile bırakılmayan hücrelere gerçekleştirilen boyama işlemi sonucunda sıcak şokuna maruz bırakılmış hücrelerde polisakkarit açısından zengin olduğunu ve kuru ağırlığa oranla polisakkarit miktarının %90 oranında arttığı bulunmuştur.

Çalışma kapsamında biyofilm mikroorganizmalarının maruz bırakıldığı bir diğer parametre ise ozmotik şok uygulamasıydı. Suyun kullanılabilirliğinin ölçümü, çözültide bulunan çözünen maddelerin miktarına bağlı olan 'su aktivitesi' olarak ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalar, ekstrem koşullarda bulunan ve tuzluluk, kuruluk ve UV radyasyonu gibi stres koşullarına maruz kalan mikroorganizmaların hücre dışı ekzopolimerlerden bol miktarda üretme kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir. Hücre dışı polimerler biyofilm yapısını çoğaltmakta ve belki de su kaybının engellenmesinde temel bileşen olabilmektedirler (Seufferheld ve diğ., 2008). Stres koşulları altında bakterilerin hayatta kalmaları için gerekli katkıları yapan düzenleyici elementler, *RpoS* ve *RpoE* olan sigma faktör alternatiflerini kapsamaktadır. Bu sigma faktörleri *P.aeruginosa*'da *AlgU* ve *AlgT* olarak refere edilmektedir. *RpoS*, farklı *Pseudomonas* türlerinden meydana gelen kültürün durağan fazının hiperozmolariteye ve yüksek sıcaklığa toleransı için gerekli bulunmaktadır. *AlgU* ise, *P. aeruginosa*'da oksidatif, sıcaklık, ozmotik strese karşı toleransı düzenlemektedir. Schnider-Kell ve diğ., (2001) tarafından yapılan çalışmada *P. aeruginosa*'da *AlgU*'nun kuruluk ve yüksek tuzluluğa adaptasyonunda çok önemli bir bileşen olduğu ortaya çıkmıştır. Hiperozmotik şartlar *P.aeruginosa*'da alginat biyosentez geninin transkripsiyonunu arttırmaktadır. *P.fluorescans*'ta ise *AlgU*'nun anlatımında gözlenen artışın EPS sentezinde artışa neden olduğu bulunmuştur. Pek çok bakteri, hücre turgor basıncının devamlılığı için aktif su transport mekanizmasına sahip değildir ve bunun yerine hiperozmotik strese hayatta kalabilmek için karmaşık mekanizmalar geliştirirler. Potasyum pompaları kullanılarak hücre içi K^+ konsantrasyonunun artması ve uygun çözünenlerin birikmesi pek çok bakteride ozmotik stresle başa çıkmada kullanılan iki ortak stratejidir. Uygun

çözünenler glisin betain, prolin ve karnitindir. Bu organik bileşenler fizyolojik fonksiyonları bozan şartlar dışında hücrede sentezlenirler. *S. mutans* üzerinde, real time PCR kullanılarak yapılan çalışmada tuz stresinin stresten korunmada görevli olan bileşenleri üreten genlerin anlatımını teşvik ettiği ortaya çıkmıştır (Lemos ve Burne, 2006). Bu çalışmada ilk aylarda tuz uygulamaları sonucunda kayda değer bir azalma gözlenmekle birlikte 5. aydan itibaren biyofilm tabakasındaki azalmaya bağlantılı olarak mikroorganizma sayılarında azalmalar tespit edilmiştir. Kullanılabilir su, tüm hücrelerin biyokimyasal aktiviteleri için gereklidir. Gerçekleştirdiğimiz çalışma kapsamında 3M tuz çözeltisi ile 24 saat muamamelesi sonucunda HBS'nda zamana bağlı olarak azalma olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte *L. pneumophila* sayısında 2. ayda gözlenen düşüşü 4. aya kadar bir yükseliş takip etmiş olup, bu aydan itibaren hem HBS hem de *L. pneumophila* sayısında azalan biyofilm yoğunluğuna paralel olarak düşüş gözlenmiştir.

Biyofilm içindeki bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdikleri direnç mekanizmasıyla ilgili olarak pek çok teori geliştirilmiştir. Geliştirilen bu teorilerden bazıları, glikokaliks aracılığıyla materyal difüzyonunun azaltıldığını, hidrolitik enzimlerin aşırı derecede üretildiğini ve bu enzimlerin eksopolimer matriks içindeki konsantrasyonlarının artırıldığını, fizyolojik değişimlerden dolayı üreme oranının azaltıldığını ve yüzeye tutunan bakterilerden antimikrobiyal ajanlara karşı direnç fizyolojisinin geliştirildiğini kapsamaktadır. Yapılan çalışmalarda elde edilen en önemli kanıt ise, uzun süre ile antimikrobiyal ajanlara maruz kalan bakterilerin dirençlerinde artış sağlayabilmeleridir. Gerek okside edici gerek okside edici olmayan biyosidal bileşenler, endüstriyel sistemlerdeki mikrobiyal aktivitenin kontrol edilmesinde veya ortadan kaldırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Macdonald ve diğ., 2000). Geliştirilen teorilerin başında gelen penetrasyondaki başarısızlık, biyofilmin kalınlığı ve yüksek reaktif antimikrobiyal ajanlarla ilgili olarak bir direnç mekanizması olarak oldukça tutarlı bir durumdur. Biyofilmin azalan duyarlılığı ile ilgili ikinci teori deney sırasında yaşanan besin kısıtlılığına bağlı olarak biyofilm içindeki bakterileri yavaş üreme durumuna geçmesidir. Yavaş üreyen veya hiç üremeyen hücrelerin geniş çeşitlikteki antimikrobiyal hücrelere karşı zengin besiyerinde yüksek üreme oranında üreyen hücrelere kıyasla daha az duyarlı olduğu gözlenmektedir. Bir diğer teori ise, diğerlerine oranla daha spekülatiftir. Biyofilm içindeki hücrelerin bazılarının farklı ve nispeten daha koruyucu olan biyofilm fenotipini benimsediklerini içermektedir. Bu

fenotip besin kısıtlılığının bir sonu değildir. Geliştirilen bu biyofilm fenotipi, biyofilmin azalan direncini ifade etmede pratik öneme sahiptir. Araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda 24 saatlik biyofilm hücrelerinin monokloramine karşı planktonik olan mikroorganizmalara göre daha az duyarlı olduğunu göstermektedir. Monokloramin için biyofilm duyarlılığındaki azalmanın biyofilm yaşı arttıkça artacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca elde edilen diğer bir sonuç da, cam yüzeyde üreyen biyofilmlerin monokloramin dezenfeksiyonuna karşı azalan bir duyarlılık sergiledikleridir. Bu biyofilmler, muhtemelen biyofilm içine biyosit penetresyon transportunun sınırlandırılmasını içeren, çoklu direnç mekanizması tarafından korunmaktadırlar. Çalışmada mikroorganizmaların yüzeye tutundukları zaman fizyolojik ve metabolik olarak değişimler geçirdikleri gözlenmiştir (Cochran ve diğ., 2000). Yüksek oranda klorlama, *Legionella* üremesinin kontrolünde kullanılan eski metodların başında gelmektedir. Kalıntı dezenfeksiyon için, klordan monokloramine değişim sudaki trihalometan bileşenlerinin düşük konsantrasyonu ile sonuçlanmaktadır. Monokloraminin kararlılığındaki artış, su sistemlerinde yüksek dezenfektan konsantrasyonuna neden olmaktadır. Çünkü klor yüksek sıcaklıkta çok çabuk tüketilmektedir. Dezenfektanın yüksek konsantrasyonu ve monokloraminin biyofilme girebilme yeteneği, *Legionella*'ya etkiden sorumludur. Model sistemlerde, monokloramin, biyofilmle ilişkili *Legionella*'nın %99'unun elimine edilmesini sağlamaktadır. Model sistemde bulunan amip, monokloraminin kısa süreli etkisinden *Legionella*'yı korusa da, bu koruyucu etkiye bir kanıt bulunamamıştır (Flannery ve diğ., 2006). 4 ppm monokloraminin kullanıldığı klasik kültür ve epifloresan mikroskopi tekniğinden yararlanılan benzer bir çalışma sonucunda, monokloramin uygulamasına tabi tutulan solunum yapan bakterilerin sayısında çok az bir azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte koloni sayımıyla elde edilenden yaklaşık olarak iki kat daha fazla canlı hücreye rastlanmıştır. Bu durum hala solunum yapan bakteri bulunmasına rağmen bakterilerin agar üzerinde koloni oluşturmadıklarını göstermiştir (Steward ve diğ., 1994).

Bu çalışmada monokloramin uygulaması 3 farklı dozda gerçekleştirilmiştir. 2 ppm'lik monokloramin uygulaması sonucunda koloni sayım yöntemiyle 3. aydan itibaren *L. pneumophila*'ya rastlanmamıştır. Fakat epifloresan mikroskopi ve DAPI-CTC boyama kombinasyonu ile canlı hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. HBS'nda ise ciddi bir azalma

gözlenmemiştir. 500 ve 1000 ppm'lik şok dezenfeksiyon uygulamaları sonucunda ise kültürde HPC ve *L. pneumophila* kolonisine rastlanmamakla birlikte epifloresan mikroskopi tekniği ile az olmakla birlikte canlı hücrelerin var olduğu tespit edilmiştir.

Mikrobiyal yaşamın evrensel yolu olmasından dolayı hemen hemen tüm mikroorganizmalar biyofilm içinde yaşayabilme yeteneğine sahiptirler. Öte yandan istenmeyen birikim ve biyofilm üremesi olarak tanımlanan biyofauling, medikal araçların kolonizasyonundan, içme ve kullanma suyu süreçlerine ve boru duvarında, gemi karinalarında ve çeşitli kaynaklardaki bozulmalara kadar geniş aralıkta olmak üzere çok çeşitli yüzeylerde meydana gelmektedir. Biyofauling, farklı yüzeylerde meydana gelmesine rağmen, ortak neden biyofilm oluşumudur. Biyofilmlerin, dünyadaki en başarılı yaşam formları olmaları nedeniyle, mikroorganizmaların öldürülmesini ya da biyofilmin yüzeyden kaldırılmasını kapsayan mücadele, oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Savunulabilir bir antifauling stratejisi için, biyofauling durumunun analizini, uygun metotların kullanımını ve etkili kontrol yöntemlerini kapsayan entegre bir yaklaşıma gerek duyulmaktadır (Flemming, 2002).

Zamana bağlı olarak soğutma kulelerinde meydana gelen biyofilm tabakasının yoğunluğunda artış gözlenebilmektedir. Çalışma kapsamında HPC ve *L. pneumophila* sayılarında 2. ayda gözlenen azalmanın, bakterilerin ortama adaptasyonu ile alakalı olduğu, adapte olan mikroorganizmaların bu sürecin artından sayılarını arttırdıkları düşünülmektedir. Boe- Hansen ve diğ., (2002) tarafından gerçekleştirilen biyofilm yoğunluğu ile ilgili benzer bir çalışma sonucunda da 100 günden fazla bir süre sonunda biyofilm tabakasındaki bakterilerin yarı durağan faza girdikleri tespit edilmiştir. Bu fazın gözlemlendiği biyofilm tabakaları, mikrobiyolojik açıdan tamamen olgun olarak nitelendirilmektedir. Çevresel şartlarda meydana gelen önemsiz bir değişim bile, farklı organizmaların üremesini kolaylaştırabildiği ve seçilimin sürekli olarak devam etmesinden dolayı akuatik ortamlarda tam durağan şartlar asla sağlanamamaktadır. Yapılan çalışma sonucunda olgun biyofilmin üreme oranının olgun olmayan biyofilme oranla önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir. Biyofilmin erken evrelerinde üremenin oranının artışı muhtemelen emilen organik bileşenlerden ve bakteriler arasındaki düşük yarıştan kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak biyofilm içinde bakteri üremesi suyun içine yüksek sayıda bakterinin yayılmasına izin veren olgun biyofilme

kıyasla olgun olmayan biyofilm için daha yaygındır (Boe-Hansen ve diğ., 2002). Gerçekleştirilen deney kapsamında ilk aylarda biyofilm yoğunluğunda gözlenen artışın sistemin ilk aylarında su içinde bulunan organik bileşenlerin mikroorganizmalar için yeterli olması sonucunda üremenin artarak devam ettiği fakat takip eden zamanlarda organik bileşenlerdeki azalmayla paralel olarak mikroorganizmaların besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak üreme oranlarını azalttıkları yarı durağan faza girdikleri düşünülmektedir. Bu durumun sonucunda ilk aylarda artış gözlenen biyofilm yoğunluğunda 5. aydan itibaren düşüş gözlenmiştir.

Mikrobiyal biyofilm biyokültesinin hesaplanmasında HBS, direkt toplam bakteri sayımı ve karbonhidrat ölçümünü gibi farklı analitik metotlar kullanılmaktadır. Bu yöntem ile biyofilm yapısının temel bileşenlerinden olan EPS içinde bulunan karbonhidratlar fenol-sülfürik asit metoduyla kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Fenol- sülfürik asit yöntemi sadece hücre dışı karbonhidratların değil aynı zamanda bakteriyal polisakkaritlerin de ölçülmesine olanak sağlamaktadır (Storey ve Ashbolt, 2002). Yaptığımız çalışma kapsamında aylık olarak EPS yoğunluğu fenol-sülfürik asit metoduyla tayin edilmiştir.

Çalışmada alınan sonuçlara göre kültüre edilebilirlik en yüksek olarak başlangıç aşamasında elde edilmiştir. Biyofilmin olgunlaşmasına doğru kültüre edilebilirlikteki azalma kısmen, yüzeye aktif olmayan bakterilerin birikiminden kaynaklanmaktadır. Kültüre edilebilirlik, olgun biyofilme kıyasla, biyofilm oluşumunun başlangıcı boyunca daha yüksektir. Olgun biyofilmin üreme oranı önemli ölçüde yoğunluk, topluluk ve besin seviyesindeki değişimlerden etkilenmektedir (Boe-Hansen ve diğ., 2002). Çalışmamız kapsamında ilk aylarda kültür sonucu daha yüksek sayıda bakteri elde edilmiş olup, 5. ve 6. aylarda kültüre edilebilen bakteri sayısında önemli ölçüde azalmalar gözlenmiştir. Bu durum yukarıda bahsi geçen organik bileşenlerin azalmasından kaynaklı olabileceği gibi, yüzeye biriken aktif olmayan bakterilerden kaynaklı da olabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda, biyofilm içindeki bazı hücrelerin yavaş üreme oranının nedeninin besin kısıtlılığından olmadığı, genel stres yanıtının biyofilmdeki üreme tarafından başlatıldığı zannedilmektedir. Fizyolojik değişimlerdeki stres yanıtı sonuçları, çeşitli çevresel streslerden hücreyi korumada rol oynamasından dolayı da bu fikir caziptir. Sonuç olarak hücreler, sıcaklık şoku, soğuk şoku, pH'daki değişimler ve pek çok kimyasal ajanın olumsuz etkilerinden

korunurlar. Bu yanıtın düzenleyicisi sadece durağan fazda anlatımı yapılan, *RpoS* tarafından kodlanan sigma faktördür. Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalar *RpoS* geninin yüksek hücre yoğunluğu tarafından teşvik edildiğini ve bu yüksek yoğunlukta üreyen hücrelerin trihaloz ve katalaz üretmeleri sonucunda genel stres yanıtına uğradığı görülmektedir (Mah ve O'Toole, 2001).

Chae ve Schraft, (2001) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise aynı türe ait farklı suşların arasında bile yüzeyden kaldırılma işleminde belirgin ölçüde fark gözlenmiştir. Bununla birlikte biyofilm yaşı arttıkça bakterileri yerinden kaldırmanın zorlaştığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca bazı suşların yüzeye oldukça sıkı bir şekilde tutunduğu ve bu sebeple swab yöntemi ile yüzeyden kaldırılamadıkları ortaya çıkmıştır. Koloni sayım yöntemiyle bakteri sayımı, bazı bakteri türlerinin katı besi ortamında canlılıklarını devam ettirebilmelerine rağmen üreme yeteneklerini kaybetmelerinden (VBNC) dolayı, tüm canlı hücreleri içerebilmektedir. Bu sebeple de özellikle uzun süreli bir çalışmada örneklerin yüzeyden toplanması oldukça önemlidir. Yaptığımız çalışma kapsamında biyofilmi yüzeyden kaldırmada stomacher cihazından yararlanılmıştır. Biyofilm hücrelerini yüzeyden kaldırmada ideal metot olarak seçilen bu yöntem, biyofilm hücrelerinin yüzeyden kaldırılmasında ve tek bir adımda süspanse edilmesinde önemli bir avantaj sağlamaktadır (Gagnon, 1999).

Örneklerin yüzeyden toplanması kadar önemli olan bir diğer konu da analiz için tek bir yöntem kullanılarak bir yargıya varılmasıdır. Örneğin sadece kültür metoduna dayanarak bir yargıya varmak her zaman gerçeği yansıtmamaktadır. Bundan yaklaşık 50 yıl kadar önce bakteriyel hücrelerin canlı veya ölü olup olmadıklarını belirlemek için standart mikrobiyolojik metotlar kullanılırdı. Bakteriyel hücrelerin canlılığı, geleneksel olarak üremeleri ve koloni oluşturma yetenekleri ile tanımlanırdı. Ancak son zamanlarda yapılan pek çok çalışma hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin VBNC fazına girebilme yeteneği olduğunu göstermiştir. Biyofilm üzerine yapılan benzer çalışmaların sonucunda da sadece tek bir metot kullanılarak elde edilen sonuçların doğruyu yansıtmayabileceği sonucuna varılmıştır. Örneğin, klasik kültür yöntemi ve ölü/canlı sayım tekniğinin kullanıldığı biyofilmin karşılaştırmalı çalışmalarında, kültürde üreyebilen bakteri sayısının, gerçek değerinin altında çıktığı ortaya konmuştur. Mikroskopik teknikler kültür metotlarına tercih edilmektedir. Daha

önceden yapılmış çalışmalara göre, direkt mikroskopi ile sayılan hücreler sonucunda kültür metodundan en az 1 log daha fazla sayıda bakteri elde edilmiştir. Bu durum, koloni sayım metodunun sağladığı şartlar altında bakterilerin ürememesinden veya yüzeyden kaldırılmasının ardından yüzey üzerinde çok fazla sayıda bakterinin kalmasından kaynaklanabilmektedir. Sonuç olarak biyofilmin keşfinde ve kopartılmasında kullanılacak metotlar dikkatli bir şekilde seçilmelidir. Bir test prosedürü, kültür, fotoğraf analizi, metabolik indikatör temelli olmalıdır örneğin DAPI-CTC gibi. Bu metodlar farklı parametrelerin değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir (Sardecassai, 2005, Wirtanen ve diğ., 2001). Bu çalışma kapsamında klasik kültür metoduna ek olarak mikroskopi temelli bir teknik de kullanılmıştır. Analizler sonucunda klasik kültür metodunda üreme gözlenmeyen pek çok durumda canlı mikroorganizmalara rastlanmıştır. Bu durum mikroorganizmaların çevresel şartlara bağlı olarak VBNC faza geçtiklerini göstermektedir.

Mikroorganizmaların yüzeye tutunması, çeşitli değişkenlerin etkili olduğu oldukça kompleks bir süreçtir. Bu değişkenler kısaca, yüzey etkisi, koşullanmış tabaka, suyun hidrodinamiği, sucul ortamın karakteristiği ve hücresel özellikleri kapsamaktadır. Yüzey pürüzlülüğünün fazla olduğu yerlerde biyofilm oluşumu da fazladır. Yüzeyin fizikokimyasal özellikleri de, tutunmanın yaygınlaşmasında ve oranında güçlü etkiye sahiptir. Fletcher ve Loeb, (1979) ve Bendinger ve diğ., (1993) tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda mikroorganizmaların hidrofobik polar olmayan teflon ve diğer plastik yüzeylere, cam ve metal gibi hidrofilik yüzeylere oranla daha hızlı tutunduğunu bulmuştur. Koşullanmış tabaka ile kasıt ise, sucul ortamda bulunan bir materyal yüzeyinin çevrede bulunan polimerler tarafından kaplanması ve bunun sonucunda meydana gelen kimyasal modifikasyonlar ile mikrobiyal tutunmanın büyüklüğü ve oranı etkilenmesidir. Bu tabakanın oluşması sonucunda mikroorganizmalar geri dönüşümlü olarak yüzeye tutunabilmektedirler. Asılı ortamın yüzey enerjisi, yüzey karakteristiğinin değişimi ile yüzeyde bulunan mikrobiyal hücrelerin hidrodinamik etkileşimlerini etkilemektedir. Suyun akış hızı hidrodinamik birimlerle ifade edilmektedir. Hücreler sıvı içinde partikül gibi davranmakta ve yerleşme oranları ve yüzey ile olan ilişkileri, geniş oranda sıvının akış hızına bağlı olmaktadır. Yavaş doğrusal hız altında hücreler yüzeyde yaygın bir tabaka oluştururlarken; hız arttığında ise hücrelerin artan tirbülansın hükmü altına girmeleri

sonucunda kopmalar meydana gelmektedir. Bunların dışında fimbria ve flagella bulunması, EPS üretimi gibi hücrenin yüzeyel özellikleri de tutunmanın büyüklüğünü ve oranını etkilemektedir. Özellikle EPS üretimi sonucunda tutunma geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Fimbria, proteolitik enzimler gibi proteinler ve *Micobacterium* cinsi bakterilerin sahip olduğu mikolik asitler, hidrofobik yüzeye tutunmada baskınken, EPS ve lipopolisakkaritler hidrofilik yüzeye tutunmada baskındırlar (Berger ve diğ., 1992, Donlan, 2002, Gomez- Saurez ve diğ., 2002, Flemming, 2002).

Hyde ve diğ., (1997) tarafından gerçekleştirilen farklı yüzeylerde biyofilm oluşumu ile ilgili çalışmalarda biyofilm oluşumunun farklı yüzeyler arasında değişiklik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Biyofilmde tutunma konusunda, mikroorganizmaların yüzeye tutunma tercihleri yüksekten düşüğe doğru çelik, polipropilen, cam olarak gösterilmiştir. Çeşitli yüzey ölçümünü gösteren ATM (atomik force microscopy) ve SEM (scanning electron microscopy) analizleri ile yüzey pürüzlülüğü açısından yüksekten düşüğe doğru çelik, propilen, cam şeklinde sıralama yapılmıştır. Bu yüzey pürüzlülüğü ölçümleri sonucunda cam yüzeylerin çok düzgün, polipropilenin daha az düzgün, çeliğin ise en az düzgün olduğunu gösterilmiştir. Cam yüzeyden biyofilm kaldırımının kolaylığı, kısmen yüzeyin çok düzgün olmasına bağlanabilir. Cam yüzeyler için biyofilm gelişimi ve kaldırımı süreçleri geri dönüşümlü kimyasal süreçlerin egemenliği altındadır. Çok düzgün olan bu yüzeylerde minimal mekanik tutunma meydana gelmektedir. Biyofilm tutunması ve taşınması tek bir değişken ile kontrol edilemez. Endüstriyel süreçleri için bir materyal seçilirken birkaç faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar biyolojik komponentler ile yüzey arasındaki kimyasal etkileşimlerin potansiyeli, materyalin yüzey durumu, üretim sürecinin tüm aşamalarında kullanılacak materyalin fiziksel ve kimyasal kapasitesidir. Bu çalışma kapsamında biyofilm oluşumu için cam yüzey tercih edilmiştir. Bunun sebebi ise cam yüzeylerin diğer yüzeylere oranla daha düzgün olmasına bağlı olarak örneklerin yüzeyden daha kolay toplanabilmesi ve camın inert madde olmasındandır. Zira doğru bir şekilde toplanamayan örneklerle gerçekleştirilen analizler gerçeği yansıtmada yetersiz kalabilmektedir.

R2A agar, su uygulama süreçlerinde veya dağıtım suyundaki aerobik heterotrofik bakteri popülasyonunun izlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir. Reasoner

ve Geldreich tarafından geliştirilen bu besiyeri, denizel olmayan sucul ortamlardaki geniş çeşitlilikte bakterinin izolasyonu ve sayımı için kullanılmaktadır. R2A agardaki bakteri kolonileri yavaş gelişim gösterdiklerinden dolayı 28 °C’ de 5-7 gün süreyle inkübe edilmesi tavsiye edilmektedir. Bu şartlar, pigment üretimi ve yavaş üreyen bakterilerin üremesi için uygun zaman sağlamaktadır. Aynı zamanda kolonilerin yavaş gelişmesine bağlı olarak daha kolay ve daha doğru bir şekilde sayım yapılabilmesi için de inkübasyon süresinin uzun olması gerekmektedir. R2A agarda 48 ile 120 saat arasında kültür edilebilen bakteri sayısı 100 kat artmaktadır. Bu süre içinde dahi bakteri kolonileri yayılmaya karşı çok az ya da hiç eğilim göstermemektedirler. R2A, dezenfektan muamelesi görmüş sulardaki heterotrofik bakterilerin sayımı için kullanılmaktadır (Reasoner ve Geldreich, 1985, Rodriguez ve diğ., 1992, Macdonald ve diğ., 2000). Bu çalışmada HB izolasyonu için R2A agar besiyeri kullanılmıştır. Ekim işlemini takip eden 4. güne kadar Petri kutularında bakteri kolonilerine rastlanmamıştır. Dördüncü günden itibaren koloniler belirmeye başlamış olup sayım işlemi kolonilerin yeterli büyüklüğe ulaştığı 7. günde gerçekleştirilmiştir.

Mikroorganizmalara sağladıkları hava, sıcaklık ve ışıktan dolayı soğutma kuleleri mikroorganizmaların gelişimi için ideal ortamlardır. Biyofilmler soğutma kulelerinde önemli problemlere sebep olmaktadır. Bu problemler buharlaştırıcıda basınç düşüşlerinden yardımcı sistemlerin performansında eksilmelere kadar çok çeşitli olabilmektedir. Biyofilm yapısının, oranının ve tipinin önceden bilinmesi endüstriyel soğutma kulesi sistemlerinin dizaynı ile ilgili çalışmalarda ve biyofauling oluşuma eğimli endüstriyel ekipmanların operasyonunda yarar sağlamaktadır (Rao, 2010). Soğutma kulelerinde biyofilm meydana gelmesi tüplerde direncin artması, ısı değiştiricinin ısı değiştirme kapasitesinde azalmalar gibi pek çeşitli probleme sebep olmaktadır. Sistem içinde biyofilm oluşumunun izlenmesi, biyofilmle ilişkili problemlerden kaçınmak için ve biyosit eklemesini minimuma indirmek için gereklidir. Biyofilmin iyi bir şekilde izleme takip edilmesi, biyofilm oluşumu ve olgunlaşmasının kontrol edilmesi için etkili stratejilerin geliştirilmesinde ilk koşuldur. Soğutma kulerinde gözlem parametreleri genellikle KOB sayıları ve ATP konsantrasyonunun ölçümüdür (Tanji ve diğ., 2007). Gerçekleştirdiğimiz çalışma kapsamında laboratuvar ölçekli soğutma kulesi model sistemi kullanılmıştır. Kullanılan model sistem aracılığıyla gerçek sistemlerde meydana gelen biyofilm tabakasının oluşumu ile farklı fiziksel ve

kimyasal parametrelerin biyofilm tabakası üzerindeki etkilerinin gözlenmesine olanak sağlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan bu tür model sistemler gerçek sistemleri temsil etmeleri dolayısıyla laboratuvar şartlarında biyofilm oluşumunun gözlenmesi, biyofilme ilişkin sayısal değerlere ulaşılmasına ve biyofilmle mücadeleyle ilişkin metotların belirlenmesine olanak tanımaktadır (Hermanowicz, 1999, Donlan ve diğ., 2004,). Biyofilm oluşunu incelemek adına sadece bir Petri kutusu gibi basit bir yapıdan oluşan statik sistemlerden, içinde suyun sirküle olduğu, pek çok değişkenin gözlemlenebildiği dinamik sistemlere kadar çeşitli model sistemler kullanılmaktadır. Özellikle dinamik sistemler uygulanan parametrelerin hedef üzerindeki etkilerinin gözlenmesinde başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Lawrance ve diğ., 2002)

Legionella'nın su ile temas halindeki çeşitli materyallerde üremesi biyofilm oluşumuyla bağlantılıdır. *Legionella*'nın sisteme saf kültür olarak eklendiği durumlarda üreme gözlenmemektedir. Üremeyi destekleyen faktörlerin, pastörizasyon gibi çeşitli işlemler tarafından inaktive edilmesi ile mikroorganizmaların üremelerinde gözlenen azalma, yaşayan hücrelerin biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmaların üremelerini destekleyen faktörler olduğunu göstermektedir. Yapılan benzer bir çalışmada da, biyofilm içindeki bakteri topluluğunun *Legionella*'nın hücre dışında üremesi için yeterli besinleri sağladığını göstermektedir (Paris ve diğ., 2008). Yamamoto ve diğ., (1992) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Legionella* üremesinde pH, sıcaklık, organik bileşenler, belli metaller gibi abiyotik faktörlerin teşvik edici veya engelleyici olmak üzere önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Diğer taraftan *Legionella* simbiyotik bir bakteridir ve siyanobakteriler, heterotrofik bakteriler, siliatlar ve amipler, *Legionella*'nın doğal ve insan yapımı sistemlerde çoğalmasında ve hayatta kalmasında etkilidirler. Bahsi geçen çalışma kapsamında *Legionella* oranının suyun sıcaklığıyla arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada 20 °C'nin altındaki sıcaklıkta bulunan kulelerden alınan örneklerin %45'nde *Legionella*'ya rastlanırken, 20-25 °C arasında sıcaklığa sahip kulelerden alınan örneklerin %57'sinde, 25 °C üstünde sıcaklığı olan kulelerden örneklerin %66'sında *Legionella*'ya rastlanmıştır. Bu sonuçlara göre su sıcaklığı ile *Legionella* sayısı arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda pH ile *Legionella* sayısı arasında da pozitif yönlü bir ilişkiye rastlanmıştır. En fazla sayıda *Legionella* pH 8.4 ile 9.1 arasında elde edilmiştir. Bulunan bu sonuç 6.9 ile 7.3 arasında 8.2-8.5'e oranla daha az *Legionella*'nın bulunduğu

sonuçların tersi yönündedir. *Legionella*'nın alkali pH'da bulunabilmesinin bir sebebi olarak *Legionella*'nın biyofilm içinde bulunması gösterilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalar, suda bulunan heterotrofik bakterilerin L-sistein içermeyen besiyerinde *Legionella*'nın üremesini destekleyen bakteriler olarak belirtilmiştir. Fakat yapılan bu çalışmada heterotrofik bakteriler ve *Legionella* arasında anlamlı bir korelasyon olmadığını gösterilmektedir. Bu durumda heterotrofik bakteriler ve *Legionella* arasındaki ilişkinin indirek ve sinerjistik bir ilişki olması söz konusudur (Yamamoto ve diğ., 1992).

Fakat heterotrofik bakterilerde olduğu gibi *Legionella*'da da sadece kültür metoduna göre elde edilen bir sonuç pek sağlıklı sayılmamaktadır. Çünkü heterotroflarda olduğu gibi *Legionella* da VBNC fazına girebilen bir bakteridir. Örneğin, Steinert ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 125 gün süre ile inkübe edilen suda *Legionella*'nın üreme yeteneğinin test edilmesi için yapılan ekimlerde BCYE agarda üreme gözlenmemekle birlikte akridin oranj kullanılarak yapılan direkt sayım metodunda önemli sayıda *Legionella* elde edilmiştir. Bunun nedeninin uzun süreli inkübasyon sonucunda oluşmuş VBNC fazındaki bakteri olduğu düşünülmektedir (Steinert ve diğ., 1997). Bu çalışma kapsamında *L. pneumophila* üremesi için BCYE agar kullanılmıştır. Koloni sayımı 7. günde gerçekleştirilmiştir. Fakat klasik kültür metodu dışında epifloresan mikroskopi tekniği kullanılmamıştır. Klasik kültür metodu ile epifloresan sonuçları karşılaştırıldığında pek çok ayda 60 °C, pH 11, 500 ve 1000 ppm monokloramine maruz bırakılan örneklerde, kültürde üreme rastlanmazken epifloresan mikroskopi sonuçlarında canlı bakterilere rastlanmıştır. Bu sonuç *L. pneumophila*'nın olumsuz şartlar altında VBNC fazına girmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada varılan sonuçlar kısaca şu şekilde özetlenebilir;

- Model sistem sistem içine giren suda bulunan mikroorganizmalar, sistem içinde bulunan yüzeylere kolonize olarak biyofilm tabakası meydana getirebilmektedirler.
- Uygulanan parametreler içinde HBS üzerine bakterileri öldürme açısından en etkili olan parametrenin 60 °C sıcaklık, pH 3, 3M Tuz çözeltisi, 500 ve 1000 ppm monokloramin muamelesi olduğu tespit edilmiştir.

- Mikroorganizmalarla mücadele amacıyla kullanılan farklı sıcaklık, pH, ozmotik ortam ve farklı dozdeki dezenfektanlar, biyofilm bakterilerinde planktonik bakteriler üzerinde olduğu kadar etkili olmamaktadır.
- Ekstrem koşullarda uygulanan parametrelerde dahi (pH 3, 500 ve 1000 ppm monokloramin gibi) biyofilm yapısında canlı mikroorganizmalar rastlanmaktadır.
- Farklı fiziksel ve kimyasal parametrelerle muamelenin ardından klasik kültür metodu ile koloni elde edilemezken, ölü/canlı sayım tekniği ile canlı mikroorganizmaların varlığının tespit edilmesi, mikroorganizmaların ekstrem koşullar altında VBNC fazına girdiklerini göstermektedir.
- Biyofilmler, *L. pneumophila* 'nın üreyip çoğalmasına olanak sağlamaktadır.
- Uygulanan parametreler içinde *L. pneumophila* üzerine en etkili olan parametrenin 60 °C sıcaklık, 500 ve 1000 ppm monokloramin muamelesi olduğu tespit edilmiştir.
- Ülkemizde temizliği oldukça ihmal edilen soğutma kulelerinde, halk sağlığını olumsuz etkileyebilecek *L. pneumophila* bakterisinin, çok düşük sayıda sisteme girmesi durumunda bile sistemde hızla kolonize olup çoğalarak tehlikeli sayılan miktarlara ulaşabildiği bu çalışma sonunda ortaya çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

- ABU, K. Y., VENKATARAMAN, C., HARB, O.S., GAO, L.Y., 1998, Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*, *Appl Environ Microbiol*, 64, 3134–3139.
- ABRANCHES, J., LEMOS, J. A., BURNE, R.A., 2006, Osmotic stress responses of *Streptococcus mutans* UA159, *FEMS Microbiol Lett*, 255, 240–246.
- ALLERON, L., MERLET, N., LACOMBE, C., FRE'RE, J., 2008, Long-Term Survival of *Legionella pneumophila* in the Viable But Nonculturable State After Monochloramine Treatment, *Curr Microbiol*, 57, 497–502.
- ALLISON, D. G., GILBERT, P., LAPPIN-SCOTT, H. M., WILSON, M., 2000, Community structure and co-operation in biofilms, *Chambridge University Press*, New York, 0-511-14132-7.
- ALLISON, D. G., RUIZ, B., SANJOSE, C., JASPE, A., GILBERT, P., 1998, Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, *FEMS Microbiol. Lett*, 167, 179–84.
- ANDERSON, K.L., ROBERTS, C., DISZ, T., VONSTEIN, V., HWANG, K., OVERBEEK, R., OLSON, P.D., PROJAN, S. J., DUNMAN, P. M., 2006, Characterization of the *Staphylococcus aureus* Heat Shock, Cold Shock, Stringent, and SOS Responses and Their Effects on Log-Phase mRNA Turnover, *Journal of bacteriology*, 188, 6739–6756.
- BAGH, L. H., ALBRECHTSENA, H. J., ARVINA, E., OVESEN, K., 2003, Distribution of bacteria in a domestic hot water system in a Danish apartment building, *Water Research*, 1-12.
- BATTÉ, M., APPENZELLER, B.R.M., GRANDJEAN, D., FASS, S., GAUTHIER, V., JORAND, F., MATHIEU, L., BOUALAM, M., SABY, S., BLOCK, J.C., 2003, Biofilms in drinking water distribution systems, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2, 147-168.
- BENDSINGER, B., RIJINAARTS, H. H. M., ALTENDORF, K., ZEHNDER, A. J. B., 1993, Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids, *Appl Environ Microbiol*, 59, 3973–3977.
- BERGER, P. S., LE'CHAVILLER, M. W., REASONER, D.J., 1992, Control of Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems, Control of Biofilm Growth in Drinking Water Distribution System, November 1990, U.S., *Printed on Recycled Paper*, 1-30.

BESNARD, V., FEDERIGHI, M., DECLERQ, E., JUGIAU, F., CAPPELIER, J. M., 2002, Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*, *Vet. Res.* 33, 359–370.

BEVERIDGE, T.J., MAKIN, S.A., KADURUGAMUWA, J.L., LI, Z., 1997, Interaction between biofilms and the environment, *FEMS Microbiol Rev*, 20, 291-303.

BOE-HANSEN, R., 2001, *Microbial growth in drinking water distribution systems*, Thesis (PhD), Denmark Technical University.

BOE-HANSEN, R., ALBRECHTSEN, H.J., ARVIN, E., 2003, Experimental systems for studying biofilm growth in drinking water, Biofilm in medicine, *Industry and Environmental biotechnology*, IWA , 215-229.

BOE-HANSEN, R., ALBRECHTSEN, H.J., ARVIN, E., JORGENSEN, C., 2002, Dynamics of biofilm formation in a model drinking water distribution system, *J Wat Supply*, 51, 399-406.

BOIVIN, M., MASSIEUX, B., BREURE, A.M., ENDE, F.P., GREVE, G.D., RUTGERS, M., ADMIRAL, W., 2005, Effects of copper and temperature on aquatic bacterial communities, *Aquatic Toxicology*, 71, 345–356.

BOPP, C. A., SUMNER, J. W., MORRIS, G. K., WELLS, J. G., 1981, Isolation of *Legionella* spp. from Environmental Water Samples by Low-pH Treatment and Use of a Selective Medium, *Journal of clinical microbiology*, 13(4), 714-719.

BOS, R., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H.J, 1999, Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiol Rev*, 23, 179-230.

BOSS, M. J. and DAY, D. W., 2003, Biological Risk Engineering Handbook: Infection Control Legionella and Cooling Towers, *CRC*, Chapter 11.

BUTTERFIELD, P.W., CAMPER, A.K., ELLIS, B.D., JONES, W.L., 2002, Chlorination of model drinking water biofilms: implications for growth and organic carbon removal, *Wat Res*, 36, 4391-4405.

CHAE, M.S. and SCHRAFT, H., 2001, Cell viability of *Listeria monocytogenes* Biofilms, *Food Microbiology*, 18, 103-112.

CHARACKLIS, W. G., 1990, Biofilm processes. In *Biofilms*, ed. WG Characklis, KC Marshall, *New York: Wiley*, 195–231.

CODONY, F., MORATA, J., MAS, J., 2005, Role of discontinuous chlorination on microbial production by drinking water biofilms, *Water Research* ,39, 1896–1906.

COSTERTON, J. W., 1999, Introduction to biofilm, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 217–221.

CRITCHLEY, M. and BENTHAM, R., 2007, *Legionella* and Protozoa in Cooling Towers: Implications for Public Health and Chemical Control, *Environmental Health*, 7, 36-45.

CZARA, N. and HOEKSTRA, F., 2009, Microbial Communication, Cooperation and Cheating: Quorum Sensing Drives the Evolution of Cooperation in Bacteria, *Plos one*, 4, 1-10.

DECLERCK, P., 2009, Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*, *Environmental Microbiology*, 1462-2920.

DECLERCK, P., BEHETS, J., DEALAEDT, Y., MARGINEANU, A., LAMMERTYN, V., OLLEVIER, F., 2005, Impact of Non-Legionella Bacteria on the Uptake and Intracellular Replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*, *Springer Science+Business Media, Inc.*, 50, 536-549.

DE SARA VIA, S. G. and DE MELE, F.M., Non- investigate methods for monitoring biofilm growth in industrial water systems.

DOBRET SOV, S., TELPLITSKI, M., PAUL, V., 2009, Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling, *Taylor and Francis Group*, 25(5), 413-427.

DONLAN, R.M., 2002, Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerging Infect Dis*, 8, 881-890.

DONLAN, R., MURGA, R., CARPENTER, J., BROWN, E., BESSER R., FIELDS, B., 2002, Monochloramin Disinfection of Biofilm-Associated *Legionella pneumophila* in A Potable, *Asm*, 406-410.

DONLAN, R.M., PIEDE, J.A., HEYES, C.D., SANII, L., MURGA, R., EDMONDS, P., EL-SAYED, I., EL-SAYED, M.A., 2004, Model System for Growing and Quantifying *Streptococcus pneumoniae* Biofilms In Situ and in Real Time, *Applied and Enviromental microbiology*, 70 (8), 4980-4988.

DREESZEN, P. H., 2003, Key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking Water Systems, *Edstrom Industries*, 2, 1-19.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal Chem*, 28, 350-356.

DUNNE, M. J., 2002, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, *Clinical microbiology rewiews*, 15(2). 155-166.

EDSTROM INDUSTRIES, 1999, Biofilm (online)
<http://www.edstrom.com/DocLib/biofilm.pdf> (Ziyaret tarihi: 04.04.2011)

EISENSTARK, A., CALCUTT, M., BECKER-HAPAK, M., IVAONA, A., 1996, Role of *E. coli* rpd and associated genes in defense against oxidative damage, *Free Rad. Biol. Med.*, 2,975-993.

FANG, W., HU, J.Y., ONG S.L., 2008, Influence of phosphorus on biofilm formation in model drinking water distribution systems, *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.

FARE'S, A. B., JEBBAR, D. B., HARAS, D., 2007, Influence of high salinity on biofilm formation and benzoate assimilation by *Pseudomonas aeruginosa*, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 5–8.

FLANNERY, B., GELLING, L. B., VUGIA, D. J., WEINTRAUB, J. M., SALERNO, J. J., CONROY, M. J., STEVENS, V. A., ROSE, C. H., MOORE, M. R., FIELDS, B. S., BESSER, R. E, 2006, Reducing *Legionella* Colonization of Water Systems with Monochloramine, *Emerging Infectious Diseases*, 12, 588-596.

FLEMMING, H.C., 2002, Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 629-640.

FLETCHER, M., and LOEB, G. I., 1979, Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces, *Appl Environ Microbiol*, 37:, 67–72.

FORSTMEIER, M., WOZNY, G., BUSS, K., TOLLE, J., 2005, *Legionella* control in cooling tower with electrolit disinfection, *Chemical Engineering Technology*, 28(7), 761-765.

FOSTER, J.W. and HALL, H. K., 1990, Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*, *J Bacteriol*, 172, 771-778.

FUX, C.A., COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., STOODLEY, P., 2004, Survival strategies of infectious Biofilms, *Trends in Microbiology*, 1-7.

GAGNONA, G. A., SLAWSON, R.M., 1999, An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *Journal of Microbiological Methods*, 34, 203–214.

GILBERT, P., MCBAIN, A.J., RICKARD, A.H., 2003, Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control, *Int Biodet Biodeg*, 51, 245-248.

GLEESON, C. and GRAY, N. F., 1997, The Coliform Index And Waterborn Disease: Problem of Microbial Drinking Water Assessment, *Taylor & Francis Group*, 1-37.

GOMEZ-SUAREZ, C., PASMA, J., VAN DER BORDEN, A.J., WINGENDER, J., FLEMMING, H.C., BUSSCHER, H.J, VAN DER MEI, H.C., 2002, Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces, *Microbiology*, 148, 1161-1169.

- HALLAM, N.B., WEST, J.R., FORSTER, C.F., SIMMS, J., 2001, The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Wat Res*, 35, 4063-4071.
- HERMANOWICZ, S.W., 1999, Two-dimensionel simulations of biofilm development: effects of external enviromental conditions, *Pergamon*, 39, 107-114.
- HENRICI, A. T., 1933, Studies of freshwater bacteria. I.A direct microscopic technique, *J. Bacteriol*, 25, 277-87.
- HYDE, FW, ALBERG, M., SMITH, K., 1997, Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , 19, 142-149.
- HEYDE, M. and PORTALIER, R., 1990, Acid shock proteins of *E. coli*, *FEMS Microbiol Lett*, 69, 19-26.
- ISHIMATSU, S., MIYAMOTO, H., HORI, H., TANAKA, I., YOSHIDA, S., 2001, Sampling and Detection of *Legionella pneumophila* Aerosols Generated from an Industrial Cooling Tower, *Pergamon*, 45, 421-427.
- JACANGEL, J. G. and OLIVIERI, V. P., 1985, Aspects of the mode of action of monochloramine, *Water chlorination, chemistry, environmental impact and health effects*. Lewis Publishers Inc., 575-586.
- JAMES, G. A., BEAUDETTE, L., COSTERTON, J. W., 1995, Interspecies bacterial interactions in biofilms, *J. Ind. Microbiol*, 15, 257-262.
- JAN, G., ROUAULT, A., MAUBOIS, J. L., 2000, Acid stress susceptibility and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Lait*, 80, 325-336.
- KAISER, D., 1996, Bacteria also vote, *Science*, 272, 1598-1599.
- KIEREK -PEARSON, K. and KARATAN, E., 2005, Stages of Biofilm Development, Biofilm Development in Bacteria, *Advances in Applied Microbiology*, Boston-Massachuttes, 81-98.
- KIVES, J., ORGAZ, B., SANJOSE, C., 2006, Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 50 , 104-108.
- KJELLEBERG, S. and MOLIN, S., 2002, Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?, *Curr Opinion Microbiol*, 5, 254-258.
- KREFT, J.-U., 2004, Conflicts of interest in biofilms, *Cambridge University Press*, 1, 265-276.
- KRUSNELL, J. W. and LINDER, E., 1999, Free-living Amoebae Protecting *Legionella* in Water: The Tip of an Iceberg?, *Scand J Infect Dis*, 31, 383-385.

- KOKARE, C. R., CHAKRABORTY, S., KHOPADE, A. N., MAHADIK, K. R., 2009, Biofilm: importance and applications, *Indian journal of biotechnology*, 8, 159-168.
- KOLARI, M., 2003, Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces, Thesis (PhD), University of Helsinki Finland.
- KOOL, J.L., 2002, Control of *Legionella* in drinking water systems: impact of monochloramine, *ASM Press, Washington, DC*, 411–418.
- KOOL, J.L., CARPENTER, J.J., FIELDS, B.S., 1999, Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease, *Lancet*, 353, 272- 277.
- KUIPER, M.W., WULLINGS, B.A., AKKERMANS, A.D.L., BEUMER, R.R., KOOIJ, D., 2004, Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride, *Appl Environ Microbiol*, 70, 6826-6833.
- LAPAGLIA, C. and HARTZELL, P.L., 1997, Stress-Induced Production of Biofilm in the Hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*, *Applied and environmental microbiology*, 63, 3158–3163.
- LAWRENCE, J.R., NEU, T.R., MARSHALL, K.C., 2002, Colonization, adhesion, aggregation, and biofilms, 466-477, *Manual of Environmental Microbiology*, HURST, C.J., 2. Bask1, ISBN: 1-55581-199-X, ASM Press, Washington, D.C., USA.
- LEAPHART, A. B., THOMPSON, D. K., HUANG, K., ALM E., WAN, X. F., ARKIN, A., BROWN, S. D., WU, L., YAN, T., LIU, X., WICKHAM, G. S., ZHOU, J., 2006, Transcriptome Profiling of *Shewanella oneidensis* Gene Expression following Exposure to Acidic and Alkaline pH, *Journal of bacteriology*, 188, 1633–1642.
- LECHEVALLIER, M.W., CAWTHON, C.D. and LEE, R.G., 1988, Inactivation of Biofilm Bacteria, *Applied and environmental*, 1988, 2492-2499.
- LIN, J., SMITH, M. P., CHAPIN, K.C., 1996, Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *E. coli*, *Appl and Environ Microbiol*, 62, 3094-3100.
- LIU, Y. and TAY, J.H., 2001, Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behavior of biofilms, *World J Microbiol Biotechnol*, 17, 111-117.
- LIU, Y., ZHANG, W., SILEIKAA, T., WARTAA, R., CIANCIOOTOB, N. P., PACKMANA, A., 2009, Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems, *Biofouling*, 25(3), 241–253.
- LIU, Z., LIN, Y.E., STOUT, J.E., HWANG, C.C, VIDIC, R.D., YU, V.L., 2006, Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system, *Journal of Applied Microbiology*, 101, 437–442.

MACCHIAROLO, N. T., MCGUIRE, B. G., CSALISE, J. M., 1981, Method For The Control Of Biofouling In Recirculating Water System, *United States Patent*, 19,1-14.

MACDONALD, R., SANTA, M., BRÖZEL, V.S., 2000, The response of a bacterial biofilm community in a simulated industrial cooling water system to treatment with an anionic dispersant, *J Appl Microbiol*, 89, 225-235.

MAH, T.C. and O'TOOLE, G.A., 2001, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends Microbiol*, 9, 34-39.

MAINS, C., 2008, Biofilm Control in Distribution Systems, *National Enviromental Services Center*, 8, 1-4.

MAN, A. and FRANCA, F. B., 1998, Biofilm formation on brass coupons exposed to a cooling system of an oil refinery, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 39-44.

MCDUGLAD, D., RICE, S. A., WEICHARTD., KJELLLEBERG, S., 1998, Nonculturability: adaptation or debilitation?, *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 1-9.

MCGRANE, W. K., 1994, Cooling tower *Legionella pneumophila* study cdc joint research, Watertech'94 Conference, November 9-11 1994, Houston.

MELO, L.F. and BOTT, T.R., 1997, Biofouling in water systems, *Experimen Therm Fluid Sci*, 14, 375-381.

MILLER, M. B. and BASSLER, B. L., 2001, Quorum sensing in bacteria, *Annu. Rev. Microbiol*, 55, 165-99.

MILLER, J. and SIMPSON, G. D., 1999, Chemical control of *Legionella*, thesis (PhD), Vulcan Chemical Technologies.

MOMBA, M. N. and BINDA, M. A., 2002, Combining chlorination and chloramination processes for the inhibition of biofilm formation in drinking surface water system models, *J Appl Microbiol*. 92, 641-648.

MOORTHY, S. and WATNICK, P. I., 2004, Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development, *Molecular Microbiology*, 52(2), 573-587.

MUNRO, P.M., FLATAU, G.N., CLEMENT, R.L., GAUTHIER M.J., 1995, Influence of the RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella tyhimurium* in seawater, *Appl. Environ. Microbial*, 61, 1853-1858.

MURGA, R., MILLER, J.M., DONLAN, R. M., 2001, Biofilm Formation by Gram-Negative Bacteria on Central Venous Catheter Connectors: Effect of Conditioning Films in a Laboratory Model, *Journal of clinical microbiology*, 39 (6), 2294-2297.

NDIONGUE, S., HUCK, P.M., SLAWSON, R.M., 2004, Effects of temperature and biodegradable organic matter on control of biofilms by free chlorine in a model drinking water distribution system, *Water Research*, 2005, 1-12.

NEDWELL, D. B., 1999, Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature, *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 101-111.

O'TOOLE, KAPLAN, H., KOLTER, R., 2000, Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79.

PARIS, T., SKALI-LAMI, S., BLOCKI, J. C., 2008, Probing young drinking water biofilms with hard and soft particles, *Water research*, 1-10.

PARK, S. K. and KIM, Y. K., 2008, Effect of chloramine concentration on biofilm maintenance on pipe surfaces exposed to nutrient-limited drinking water, *Water SA*, 34(3), 373-379.

RAYNER, J. C. and LAPPIN-SCOTT, H. M., 2002, Experimental biofilms and their applications in the study of environmental processes, *Methods in biotechnology*, 12, 297-305.

RODRIGUEZ, G. G., PHILPS, D., ISHIGURO, K., RIDGWAY, H. F., 1992, Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria, *Applied and environmental microbiology*, 58, 1801-1808.

RUSSELL, J. B. and DOMBROWSKI, D. B., 1980, Effect of pH on the Efficiency of Growth by Pure Cultures of Rumen Bacteria in Continuous Culture, *Applied and environmental microbiology*, 39(3), 604-610.

SABRIA, M., ALVAREZ, J., DOMINGUEZ, A., PEDROL, A., SAUCA, G., SALLERAS, L., LOPEZ, A., GARCIA-NUNEZ, M. A., PARRON, I., BAUFFUET, M.P., 2006, A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source, *Clin Microbiol Infect*, 12, 642-647.

SARDEASSAI, Y. N., 2005, Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health, *Current Science*, 89, 1650.

SAUER, K., CAMPER, A. K., EHRLICHG, D., COSTERTON, J. W., DAVIES, D. G., 2002, *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *J Bacteriol*, 184, 1140-54.

SCHNIDER-KEEL, U., LEJBOLLE, K. B., BAEHLER, E., HAAS, D., KEEL, C., 2001, The Sigma Factor AlgU (AlgT) Controls Exopolysaccharide Production and Tolerance towards Desiccation and Osmotic Stress in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0, *Applied and environmental microbiology*, 67, 5683-5693.

NEILANDS, J., 2007, Acid tolerans of *Streptococcus mutans* biofilms, Malmo University, 11-76.

RAO, T. S., 2010, Comparative effect of temperature on biofilm formation in natural and modified marine environment, *Aquat Ecol*, 44, 463–478.

REASONER, D. J., and GELDREICH, E. E., 1985, A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl Environ Microbiol*, 49, 1-7.

www.scvurppp-w2k.com (Ziyaret Tarihi: 20 Ekim 2010)

SIMONES, L. C., AZEVEDO, N., PACHECO, A. , KEEVIL, C. W., VIEIRA, M. J., 2006, Drinking water biofilm assessment of total and culturable bacteria under different operating conditions, *Biofouling*, 22, 91 – 99.

SPLENDIANI, A., LIVINGSTON, A. G., NICOLELLA, C., 2006, Control of Membrane-Attached Biofilms Using Surfactants, *Wiley Periodicals, Inc.*, 15-23.

SRIVASTAVAS., YADAVA., SEEM, K., MISHRA, S., CHAUDHARY, V., NAUTIYAL, C. S., 2008, Effect of High Temperature on *Pseudomonas putida* NBRI0987 Biofilm Formation and Expression of Stress Sigma Factor RpoS, *Curr Microbiol*, 56, 453–457.

STEINERT, M., EMODY, L., AMANN, R., HACKER J., 1997, Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, *Applied and environmental microbiology*, 63, 2047–2053.

STEWART, P. S., GRIEBE, T., SRINIVASAN, R., CHEN, C.I., YU, F. P., DEBEER, D., MCFETERS, G. A., 1994, Comparison of Respiratory Activity and Culturability during Monochloramine Disinfection of Binary Population Biofilms, *Applied and environmental microbiology*, 60, 1690-1692.

SUTHERLAND, I.W., 2001, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiol*, 147, 3-9.

STOODLEY, L. H. and STOODLEY, P., 2004, Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens, *Trends in Microbiology*, 2-4.

STOODLEY, P., DE BEER, P., LAPPIN-SCOTT H. M., 1997, Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect *Antimicrob, Agents Chemother*, 41, 1876–1879.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W., 2002, Biofilms as complex differentiated communities, *Annu Rev Microbiol*, 56, 187-209.

STOODLEY, P., WILSON, S., HALL-STOODLEY, L., BOYLE, J.D., LAPPIN-SCOTT, H.M., COSTERTON, J.W., 2001, Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms, *Appl Environ Microbiol*, 67, 5608-5613.

- STOREY, M. V. and ASHBOLT, N.J., 2002, A comparison of methods and models for the analysis of water distribution pipe biofilms, *Wat Sci Tech*, 2, 73–80.
- SURDEAU, N., LAURENT-MAQUI, D., BOUTHORS, S., GELLE, M. P., 2006, Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, Oxsilw 320N, *Journal of Hospital Infection*, 62, 487–493.
- SZEWZYK, U., SZEWZYK, R., MANZ W., SCHLEIFER, K. H., 2000, Microbiological safety of drinking water, *Annu. Rev. Microbiol*, 54, 81–127.
- SZYMANSKA, J., 2003, Biofilm and dental unit waterlines, *Ann Agric Environ Med*, 10, 151–157.
- TANJI, Y., NISHIHARA, T., MIYANAGA, K., 2007, Monitoring of biofilm in cooling water system by measuring lactic acid consumption rate, *Biochemical Engineering Journal*, 35, 81–86.
- THOMAS, V., BOUCHEZ, T., NICOLAS, V., ROBERT, S., LORET, J. F., LE' VI, Y., 2004, Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 950–963.
- TOSUN, H. ve AKTUĞ GÖNÜL, Ş., 2005, The Effect of Acid Adaptation Conditions on Acid Tolerance Response of *Escherichia coli* O157: H7, *Tubitak*, 29, 197-202.
- TSUNEDA, S., AIKAWA, H., HAYASHI, H., YUASA, A., HIRATA, A., 2003, Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface, *FEMS Microbiol Lett*, 223, 287-292.
- TSUNEDA, S., JUNG, J., HAYASHI, H., AIKAWA, H., HIRATA, A., SASAKI, H., 2003, Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory, *Colloids Surfaces*, 29, 181-188.
- TROUSSELLIER, M., BONNEFONT, J. L., COURTIES, C., DERRIEN, A., DUPRAY, E., GAUTHIER, M., GOURMELON, M., JOUX, F., 1998, Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater, *Oceanologica Acta*, 21, 965-981.
- TURETGEN, I., 2004, Comparison of the Efficacy of Free Residual Chlorine and Monochloramine against Biofilms in Model and Full Scale Cooling Towers, *Biofouling*, 20 (2), 81 – 85.
- ULUSU, N. N. ve TEZCAN, E. F., 2001, Cold Shock Proteins, *Tubitak*, 31,283-290.
- VAN LOOSDERCHT, M. C. M., LYKLEMA, J., NORDE, W., SCHRAA, G., ZEHLER, A. J. B., 1987, Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion, *Appl Environ Microbiol*, 53, 1898–1901.

VANPELT, A. W. J., WEERKRAMP, A. H., UYEN, M., BUSSCHER, H. J., DE JONG, H. P., ARENDS, J., 1985, Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies, *Appl Environ Microbiol*, 49, 1270–1275.

WATERS, C. M. and BASSLER, B. S., 2005, Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 319–46.

WE'RY, N., BRU-ADAN, V., MINERVINI, C., DELGE'NES, J. P., GARRELLY, L. , GODON, J. J., 2008, Dynamics of *Legionella* spp. and Bacterial Populations during the Proliferation of *L. pneumophila* in a Cooling Tower Facility, *Applied and enviromental microbiology*, 74(10), 3030–3037.

WIRTANEN, G., SALO, S., HELANDER, I. M., MATTILA-SANDHOLM, T., 2001, Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm, *Colloids Surfaces*, 20, 37-50.

XAVIER, J. B., PICIOREANU, C., RANI, S. A., LOOSDRECHT, M., STEWART, P.S., 2005, Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study, *Microbiology* , 151, 3817–3832.

YAMAMOTO, H., SUGIURA, M., KUSUNOKI, S., EZAKI, T., IKEDO, M., YABUUCHI, E., 1992, Factors Stimulating Propagation of *Legionella* in Cooling Tower Water, *Applied and Enviromental microbiology*, 58, 1394-1397.

ZHANG, X. and BISHOP, P.L., 2003, Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, 50, 63–69.

ZHANG, X., BISHOP, P. L., KINKLE, B.K., 1999, Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms, *Wat Sci*, 39(7), 211-218.

ÖZGEÇMİŞ

15 Aralık 1986 tarihinde İstanbul’da doğmuştur. 2004 yılında Adile Mermerci Anadolu Lisesi, 2008 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun olmuştur. Ayrıca Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi İktisat Bölümü’nde okumaktadır. 2007 Eylül ayında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ana bilim dalında staj yapmıştır. Katıldığı eğitim ve kongreler; Mart 2006, 3. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, Haziran 2010, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi.

(E-posta: cansuvatansever@hotmail.com)

