



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

BİYOFİLM TABAKASINA UYGULANAN ÇEŞİTLİ STRES FAKTÖRLERİNİN BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Cansu VATANSEVER

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

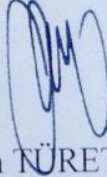
**DANIŞMAN
Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN**

Mart, 2017

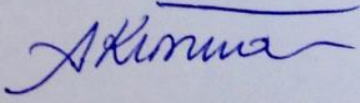
İSTANBUL

Bu çalışma 17.03.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

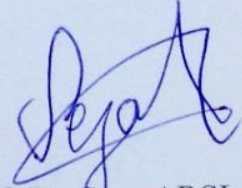
Tez Jürisi



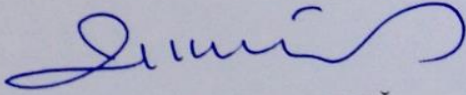
Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



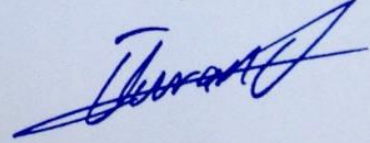
Prof. Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Seza ARSLAN
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Gülşen ALTUĞ
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 38263 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında akademik bilgi ve tecrübelerini cömertçe paylaşan, fikir ve önerileriyle yol gösteren, sabrının yanı sıra hoşgörüsünü de hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN'e,

Çalışmalarım süresince engin bilgi ve fikirleri ile sadece tezime değil bilime olan bağlılığıma da katkıda bulunan, her konuda desteğini hissettiğim Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK'a,

Doktora tez izleme komitemde yer alarak bilgileriyle destek olan, sunduğu öneriler ve yapıcı eleştirileriyle tezimin gelişmesine katkıda bulunan Prof. Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM'e,

Doktora tez izleme komitemde yer alma nezaketini gösteren ve değerli görüşleriyle çalışmama katkı sağlayan Prof. Dr. Seza ARSLAN'a,

Tez çalışmam sırasında ihtiyaç duyduğum her konuda güler yüzüyle yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI YÜRÜDÜ'ye,

Tez çalışmamın bir parçası olan Real Time PCR cihazını sağlayarak tezime büyük katkı sağlayan Bilim Laboratuvarı A.Ş. nezdinde Doğan HALİS ve çalışanlarına,

Hayata karşı bakış açısıyla her zaman örnek aldığım, dualarıyla hep yanımda olan anneannem Hatice KOBAK ve zamansız kaybettiğim ama her an ışıkların içinden beni izlediğine inandığım dedem Niyazi KOBAK'a,

Attığım her adım ve aldığım her kararda koşulsuz yanımda olan, anlayışlarını ve desteklerini her an hissettiren, sundukları sonsuz sevgi ve ilgiyle bugünlere gelmemi sağlayan babam Behçet VATANSEVER ve annem Emine VATANSEVER'e,

Tez çalışmamın her aşamasında olduğu kadar hayatın her anını da benimle birlikte göğüsleyen, verdiği güç ve güvenle başarılarımda en büyük payı olan, ablası olmaktan her zaman gurur duyduğum kardeşim Cansel VATANSEVER'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Mart 2017

Cansu VATANSEVER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ	xviii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xix
ÖZET.....	xxiii
SUMMARY	xxv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	10
2.1. BİYOFİLM TABAKASI.....	10
2.1.1. Tanım ve Tarihçe	10
2.1.2. Biyofilm Tabakasının Meydana Geldiği Yerler ve Sebep Olduğu Zararlar ..	12
2.1.3. Biyofilm Tabakasının Mikroorganizmalara Sağladığı Yararlar	14
2.1.4. Mikrobiyal Biyofilmin Yapısı ve Oluşumu	16
2.1.5. EPS Tabakası	20
2.1.6. İnsan Yapımı Su Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilmin Önemi	22
2.1.7. Biyofilmin Yararları.....	25
2.1.8. Biyofilm ve Çoğunluğu Algılama İletişim Sistemi.....	28
2.2. LEGIONELLA PNEUMOPHILA.....	30
2.2.1. <i>Legionella pneumophila</i> 'nın keşfi, genel ve fenotipik özellikleri	30
2.2.2. <i>L. pneumophila</i> 'nın yaşam alanları	32
2.2.3. Bulaşma Yolları ve Sebep Olduğu Hastalık Durumları.....	32
2.2.4. Biyofilm Tabakası ve <i>L. pneumophila</i> ilişkisi	34
2.2.5. <i>L. pneumophila</i> 'nın Konak Hücre İçine Alınışı, Üremesi ve Sağladığı Avantajlar	35
2.2.6. İzolasyon ve İdentifikasyon	37
2.3. SOĞUTMA KULELERİ	38
2.3.1. Soğutma Kulesi Tanım, Görev ve Tipleri	38
2.3.2. Soğutma Kulesinde Biyofilm Oluşumunun Önemi	41

2.3.3. Soğutma Kulesinde Kullanılan Biyofilm Kontrol Teknikleri.....	42
2.3.4. Biyofilm Geliştirilmesinde Kullanılan Model Sistemler	44
2.4. STRES FAKTÖRLERİNİN BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ VE BAKTERİLER TARAFINDAN VERİLEN YANITLAR	47
2.4.1. Sıcaklık Stresi Etkisi ve Bakteriye Yanıt.....	47
2.4.2. pH Stresi Etkisi ve Bakteriye Yanıt	49
2.4.3. Dezenfeksiyon Stresi Etkisi ve Bakteriye Yanıt.....	51
2.4.4. Ozmotik Konsantrasyon Stresi Etkisi ve Bakteriye Yanıt.....	56
2.4.5. Kuruluk Stresi Etkisi ve Bakteriye Yanıt.....	58
2.4.6. Açlık Stresi Etkisi ve Bakteriye Yanıt	61
2.4.7. UV Stres Etkisi ve Bakteriye Yanıt	63
2.4.8. Stres Koşulları ve VBNC Fazı	66
3. MALZEME VE YÖNTEM	69
3.1. SU SİRKÜLASYON TANKI VE İŞLETİM KOŞULLARI.....	69
3.2. STRES FAKTÖRLERİNİN UYGULANMASI.....	73
3.2.1. Sıcaklık Uygulaması	73
3.2.1.1. <i>Biyofilm Örneklerine Sıcaklık Uygulaması</i>	73
3.2.1.2. <i>Planktonik Faz Örneklerine Sıcaklık Uygulaması</i>	73
3.2.2. pH Uygulaması	73
3.2.2.1. <i>Biyofilm Örneklerine pH Uygulaması</i>	74
3.2.2.2. <i>Planktonik Faz Örneklerine pH Uygulaması</i>	74
3.2.3. Dezenfeksiyon Uygulaması	75
3.2.3.1. <i>Biyofilm Örneklerine Dezenfeksiyon Uygulaması</i>	75
3.2.3.2. <i>Planktonik Faz Örneklerine Dezenfeksiyon Uygulaması</i>	75
3.2.4. Ozmotik Konsantrasyon Uygulaması	76
3.2.4.1. <i>Biyofilm Örneklerine Ozmotik Konsantrasyon Uygulaması</i>	76
3.2.4.2. <i>Planktonik Faz Örneklerine Ozmotik Konsantrasyon Uygulaması</i>	77
3.2.5. Kuruluk Uygulaması	77
3.2.5.1. <i>Biyofilm Örneklerine Kuruluk Uygulaması</i>	77
3.2.5.2. <i>Planktonik Faz Örneklerine Kuruluk Uygulaması</i>	78
3.2.6. Açlık Uygulaması	78
3.2.6.1. <i>Biyofilm Örneklerine Açlık Uygulaması</i>	78
3.2.6.2. <i>Planktonik Faz Örneklerine Açlık Uygulaması</i>	78
3.2.6. UV Uygulaması.....	79
3.2.6.1. <i>Biyofilm Örneklerine UV Uygulaması</i>	79

3.2.6.2. Planktonik Faz Örneklerine UV Uygulaması.....	79
3.3. BAKTERİYOLOJİK ANALİZLER.....	80
3.3.1. Sıcaklık Uygulama Örneklerinin Hazırlanması	80
3.3.1.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması, Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	80
3.3.1.2. Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	80
3.3.2. pH Uygulama Örneklerinin Hazırlanması	81
3.3.2.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	81
3.3.2.2. Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	82
3.3.3. Dezenfeksiyon Uygulama Örneklerinin Hazırlanması	82
3.3.3.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	82
3.3.3.2. Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	83
3.3.4. Ozmotik Konsantrasyon Uygulama Örneklerinin Hazırlanması	84
3.3.4.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	84
3.3.4.2. Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	84
3.3.5. Kuruluk Uygulama Örneklerinin Hazırlanması.....	85
3.3.5.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	85
3.3.5.2. Planktonik Faz örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	85
3.3.6. Açlık Uygulama Örneklerinin Hazırlanması	86
3.3.6.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	86
3.3.6.2. Planktonik Faz örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	87
3.3.7. UV Uygulama Örneklerinin Hazırlanması	88
3.3.7.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	88
3.3.7.2. Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve <i>L. pneumophila</i> 'nın İzolasyon ve Sayımı	88
3.4. EPİFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME.....	89
3.4.1. CTC-DAPI BOYA UYGULAMASI.....	89

3.4.1.1. Uygulamanın Prensibi.....	89
3.4.1.2. Örneklerin Hazırlanması.....	89
3.4.1.3. Boyama ve İnceleme	90
3.4.2. LIVE/DEAD KİT UYGULAMASI.....	91
3.4.2.1. Uygulamanın Prensibi.....	91
3.4.2.2. Örneklerin Hazırlanması.....	92
3.4.2.3. Boyama ve İnceleme	92
3.5. ALAMAR BLUE BOYAMA YÖNTEMİ	93
3.5.1. Uygulamanın Prensibi.....	93
3.5.2. Örneklerin Hazırlanması	94
3.5.3. Boyama ve Ölçüm.....	94
3.6. EMA-QPCR YÖNTEMİ	95
3.6.1. Uygulamanın Prensibi.....	95
3.6.2. EMA optimizasyon işlemi	96
3.6.3. Örneklerin Hazırlanması ve EMA ile Muamele	96
3.6.4. DNA İzolasyonu ve PCR İşlemi	97
3.7. SU SİRKÜLASYON TANKI İŞLETİM KOŞULLARI ÖLÇÜMLERİ.....	98
3.7.1. Toplam Çözünmüş Madde Ölçümü	98
3.7.2. Çözünmüş Oksijen Ölçümü	99
3.7.3. Sıcaklık ve pH Ölçümü	99
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	99
3.9. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER	100
3.9.1. R2A Agar	100
3.9.2. CYE (Charcoal yeast extract) Agar	100
3.9.3. BCYE Besiyeri Katkısı	101
3.9.4. Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	101
3.9.5. 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC).....	102
3.9.6. 4-,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	102
3.9.7. Etidyum Monoazid Bromür (EMA).....	102
3.9.8. pH Çözeltilerinin Hazırlanışı	102
3.11.8.1. 1M HCl Çözeltisi	103
3.9.8.2. 3M HCl Çözeltisi	103
3.9.8.3. 1M KOH Çözeltisi	103
3.9.8.4. 3M KOH Çözeltisi	103

3.9.9. Dezenfektan Çözeltilerinin Hazırlanışı	103
3.9.9.1. 2 ppm Klor Çözeltisi.....	103
3.9.9.2. 4 ppm Klor Çözeltisi.....	104
3.9.9.3. 10 ppm Klor Çözeltisi.....	104
3.9.9.4. 20 ppm Klor Çözeltisi.....	104
3.9.9.5. 2 ppm Monokloramin Çözeltisi	104
3.9.9.6. 4 ppm Monokloramin Çözeltisi	104
3.9.9.7. 10 ppm Monokloramin Çözeltisi	105
3.9.9.8. 20 ppm Monokloramin Çözeltisi	105
3.9.10. Sodyum Tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	105
3.9.10.1. %0.5'lik Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi.....	105
3.9.10.2. %1'lik Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi.....	106
3.9.11. Tuz Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	106
3.9.11.1. %0.1'lik Tuz Çözeltisi	106
3.9.11.2. %0.2'lik Tuz Çözeltisi	106
3.9.11.3. %3'lük Tuz Çözeltisi.....	106
3.9.11.4. %6'lık Tuz Çözeltisi	107
4. BULGULAR	108
4.1. SICAKLIK UYGULAMA SONUÇLARI	110
4.1.1. Sıcaklık - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	110
4.1.2. Sıcaklık - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	111
4.1.3. Sıcaklık - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	113
4.1.4. Sıcaklık - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	114
4.1.5. Sıcaklık - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm	115
4.1.6. Sıcaklık - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Planktonik	117
4.1.7. Sıcaklık - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm.....	120
4.1.8. Sıcaklık - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik.....	122
4.1.9. Sıcaklık - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm.....	124
4.1.10. Sıcaklık - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik.....	125
4.1.11. Sıcaklık - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm	127
4.1.12. Sıcaklık - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik	127
4.2. PH UYGULAMA SONUÇLARI	128
4.2.1. pH - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	128
4.2.2. pH - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	129

4.2.3. pH - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	131
4.2.4. pH - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	132
4.2.5. pH - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm.....	133
4.2.6. pH - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Planktonik.....	135
4.2.7. pH - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm.....	137
4.2.8. pH - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik	139
4.2.9. pH Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm	141
4.2.10. pH - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik.....	142
4.2.11. pH - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm.....	144
4.2.12. pH - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik.....	144
4.3. DEZENFEKTAN UYGULAMA SONUÇLARI	145
4.3.1. Dezenfektan - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	145
4.3.2. Dezenfektan - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	146
4.3.3. Dezenfektan - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm.....	147
4.3.4. Dezenfektan - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik.....	149
4.3.5. Dezenfektan - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm	150
4.3.6. Dezenfektan - CTC-DAPI Sonuçları - Planktonik.....	153
4.3.7. Dezenfektan - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm.....	156
4.3.8. Dezenfektan - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik.....	160
4.3.9. Dezenfektan - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm	163
4.3.10. Dezenfektan - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik.....	165
4.3.11. Dezenfektan - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm	166
4.3.12. Dezenfektan - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik	167
4.4. OZMOTİK KONSANTRASYON UYGULAMA SONUÇLARI	167
4.4.1. Ozmotik Konsantrasyon - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	167
4.4.2. Ozmotik Konsantrasyon - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	168
4.4.3. Ozmotik Konsantrasyon - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	169
4.4.4. Ozmotik Konsantrasyon - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	170
4.4.5. Ozmotik Konsantrasyon - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm	172
4.4.7. Ozmotik Konsantrasyon - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm.....	176
4.4.8. Ozmotik Konsantrasyon - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik.....	178
4.4.9. Ozmotik Konsantrasyon - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm.....	180
4.4.10. Ozmotik Konsantrasyon - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik.....	182
4.4.11. Ozmotik Konsantrasyon - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm	183

4.4.12. Ozmotik Konsantrasyon - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik.....	184
4.5. KURULUK, AÇLIK VE UV UYGULAMA SONUÇLARI	184
4.5.1. Kuruluk, Açlık ve UV - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	184
4.5.2. Kuruluk, Açlık ve UV - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik.....	185
4.5.3. Kuruluk, Açlık ve UV - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm	186
4.5.4. Kuruluk, Açlık ve UV - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik	187
4.5.5. Kuruluk, Açlık ve UV - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm.....	189
4.5.6. Kuruluk, Açlık ve UV - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Planktonik.....	191
4.5.7. Kuruluk, Açlık ve UV - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm	193
4.5.8. Kuruluk, Açlık ve UV - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik	195
4.5.9. Kuruluk, Açlık ve UV - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm.....	197
4.5.10. Kuruluk, Açlık ve UV - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik.....	198
4.5.11. Kuruluk, Açlık ve UV - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm.....	200
4.5.12. Kuruluk, Açlık ve UV - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik.....	201
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	202
KAYNAKLAR	242
EKLER.....	275
EK 1. İstatistiksel Analizler.	275
ÖZGEÇMİŞ.....	375

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Üç adımda biyofilm oluşumu (Stoodley ve Dirckx, 2003).....	20
Şekil 2.2: Açık devre soğutma kulesi şeması (www.evapco.com).....	39
Şekil 2.3: Kapalı devre soğutma kulesi şeması (www.evapco.com).....	40
Şekil 3.1: Model su sirkülasyon sisteminin şematik diyagramı.....	70
Şekil 4.1: 14 haftalık biyofilm oluşum süreci sonunda parametrelerle muamele edilmek üzere sistem çıkarılan cam kuponlar.....	109
Şekil 4.2: Kuponların parametre solüsyonları ile inkübasyonu.....	109
Şekil 4.3: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).....	111
Şekil 4.4: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).....	112
Şekil 4.5: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).....	113
Şekil 4.6: BCYE Agarda üreyen <i>L. pneumophila</i> koloni görüntüleri. A) Kontrol örneği B) 65°C sıcaklık ile 1. saatlik muamele örneği.....	114
Şekil 4.7: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).....	115
Şekil 4.8: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).....	116
Şekil 4.9: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).....	117
Şekil 4.10: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).....	118
Şekil 4.11: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).....	119
Şekil 4.12: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).....	120

Şekil 4.13: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	121
Şekil 4.14: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	122
Şekil 4.15: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	123
Şekil 4.16: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).....	125
Şekil 4.17: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).....	126
Şekil 4.18: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	129
Şekil 4.19: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	130
Şekil 4.20: R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakteri koloni görüntüleri. A) Kontrol örneği, B) pH 3 ile 24. saatlik muamele örneği.	131
Şekil 4.21: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	132
Şekil 4.22: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	133
Şekil 4.23: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	134
Şekil 4.24: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	135
Şekil 4.25: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	136
Şekil 4.26: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	137
Şekil 4.27: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE-DEAD).	138
Şekil 4.28: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE-DEAD).	139

Şekil 4.29: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE-DEAD).	140
Şekil 4.30: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE-DEAD).	141
Şekil 4.31: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar Blue).	142
Şekil 4.32: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar Blue).	143
Şekil 4.33: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	146
Şekil 4.34: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	147
Şekil 4.35: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	148
Şekil 4.36: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	149
Şekil 4.37: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	151
Şekil 4.38: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	151
Şekil 4.39: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	152
Şekil 4.40: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	153
Şekil 4.41: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	154
Şekil 4.42: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	154
Şekil 4.43: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	155
Şekil 4.44: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	156

Şekil 4.45: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	157
Şekil 4.46: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	158
Şekil 4.47: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	159
Şekil 4.48: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	159
Şekil 4.49: LIVE/DEAD kit boyama tekniği epifloresan mikroskop görüntüleri. A) Kontrol örneği, B) 10 ppm monokloramin ile 24. saatlik muamele örneği.	160
Şekil 4.50: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	161
Şekil 4.51: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	161
Şekil 4.52: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	162
Şekil 4.53: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	163
Şekil 4.54: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).	164
Şekil 4.55: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).	165
Şekil 4.56: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	168
Şekil 4.57: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	169
Şekil 4.58: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	170
Şekil 4.59: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	171
Şekil 4.60: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	172

Şekil 4.61: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).....	173
Şekil 4.62: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).....	174
Şekil 4.63: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).....	175
Şekil 4.64: CTC-DAPI boyama tekniği ile epifloresan mikroskop görüntüleri. A) Kontrol örneği, B) Hipertonik tuz ile 24. saatlik muamele örneği.....	176
Şekil 4.65: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	177
Şekil 4.66: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	178
Şekil 4.67: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	179
Şekil 4.68: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	180
Şekil 4.69: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).	181
Şekil 4.70: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).	182
Şekil 4.71: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	185
Şekil 4.72: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).	186
Şekil 4.73: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	187
Şekil 4.74: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan <i>L. pneumophila</i> sayıları (BCYE Agar).	188
Şekil 4.75: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	189
Şekil 4.76: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	190

Şekil 4.77: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).	191
Şekil 4.78: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).	192
Şekil 4.79: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	194
Şekil 4.80: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	195
Şekil 4.81: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	196
Şekil 4.82: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).	197
Şekil 4.83: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).	198
Şekil 4.84: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).	199
Şekil 4.85: Alamar blue boyası ile 24 saatlik muamele sonucunda boyanın indirgenmesine bağlı olarak gözlenen renk değişimi.	200

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Toplam deney süresince sisteme ilave edilen ve sistemden çıkarılan kuponların süreleri.....	72
Tablo 4.1: Toplam deney süresince ölçülen pH, çözünmüş oksijen ve TÇM miktarları.	108
Tablo 4.2: Farklı sıcaklık koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU(Genomik birim)/cm ²).	127
Tablo 4.3: Farklı sıcaklık koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).	128
Tablo 4.4: Farklı pH koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm ²).	144
Tablo 4.5: Farklı pH koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).	144
Tablo 4.6: Farklı dezenfektan koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm ²).	166
Tablo 4.7: Farklı dezenfektan koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).	167
Tablo 4.8: Farklı ozmotik konsantrasyon koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm ²).	183
Tablo 4.9: Farklı ozmotik konsantrasyon koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).	184
Tablo 4.10: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm ²).	201
Tablo 4.11: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).	201

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
α	: Alfa.
%	: Yüzde.
°C	: Santigrat Derece.
®	: Registered Sign.
™	: Trade Mark Sign.
ϵ	: Epsilon.
λ	: Lambda.
σ^S	: Sigma Faktörü.

Kısaltmalar	Açıklama
23S-5S ISR	: 23S-5S Ribozomal Genler Arası Boşluk Bölgesi.
A	: Absorbans.
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi.
AFM	: Atomik Güç Mikroskobu.
AHLs	: Açıl Homoserin Laktonlar.
AIP	: Otoindükleyici Peptit.
ATCC	: Amerikan Kültür Koleksiyonları.
ATP	: Adenozin Trifosfat.
ATPaz	: Adenozin Trifosfataz.
ATR	: Asit Tolerans Yanıtı.
a_w	: Su aktivitesi.
BCYE	: Buffered Charcoal Yeast Extract.
BLS	: Bakteriyosin Benzeri Substrat.
Ca^{2+}	: Kalsiyum.
CAP	: Soğuk Ortama Alışma Proteini.
CDC	: Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi.
CLSM	: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop.
cm	: Santimetre.

cm²	: Santimetre Kare.
CO₂	: Karbondioksit.
CSP	: Soğuk Şoku Proteini.
CTC	: 5-Cyano-2,3-Ditoly Tetrazolium Chloride.
CTI	: Soğutma Kulesi Enstitüsü.
CYE	: Charcoal Yeast Ekstrakt.
ÇO	: Çözünmüş Oksijen.
DAPI	: 4',6- Diamino-2-Phenylindole.
DFA	: Direk Floresan Antikor.
DGGE	: Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi.
dk	: Dakika.
DLVO	: Derjaguin Landau Verwey Overbeck.
DNA	: Deoksiribonükleik Asit.
Dot	: Organel trafiğinde kusur.
DotA	: Kusurlu organel tespiti.
EFM	: Epifloresan Mikroskop.
ELISA	: Enzim Bağlı ImmüNosorbent Deney.
EM	: Elektron Mikroskobu.
EMA	: Etidyum Mono Azit Bromür.
EPS	: Hücre Dışı Polimerik Madde.
EWGLI	: <i>Legionella</i> Enfeksiyonları Avrupa Çalışma Grubu.
Fe³⁺	: Demir.
FISH	: Floresan In Situ Hidridizasyon.
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.
g	: Gram.
g	: G-Gücü.
GU	: Genomik Birim.
H⁺	: Hidrojen.
HCl	: Hidroklorik Asit.
HOCl	: Hipokloröz Asit.
HSPs	: Sıcaklık Şoku Proteinleri.
Icm	: Hücre içi çoğalma.
J	: Joule.
K⁺	: Potasyum.

kDa	: Kilodalton.
kJ	: Kilojoule.
km	: Kilometre.
KOB	: Koloni Oluşturan Birim.
KOH	: Potasyum Hidroksit.
l	: Litre.
LAI-1	: <i>Legionella</i> Otoindükleyici-1.
LPS	: Lipopolisakkarit.
log	: Logaritma.
lqs	: <i>Legionella</i> çoğunluğunu algılama.
LSD	: En Düşük Anlamlı Fark.
m²	: Metrekare.
M	: Molar.
mAb	: Monoklonal Antikor altgrubu.
mg	: Miligram.
Mg²⁺	: Magnezyum.
MIP	: Makrofaj Enfektivite Güçlendirici.
mJ	: Milijoule.
ml	: Mililitre.
mm	: Milimetre.
mM	: Milimolar.
N	: Normal.
Na⁺	: Sodyum.
NaCl	: Sodyum Klorür.
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit.
NaOH	: Sodyum Hidroksil.
nm	: Nanometre.
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi.
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltilisi.
PFGE	: Darbeli Alan Jel Elektroforezi.
pH	: Power of Hydrogen.
PHB	: Poli-3-Hidroksibütirat.
PIA	: Hücreler Arası Adezyon Polisakkariti.
PMA	: Propidyum Mono Azit.

Post-Hoc	: Çoklu Karşılaştırma.
ppm	: Milyonda parçacık.
PVC	: Polivinil Klorür.
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu.
QS	: Çoğunluğu Algılama İletişim Sistemi.
R2A	: Reasoner's 2A.
Re	: Reynold sayısı.
RecA	: Rekombinant protein A.
RNA	: Ribonükleik Asit.
rpoB	: RNA polimeraz B-alt birim.
RpoS	: Durağan faz Sigma faktörü.
S	: Svedberg Birimi.
SBT	: Dizileme Bazlı Tiplendirme.
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu.
SERS	: Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi.
sn	: Saniye.
STS	: Sodyum Tiyosülfat.
STXM	: Taramalı Transmisyon X-Ray Mikroskobu.
TÇM	: Toplam Çözünmüş Madde.
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu.
US-EPA	: Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı.
USPs	: Evrensel Stres Proteinleri.
UV	: Ultraviyole.
VBNC	: Canlı Ama Kültüre Edilemeyen Faz.
W	: Watt.
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü.
µg	: Mikrogram.
µl	: Mikrolitre.
µm	: Mikrometre.
µW	: Mikrowatt.

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BİYOFLİM TABAKASINA UYGULANAN ÇEŞİTLİ STRES FAKTÖRLERİNİN BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Cansu VATANSEVER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN

Biyofilm, mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeylere tutunarak kendi ürettikleri hücre dışı polimerik matriks içinde yaşaması ile meydana gelen bakteri topluluklarıdır. Biyofilm yapısında bulunan pek çok mikroorganizma içinde özellikle *Legionella pneumophila* önemli bir yer tutmaktadır. Soğutma kuleleri, biyofilm tabakasının meydana geldiği ve *L. pneumophila*'nın yaygın olarak bulunabildiği cihazların başında gelmektedir. Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar olumsuz çevresel koşullar karşısında daha dayanıklıdır. Çalışmanın amacı biyofilm ve planktonik bakterilerle mücadele en etkili eliminasyon stratejilerinin en güvenilir teknikler ile tespit edilmesidir. Bu yolla sağlık ve ekonomik açıdan önemli olan biyofilm kaynaklı sorunların önlenmesi hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında şebeke suyuna *L. pneumophila* ATCC 33152 suşu aşılanması ile soğutma kulesi model sisteminde bulunan cam kupon yüzeylerinde meydana getirilen 14 haftalık biyofilm ve planktonik faz bakterileri üzerine 1, 4 ve 24 saat süreyle olmak üzere 4°C, 37°C, 65°C gibi farklı sıcaklıklar; pH 3 ve pH 11 gibi farklı pH değerleri, hipotonik (% 0,01 NaCl) ve hipertonic tuz (% 3 NaCl) ortamı, 2 ve 10 ppm klor ve 2 ve 10 ppm monokloramin gibi dezenfektanlar, açlık, kuruluk ve 1 ve 4 saat süreyle olmak üzere 254 nm dalga boyundaki UV ışık stres koşulları uygulanmıştır. Stres koşullarının ardından biyofilm yapısında bulunan ve planktonik fazdaki aerobik heterotrofik bakteriler ve *L. pneumophila* bakterisinin canlılık durumları klasik kültür, CTC-DAPI boyama yöntemi,

LIVE/DEAD canlılık tayin kiti, Alamar blue boyama yöntemi ve EMA-qPCR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda biyofilm yapısında bulunan bakterilerin stres koşulları karşısında planktonik faz bakterilerinden daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. 65°C sıcaklık, asidik pH uygulaması, 10 ppm monokloramin, hipertonic tuz, kuruluk ve UV uygulamalarının biyofilm tabakasının ve planktonik bakterilerin eliminasyonunda en etkili teknikler olduğu belirlenmiştir. Epifloresan mikroskop ve klasik kültür tekniğinden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında, epifloresan mikroskop tekniği ile klasik kültür tekniğine oranla daha yüksek sayıda canlı bakteri elde edilmiştir. Bu durum stres koşulları altında bulunan mikroorganizmaların VBNC (viable but non culturable) fazına girerek kültüre edilebilirliklerini kaybettiklerini göstermektedir. Bu sebeple sadece klasik kültür metodunun analiz amacıyla kullanılmasının yeterli olmadığı, bu tekniğin mikroskopi gibi tekniklerle desteklenmesi gerektiği bulunmuştur. Epifloresan mikroskop teknikleri içinde LIVE/DEAD kit ile CTC-DAPI boyasına oranla daha yüksek sayıda canlı ve toplam mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. Bu sebeple canlı ve toplam mikroorganizma tespitinde LIVE/DEAD kit kullanımının daha güvenilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Alamar Blue boyama yöntemi ile elde edilen sonuçların pek çok analizde epifloresan mikroskop tekniği ile elde edilen sonuçlarla tutarlılık göstermesi dolayısıyla canlılığın yüzde cinsinden belirlenmesinde kullanılabilecek bir teknik olduğu tespit edilmiştir. EMA-qPCR tekniğinin, uygun optimizasyon aşamalarının ardından elde edilen prosedür ile örnekteki canlı mikroorganizma varlığının tespitini sağlayabilmesi açısından PCR teknikleri içinde avantajlı bir hale gelebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Mart 2017, 402 sayfa.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, *L. pneumophila*, stres faktörleri, LIVE/DEAD kit, etidyum monoazit bromür-qPCR

SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION THE EFFECTS OF VARIOUS STRESS FACTORS ON TO BACTERIA IMPLEMENTED BIOFILM LAYER

Cansu VATANSEVER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN

Biofilm is a population of microorganisms that is formed by microorganisms which lives in produced their own extracellular polymeric matrix by attaching to living or inert surfaces. Among the many pathogenic microorganisms located in biofilm structure, especially *Legionella pneumophila* holds an important place. Cooling towers are the primary devices which biofilm layer is occurred and *Legionella pneumophila* can be found widely. Microorganisms found in a biofilm structure are quite strong against adverse environmental conditions. The aim of this study was identify the most effective elimination strategies for combating biofilm and planktonic bacteria with using most reliable techniques. In this way, it was aimed to prevent biofilm-related problems which are important in terms of health and economics.

In this study, *L. pneumophila* ATCC 33152 was inoculated in the cooling tower model system with potable water and formed biofilm on surfaces of glass coupons for 14 weeks. 14 weeks biofilm and planktonic phase bacteria were treated with various stress factors including different temperature such as 4°C, 37°C and 65°C, different pH such as pH 3 and pH 11; hypotonic salt (% 0,01 NaCl) and hypertonic salt (% 3 NaCl), 2 and 10 ppm chlorine and 2 and 10 ppm monochloramine solutions, dryness, starvation for 1, 4 and 24 hours and 254 nm UV radiation conditions for 1 and 4 hours. Following the treatment with stress factors, it was aimed that viability of both the biofilm structure and planktonic phase *L. pneumophila* and aerobic heterotrophic bacteria were determined conventional

culture, CTC-DAPI staining, LIVE/DEAD viability kit, Alamar blue staining and EMA-qPCR methods.

Results of study indicated that bacteria in biofilm structure are more resistant than planktonic phase bacteria against stress conditions. It was identified that temperature of 65°C, acidic pH, 10 ppm monochloramine, hypertonic salt, dryness ve UV treatments are the most effective techniques for elimination of biofilm and planktonic phase bacteria. When the results obtained from the epifluorescence microscope and the conventional culture technique were compared, a higher number of live bacteria were obtained with the epifluorescence microscope technique than the conventional culture technique. These results indicated that microorganisms under stress conditions enter the VBNC (viable but non culturable) phase by losing their culturability. For this reason, it was found that it is not enough to use only conventional culture method for analysis, so this technique should be supported by some different techniques such as microscopy. In epifluorescence microscope techniques, with the LIVE / DEAD kit a higher number of live and total microorganisms were detected than with CTC-DAPI dye. Therefore, it was reached that the use of LIVE / DEAD kit is more reliable in detecting live and total microorganisms. The results obtained with the Alamar Blue staining method were consistent with the results obtained with the epifluorescence microscope technique in many analyzes. Hence it was found that Alamar Blue staining method can be used to determine the percentage of viability. It was reached that the EMA-qPCR technique may become advantageous in PCR techniques in order to enable the detection of the presence of viable microorganisms in the sample following the appropriate optimization steps.

March 2017, 402 pages.

Keywords: Biofilm, *L. pneumophila*, stress factors, LIVE/DEAD kit, etidium monoazide bromide-qPCR

1. GİRİŞ

Yeryüzünde bakteriler serbest yüzen planktonik form ve biyofilm formu olmak üzere iki temel yapıda bulunmaktadır. Biyofilm oluşturma yeteneği bakterilerin sahip olduğu evrensel bir niteliktir. Bakterilerin % 99'u biyofilm içinde bulunurken yalnızca % 1'lik kısmı planktonik formda yaşamaktadır (Paraje, 2011). Biyofilmler, canlı veya cansız olmak üzere hemen hemen her türlü yüzeye tutunabilen, kendi ürettikleri hücre dışı polimerik matriks içinde gömülü halde bulunan, aralarında organize olarak işbirliği halinde olan ve genellikle farklı türlerden oluşan çok hücreli yaşam formu olarak tanımlanmaktadır (Paraje, 2011; Lopez ve diğ., 2010; Hall-Stoodley ve Stoodley 2009; Nadel ve diğ., 2009).

Biyofilm yapısında bulunmak bakterilere pek çok avantaj sağlamaktadır. Biyofilm mikroorganizmalarının korunmasında en önemli bileşen EPS (hücre dışı polimerik madde) tabakasıdır. EPS tabakası mikroorganizmaların yüzeye tutunmalarını sağlamanın yanı sıra fiziksel bariyer özelliği ile hücreleri biyosit, antibiyotik, pH ve sıcaklık değişimleri, kuruluk, ultraviyole (UV) radyasyonu, toksik bileşenler, su akışı, avcı organizmalar gibi zararlı etkilere korunmaktadır. EPS tabakası ortamdaki besinleri yakalayarak konsantre etmekte ve bu yolla hücrelere besin sağlamaktadır (Paraje, 2011; Stoodley ve Stoodley, 2004; Kierek-Pearson ve Karatan, 2005). Ayrıca biyofilm içinde bulunan hücreler yakın konumlanmış ve yüksek yoğunlukta olduklarından dolayı genetik madde alış-verişi daha kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Konjugasyon ve transdüksiyon gibi mekanizmalarla gerçekleştirilen yatay gen aktarımı çevresel koşullara dirençte önemli rol oynamaktadır (Parsek ve Singh, 2003). Biyofilm içinde hücreler arası iletişim hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve gen anlatımının düzenlenmesi teşvik edilmektedir. Böylece oluşan fenotipik varyasyonlar ile mikroorganizmaların bulundukları ortama adaptasyonu sağlanmaktadır (Garret ve diğ., 2008).

Metabolik faaliyetleri ve üremeleri için gerekli olan kullanılabilir besinin olduğu her yerde biyofilmler meydana gelebilmektedirler. Bu nedenle sadece doğal ortamlarda değil insan yapımı su sistemlerinde de yaygın olarak bulunmaktadır (Borella ve diğ., 2005).

Doğal ve endüstriyel pek çok çevrede çok türden oluşan biyofilmler hakim yaşam formunu oluşturmaktadırlar (Fernandez ve diğ., 2008). Soğutma kuleleri, sıhhi tesisat armatürleri, ısıtma, havalandırma ve klima ekipmanları, gemi karinaları, gıda endüstrisinde kullanılan yüzeyler biyofilmlerin meydana geldiği başlıca insan yapımı su sistemleridir. İnsan vücuduna yerleştirilen eklem protezleri, kalp kapakçıkları, damar kateterleri, kontakt lensler ve diş protezi gibi biyomateryaller de biyofilmlerin yaygın olarak meydana geldiği klinik yüzeylerdir (Borella ve diğ., 2005; Bakker ve diğ., 2004; Flemming ve Wingender, 2010; Hoiby ve diğ., 2105).

Biyofilmler endüstriyel sistemlerde korozyon, ısı transferinde azalma, sürtünme direncinde artma, düşük üretim verimliliği, hoş olmayan kokular, boru tıkanıklıkları, enerji transfer direncinde artma, sistemlerin durmasına bağlı olarak zamansal aksamalara ve ekipman arızası gibi sorunlara neden olmaktadır (Garret ve diğ., 2008; Tanji ve diğ., 2007; Simoes ve diğ., 2010; Liu ve diğ., 2009; Eguia ve diğ., 2007). Gıda üretim yüzeylerinde meydana gelen biyofilmler gıdalarda bozulmanın yanı sıra gıda kaynaklı hastalıklara sebep olmaktadır (Garret ve diğ., 2008; Simoes ve diğ., 2010). Klinik yüzeylerde meydana gelen biyofilmler ise antibiyotiklere direnç göstermeleri ve hastaların bağışıklık sistemlerinden kaçabilmeleri nedeniyle sürekli ve ilerleyici enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Hoiby ve diğ., 2015).

Biyofilm oluşumu çok adımlı bir süreç olup ilk adımda mikroorganizmalar yüzeye yaklaşmaktadır (Fernandez ve diğ., 2008). Bu adımda planktonik hücreler rastgele veya kimyasal cezbediciler tarafından yüzey ile temas ederler (Nadell ve diğ., 2009). Yüzeye tutunma van der Waals, Lewis asit baz, hidrofobik etkileşimler gibi spesifik olmayan elektrostatik etkileşimler ile gerçekleşmektedir (Abdallah ve diğ., 2014; Fernandez ve diğ., 2008). Başlangıç tutunması geri dönüşümlüdür ve eğer ortam şartları uygun olmazsa hücreler yüzeyden ayrılabilirler (Nadell ve diğ., 2009).

Ortam sıcaklığı, organik madde ve pH'ı, hem hücrenin hem de tutunma yüzeyinin özelliklerini değiştirdiğinden dolayı tutunmada önemli rol oynamaktadır (Abdallah ve diğ., 2014). Başlangıç tutunması ile ilgili en önemli nokta 'koşullanma' olarak adlandırılan süreçtir. Bu aşamada tutunmanın gerçekleşeceği yüzey bulunduğu ortama bağlı olarak inorganik tuzlar, proteinler, glikoproteinler ve hüyük bileşenlerle kaplanmaktadır (Kolari, 2003). Oluşan film yüzeyin hidrofobitesini değiştirmekte ve

mikroorganizmaların tutunmasını kolaylaştırmaktadır (Kolari, 2003; Abdallah ve diğ., 2014).

Sonraki adım geri dönüşümsüz tutunmanın gerçekleştiği evredir. Daha kararlı tutunma, tutunma molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu moleküller tutunmada görevli disakkaritler, kitin polimerleri, flagella ve EPS gibi bileşenleri kapsamaktadır. EPS tabakası hücrelerin yüzeye ve birbirlerine tutunmalarında en büyük rolü olan bileşendir. Tutunmanın ardından bakterilerin üreyerek yüzeyde birikmesi ve EPS üretiminin de artarak devam etmesi ile mikrokoloni gelişiminin gözlenmesi ile sonuçlanmaktadır (Fernandez ve diğ., 2008; Abdallah ve diğ., 2014; Nadell ve diğ., 2009).

Sonraki aşamada ise hücre dışı polimerik maddelerin birikimine bağlı olarak artan hücre-yüzey tutunması ile mikrokolonilerden biyofilm olgunlaşması gerçekleşmektedir. Olgun biyofilm, mantar benzeri kompleks bir yapı oluşturmakta ve yaygın EPS tabakası boyunca uzanan su kanalları ile karakterize edilmektedir (Fernandez ve diğ., 2008). Bu aşamada biyofilmler mantar yada apartman şeklini almaktadırlar (Akan ve Kınık, 2014; Nadell ve diğ., 2009). Son adım ise ortamın akış kuvveti, biyofilmin kendisinden kaynaklanan enzimatik bozulma, EPS veya yüzey bağlanma proteinlerinde meydana gelen değişiklikler ile hücrelerin tek tek veya kümeler şeklinde koparak ayrıldığı aşamadır (Akan ve Kınık, 2014).

Mikrobiyal orjinli hücre dışı EPS tabakası, polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler, üronik asitler, hümik bileşenler, lipitler gibi biyopolimerlerden oluşan kompleks bir yapıya sahiptir (Pal ve Paul, 2008). EPS üretimi yaygın bir bakteriyel davranış olup biyofilme sabit ve yapışkan doğasını kazandırmaktadır (Nadell ve diğ., 2009). EPS hücreler arası haberleşme, yüzeye tutunma, flok oluşumu, kuruluktan koruma, avcı organizma saldırılarından koruma, hücrelere biyositlerin ulaşmasını engelleme, hücrelerin besin açısından zengin noktalara doğru gelişmesini sağlama, akış halinde bulunan sistemlerde besinlerin yüzeyde tutulmasını sağlama ve besinlerin biyofilm içinde dağıtılmasına yardımcı olmaktadır (Pal ve Paul, 2008; Nadell ve diğ., 2009; Murthy ve diğ., 2004).

Pek çok mikroorganizmayı yapısında barındıran biyofilmlerde bulunan mikroorganizmaların başında *Legionella* türleri gelmektedir. *Legionella* cinsi 57 tür ve

79 serogruba sahip geniş bir ailedir. Bu geniş aile içinde *Legionella pneumophila* serogrup 1 epidemiyolojik olarak yaklaşık % 90 gibi yüksek bir oranla hastalıklardan birinci derecede sorumludur (Walser ve diğ., 2014). *L. pneumophila*'nın sebep olduğu hastalığa Lejyonelloz adı verilmektedir. Lejyonelloz su kaynaklı bir hastalık olup, hastalığın meydana gelmesinde *Legionella* bakterisini içeren aerosollerin solunması ve inhalasyonu temel yoldur. Lejyonelloz klinik anlamda Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşi olmak üzere 2 farklı hastalık türünün genel olarak tanımlanmasında kullanılmaktadır (Hines ve diğ., 2014; Ji ve diğ., 2014). Pontiak ateşi kendi kendini kısıtlayan grip benzeri bir hastalıktır. Lejyoner hastalığı ise kırıklık, öksürük, üşüme, nefes darlığı, baş ağrısı, göğüs ağrısı gibi çok sayıda semptom ile kendini gösteren zamanında ve doğru teşhis edilmediği takdirde ölümcül olabilen şiddetli bir zatürredir (Gomez-Valero ve diğ., 2009; Decklerck, 2009).

L. pneumophila çok geniş bir sıcaklık aralığında (5-65°C) hayatta kalabilmekte ve farklı ortamlara uyum sağlayabilmektedir. Sulu olan her türlü ortamda geniş bir dağılım göstermekle birlikte özellikle insan yapımı su sistemlerinde bulunmaktadır. Klimalar, soğutma kuleleri, sıcak su sistemleri, yüzme havuzları, spalar, duş başlıkları, dental ünite su sistemleri *Legionella* bakterilerinin üremesi ve çoğalması için uygun ortam sağlamaktadır (Ji ve diğ., 2014; Walser ve diğ., 2014; Taylor ve diğ., 2009). Lejyoner hastalığı salgınları soğutma kuleleri, yüzme havuzları, kaplıcalar, çeşmeler, buz makineleri, sebze sulama ekipmanları ve duş başlıkları gibi geniş bir yelpazedeki çevresel su kaynaklarında izlenmiş olup salgınlar ev, ofis, otel, hastane ve yolcu gemileri gibi pek çok alanda meydana gelmiştir (Atlas, 1999).

Legionella bakterisi serbest yaşayan planktonik formda, protozoon içinde hücre içi paraziti olarak ve karışık topluluklardan oluşan biyofilm yapısında bulunabilmektedir (Carvalho ve diğ., 2007). Biyofilmlerin sağladığı zengin besin ortamı *Legionella* gibi besin açısından titiz mikroorganizmaların besinin az olduğu sistemlerde yaşamasına olanak tanımaktadır (Taylor ve diğ., 2009). Biyofilm yapısında gelişen *Legionella*'nın daha gelişmiş bir virulansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Lejyonelloz salgınlarının bazılarının biyofilmle ilişkili olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (Abdel-Nour ve diğ., 2013). Biyofilm yapısında bulunmak *L. pneumopila*'nın hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlamanın yanı sıra olumsuz koşullarda duyarlı bir şekilde beklemede

kalması için uygun ortam sunmakta, çevresel streslere ve biyositlere karşı direncinin artmasına yardımcı olmaktadır (Abdel-Nour ve diğ., 2013; Atlas, 1999; Pecastaings ve diğ., 2010).

L. pneumophila amiplerin ve makrofajların içinde hücre içi parazit olarak yaşayabilmekte ve bu yolla çoğalma sağlayabilmektedir. *Acanthamoeba*, *Hartmannella* ve *Naegleria L. pneumophila*'nın en çok enfekte ettiği amip cinsleridir. Bakteri makrofaj veya fagosit içine normal fagositoz adımları ile girmektedir. Dot-Icm (Organel trafiğinde kusur - Hücre içi çoğalma) kompleksi olarak adlandırılan tip IV sekresyon sistemi ile salgılanan efektör proteinler *L. pneumophila*'nın konak hücre içindeki fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. *dot/icm* genleri tarafından kodlanan bu proteinler fagozom-lizozom birleşmesini geciktirme, endoplazmik retikulum granüllerinin sağlanması ve fagozom olgunlaşmasını engellemektedir. Lizozom tutunmasının engellenmesi ve böylece asidik komponentlerden kaçış ile bakteri kendini korumaktadır. Bu yolla konak içindeki vakuolde çoğalan *L. pneumophila*, konak hücrenin aminoasit içeriği çoğalmayı engelleyecek ölçüde azaldığında konağı patlatarak serbest kalmakta ve yeni konakları enfekte etmektedir (Borella ve diğ., 2005; Felipe ve diğ., 2005; Taylor ve diğ., 2009).

Otel, hastane gibi binaların havalandırma sisteminde bulunabilen soğutma kuleleri sahip oldukları atmosfere açılan büyük hacimli su depoları ile sirküle edilen sudan ısının uzaklaştırılmasında kullanılan soğutucu cihazlardır. Sistem içinde su sıcaklığı genelde 25-35°C arasında korunmaktadır. Atmosferden gelen su ve karbonun yanı sıra kireçtaşı önleyici ve korozyon inhibitörleri gibi geleneksel olarak sulara uygulanan kimyasallar da mikrobiyal üreme için gerekli besini sağlamaktadır (Liu ve diğ., 2011). Soğutma kulelerinin sağladığı bu koşullar mikrobiyal gelişim için uygun ortam sunmaktadır. Soğutma kulesi tarafından ısının uzaklaştırılması esnasında üretilen aerosoller, içinde bulunan mikroorganizmaların 10 km'den daha uzak mesafelere kadar taşınmasını sağlamaktadır (Qin ve diğ., 2012).

Soğutma sistemlerinin sunduğu sıcaklık aralığı *L. pneumophila* üremesi için de uygun değerler arasındadır. Bugüne kadar *Legionella* ile kontamine pek çok soğutma kulesi kayıtlarda bulunmaktadır. Soğutma kulesinin işlem sürecinde üretilen aerosoller, *Legionella*'nın dağılımında önemli rol oynamaktadır. Pek çok Lejyoner salgınının *L.*

pneumophila ile kontamine suya sahip soğutma kulesi kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Mouchtouri ve diğ., 2010; Kusnetsov ve diğ., 1997; Wery ve diğ., 2008).

Mikroorganizmalar genellikle yerel ortamlarında çeşitli dalgalanmalara maruz kalmaktadırlar. Bu çevresel dalgalanmalar mikroorganizmaların canlılıklarını ve topluluk dinamiklerini etkilemektedir (Perez ve diğ., 2010). Bakteriler bulundukları çevrelerde sıcaklık ve pH dalgalanmaları, kullanılabilir besin kısıtlılığı, ozmotik stres, güneş ışınları, oksijen konsantrasyonlarındaki değişimler gibi çeşitli streslere maruz kalmaktadırlar (Besnard ve diğ., 2002).

Mikroorganizmalar hayatta kalma ve üreyebilme yeteneklerini baskılayan stres faktörlerinin üstesinden gelmek zorundadırlar (Haruta ve Kanno, 2015). Mikroorganizmalar çevresel bir stresle karşılaşmaları durumunda stres karşısında meydana gelen hasarı onarabilen, hücrenin yaşamını devam ettirebilen veya stres ajanlarını elimine edebilen proteinlerin üretimi, stres faktörlerine karşı toleransın kısa sürede şekillenmesi, hücrenin canlı fakat kültürü yapılamayan (Viable But Not Culturable, VBNC) duruma geçmesi, konakçı olduğu organizmanın savunma sisteminden kurtulması, kist ve spor oluşumu, hücre membranlarında değişiklikler, zararlı bileşikler parçalayan enzim sentezi, antibiyotik üretimi gibi mekanizmalarla yanıt vermektedirler (Dikici, 2009; Kunst ve Rapoport, 1995).

Bakterilerin gen anlatımları incelendiğinde, stresle teşvik edilen ve durağan faz genlerinin farklı bakteriyel türlere ait biyofilm hücrelerinde aktive edildiği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar durağan faz hücrelerine benzeyen bu biyofilm hücrelerinin biyofilmin genel bir resmini temsil ettiğini ortaya çıkarmıştır. Genel stres yanıtını düzenleyici sigma faktörün (σ^S) sentezlenmesinin biyofilm yapısındaki mikroorganizmaların çevresel streslere adaptasyonunda önemli olduğu ortaya çıkmıştır (Serra ve Hengge, 2014).

Mikroorganizmalar, soğuk şoku ile karşılaştıklarında gen anlatımlarında değişiklikler meydana getirmekte ve soğuk şoku proteinleri üretmektedirler. Bu proteinler DNA (deoksiribonükleik asit)'ya bağlanarak replikasyon, transkripsiyon gibi süreçlerin başarılı bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır. Ayrıca soğuk şoku altında biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin de anlatımı teşvik edilmekte ve biyofilm oluşumunda artış gözlenmektedir (Schmid ve diğ., 2009; White-Ziegler ve diğ., 2008). Soğuk koşullar

membran akışkanlığını bozarak sertleşmelere sebep olmaktadır. Mikroorganizmalar bu durumun önüne geçmek için membrandaki doymamış yağ asitlerinin miktarı ve membranda bulunan yağ asitlerinin uzunluklarını arttırmaktadırlar (Russell ve diğ., 1995).

Mikroorganizmalar yüksek sıcaklık ile karşılaştıklarında gen anlatımında değişiklikler yaparak sıcaklık şoku proteinleri sentezlemektedirler. Bu proteinler yüksek sıcaklık sonucunda zarar gören proteinlerin doğru katlanmalarını veya doğru katlanması mümkün olmayan proteinlerin parçalanmasını sağlamaktadır (Grover ve diğ., 2011). Bununla birlikte yüksek sıcaklık koşullarında daha hızlı bir şekilde biyofilm oluştuğu veya biyofilm tabakasının kalınlığında artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Piao ve diğ., 2006). Mikroorganizmalar yüksek sıcaklığın sebep olduğu membran akışkanlığını azaltıcı etkisinden korunmak için membranda bulunan trans-cis yağ asit oranını arttırmaktadırlar (Cronan, 2002).

Ortam pH'ında meydana gelen değişiklikler sonucunda mikroorganizmalar gen anlatımını düzenleyerek strese yanıt veren proteinlerin sentezlemekte, hücre içi pH'ı düzenleyen protein translokasyon ATPaz (adenozin trifosfataz) arttırmakta, amino asit metabolizması ve membran kompozisyonlarında değişiklikler yapmaktadırlar. Tüm bu düzenlemelere asit tolerans yanıtı (ATR) adı verilmektedir. Asidik koşullar karşısında mikroorganizmaların hücre dışına proton çıkışını, şaperon ve proteaz üretimini artırdığı tespit edilmiştir (Welin-Neilands ve Svensater, 2007; Yousef ve Courtney, 2003; Lemos ve Burna, 2008). Benzer düzenlemeler alkali koşullar meydana geldiğinde de gözlenmektedir. Alkali koşullar karşısında gözlenen gen anlatımındaki değişikliklere paralel olarak dışarı atılan proton miktarında da artış tespit edilmiştir (Wiegert ve diğ., 2001).

Biyofilm yapısında bulunmak mikroorganizmaların antimikrobiyal uygulamalar karşısında direnç geliştirmelerine sebep olmaktadır. Bu direncin başında biyofilmin antimikrobiyal difüzyonu için bir bariyer oluşturması ve bu yolla mikroorganizmalara ulaşmasının engellenmesi gelmektedir. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar üreme hızlarını azaltmakta, dışarıdan besin alımını kısıtlamakta ve böylece antimikrobiyal girişini azaltmaktadırlar. Biyofilm içinde yatay gen alış-verişi ile direnç gelişimi, yüzeyde bulunan bakterilerin sahip oldukları farklı biyofilm fenotipi ile dezenfektanları etkisiz

hale getirmektedir. Biyofilm hücreleri biyosit ve antibiyotik hedeflerini değiştirmekte, geliştirdikleri pompalar ile antimikrobiyal ajanları dışarı atarak direnç geliştirmektedirler (Paraje, 2011; Szymanska, 2003; Surdeau ve diğ., 2006; Abdallah ve diğ., 2014; Bridier ve diğ., 2011). Ayrıca yapılan çalışmalar antimikrobiyal stres karşısında gen anlatımında meydana gelen değişiklikler sonucunda yüzeye tutunma genlerinin anlatımında artış gözlemlendiği ve biyofilm oluşumunun arttığı tespit edilmiştir (Zou ve diğ., 2012).

Ortamın ozmotik koşullarında meydana gelen değişimler mikroorganizmalar için stres koşulları yaratmaktadır. Mikroorganizmalar yüksek ozmotik konsantrasyon ile mücadele etmek amacıyla hücre içinde ‘uyumlu çözünen’ olarak adlandırılan maddeleri sentezlemekte veya dış ortamdan almaktadır. Bu yol ile hücre içi konsantrasyon artırılarak suyun aşırı bir şekilde hücre dışına çıkışı engellenmektedir (Madigan ve Martinko, 2010). Bu değişikliklerin yanı sıra gen anlatımında meydana gelen düzenlemeler sonucunda hücre içi turgorun devamlılığını sağlayan aktif su taşıma mekanizmaları devreye sokulmaktadır (Abranches ve diğ., 2006). Çalışmalar ortamın ozmotik konsantrasyonundaki artışın biyofilm yapısında da artışa sebep olduğunu göstermektedir (Sheng ve Yu, 2006; Qurashi ve Sabri, 2012).

Kuruluk, açlık ve UV ise mikroorganizmaların bulundukları çevrelerde karşılaştıkları diğer stres koşullarıdır. Söz konusu stres koşulları ile ilgili olarak yapılan çalışmalar biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmaların planktonik yapıda bulunan mikroorganizmalara oranla daha dirençli olduklarını göstermektedir. EPS’nin ve peptidoglikan bileşeni olan N-asetilglukozamin’in su tutma yeteneği (Hansen ve Vogel, 2011), besinleri yakalama ve konsantre etme (Shen ve diğ., 2010; Murthy ve diğ., 2004) özelliklerinin yanı sıra biyofilm tabakasının geçirgenliğinin kısıtlı olması gibi nedenler biyofilm mikroorganizmalarının direnç gelişimine katkı sağlamaktadır (Bak ve diğ., 2009).

Başta soğutma kuleleri olmak üzere su sistemlerinde meydana gelen biyofilmeler gerek endüstriyel gerekse klinik alanlarda ciddi sorunlara sebep olmaktadır. Biyofilm tabakasından kaynaklı sorunlar, sebep oldukları mali zararın yanı sıra biyofilmle ilişkili olarak meydana gelen enfeksiyonların önemi dolayısıyla üzerinde titizlikle çalışılan bir konudur. Biyofilmelerin *L. pneumophila* serogrup 1 gibi patojen mikroorganizmaları yapısında barındırmaları, onların üreme ve gelişimleri için uygun ortam sunmaları ve

Çevresel stres koşulları karşısında korumaları biyofilmle mücadele süreçlerinin başarıszlıkla sonuçlanması neden olmaktadır. Tüm bu sebeplerden yola çıkarak biyofilmlerin stres koşulları karşısında yapısında bulunan mikroorganizmaları koruması nedeniyle bu bakterilerin planktonik formlara oranla daha dirençli olduklarını göstermek ve biyofilm tabakası ile planktonik fazda bulunan bakterilerin eliminasyonu için en etkili tekniklerin belirlenmesi çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

Tez kapsamında *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC (Amerikan kültür koleksiyonları) 33152 suşu aşılanması ve şebeke suyu eklenmesi ile soğutma kulesi model sistemi içindeki deney kuponlarının üzerinde 14 hafta süreyle biyofilm oluşturulmuştur. Ardından biyofilm tabakası ve planktonik formda bulunan *L. penumophila* ve aerobik heterotrofik bakteriler üzerine 1, 4 ve 24 saat süreyle olmak üzere 4°C, 37°C, 65°C gibi farklı sıcaklık; pH 3, pH 11 gibi farklı pH değerleri, hipotonik tuz (% 0.01 sodyum klorür- NaCl) ve hipertonic tuz (% 3 NaCl) ortamı, 2 ve 10 ppm klor ve 2 ve 10 ppm monokloramin dezenfektan uygulamaları, kuruluk, açlık ve 254 nm dalga boyundaki UV ışık stres koşulları uygulanmıştır. Stres koşullarının ardından klasik kültür, CTC-DAPI (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride - 4',6-diamino-2-phenylindole) boyama yöntemi, LIVE/DEAD canlılık tayin kiti, Alamar blue boyama yöntemi ve EMA-qPCR (Etidyum mono azit bromür-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemleri kullanarak mikroorganizmaların stres koşulları karşısındaki canlılık durumları incelenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOFİLM TABAKASI

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Biyofilm tabakası, mikrobiyal orjinli EPS matriksi içine gömülü halde bulunan, canlı veya cansız yüzeylere tutunan mikrobiyal hücre toplulukları olarak tanımlanmaktadır (Flemming ve Wingender, 2010). Benzer bir tanımlamaya göre biyofilmmler kendi ürettikleri polimeriks matriks içinde gömülü olan ve yüzeylere tutunan mikrobiyal kökenli sessil topluluklardır (Flemming ve diğ., 2009). Bakteriyel biyofilmmler canlı veya cansız yüzeylere tutunmuş halde bulunabilecekleri gibi serbest yüzen topluluklar halinde de olabilirler (Madsen ve diğ., 2012). Biyofilm tanımının ‘mikrobiyal veya bakteriyel kökenli’ olarak sınırlanması enfeksiyonda bakterilerin etkileşim halinde olduğu konak moleküllerini, tutunma, replikasyon ve agregasyon reseptörlerini yok saymaktadır. Bu nedenle, klinik alanla ilgili biyofilm için ‘konak bileşenleri içerebilen, hücrelerin kendileri tarafından üretilen polimerik matriks ile çevrili mikrobiyal hücre toplulukları’ olarak daha kapsamlı bir tanımlama yapılmıştır (Hall-Stoodley ve diğ., 2012).

Biyofilm tanımının kökeni 1847 yılında Antony van Leeuwenhoek tarafından kullanılan ilkel ama etkili mikroskop aracılığıyla gerçekleştirilen, insan diş yüzeylerinden kazınarak alınan tabaka içinde bulunan ve ‘animalcules’ olarak adlandırılan yapıya dayanmaktadır (Costerton, 1999). Biyofilmle ilgili kaydedilmiş ilk gözlem 1933 yılında Henrici tarafından ‘suyun pek çok kısmında bakterilerin serbest olarak yaşamadığı kesin bir süreçtir, bununla birlikte üreme suyla çevrelenmiş yüzeylerde gerçekleşir’ ifadesiyle tanımlanmıştır (Henrici, 1933). 1934’de, Claude Zobell direkt mikroskopi ile doğal deniz popülasyonlarını incelemiş ve bakterilerin yüzeylere çekilerek sessil popülasyonlar oluşturmak için bazen yüzeylere tutunduğu sonucuna ulaşmıştır (Costerton, 1999). 1943 yılında yine Zobell tarafından yapılan başka bir çalışmada yüzeye tutunan bakterilerin, planktonik formlarında gelişmenin meydana gelmediği bazı koşullarda üreyebildiğini ortaya çıkarmıştır (Zobell, 1943).

1970'lerde bu tutunmuş halde bulunan yapı keşfedilmeye başlanmış olup 1976 yılında Marshall tarafından mevcut olan bilgilere yüzeye tutunmuş bakterilerin yanı sıra çok ince hücre dışı polimer fibrillerin varlığı bilgisi eklenmiştir (Marshall, 1976). Costerton ve arkadaşları 1978 yılında su sistemlerinde tutunmuş halde bulunan bakteri topluluklarının doğada bulunan polisakkaritlerden oluşan glikokaliks matriks ile kaplı olduğunu ve bu matriksin tutunmaya aracılık ettiğini göstermiş olup bu yapıyı tanımlamak için 'biyofilm' terimini kullanmışlardır (Costerton ve diğ., 1978). 1987 yılında Costerton ve arkadaşları biyofilmin yüksek derecede sulu ve anyonik eksopolimer matriks içine gömülü tek tek hücreler veya küçük kolonilerden oluştuğunu ortaya koymuşlardır (Costerton ve diğ., 1987).

Characklis ve Marshall 1990 yılında zamansal ve mekansal heterojenite karakteristiği, biyofilm matriksi içinde bulunan inorganik ve abiyotik madde içeriği gibi biyofilmin diğer belirleyici özelliklerini tanımlamışlardır (Characklis ve Marshall, 1990). 1995 yılında ise Costerton ve Lappin-Scott tutunma ve biyofilm oluşumu için gerekli olan bakteri bileşenlerinin üretimini kontrol eden adhezyon genlerinin anlatımını tespit etmiştir. Bunun yanı sıra biyofilm oluşum sürecinin hücrelerin başlangıç tutunması sırasında anlatımı yapılan spesifik genler tarafından düzenlendiğini belirlemişlerdir (Costerton ve Lappin-Scott, 1995).

Biyofilm enfeksiyonları kavramı ve tıptaki önemi ise 40 yıldan az bir geçmişe sahiptir. Biyofilmin klinik sürecinin başlangıcı Hoiby tarafından kistik fibröz hastalarının balgam ve akciğer dokularında *P. aeruginosa* yığınlarına rastlanmasına ve Jendresen tarafından diş yüzeyinde dental plak oluşumlarının gözlenmesine dayanmaktadır. Kesin olarak biyofilm teriminin tıp alanına girmesi 1985 yılında Costerton tarafından olmuştur. Devam eden yıllarda da biyofilm enfeksiyonlarının tıp ve odontoloji alanlarında oldukça yaygın ve önemli oldukları kabul edilmiştir (Hoiby, 2014).

Günümüzde biyofilm karakterizasyonu amacıyla epifloresan mikroskop (EFM), konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ve elektron mikroskopları (EM) yaygın olarak kullanılmaktadır. Epifloresan mikroskop ile birleştirilen boyama teknikleri yapıdaki canlı ve total bakteri sayısını vermelerinin yanı sıra biyofilm bakterilerinin iki boyutlu dağılımları hakkında bilgi de vermektedir (Wolf ve diğ., 2002). Konfokal lazer taramalı mikroskop ise biyofilmin 3 boyutlu yapısı hakkında ve otofloresan veya spesifik floresan

boyaların kullanımıyla biyofilmin farklı bileşenleri hakkında bilgi vermektedir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) biyofilmin kompleks yapılarının görüntülenmesini sağlarken transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ise biyofilm kesitlerindeki mikroorganizmaların varlığını ve birbirleriyle olan ilişkilerinin gözlenmesine olanak tanımaktadır (Le-Clech ve diğ., 2007; Denkhaus ve diğ., 2007; Lawrence ve diğ., 2003). Taramalı transmisyon X-ray mikroskopi (STXM), atomik güç mikroskobu (AFM), soft X-ray mikroskopi, dijital hızlandırılmış mikroskopi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), kızılötesi spektroskopisi, yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), dijital zaman atmalı mikroskopi ve yakın alan taramalı optik mikroskopi tekniklerinin yanı sıra floresan in situ hidridizasyon (FISH), PCR, denature edici gradient jel elektroforezi (DGGE), darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), DNA dizi analizi gibi moleküler teknikler de biyofilm araştırmalarında kullanılmaktadır (Nguyen ve diğ., 2012; Denkhaus ve diğ., 2007).

Son yıllarda yapılan biyofilm araştırmaları dikkat çekici bulgular ortaya koymuştur. Biyofilm çalışmalarında kullanılan yeni mikroskobik uygulamalar ve moleküler teknikler, mikrobiyal biyolojinin gereğinin altında değer verilen bu alanı hakkında gözlerimizi açmıştır. Bu teknolojilerin kullanılması ile yapılan araştırmalar biyofilmlerin cıvık tabaka içeren basit organizmalar değil bunun yerine yapısal, koordinasyonel ve fonksiyonel açıdan yüksek seviyede organize olmuş biyolojik sistemleri temsil ettiğini göstermiştir (O'toole ve diğ., 2000).

2.1.2. Biyofilm Tabakasının Meydana Geldiği Yerler ve Sebep Olduğu Zararlar

Biyofilmler doğal ve insan yapımı tüm çevrelerde bulunabilirler ve genellikle bakteri, siyanobakteri, alg, mantar ve protozoadan oluşan kompleks mikrobiyal birliklerdir. Biyofilmler sürekli olarak su ile temas halinde olan yüzeylerde veya sıvı-sıvı, hava-katı, katı-sıvı, hava-sıvı gibi farklı tiplerdeki ara yüzeylerde meydana gelmektedirler (Keevil, 2003; Clarelli ve diğ., 2013). Biyotik ve abiyotik olmak üzere çok çeşitli yüzeylerde meydana gelebilen biyofilmler tek bir türe ait mikroorganizmalardan meydana gelebileceği gibi çok sayıda mikrobiyal türe ait topluluklardan da oluşabilirler (Davey ve O'toole, 2000).

Biyofilm gelişiminin etkileri oldukça büyük olup, herkes ve her yüzey için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Biyofilm tarafından işgal edilen yüzey ve çevrelerin çeşitliliği neredeyse sınırsızdır (Garret ve diğ., 2008). Biyofilmler, karasal ve akuatik çevrelerde, bitkisel dokularda, hayvanlarda ve insanlarda meydana gelmelerinin yanı sıra içme ve kullanma suyu dağıtım sistemleri, dental ünite su sistemleri, medikal implantlar, soğutma kuleleri, petrol rafinerileri, gemi gövdeleri, borular, ısı dönüştürücüler, gıda üretim ekipmanları, klimalar, filtreler, porlu materyaller, depolar, kağıt üretim ekipmanları ve madencilik alanlarında da oluşmaktadırlar. Biyofilmlerin endüstriyel alanlarda sebep olduğu kayıpların maliyeti yıllık milyar doları aşmaktadır (Allison ve diğ., 2000; Elvers ve diğ., 2002; Pasmore ve diğ., 2002, Parsek ve Singh, 2003; Epstein ve diğ., 2012; Denkhaus ve diğ., 2007).

Biyofilmler kalıcı enfeksiyonlar, gıda kontaminasyonu, endüstriyel sistemlerde biyolojik kirlilik gibi farklı alanlarda önemli sorunlara yol açmaktadırlar (Zubair ve diğ., 2014). Endüstriyel alanlarda meydana gelen biyofilmler, enerji kayıplarına, maliyetlerde artışlara, sistemde öngörülemeyen duraklamalara ve boşa kalma süresinde artışa, kalite kontrol, güvenlik ve çevre sorunlarına neden olmaktadır (Eguia ve diğ., 2007).

Endüstriyel alanlarda biyofilm tabakasının yaygın olarak meydana geldiği yüzeylerin başında soğutma kuleleri gelmektedir. Soğutma kuleleri sirküle halde bulunan sudan ısının atmosfere iletiminde kullanılan soğutma sistemleridir. Soğutma kuleleri sahip oldukları sıcaklığı 25-35°C arasında olan geniş su rezervuarı ile mikrobiyal gelişme ve yayılma için uygun ortam sağlamaktadır (Aruliah ve Ting, 2014). Soğutma kulelerinde meydana gelen biyofilmler, sistemde bulunan boru hatları ve ısı değiştiricide akış kısıtlamaları, tüm metal boyunca ısı transferinde azalma, sıvı sürtünme direncinde artma ve akışta azalmaya neden olan yüzey pürüzlülüğünü değiştirme, korozyon gibi sorunlara neden olmaktadır. Bununla birlikte soğutma kuleleri tarafından üretilen aerosoller, sistem içinde bulunan mikroorganizmaların uzak mesafelere yayılmasını sağlayarak sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Murthy ve diğ., 2004, Tanji ve diğ., 2007; Liu ve diğ., 2009).

Biyofilmlerin meydana geldiği diğer önemli bir yüzey türü de gıda endüstrisidir. Gıda üretim süreçlerinde gıdanın temas ettiği yüzeylerde meydana gelen istenmeyen biyofilm oluşumu gıda kaynaklı hastalıkların oluşumuna, biyofilm hücrelerinin kopması sonucu çapraz kontaminasyonlara, süreç sonrası kontaminasyonlara, gıdada bozulmalara,

temizlik işlemleri arasındaki sürenin kısaltılmasına, boru ve tanklarda metal korozyonuna, ısı transferinde azalma ve ısıtma ekipmanlarında tıkanmalara neden olmaktadır (Cappitelli ve diğ., 2014; Kostaki ve diğ., 2012; Cheng ve diğ., 2007).

Biyofilmlerin meydana geldiği diğer bir alan ise klinik açıdan önemli yüzeylerdir. Klinik alanlarda meydana gelen bazı biyofilmler, konaktaki doğal ve cihazlarda dahil olmak üzere yapay yüzeylere tutunurken diğerleri doğrudan yüzeylere tutunmayıp agregatlarla ilişkili olabilmektedirler (Ramage ve diğ., 2014; Lebeaux ve diğ., 2013). Biyofilm tabakasının meydana geldiği cihazlara örnek olarak üriner kateter, santral venöz kateter, protez kalp kapakçığı, dental implant, kalça ve diz eklem protezleri, kontak lensler ve işitme cihazları örnek verilebilir (Kokare ve diğ., 2009; Flemming ve Wingender, 2010; Hoiby ve diğ., 2015). Çeşitli polimerlerden üretilerek vücut içine steril olarak yerleştirilen ve ‘biyopolimer’ olarak adlandırılan biyolojik olarak uyumlu materyaller biyofilm oluşumu için ideal bir tabaka sağlamaktadırlar (Habash ve Reid, 1999; Welch ve diğ., 2012).

Biyofilmlerin dokularda veya tıbbi cihazların yüzeylerinde gelişmesi kronik enfeksiyonlara neden olup bu enfeksiyonlar, antibiyotik tedavisi ve hastanın doğal ve kazanılmış savunma mekanizmalarına rağmen devam etmektedir. Biyofilm enfeksiyonları kalıcı ve ilerleyici patoloji ile karakterize edilirler ve bu nedenle pek çok biyofilm enfeksiyonunu teşhis ve etkili bir şekilde tedavi etmek zor olabilmektedir (Hoiby ve diğ., 2015). Hastane kaynaklı enfeksiyonların % 65’inin biyofilmle ilişkili olduğu ve biyofilm temelli enfeksiyonların yıllık tedavi maliyetlerinin 1 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Mah ve O’toole, 2001).

2.1.3. Biyofilm Tabakasının Mikroorganizmalara Sağladığı Yararlar

Biyofilm matriksi mikroorganizmaları kalkan gibi sararak akış stresi, besin kısıtlılığı, pH ve sıcaklık değişimleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, antibiyotikler, kuruluk, UV radyasyonu, ozmotik şok, protozoon saldırıları ve konak savunma sistemi gibi sert koşullardan korumaktadır (Kim ve diğ., 2012; Rühs ve diğ., 2013; Stoodley ve Stoodley, 2004; Davey ve O’toole, 2000; Lopez ve diğ., 2010).

Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlara karşı en az 100-1000 kat daha dirençlidirler (Rodriguez-Martinez ve Pascual, 2006; Luo ve diğ., 2006;

Eiff ve diğ., 2005; Mah ve O'toole; 2001). EPS tabakası fiziksel bir iyon değiştirici gibi hareket ederek biyofilm içine belirli antimikrobiyal maddelerin erişimini engellemektedir. Böylece biyofilm içine dış ortamdan bileşiklerin difüzyonu kısıtlanarak biyofilm hücreleri korunmaktadır (Davey ve O'toole, 2000). Ayrıca biyofilm yapısında bulunan EPS retimi için harcanan enerji, üremenin kısıtlanmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda mikroorganizmaların antibiyotiklere dirençli hale gelmesi sağlanmaktadır. Çünkü antibiyotikler üreme fazında olan hücrelere etki etmektedirler (Kokare ve diğ., 2009).

Mikrokoloni çevresindeki alanlarda biyofilm boyunca serpiştirilmiş şekilde bulunan son derece geçirgen su kanalları, ilkel dolaşım sistemine benzemektedir. Bu kanallar sayesinde besinler ve metabolitler dış ortam ile sürekli olarak değişim halindedir. Bu durum kullanılabilir besinleri sağlamanın yanı sıra toksik metabolitlerin uzaklaştırılmasını da sağlamaktadır (Davey ve O'toole, 2000). Kullanılabilir besinin arttırılması ve akış halinde olan sistem içinde yüzeyde konsantre edilmesi besin sağlama açısından hücrelere avantaj sağlamaktadır (Murthy ve diğ., 2004).

Biyofilmler genetik materyal alış-verişi için ideal ortam sağlamakta ve böylece büyük ve erişilebilir bir gen havuzu yaratmaktadırlar. Biyofilm yapısında olmak hücrelerin yakın bir şekilde konumlanmasını sağlamasından dolayı yatay gen transferini kolaylaşmaktadır (Flemming ve diğ., 2007). Yapılan çalışmalarda biyofilm yapısında bulunan bakteriler arasında planktonik türlere oranla oldukça yüksek oranda konjugasyon meydana geldiği tespit edilmiştir. Biyofilm içinde planktonik formlara oranla daha yüksek oranda meydana gelen yatay gen transferi bakterilerin adaptasyon ve evrim sürecine katkıda bulunmaktadır (Madsen ve diğ., 2012). Yüksek oranda meydana gelen konjugasyon ile yapılan plazmit aktarımı sonucunda bakterilerin hayatta kalma şansı artmaktadır (Parsek ve Singh, 2003; Hausner ve Wuertz, 1999).

Yatay gen alışverişi dışında mikroorganizmaların yzeeye tutunması biyofilme spesifik genlerin anlatımının yapılmasına bunun sonucunda spesifik fenotiplerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum biyofilmde bulunan hücrelerin olumsuz koşullara dirençli olmasına katkı sağlamaktadır (Murthy ve diğ., 2004). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar biyofilm hücrelerinin planktonik hücrelerden daha dirençli olduğunu gösterirken aynı

zamanda karışık türden oluşan biyofilmlerin de tek türden oluşan biyofilmlerden daha dirençli olduğu göstermektedir (Lee ve diğ., 2013).

2.1.4. Mikrobiyal Biyofilmin Yapısı ve Oluşumu

Biyofilmin temel bileşenleri % 95'ten fazla oranla su iken, kalan kısım mikrobiyal hücreler ve EPS'dir (Deckhaus ve diğ., 2007). Pek çok biyofilm tabakasının benzer seviyelerde heterojenite sergilediği, tek tabakadan oluşmadığı, yoğunluğu değişkenlik gösteren hücre dışı polimerik matriks arasına yayıldığı ve su kanallarının olduğu açık alanlar içerdiği tespit edilmiştir (Davey ve O'toole, 2000).

Biyofilm matriksi % 97 oranında su; % 2-5 oranında mikrobiyal hücre; % 1-2 oranında polisakkarit; % 1-2 oranında nükleik asit; < % 1-2 oranında protein ve lipit, fosfolipit ve çevreden alınan bazı iyonların değişen miktarlarından oluşmaktadır (Zubair ve diğ., 2014; Allison, 2003). % 97'lik oranla su, matriksin temel bileşenidir (Sutherland, 2001). Su, fiziksel özellikleri çözünen madde olarak tanımlanan maddeleri çözmekte, biyofilm matriksine canlılık ve bağlayıcılık vermekte, hücrelerin bir arada tutulmasını sağlamakta, yapı içinde suyun muhafaza edilmesine ve biyofilmde meydana gelen difüzyon süreçlerine aracılık etmektedir (Sutherland, 2001; Flemming ve diğ., 2007). Bunların dışında biyofilmin meydana geldiği yüzeye bağlı olarak mineral kristalleri, korozyon partikülleri, alüminyum veya kil partikülleri, kan komponentleri gibi hücresel olmayan materyaller de biyofilm matriksi içinde bulunabilmektedirler (Szymanska, 2003). Matriks genellikle biyofilm merkezine yakın yerlerde en yoğun halde bulunmaktadır (Costerton, 1999).

Biyofilm oluşumu bakterilerin kendi çevreleriyle etkileşim halinde olduğu bir dizi adımdan meydana gelmektedir. Gen anlatımı, yüzey özelliği, hidrodinamik koşullar, çoğunluğu algılama iletişim sistemi (Quorum Sensing, QS) sinyalleri, besi ortamının karakteristiğini kapsayan çevresel koşulların bakteriyel biyofilm oluşumu üzerinde olumlu ya da olumsuz etkileri olabilmektedir (Kim ve diğ., 2012).

Biyofilmin yaşam döngüsü bakteriyel tutunma, biyofilm olgunlaşması ve biyofilmden koparak ortama dağılma olmak üzere 3 dönemden oluşmaktadır (Declerk, 2010; Zou ve diğ., 2012).

Tutunma: Mikroorganizmaların sıvı ortamda süspansiyon halinden yüzeyde tutunan forma geçişi olup 3 adıma ayrılmaktadır (Jeyachandran ve diğ., 2006). Bu adımlar;

1- Geri dönüşümlü tutunma: Biyofilm oluşumunda ilk adım tek bir mikroorganizmanın yüzeye zayıf ve geri dönüşümlü olan çeşitli etkileşimler ile tutunmasıdır. Başlangıçta geçici olan bu tutunmayı ilerleyen adımlarda sağlam ve geri dönüşümsüz bağlanma takip etmektedir (Denkhaus ve diğ., 2007). Mikrobiyal kolonizasyon yüzeyin pürüzlülüğü ve hidrofobikliği; hücrelerin hücre yapışma proteinleri, pili, kamçı, EPS ve lipopolisakkaritlerden kaynaklanan hidrofobisitesine bağlıdır (Denkhaus ve diğ., 2007; Zeraik ve Nitschke, 2012; Pasmore ve diğ., 2002). Hücreler genel olarak pürüzlü, hidrofobik ve sıvı ortam tarafından şartlandırılmış yüzeylere daha hızlı bir şekilde tutunmaktadır. Mikroorganizmaların hücre yüzey polimerlerinden polar olmayan yapıda olanlar tutunmak için hidrofobik yüzeyleri tercih ederken, EPS ve lipopolisakkaritler hidrofilik yüzeyleri tercih etmektedirler (Denkhaus ve diğ., 2007). Tutunma ayrıca laminar veya turbülanslı akış, akış hızı gibi hidrodinamik güçlerin yanı sıra ortamda bulunan besinlerden de etkilenmektedir (Denkhaus ve diğ., 2007; Simoes ve diğ., 2007). Bunların yanı sıra bakterilerin yüzeye tutunma süreci van der Waals, Lewis asit-baz, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler gibi çeşitli etkileşimleri kapsamaktadır (Zeraik ve Nitschke, 2012).

Mikroorganizmaların yüzeye yaklaşması ve tutunmasını sağlayan karmaşık etkileşimleri açıklamak için çeşitli teoriler ortaya konmuştur. Bu teorilerden bir tanesi termodinamik teoridir. Bu teori van der Waals, elektrostatik etkileşimler veya dipol-dipol olarak çeşitli itici ve çekici etkileşimleri kapsamaktadır ve bunların hepsi serbest enerji tanımı altında toplanarak termodinamik olarak adlandırılmıştır. Bu yaklaşımda yapışma enerjisini hesaplamak için bakteri ve yüzeylerin serbest enerjisi, süspansiyonun yüzey gerilimi gibi termodinamik parametrelerin sayısal değerlerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu teoride termodinamiğin ikinci yasası gereği tutunma, sistemin serbest enerjisinde azalma ile gerçekleşmektedir. Toplam serbest enerjide meydana gelen azalma, emilim şeklinde hücrelerin yüzeye tutunmasına sebep olmaktadır (Katsikogianni ve Missirlis, 2004; Kolari, 2003).

Diğer bir teori ise Derjaguin, Landau, Verwey ve Overbeck (DLVO) kolloidal karmaşıklık teorisi olup bu teori hidrofobisite, yüzey yükü ve yüzeyin serbest enerjisi gibi

etkileşimleri kapsamaktadır. Teoriye göre tutunma, van der Waals, asit-baz ve elektrostatik etkileşimlerin toplamı ile gerçekleşmektedir. 1971 yılında Marshall tarafından ileri sürülen bu teoride 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 Lewis asit baz etkileşimleri ve Brownian güçlerinin dengesi olarak tanımlanmaktadır (Habash ve Reid, 1999; Bakker ve diğ., 2003; Kolari, 2003, Splendiani ve diğ., 2006).

Genel olarak bakıldığında termodinamik teorisi tutunmanın geri dönüşümlü olduğunu varsaymakta olup gerçekte durum böyle değildir. DLVO teorisinde etkileşim enerjisi uzaklığı bağlı olmasına karşın termodinamik teoride ise hücre-yüzey ara yüzeyinin oluşumu yüzey-ortam ara yüzeyine göre hesaplanmaktadır. Eğer hücre-yüzey ara yüzeyi oluşmazsa teori geçerli olmamaktadır. Ayrıca termodinamik yaklaşım kinetik yorumlamayı içermeyen bir eşitlik modelidir. Ancak genel olarak bu eşitliğin elde edilmesi mümkün değildir çünkü bakteri hücrelerinin yüzey serbest enerjisinin karmaşık kimya ve hidrasyondan dolayı tam olarak gerçek değeri hesaplanamamaktadır. Ayrıca termodinamik teori, dışarıdan hiçbir enerji girişinin olmadığı kapalı sistemler için geçerlidir. Ama bakteriler substratları enerjiye dönüştüren canlılardır ve tutunma, fizyolojik mekanizmalar ile enerjinin tüketilmesi veya tutunmada görevli polimerlerin sentezi ile gerçekleştirilmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı termodinamik teori bakterilerin çeşitli tutunma davranışlarını tamamıyla başarılı bir şekilde açıklamada yeterli değildir (Katsikogianni ve Missirlis, 2004).

Tutunmada uzaklık 50 nm'nin üzerinde olduğu durumda sadece van der Waals güçleri çalışmaktadır çünkü bu uzaklık mikroorganizmalar ve yüzey için yüzey yükü, hidrofobiklik gibi yüzey özelliklerinin tanımlanması için oldukça uzaktır. Yüzeye olan uzaklık 20-30 nm'ye düştüğünde bakteri ve yüzey arasında elektrostatik etkileşimler meydana gelmekte ve bu aşamada gerçek bağların olmaması nedeniyle geri dönüşümlü tutunma gerçekleşmektedir. Ardından mikroorganizma katı yüzeye ulaşmak için hidrofobik etkileşimlere ihtiyaç duymaktadır. Çünkü bu etkileşimler bakteri ve yüzey arasında bulunan su tabakasını kaldırmaktadır. Bu durum bakterilerin yüzeye 1.5 nm'den daha yakın mesafeye gelmesini sağlamaktadır ki bu noktada Lewis asit baz etkileşimleri

ve Brown hareketleri gibi kısa menzilli birçok etkileşim meydana gelmekte ve bu etkileşimler sonucunda bakteriler yüzeye tutunmaktadır (Busscher ve Weerkamp, 1987).

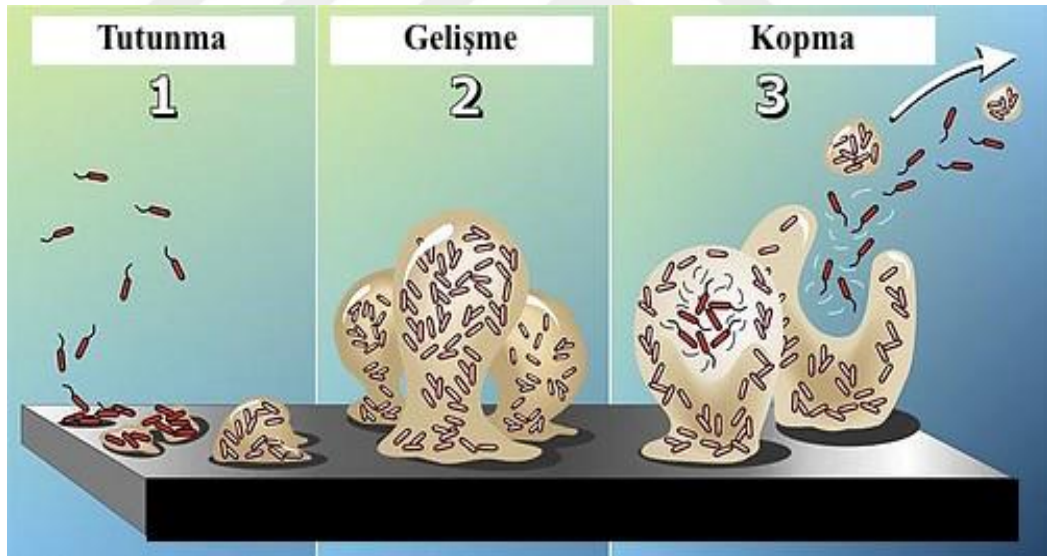
2- Koşullanma: Sulu ortama maruz kalan materyal yüzeyi hemen ve kaçınılmaz bir şekilde ortamda bulunan polimerler tarafından kaplanmaktadır (Donlan, 2002). Sıvı ortamda bulunan organik ve inorganik bileşenlerin yüzeye tutunması, materyalin sıvı ortama konulmasından itibaren geçen birkaç dakika içinde meydana gelmektedir (Kolari, 2003; Melo, 2003). Kısa süre içinde meydana gelen filmin kalınlığı 30-80 nm arasında değişmektedir (Whitehead ve diğ., 2010). Bu moleküllerin tutunması yüzeyin yüzey serbest enerjisi, hidrofobisite ve elektrostatik yük gibi fiziko-kimyasal özelliklerini değiştirmektedir (Palmer ve diğ., 2007). Ayrıca moleküllerin polimerik yapıdaki zincirleri mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan hücre dışı polimerler ile etkileşmekte ve bunun sonucunda bakteri hücrelerinin yüzeye tutunmasını sağlayan güçlü köprüler oluşmaktadır (Whitehead ve diğ., 2010). Bu sürenin sonucunda yüzeyde meydana gelen kimyasal modifikasyon, mikrobiyal tutunmanın hız ve derecesini etkilemektedir (Donlan, 2002). Koşullanma olarak da adlandırılan bu süreç mikroorganizmaların yüzeye tutunması için önemli bir adımdır. Doğada meydana gelen koşullanmada yüzeyler çoğunlukla organik bileşenler tarafından kaplanırken (Whitehead ve diğ., 2010); klinik alanlarda kullanılan biyomateryal yüzeyinde kan, gözyaşı, tükürük ve üre gibi bileşenler tarafından meydana getirilmektedir (Donlan, 2002).

3- Geri dönüşümsüz tutunma: Hücreler yüzeye tutunmalarını takiben geçen birkaç dakika içinde spesifik tutunma genlerinin anlatımını arttırmaları. Tutunmuş hücreler yüzeye tutunmalarını güçlendirmek için yeni hücre dışı polisakkaritler sentezlemekte ve bakteri hücreleri biyofilm yapısı içine dağılmaktadır. Bu sürecin sonunda geri dönüşümlü olan tutunma, biyofilm yapısının geri dönüşümsüz bağlanmasına dönüşmektedir (Zubair ve diğ., 2014). Yüzeylerde meydana gelen tek tabakalı biyofilm diğer hücrelerin ve abiyotik komponentlerin yapıya eklenmesini kolaylaştırmaktadır (Melo, 2003).

Olgunlaşma: Biyofilm gelişiminin bu aşamasında hücreler çoğalarak sayılarını arttırmakta ve mikrokoloniler içinde toplanmaktadır. Bu aşama ilk hücrelerin yüzeye tutunması ve biyofilmi bir arada tutan EPS üretimi ile kolaylaştırılmaktadır. Hücre bölünmesi ile mikroorganizma sayısının artması ve çevreden yapıya yeni hücreler eklenmesi olgun biyofilmin meydana gelmesine sebep olmaktadır (Denkhaus ve diğ.,

2007). Olgunlaşma aşaması yüksek oranda organize, besin ve metabolik atıkların taşındığı su kanalları ile çevrili bakteriyel sütunlardan oluşan üç boyutlu yapının oluşumu ile tanımlanır. Hücre dışı polisakkaritler pek çok biyofilm türünün üç boyutlu yapısı için gereklidir (Moorthy ve Watnick, 2004).

Kopma: Biyofilm yaşam döngüsünün son adımı kopmadır. Kopma 3 şekilde gerçekleşmektedir. İlki erozyondur. Bu şekilde meydana gelen kopmada biyofilmden küçük parçalar ayrılmaktadır. Diğer bir kopma süreci olan dökülmede hızlı bir şekilde büyük parçaların kopması gerçekleşmektedir. Aşınma ise sıvı içindeki parçacıkların biyofilm ile çarpışması sonucunda kopmaya sebep olmasıdır. Erozyon biyofilm kalınlığı ve akış hızı arttıkça artmaktadır. Dökülme ise erozyondan daha rastlantısal olup biyofilm içindeki besin ve oksijenin azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dökülme besin açısından zengin ortamlarda meydana gelen kalın biyofilm tabakalarında gözlenmektedir (Lecuyer ve diğ., 2011; Donlan, 2002; Ochoa ve diğ., 2007).



Şekil 2.1: Üç adımda biyofilm oluşumu (Stoodley ve Dirckx, 2003).

2.1.5. EPS Tabakası

Birçok biyofilm tutunmuş halde bulunan hücreleri saran hücre dışı matriks üretimi ile karakterize edilmektedir. Matriksin önemli bir özelliği, yapıda bulunan bakterilerin hücre yüzey bileşenlerinin dışında bulunan sentetik mikrobiyal polimerler içermesidir (Allison, 2003). Ekstraselüler polimerik bileşenler mikroorganizmaların yüksek molekül ağırlıklı salgıları olup polisakkarit, protein, nükleik asit, lipid, glikoprotein ve fosfolipitler gibi

çeşitli organik bileşenlerden oluşmaktadır (Nguyen ve diğ., 2012; Allison, 2003). Hücre dışı polimerler üç boyutlu, jel benzeri, yüksek oranda sulu ve genellikle anyonik olmak üzere yerel olarak yüklü biofilm matriksinin oluşum ve devamlılığını sağlamaktadır (Denkhaus ve diğ., 2007). Tüm biyofilm polimerleri son derece sulu halde olmaları nedeniyle biyofilm hücrelerini bir arada tutan ve su muhafaza eden bir matriks oluşumuna katkı sağlamaktadır (Flemming ve diğ., 2007).

1990’larda Thomas Neu, Hans-Curt Flemming ve arkadaşları söz konusu polimerler için hücre dışı polimerik maddeler veya sekresyonları kapsayacak şekilde EPS kısaltmasını geliştirmişlerdir (Decho, 2013). Yapılan genetik analizler sonucunda biyofilm mimarisinin belirlenmesinde EPS’nin önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır. EPS bu mikro çevrede yaşayan biyofilm hücrelerinin yaşam koşullarını, gözeneklilik, yoğunluk, su içeriği, yük, adsorpsiyon özellikleri, hidrofobiklik ve mekanik stabilitesini etkileyerek belirlemektedir (Branda ve diğ., 2005; Flemming ve Wingender, 2002).

Hücre dışı polisakkaritler, molekül ağırlıkları 500 ve 2000 kilodalton (kDa) arasında değişmekle birlikte yüksek molekül ağırlıklı polimerlerdir (Flemming ve Wingender, 2003). Bu polisakkaritler EPS matriksinin protein, lipit, iyon gibi diğer bileşenleri ve hücre yüzeyinin diğer bileşenleriyle etkileşim halinde olup biyofilm viskozitesini ve jelleşmesini belirleyen polimer bir ağ oluşturmaktadırlar (Denkhaus ve diğ., 2007).

Hücre dışı polisakkaritler negatif yüklerini üronik asidin karboksil grubundan veya fosfat, sülfat, gliserat, piruvat ve süksinat gibi karbonhidrat yapısında olmayan bileşenlerden sağlarlar. Hücre dışı polisakkaritler genellikle glukuronik asit, galakturonik asit ve mannuronik asit gibi hekzuronik asitleri değişken oranlarda içermektedir (Denkhaus ve diğ., 2007). Hücre dışı polisakkaritlerin negatif yüklü olmaları yapıya hidrofobik özellik kazandırmaktadır (Allison, 2003). Amino şekerlerin varlığından kaynaklanan polisakkaritlerdeki çok değerlikli katyonik gruplar, EPS matriksinin jel kıvamının artırılmasına katkıda bulunmaktadır (Denkhaus ve diğ., 2007; Tsuneda ve diğ., 2003).

Proteinler EPS’nin anyonik özelliğine katkıda bulunmaktadırlar. Proteinlerin negatif yükü aspartik asit ve glutamik asit gibi iki değerlikli amino asitlerden kaynaklanmaktadır (Denkhaus, ve diğ. 2007). Hücre dışı proteinlerden alanin, lösin ve glisin amino asitlerinin yapıda fazla miktarda bulunması EPS’nin hidrofobik özelliğine katkı sağlamaktadır

(Sutherland, 2001). Nükleik asitler ise nükleotitlerinde bulunan fosfattan dolayı polianyoniklerdir. Üronik asit, asidik amino asit ve fosfat EPS'nin negatif yüklü bileşenleri olup biyofilm ve flokların yapısı için önemlidirler. Çünkü kalsiyum (Ca^{2+}), magnezyum (Mg^{2+}), demir (Fe^{3+}) gibi katyonlarla etkileşim halinde olup bunun sonucunda polimerlerle çapraz bağ yaparak EPS matrik ağının oluşumu/stabilizasyonuna aracılık etmektedirler (Denkhaus, ve diğ. 2007). EPS yapısında bulunan karboksil, fosforil gibi yüklü gruplar ve proteinler gibi apolar yapılar hidrofilik ve hidrofobik gruplar içerdiğinden dolayı, hidrofobik ve hidrofilik yüzeylere tutunmaya katkıda bulunmaktadır (Nguyen ve diğ., 2012).

Biyofilmin ana bileşeni olarak bilinen EPS, bakteriyel tutunmayı arttırma, biyofilm gelişimini teşvik etme, biyosit, dezenfektan ve antibiyotiklere karşı koruyucu bariyer sağlama, biyofilm gelişimi için besin alımı ve depolanması, mikroorganizmaların iletişimi ve devamında gerçekleştirilen genetik transfer için uygun ortam sağlama dahil olmak üzere birçok role sahiptir. Matriks veya glikokaliks olarak da adlandırılan EPS tabakası ayrıca biyofilm hücrelerini, sıvı akışından dolayı kopmaya karşı korumanın yanı sıra su ve besin sıkıntısı gibi çoklu stres koşulları karşısında dirençli olmalarını sağlamaktadır (Xue ve diğ., 2012; Kives ve diğ., 2006; Denkhaus ve diğ., 2007).

2.1.6. İnsan Yapımı Su Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilmin Önemi

Biyofilm tabakasının meydana geldiği alanların başında su dağıtım sistemleri gelmektedir. Su dağıtım sistemlerindeki mikrobiyal problemler mikroorganizma üremesi, biyofilm oluşumu, korozyon ve patojenlerin varlığı ile karakterize edilmektedir (Sekar ve diğ., 2012). Su dağıtım sistemlerinde bulunan toplam mikroorganizmaların % 95'i biyofilm yapısında bulunmaktadır (Codony ve diğ., 2005). Biyofilm yapısında meydana gelen kopmalar su fazındaki mikrobiyal yükün artmasına sebep olmaktadır (Sekar ve diğ., 2012). Yüzeylere tutanan bakteriler planktonik formlara göre farklı fenotipler sergilemekte ve bu durum dezenfektanlara karşı gösterdikleri direnci arttırmaktadır. Aynı zamanda su sistemlerinde mikrobiyal biyofilm varlığı tat ve koku problemleri gibi estetik sorunlara da yol açmaktadır (Codony ve diğ., 2005).

Su dağıtım sistemlerinin en önemli özellikleri yüzey alanının hacme oranının yüksek olması, uzun depolama süreleri, reaktif boru malzemeleri varlığı ve yüksek sıcaklıktır.

Tüm bu özellikler sudaki rezidual dezenfektan oranının düşmesine neden olmaktadır. Binalardaki sıhhi tesisatlar, suda bulunan fırsatçı patojenler için önemli bir rezervuardır ve bu patojenler insanlara aerosollerin solunması veya deri ile temas gibi yollarla bulaşabilmektedir (Wang ve diğ., 2012). Su sistemlerinde bulunan fırsatçı patojenlerin başında *L. pneumophila*, tüberküloz olmayan *Mycobacteria*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acanthamoeba* türleri gelmektedir (Wang ve diğ., 2012; Flemming, 2002).

İçme suyu sistemlerinde meydana gelen biyofilm tabakası da sağlık, operasyonel ve estetik sorunlara sebep olmaktadır. Biyofilmler dağıtım sistemindeki suyun mikrobiyal kalitesini olumsuz yönde etkilemelerinin yanı sıra korozyona da sebep olmaktadır (Lethola ve diğ., 2004). Bakteriler tarafından kullanılan ve ‘kullanılabilir organik karbon’ olarak adlandırılan organik bileşen içeriği içme suyu bakteri üremesi için kritik faktördür. Kullanılabilir organik karbon, dezenfeksiyonun ardından bakteri üremesini sağlamakta ve bunun sonucunda içme suyu kalitesi önemli ölçüde etkilenmektedir. Artan kullanılabilir organik karbon suda bakteriyel üremeyi ve biyofilm oluşumunu arttırmaktadır (Brettar ve Höfle, 2008). Kullanılabilir organik karbon dışında su dağıtım sistemlerinde biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler mikrobiyal besinler, boru materyali, dezenfektanlar, sudan gelen bakteriler ve suyun hidrolik rejimidir (Lethola ve diğ., 2004).

İçme suyu sistemlerinde biyofilm oluşması ve biyofilmden kopan mikroorganizmaların su fazındaki mikroorganizma sayısının artması oldukça önemlidir. Bu mikroorganizmaların bazıları patojen olup patojenler içinde *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*, *Mycobacterium avium*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica* ve *Vibrio cholera* yer almaktadır. İçme suyu sistemlerindeki biyofilmler patojenik mikroorganizmalar için çevresel rezervuar görevi görmekte ve su kontaminasyonu için potansiyel bir kaynak oluşturmaktadırlar. Bu sebeple farkedilmeden bırakılmaları durumunda insanlar için potansiyel bir sağlık riskine yol açmaktadırlar (Simoes ve diğ., 2010; Wingender ve Flemming, 2011).

Biyofilm tabakasının meydana geldiği diğer bir su sistemi olan soğutma kulelerinde ise sisteme gelen suda bulunan mikroorganizmalar ve dışarıdan sisteme alınarak soğutma kulesi boyunca hareket eden havadaki mikroorganizmalar biyolojik tohum görevi görmektedir. Soğutma kulelerinin yüksek sıcaklık, nötre yakın pH, sürekli havalandırma

ve güneş ışığı gibi genel çalışma koşulları biyolojik büyüme için ideal koşulları oluşturmaktadır (Chien ve diğ., 2012; Aruliah ve Ting, 2014). Bu uygun koşullara ek olarak belediyeler tarafından işlenmiş atık suların da sisteme eklenmesi bu sistemlerde biyolojik kontrolü daha da zor hale getirmektedir. Çünkü bu sular yüksek oranda organik madde ve besin içermektedir. Aynı zamanda soğutma kulesi içinde sirküle olan suyun sürekli olarak buharlaşması organik madde ve besin konsantrasyonunu daha da arttırmaktadır (Chien ve diğ., 2012).

Dental ünite su sistemleri de biyofilm tabakasının meydana geldiği yüzeyler arasında önemli yer tutmaktadır. Bu sistemlerde kirlilik izlenmesi ve kontrolü içme suyu sistemlerinde olduğu gibi düzenlenmiş değildir. Bu sistemlerin birim hacmine düşen yüksek yüzey alanı, serbest halde yüzen mikroorganizmaların büyük oranlarda yüzeye tutunmasına sebebiyet vermektedir (Parsek ve Singh, 2003). Dental üniteler özellikle dar ve uzun olan boruları nedeniyle yüzeye tutunan mikroorganizma kolonileri için uygun ortam sağlamaktadır (Ajami ve diğ., 2012). Sistemlerde meydana gelen kontaminasyonun temel kaynağı dental işlemlerde kontamine su kullanımı ve kullanılan cihazlarda meydana gelen arızalar nedeniyle hastaların tükürüklerinin emilimidir (Nikaeen ve diğ., 2009). Dental ünite su sistemlerinden izole edilen patojen bakteriler *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*, tüberküloz olmayan *Mycobacterium spp.* ve *Staphylococcus spp.*'dir (Nikaeen ve diğ., 2009; Liaqat ve Sabri, 2008; Parsek ve Singh, 2003). Diş hekimleri tarafından kullanılan yüksek hızlı el spreyleri ya da ultrasonik cihazlar ile püskürtülen su/hava spreyi yapıda *L. pneumophila* gibi bakterilerin olması durumunda *Legionella* aerosollerinin havaya dağıtılmasına ve bu aerosollerin solunması ile hem hastaların hem de dental ekibin enfeksiyonuna neden olmaktadır (Ajami ve diğ., 2012; Ma'ayeh ve diğ., 2008). Bu konuda hiçbir etkili protokol veya kılavuzun bulunmaması dişhekimlerinin bu sorunla başa çıkmalarını zorlaştırmaktadır (Parsek ve Singh, 2003).

Deniz ortamlarında meydana gelen biyofilm tabakası bakteriyal biyofilmin gemi gövdesine tutunmasıyla başlamakta ve yapıya daha büyük deniz canlılarının eklenmesiyle devam etmektedir. Deniz teçhizatları ile gemilerin hidrolik ve yağlama sistemlerinde meydana gelen biyofilmler ciddi oranlarda korozyona sebep olmakta ve bu durum gemilerin yakıt tüketimini % 40'a kadar arttırmaktadır (Epstein ve diğ., 2012; Olsen, 2015). Yapılan araştırmalar Amerika Birleşik Devletleri donanmasının biyofilm

varlığının yol açtığı ek sürtünme direncini aşmak için gerekli olan ek yakıta 500 milyon dolar daha harcamak zorunda olduğunu göstermiştir (Flemming, 2002).

Klinik aletlerde biyofilm oluşumu iki kategoriye ayrılmıştır. Kalıcı implantlar; kalp kapakçıkları, diş implantları, kalp pilleri, ilaç dağıtım cihazları bu gruba girmektedir. Vücuda yerleştirilmelerini takiben kan ve organik materyallerce kaplanmakta ve biyofilm oluşumuna zemin hazırlamaktadırlar. İmplant cerrahisi sırasında, mikroorganizmalar deri veya diğer cihazlar tarafından kan dolaşımına girebilmekte ve biyofilm oluşumuna sebebiyet vermektedirler. Meydana gelen biyofilmlerin antibiyotiklere dirençli olmaları nedeniyle tedavi implantın kaldırılmasını gerektirmektedir. Geçici implantlar ise kateterler ve havalandırma borularını kapsamaktadır (Epstein ve diğ., 2012; Bixler ve Bhushan, 2012).

Kateterler en sık kullanılan tıbbi cihazlar olup ve enfeksiyonun en yüksek ikinci nedenidir. Hastanede yatan hastaların % 10'unun üretral kateter, trakeal tüp veya vasküler kateter gibi klinik implantlar nedeniyle enfeksiyona yakalandıkları ve bu enfeksiyonlar nedeniyle yılda 5000'den fazla ölüm meydana geldiği tespit edilmiştir. Klinik alanda hemodiyaliz gibi ileri arıtma sistemlerine sahip cihazlarda bile biyofilm meydana gelebilmektedir (Bixler ve Bhushan, 2012). Kişilerde bulunan kalıcı idrar sondalarının varlığı *K. pneumoniae* ve *E. coli* gibi üropatojenlerin biyofilm oluşturmaya zemin sağlamaktadır (Stahlhut ve diğ., 2012).

Santral venöz kateterler enfeksiyon riski yüksek olan kalıcı tıbbi cihazlardır. Olgun biyofilmler kan dolaşımı yoluyla mikroorganizmaların dağılımına sebep olarak septik emboliye sebep olabilmektedir (Zandri ve diğ., 2012). Biyofilmlerin antimikrobiyal ajan ve konak savunmasına karşı dirençli olmaları eradike edilmelerine zorlaştırmaktadır (Chauhan ve diğ., 2012). Tıbbi alanlarda meydana gelen biyofilmler Amerika'daki hastane enfeksiyonlarının % 10'una sebep olmakta olup bu oran yıllık 100000 kişinin ölümüne neden olmaktadır (Epstein ve diğ., 2012).

2.1.7. Biyofilmin Yararları

Sebepten olduğu zararların dışında biyofilm tabakasının yararlı olduğu alanlar da vardır. Sağladığı yararlar nedeniyle biyofilm tabakasının endüstriyel ve çevresel uygulamalarda kullanımı mevcuttur. Atık su arıtımı, içme suyu uygulamalarında biyo-filtreleme,

tehlikeli atıkların biyoremediasyonu, toprak ve yeraltı sularının korunması amacıyla biyobariyer oluşturma gibi alanlarda biyofilmler kullanılmaktadır (Lewandowski, 2005).

Biyofilmler atık su arıtımında önemli rol oynamaktadırlar. Söz konusu biyofilmler aerobik ve anaerobik mikroorganizmalardan meydana gelebilecekleri gibi damlatmalı filtre ve dönen biyolojik kontaktör gibi çeşitli reaktörlerde meydana getirilerek kullanım çeşitliliği sağlamaktadırlar. Mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen atık su arıtımı uygulanabilirliği ve verimliliği açısından avantajlı bir tekniktir (Fernandez ve diğ., 2008). Atık su arıtımında kullanılan biyofilmler farklı türleri içeren kompleks biyofilmlerdir. Bu biyofilmler hem mevcut mikroorganizmalar açısından hem de bu mikroorganizmaların fizikokimyasal çevreleri açısından heterojenite göstermektedir. Atık sularda çok fazla elektron verici ve elektron alıcı bulunmaktadır. Böylece birbirine birkaç mm yakınlığında olmak üzere çok yakın olarak konumlanmış dikey zonlarda aynı anda aerobik ve anaerobik olmak üzere farklı solunum süreçleri meydana gelebilmektedir (Okabe ve diğ., 1999). Atık su arıtımında EPS matriksine organik materyaller tutunmaktadır. EPS'nin hidrofobisite/hidrofilitesi biyoreaktör içinde mikrobiyal topluluğun hidrofobikliği üzerine önemli derecede etki etmektedir. EPS'nin hidrofobik yapısı su içinden organik bileşenlerin tutulmasını sağlamakta ve arıtımın temeli bu prensibe dayanmaktadır (Nguyen ve diğ., 2012).

Mikrobiyal biyofilmlerin kullanıldığı diğer bir alan da biyoremediasyon işlemidir. Biyoremediasyon biyolojik süreçlerin kullanımı ile kirletici maddelerin ortadan kaldırılması, zayıflatılması ya da dönüşümü olarak tanımlanmaktadır. Biyoremediasyon uygulama teknolojileri ağır metaller, petrol, hidrokarbonlar, klorlu kirleticiler, fenoller, radyonüklidler gibi kirleticileri hedef almaktadır (Vu ve diğ., 2009). Biyofilmler özellikle klorofenol, herbisitler gibi çeşitli kirleticilerin ve nikel, çinko, kadmiyum gibi ağır metallerin biyoremediasyonunda önemli rol oynarlar (Zubair ve diğ., 2014). Biyofilm aracılığıyla gerçekleştirilen remediasyonun planktonik bakterilerle gerçekleştirilen sürece oranla daha etkili ve daha güvenli olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak da biyofilm içinde yaşayan mikroorganizmaların farklı çevrelere adaptasyon şansının daha yüksek olması, devamında bu çevrelerde yaşayabiliyor olmaları, biyofilmdeki polimerik matriksin bakterilere koruyucu bir ortam sağlaması ve farklı besinlerin bulunduğu ortamda, aerobik ve anaerobik gibi farklı türlerin bir arada yaşamalarını sağlamasıdır.

Biyofilmler, yapısında bulunan hücrelerin mineralizasyon süreçlerini geliştirmek için optimal pH koşulları, lokalize çözünen konsantrasyonları ve redoks potansiyelinin korunumunu sağlamaktadır. Bu sebeple de geniş hacimli endüstriyel ve kentsel atık suların, ağır metallerin ve hidrokarbonların iyileştirilmesinde biyofilm reaktörleri kullanılmaktadır (Vu ve diğ., 2009).

Ağır metallerin çevreden kaldırılmasında EPS önemli rol oynamaktadır. Çünkü EPS flok oluşturma ve yapısında bulunan katyon bağlayan fonksiyonel grupları ile solüsyondaki metal iyonlarını bağlama yeteneğine sahiptir. Biyofilm yapısında bulunan negatifli yüklü polimerler ile metaller arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimler de kararlı bir kompleks oluşmasını sağlamaktadır. Karasal ve sucul ortamlardaki ağır metallerin biyoremediasyonunda *Enterobacter* ve *Pseudomonas* türlerinin yanı sıra anaerobik olarak da sülfat indirgeyen bakteriler yaygın olarak kullanılmaktadır (Pal ve Paul, 2008; Edwards ve Kjellerup, 2013).

Biyofilmlerin kullanıldığı diğer bir alan da biyo-liçing olarak adlandırılan mikroorganizmalar kullanılarak düşük dereceli maden cevherlerinden metallerin geri kazanımıdır. İşlemde mikroorganizmaların kullanımı ekonomik ve çevre dostu olması nedeniyle artan bir popüleriteye sahiptir. Sürecin temeli mikroorganizmalar tarafından katı bileşiklerin okside edilerek çözenen ve ekstrakte edilebilen ürünlere dönüşümüne dayanmaktadır (Liu ve diğ., 2008). Bu alanda *Achidophillus ferrooxidans* yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteri bakır yığınlarını filtreleme, zor işlenen sülfat altın cevherlerini okside etme gibi işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Suzuki, 2001; Olson ve diğ., 2003). Mikroorganizma mineral yüzeyine tutunduktan birkaç gün sonra tek tabakalı biyofilm meydana gelmekte ve devamında hücre ve mineral yüzeyi EPS ile kaplanmaktadır. Ardından EPS bakteri hücreleri ile enerji kaynağının temas kurmasına aracılık etmekte, biyofilm gelişimi ile liçing işlemi gerçekleştirilmektedir (Gehrke ve diğ., 1998).

Çevresel kullanımlarının yanı sıra bakteriyel biyofilmler insanlarda da koruyucu rol oynamaktadırlar. İnsanların gastrointestinal sisteminde bağırsakların epitel hücrelerine tutunarak, karışık türleri içeren kommensal bakterilerden meydana gelen biyofilmler gıda kaynaklı patojenlere karşı bir bariyer oluşturmakta ve hastalık oluşumunu engelleyici bir görev üstlenmektedirler (Lindsay ve Holy, 2006).

2.1.8. Biyofilm ve çoğunluğu Algılama İletişim Sistemi

Biyofilmler tamamlayıcı fonksiyonları gerçekleştirebilmek adına farklılaşmış hücre fenotipleri olarak evrimleşmektedirler. Biyofilm yapısındaki hücrelerin çoğunluğu algılama (Quorum sensing-QS) olarak adlandırılan hücre-hücre iletişimi ile işbirliği içinde hareket etmeleri, metabolik çeşitlilik ve etkinliğin artmasını sağlamanın yanı sıra çevresel streslere, antimikrobiyal ajanlara ve immün yanıtı karşı direnç gelişimine de sebep olmaktadır (Epstein ve diğ., 2012).

oğunluğu algılama sistemi bakterilerde yüzeye tutunma, EPS üretimi, biyofilm oluşumu, biyofilm içinde su kanallarının oluşumu, hücrelerin kaynaşması, lipit üretimi, virulans faktörlerinin üretilmesi, antibiyotik üretimi, biyoluminasans, sprulasyon, besin tutucu bileşiklerin salınımı gibi çeşitli fizyolojik davranışların meydana gelmesini sağlamaktadır (Kociolek, 2009; Nadell ve diğ., 2008; Frederick ve diğ., 2011).

oğunluğu algılama mekanizması, farklı bakteri taksonları tarafından kullanılan hücre-hücre iletişim mekanizmasıdır. oğunluğu algılama sistemi ile popölasyon yoğunluğuna göre gen anlatımları ve mikrobiyal grup içindeki davranışlar kontrol edilmektedir. Başlangıçta bakteri hücreleri düşük miktarda olmak üzere otoindükleyici olarak adlandırılan sinyal moleküllerini üreterek hücreden salınmalarını sağlamaktadır. Bu sinyal moleküllerine örnek olarak Gram – (negatif) bakterilerdeki açıl homoserin laktonlar (AHLs) verilebilir. Aynı zamanda hücreler otoindükleyicilerin çevresel konsantrasyonunu ölçebilmektedirler ve bu konsantrasyon kritik seviyeye ulaştığında gen anlatımında değişiklik yapılması teşvik edilmektedir. Bakterilerde bulunan otoindükleyici sentezinden sorumlu sistemlerinin büyük çoğunluğu söz konusu gen anlatımını yapmak üzere kendi kendine düzenlenmektedir (Frederick ve diğ., 2011).

Hücreler arası gerçekleşen iletişim sistemi sayesinde bakteriler çevrelerini izleyebilmekte, rekabet avantajı elde etmek, hayatta kalmak ve bulundukları çevreye uyum sağlamak amacıyla gen anlatımlarını değiştirebilmektedirler. Bakteriler tarafından üretilen sinyaller ve sinyallerin algılanmasında görevli reseptörler oldukça spesifik, bu durum tür içi haberleşmede önemlidir. Çok sayıda sinyalin üretilip farklı yollarla koordine halde düzenlenmesi verilen yanıtın düzeyini arttırmaktadır. Farklı türlerin

iletişimini sağlayan evrensel sinyaller ise türler arası haberleşmede önemli rol oynamaktadır (Jayamara ve Wood, 2008).

Bakterilerdeki iletişim mekanizmaları, sinyal moleküllerinin tür içi ve türler arası olmasına göre iki gruba ayrılmaktadır.

Tür içi iletişim sistemleri:

-Gram – bakterilerdeki: Lux I / Lux R tipindeki yoğunluğu algılama sistemi

-Gram + bakterilerdeki: Oligopeptit / iki komponentli tipteki yoğunluğu algılama sistemi

Türler arası iletişim sistemleri:

-Lux S / AI-2 tipi yoğunluğu algılama sistemi (Karaboz ve Sukatar, 2004)

Gram – bakteriler tarafından üretilen AHL bir otoindükleyicidir. AHL molekülleri LuxI tip sentaz tarafından sentezlenmektedir. Bakteriyel üreme sırasında sentezlenen AHL molekülleri üreme ortamında kritik eşik değeri konsantrasyonuna ulaşana kadar biriktirilmekte ve bu değere ulaştıktan sonra reseptörlere bağlanabilmektedir. Bu otoindükleyici hedef genlerin anlatımını düzenlemek amacıyla aynı kökenli olan LuxR tip transkripsiyonel aktivatör proteine bağlanmaktadır. Meydana gelen LuxI / LuxR kompleksi spesifik DNA promotor elementlerine bağlanarak, hedef genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Hentzer ve diğ., 2002; Karaboz ve Sukatar, 2004)

Gram + mikroorganizmalarda ise AHL molekülleri bulunmayıp 5-7 aminoasitten oluşan otoindükleyici peptitler (AIP) bulunmaktadır. Bu peptitler iki bileşenli sensör transkripsiyon sistem ailesinin membran sensör kinaz proteinine bağlanmaktadır. Bu bağlanma fosforilaz kaskadının aktivasyonuna neden olmakta ve gen anlatımında değişikliğe sebep olan ve ayrıca sistemin ikinci bileşeni olan yanıt düzenleyicinin aktivasyonu veya baskılanmasına neden olmaktadır. Bakterilerde meydana gelen türler arası iletişim de ise görevli otoindükleyici molekül AI-2 olup, AI-2 üretiminden sorumlu olan gen *LuxS*'dir (Antunes ve diğ., 2010; Karaboz ve Sukatar, 2004).

L. pneumophila'nın yoğunluğu algılama sistemi üzerine yapılan çalışmalarda klasik AHL moleküllerinin üretilmediği buna karşın *lqs* (*Legionella* yoğunluğunu algılama) gen

kümesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu gen kümesi LqsA otoindükleyici sentazı, LqsS sensör kinazı ve yanıt düzenleyici LqsR'yi kodlamaktadır. Bu Lqs kompleksi LAI-1 (*Legionella* otoindükleyici-1) olarak adlandırılan sinyal yanıt molekülünün oluşmasını sağlamaktadır. Lqs sistemi *L. pneumophila*'da patojen – fagosit etkileşimini, hücre dışı polisakkarit oluşumunu, pilus bileşenlerini ve ağır metallerin taşınmasında görevli taşıma sistemini kodlamaktadır (Spring ve diğ., 2008; Hilbi ve diğ., 2011).

2.2. LEGIONELLA PNEUMOPHILA

2.2.1. *Legionella pneumophila*'nın keşfi, genel ve fenotipik özellikleri

Amerikan Lejyonerlerinin 1976 yılının Temmuz ayında Philadelphia'da Bellevue Stratford otelinde yapılan 58. yıllık kongresine katılan 4000 üyenin 182'si şiddetli zatürreye yakalanmış olup 146 tanesi hastaneye kaldırılmış ve hastalığa yakalanan üyelerin 29 tanesini hayatını kaybetmiştir. Salgından altı ay sonra Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) araştırmacılarından Joseph McDade ve Charles Shepars, ölen hastaların akciğer dokusundan alınan otopsi örneklerinden hastalık sebebi olarak Gram – ve çomak bir mikroorganizma izole ettiklerini açıklamıştır. Hastalık etkeni olarak bakterinin tanısının konulması üç yıl sürmüştü ve bu mikroorganizmaya Lejyonerlerin anısına ithafen *Legionella pneumophila* (İngilizce'de “Legion” ordu anlamına gelmektedir) denilmiştir. Ancak bu hastalığın öyküsü 1976 yılında görülen salgından 33 yıl önceye dayanmaktadır. 1947 yılında etiyojisi bilinmeyen zatürre salgınında, 1957 yılında bir et paketleme fabrikasında ve 1974 yılında bir otelde meydana gelen salgınlarda hastalardan gelen örneklerin yeniden yapılan analizlerinde tespit edilen mikroorganizmanın aynı organizma olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte 1976 yılında meydana gelen salgın, *L. pneumophila*'nın neden olduğu epidemileri belirlemek için gerekli bilimsel odak ve kaynakları sağlamıştır (Gomez-Valero ve diğ., 2009; Diederer, 2008).

Legionellaceae ailesi Proteobacteria'nın gamma-2 alt divizyonuna ait olup tek cins olarak *Legionella*'yı içermektedir (Declerck, 2009). *Legionella* cinsi, 57 tür ve 79 serogrup içermektedir (Walser ve diğ., 2014). Tüm *Legionella* cinsleri içinde 25 tür insanlar için patojendir (Li ve diğ., 2015). Bunlar arasında, klinik açıdan en önemli türler *L. pneumophila* ve *Legionella longbeachae*'dir (Hilbi ve diğ., 2011). *L. pneumophila*, klinik

olarak belirlenmiş vakaların yaklaşık % 90'ından sorumludur. Epidemiyolojik verilere göre *L. pneumophila* serogrup 1 kontamine sulardan izole edilen en yaygın serogrup olmamasına rağmen hastalığın ana etkenidir (Messi ve diğ., 2011). *L. pneumophila* olduğu doğrulanan vakaların % 84'ünün *L. pneumophila* serogrup 1'den kaynaklandığı rapor edilmiştir (Borella ve diğ., 2005). Diğer serogruplardan özellikle 3 ve 6 ise su sistemlerinde daha sık görülmesine karşın nadiren hastalıkla ilişkilidir (Messi ve diğ., 2011).

L. pneumophila Gram – , aerobik, tek kutupta bir adet flagellalı, spor oluşturmeyen, yaklaşık genişliği 0.5 µm ve uzunluğu 2 µm olan çubuk şekilli bir bakteridir. *L. pneumophila*'nın in vitro koşullarda büyümesi nispeten zordur ve bu ortamlarda gelişebilmesi için katkı maddeleriyle desteklenmiş büyüme ortamı, optimum pH olarak 6.8-7.0 arasındaki değerlere ihtiyaç duymaktadır (Borella ve diğ., 2005). Bakteri 25-42°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilme özelliğine sahiptir (Liguori ve diğ., 2014). L-sistein, ketoglutarat ve ferrik demir içeren ve pH'ı 6.9'a ayarlanmış kömür maya agar izolasyonda en yaygın kullanılan ortamdır ancak bu ortamda bile büyüme nispeten yavaştır ve % 2.5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de kolonilerin belirgin hale geçmesi 3 - 7 gün alabilir. Doğal ortamlarda *Legionella*, yüksek sıcaklık, klorlu ortam, UV radyasyonu ve düşük pH gibi stres koşulları altında canlılığını devam ettirebilmektedir (Borella ve diğ., 2005).

L. pneumophila'nın sebep olduğu hastalıklar genel olarak Lejyonelloz olarak adlandırılmakta olup Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşi olarak adlandırılan iki ayrı hastalığa sebep olmaktadır (Whiley ve Taylor, 2014).

L. pneumophila'nın yaşam döngüsü iki döneme ayrılmaktadır. İlk dönemde bakteri hareketsizdir, hücre duvarı incedir ve virülansı düşüktür. Bu dönem replikatif faz olarak adlandırılmaktadır. İkinci dönem de ise hareketli, daha kalın hücre duvarlı ve daha kısadır. Flagella gelişimi bu dönemde meydana gelir ve virülansı oldukça yüksektir. Bu dönem enfeksiyöz faz olarak adlandırılmaktadır. *L. pneumophila*'nın yaşam döngüsünün bu iki fazı karşılıklıdır ve bu fazlar arasındaki geçiş uygun besin miktarı ile tetiklenmektedir. Uygun koşullarda *L. pneumophila* replikatif fazdadır ancak ortamdaki besin kısıtlandığı zaman bakteri üremesini durdurur ve hayatta kalmasına ve yayılmasına aracılık eden virülans faktörlerini üretmektedir. Bu faz hücre hareketi, ozmotik direnç,

sodyum duyarlılığı, sitotoksite ve fagozom-lizozom füzyonundan kaçma ile karakterize edilmektedir (Karki, 2011; Ducret ve diğ., 2014).

2.2.2. *L. pneumophila*'nın yaşam alanları

Toplam bakteriyel popülasyonunun çok küçük bir kısmını (< % 1) oluşturmalarına rağmen *Legionella* cinsi üyeleri her türlü su ve nemin olduğu doğal ortamda bulunabilmektedirler. *Legionella* türleri dünya çapında durgun göller, kaynaklar ve çamur akıntıları gibi tatlı su ortamlarında bulunur ancak doğal kaynaklardaki konsantrasyonları oldukça düşüktür. Deniz suyunda da bulunabilen bakteriler sucul ortamların dışında nemli veya ıslak topraktan da izole edilmiştir. *Legionella* doğal ortamların dışında insan yapımı su sistemlerinde de bulunabilmektedir. Özellikle sıcak su dağıtım sistemlerinde yaygın olarak bulunmasının yanı sıra dekoratif fiskiyelerde (% 15–19), spa havuzlarında (% 2), yüzme havuzlarında, dental ekipmanlarda (% 68) ve *L. pneumophila*'nın ana izolasyon yeri olan klimalar ve soğutma kulelerinde (% 36) bulunmaktadır (Borella ve diğ., 2005).

Spalar, duş başlıkları, sıcak su sistemleri ve soğutma kuleleri gibi insan yapımı su sistemleri *Legionella* türlerinin gelişmesi için ideal ortamlardır. Bu gibi ortamlarda sistemin sıcaklığı gibi fiziksel parametrelerin yanı sıra biyofilm ve amip varlığı gibi biyotik parametreler de *Legionella* çoğalma riskini arttırmaktadır (Wery ve diğ., 2008). Yapılan çalışmalar salgınların aerosol üreten cihazlarda 10^3 – 10^4 KOB/l (koloni oluşturan birim/litre)'yi aştığında meydana geldiğini göstermektedir. Avustralya, Fransa, Japonya ve İngiltere gibi ülkelerde bu değerlerde *Legionella*'ya sahip olan soğutma kulelerinde iyileştirme yapılması gerekli görülmektedir (Carducci ve diğ., 2010).

2.2.3. Bulaşma Yolları ve Sebep Olduğu Hastalık Durumları

Lejyonelloz vakaları su sıcaklığının çevre sıcaklığından daha yüksek olduğu insan yapımı su sistemlerinde izlenmektedir (Wery ve diğ., 2008). Doğal habitatlarda çok düşük olan *Legionella* konsantrasyonları, büyümeleri için en uygun sıcaklığı (25–45°C) sağlayan insan yapımı su sistemlerinde belirgin bir artış göstermektedir. Soğutma kuleleri, sıcak su dağıtım sistemleri, musluklar, buz makineleri, solunum cihazları, duş başlıkları, musluklar, nemlendirici cihazlar, yüzme ve spa havuzları, dekoratif su fiskiyeleri gibi sistemler riskli olarak kabul edilmektedir (Farhat ve diğ., 2010; Donlan ve diğ., 2005;

Liguori ve diğ., 2014; Whiley ve Taylor, 2014).

Bugüne kadar Lejyonelloz salgınlarının hiçbirinin doğal sularla ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (Lau ve Ashbolt, 2009). Ayrıca *Legionella* türlerinin insandan insana geçişi ile ilgili de hiçbir veri rapor edilmemiş olup (Whiley ve Taylor, 2014), *Legionella* enfeksiyonlarının sadece *Legionella* ile kontamine halde ve aerosol üreten cihazlar tarafından meydana getirilen bakterileri içeren aerosollerin solunması ile veya aspirasyon yolu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Whiley ve Taylor, 2014; Schoen ve Ashbolt, 2011; Qin ve diğ., 2012; Donlan ve diğ., 2005; Li ve diğ., 2015).

Özellikle, soğutma kuleleri *L. pneumophila*'dan kaynaklanan Lejyonelloz salgınlarından büyük oranda sorumludur. Endüstriyel soğutma kuleleri ile ilişkili *Legionella* enfeksiyonları ve bazı salgınların varlığı tüm dünya çapında bildirilmiştir. (Wery ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2015).

Sucul ortamlarda *Legionella* geniş bir sıcaklık aralığında, biyofilm yapısında ve protozonların içinde parazit olarak yaşayabilmektedir. Bahsi geçen yapılarda bulunmasının yanı sıra dezenfektanlara karşı gösterdiği direnç çevresel kaynaklarda bakterinin kontrol edilmesini zorlaştırmaktadır (Whiley ve Taylor, 2014). Suyun sıcaklığı, sertliği, kimyasal element konsantrasyonu, akış hızı, yüzey tipi, besin ve dezenfektan konsantrasyonu gibi pek çok faktör boru yüzeyinde bakteri birikmesine ve biyofilm oluşumuna sebep olmaktadır (Liguori ve diğ., 2014). Salgınlar kontamine aerosollerin yayılması nedeniyle soğutma kulelerine 10 km'den daha uzak mesafelerde bile meydana gelebilmektedir (Qin ve diğ., 2012). Aerosollerin coğrafik dağılımı meteorolojik koşullara bağlı olarak gerçekleşmektedir. Örneğin düşük seviyedeki hava akışı aerosollerin dikey yönde hareketini engellerken yatay düzlemde hareket etmesini sağlamaktadır (Walser ve diğ., 2014).

Legionella sucul bir bakteri olup insan akciğerlerine kontamine aerosollerin solunması ile ulaşmaktadır. Akciğerlerde makrofajlar içinde çoğalan bakteri Lejyonelloza sebep olmaktadır (Blanky ve diğ., 2015). Lejyonellozun 2 farklı klinik durumu bulunmaktadır. İlki Lejyoner hastalığı olarak adlandırılmakta olup zatürreyi de kapsayan ciddi bir enfeksiyondur. Diğer klinik tablo ise Pontiak ateşi olarak adlandırılır ve kendi kendini sınırlayabilen nezle benzeri hafif seyirli bir hastalıktır (Blanky ve diğ., 2015; Lau ve

Ashbolt, 2009). Sporadik ve salgın halindeki Lejyonelloz dünya çapında bir dağılıma sahiptir (Blanky ve diğ., 2015). Fırsatçı patojen türlerin başında *L. pneumophila* serogroup 1, *Legionella micdadei*, *L. longbeachae*, *Legionella dumoffii* ve *Legionella bozemanii* gelmektedir (Lau ve Ashbolt, 2009).

Legionella türleri, sebep olduğu hastalığın morbidite ve mortalite değerleri açısından oldukça önemli bir su bazlı patojen olarak tanımlanmaktadır (Hines ve diğ., 2014). Lejyoner hastalığı oldukça ağır seyredabilen akut zatürre olup % 5-30 arasında değişen ölüm oranına sahiptir. Sağlık durumu zayıf olan kişilerde bu oran % 50'ye yaklaşmaktadır. Lejyoner hastalığı çoklu organ yıkımı ile sonuçlanabilen şiddetli bir zatürredir (Levesque ve diğ., 2014).

1-14 gün arasında değişen inkübasyon süresine sahip olan hastalığın klinik semptomları hafif solunum yolu şikayetlerinden şiddetli atipik zatürreye kadar gidebilmektedir. Lejyoner hastalığının erken evrelerine yüksek ateş, baş ve kas ağrısı gibi şikayetler gözlenirken ilerleyen dönemlerde nefes darlığı, ishal, bulantı ve merkezi sinir sistemi bozuklukları görülebilmektedir. Hastalık ağırlıklı olarak erkeklerde, 50 yaş üstü erişkinlerde, sigara kullananlarda, bağışıklık sistemi baskılanmış, akciğer rahatsızlığı, kalp yetmezliği, diyabet rahatsızlığı bulunan kişilerde görülmektedir. Son zamanlarda elde edilen veriler Lejyoner hastalığının çocuk yaş grubu ve yeni doğan yoğun bakım ünitelerinde de meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır (Chritceley ve Bentham, 2007; Szewzyk ve diğ., 2000; Akbaş, 2013).

2.2.4. Biyofilm Tabakası ve *L. pneumophila* ilişkisi

Legionella bakterisinin doğal ve insan yapımı su sistemlerinde serbest halde uzun süre kalabilmesi biyofilm içinde yaşamasından kaynaklanmaktadır. İnsan yapımı su sistemlerinde mikrobiyal üreme % 95'lik bir oranla boru duvarlarının iç kısmı, tesisat armatürleri, ısıtma, havalandırma ve klima sistemlerinde oluşan biyofilm içinde meydana gelmektedir. Biyofilmler çevresel stresler karşısında bakterinin uzun süre hayatta kalabilmesini sağlayan oldukça verimli ve kararlı ekosistemlerdir (Declerck ve diğ., 2009; Borella ve diğ., 2005; Lau ve Ashbolt, 2009).

Legionella güç üreyen bakteri olduğundan dolayı besin içeriği zengin olan biyofilmlerde yaşayarak besin elde etme konusunda avantaj sağlamaktadır. Biyofilm içinde yaşaması

durumunda yüksek hız ve türbülanslı akış koşullarında bile canlılığını/infektif özelliğini koruyarak uzun haftalar boyunca kalabilmektedir. Ayrıca *L. pneumophila*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Acanthamoeba castellanii* ve *Saccharomyces boulardii* gibi sıcaklık ile öldürülmüş mikrobiyal hücrelerden oluşan ölü biyofilmlerde hayatta kalıp üremeye devam edebilmektedir (Lau ve Ashbolt, 2009).

Çalışmalar *L. pneumophila*'nın mevcut biyofilme 2 saat gibi kısa bir süre içinde kolonize olduğunu göstermektedir. Biyofilm yapısında bulunan *L. pneumophila* ihtiyaç duyduğu besini iki yolla elde etmektedir. Bunlardan ilkinde besinler biyofilm ortamından alınmaktadır. Bu alım alg ve heterotrofik mikroorganizmaların ürettikleri besinlerin doğrudan alınması veya indirekt olarak organik bileşenlerin ayrıştırılmasıyla gerçekleşmektedir. Diğer bir yol ise protoozonların içinde, onların peptit ve proteinlerini parçalayarak besin sağlamaktır (Declerck, 2009).

Biyofilmler *L. pneumophila*'nın konak hücrenin dışında da hayatta kalabilmelerini ve çoğalmalarını sağlamaktadır. Biyofilm içinde bulunan ölü organik materyaller ve EPS tabakası bakteriyi korurken *L. pneumophila* tarafından üretilen bakteriyosin benzeri substratlar (BLS) gibi antagonistler de bakterinin ekolojik niş içinde hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Messi ve diğ., 2011). Biyofilm yapısında bulunan *L. pneumophila* hücrelerinin kopması hem klinik hem de halk sağlığı açısından enfeksiyon ve kontaminasyonun yayılmasında temel öneme sahiptir. Çünkü biyofilm fazından kopan bakteriler su fazına geçerek sistem tarafından üretilen aerosollere katılmakta ve insanlara ulaşabilmektedir. Model sistemlerle yapılan çalışmalar biyofilme bulunan *Legionella*'ların % 90'ının serbest kalabildiğini göstermektedir (Storey ve diğ., 2004).

2.2.5. *L. pneumophila*'nın Konak Hücre İçine Alınışı, Üremesi ve Sağladığı Avantajlar

L. pneumophila'nın protozoonlar içinde çoğalabilme yeteneği ilk kez 1980 yılında Rowbotham tarafından tanımlanmıştır ve bu konak-parazit ilişkisinin *L. pneumophila*'nın patojenez ve ekolojisinde merkezi rol oynadığı açığa çıkmıştır (Borella ve diğ., 2005). *Legionella*'nın en az 20 amip türü, 2 siliat protozoon türü ve 1 cıvık mantar türü içinde parazitik olarak yaşayabildiği tespit edilmiştir. *Legionella*'nın *Acanthamoeba castellanii* ve *Hartmanella vermiformis* gibi protozoonlar ile arasındaki olağanüstü parazitik ilişkisi

yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Lau ve Ashbolt, 2009; Declerk ve diğ., 2009).

Bakterinin konakçı hücrelere girişi, hedef hücrenin bulunması, tutunma, sinyal iletimi, hücre içine giriş ve hücre içine girdikten sonraki hayatta kalma aşamalarından oluşmaktadır. *Legionella* amip veya makrofaj içine alındığında fagozom oluşmaktadır. Ardından fagozom endoplazmik retikulum ile çevrenmekte ve endozomal yoldan tamamen ayrılmaktadır. *Legionella* cinsi bakterilerde *dot/icm* genleri tarafından kodlanan Dot/Icm tip IV salgı sistemi fago-lizozomun oluşumunu geciktirerek fagozomun tekrar yapılandırılmasını kontrol etmektedir. Bu açıdan Dot/Icm kompleksi *Legionella*'nın virulansı açısından kritik öneme sahiptir. Bu sırada bakteri de koruyucu vakuol içinde virulans faktörleri olmayan replikatif forma dönüşmekte, besin maddelerini tüketmekte ve üremenin durağan fazında lizozom ile birleşerek ihtiyaç duyduğu amino asitleri sentezlemektedir. Daha sonra bu amino asitler kademeli olarak tüketilmekte, bakteri virulans faktörlerini sentezlemekte ve virulent forma dönüşmektedir. Bu aşamanın ardından konak hücre lizise uğratılmakta ve bakteri çevreye yayılarak diğer fagositleri enfekte etmek için hazır halde bulunmaktadır (Borella ve diğ., 2005; Gao ve Abu Kwaik, 1999; Costa ve diğ., 2005; Gomez-Valero ve diğ., 2009; Steinert ve diğ., 2002; Karki, 2011).

Amip içinde yaşamının bakteriye sağladığı diğer avantajlar ise protozoon bakterinin hayatta kalması için uygun ortam sağlamaktadır, amip içinde olmak bakterinin kimyasal ve biyositlerle temasını engellemektedir, amip içinde *Legionella*'nın geçirdiği adaptasyon virulansını arttırmakta ve böylece insanda makrofajlar ve epitel hücreleri enfekte edebilme yeteneği kültür ortamında gelişen bakterilere göre önemli ölçüde artmaktadır (Borella ve diğ., 2005; Ji ve diğ., 2014). Amip içinde gelişen *L. pneumophila*'nın agar ortamında yetişenlere göre makrofaj invazyonunun 10 kat, epitel hücre invazyonunun ise 100 kat arttığı tespit edilmiştir. Amip içindeki replikasyonun ardından dezenfektan gibi çevresel streslere karşı daha dirençli olmanın yanı sıra özellikle antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli hale gelmekte ve VBNC fazında bulunan *L. pneumophila* amip içinde yeniden üreyebilen forma geri dönebilmektedir (Brown ve Barker, 1999; Borella ve diğ., 2005).

Protozoon içinde olmanın sağladığı diğer avantajlar ise örneğin *Naegleria* türleri içinde bulunmak ek bir kamçıyla aşama sağlamaktadır ve böylece biyofilm yapısında besin

eksikliği gibi uygun olmayan şartların meydana gelmesi durumunda ortamdan yüzerek uzaklaşmayı sağlamaktadır. Ayrıca her birinin içinde 20-200 adet *L. pneumophila* bulunan < 5 mm büyüklüğünde solunabilir vesiküller şeklinde ortama yayılabilmektedir. Bu vesiküller kolayca aerosoller içine girebilmekte ve böyle uzak mesafelere yayılabilmektedir (Declerck, 2009).

2.2.6. İzolasyon ve İdentifikasyon

Legionella türlerinin tespiti için klasik yöntem, bakterilerin direkt kültürünü kapsamaktadır. *Legionella* türlerini izolasyonu için klinik ve çevresel örneklerin α -ketoglutarat, ferrik demir ve L-sistein ile zenginleştirilmiş BCYE (Buffered charcoal yeast extract) Agar besiyerine ekim yapılırken identifikasyon için serolojik teknikler uygulanmaktadır. Ayrıca amipli yardımcı kültür prosedürü de in vitro koşullarda *Legionella*'nın hücre içi üremesini teşvik etmek amacıyla önerilmektedir (Carvalho ve diğ., 2007).

Legionella hücrelerinin VBNC fazına girerek kültürde tespit edilememesi ve kültür ortamında *Legionella*'nın üremesini baskılayabilecek bakteri üremesi gibi nedenlerle son zamanlarda, PCR, qPCR, FISH, katı faz sitometresi, optik dalga boylu spektroskopi, DNA probu ile enzim çoğaltılmış elektrokimyasal tespit, yüzey plazmon rezonans immunosensorü ve nükleik asit prob ile tespit yöntemleri yaygın olarak kullanılmakta olup bazı moleküler teknikler de çevresel izleme amacıyla geliştirilmiştir (Carvalho ve diğ., 2007; Whiley ve Taylor, 2014). 16S rRNA (ribozomal ribonükleik asit), makrofaj enfektivite güçlendirici (MIP), kusurlu organel tespiti (DotA), RNA polimeraz β -alt birim (rpoB) genleri ya da 23S-5S ribozomal genler arası dizi analizi (23S-5S ISR) genetik belirleyiciler olarak *Legionella*'ların tür düzeyinde tespiti için kullanılmaktadır. Kültür ve PCR tekniklerine alternatif olarak direkt floresan antikor (DFA) boyama, lateks aglütinasyon teknikleri ve flow sitometri yöntemleri de kullanılmaktadır (Carvalho ve diğ., 2007; Buse ve diğ., 2012).

Lejyoner hastalığının tanısı bazı kısıtlamaları olmasına rağmen üriner antijen saptama deneylerine dayanmaktadır ki bu deneyler tiplendirme çalışmaları için uygun değildir. Salgın araştırmaları enfeksiyon kaynağını belirlemek ve kontrol altına almak için ilişkili organizmaların hızlı bir şekilde tanımlanması ve tiplendirilmesine dayanmaktadır.

Legionella için standardize edilmiş geçerli tiplendirme yöntemleri sonuçların birkaç gün içinde alınabildiği monoklonal antikor altgrubu (mAb), PFGE, çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve dizileme bazlı tiplendirme (SBT) analizlerini kapsamaktadır (Levesque ve diğ., 2014).

2.3. SOĞUTMA KULELERİ

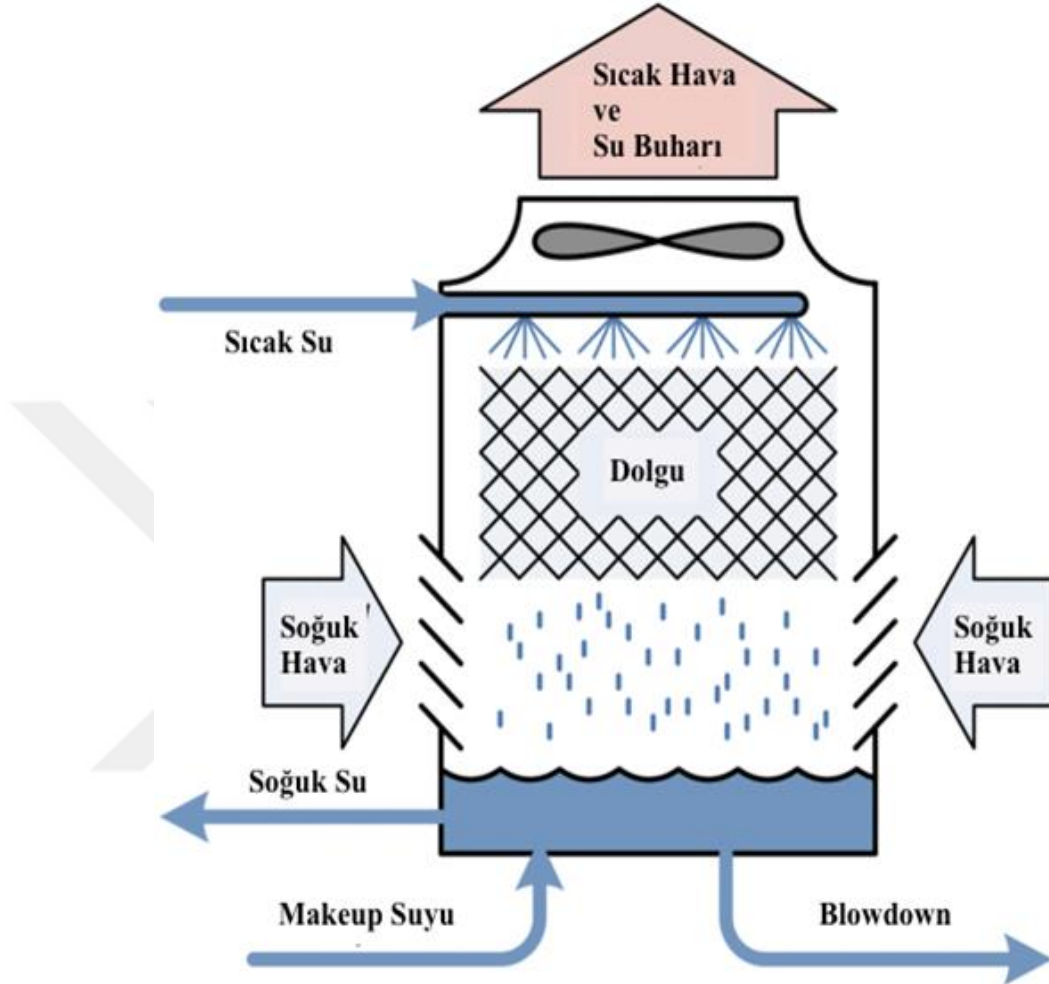
2.3.1. Soğutma Kulesi Tanım, Görev ve Tipleri

Su, endüstriyel faaliyetlerin hemen hemen her türü için en önemli bileşenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Geniş çeşitlilikteki endüstriyel faaliyetler içinde suyun ısı uzaklaştırma aracı olarak kullanımı son derece önemlidir (Venugopalan ve diğ., 2012). Soğutma kuleleri birçok endüstride soğutma aracı olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta olup termal performansı önem taşıyan sistemlerdir (Cortinovis ve diğ., 2009). Soğutma kulelerinde soğutma mekanizmasının temeli, hava ile suyun doğrudan temas işlemi kullanılarak ısıнын uzaklaştırılmasına dayanmaktadır. Soğutma kulesi sistemleri, ısıнын atmosfere iletilerek uzaklaştırıldığı klima ve diğer ısı dönüştürücü sistemler arasında enerjinin en verimli şekilde kullanıldığı ve maliyetin en düşük olduğu teknolojidir (Chang ve Lin, 2014).

Su devir daim sistemlerine göre soğutma kuleleri 2 gruba ayrılmaktadır;

1. Açık devre soğutma kulesi: Soğutma kulesi tipleri içinde en yaygın kullanılan tür olup bu tip soğutma kulesinde kondansatörden gelen sıcak su, su dağıtım sistemi boyunca pompalanmakta, kulenin üst kısmına gelmekte ve buradan yer çekimi ile aşağıya doğru inmektedir. Atmosferden gelen hava kulenin alt kısmından girmekte ve kulenin üstüne doğru akışı sağlanmaktadır. Sistem içindeki dolgu, hava - su ara yüzeyi oluşturmakta ve buharlaşma ile ısıнын havaya iletilmesine yardımcı olmaktadır. Kalan soğumuş halde bulunan su, kulenin dip kısmında bulunan havuzda toplanmakta ve pompalanarak sisteme geri dönmektedir. Sistem içinde meydana gelen buharlaşma su kaybına yol açarken bu durum mineral ve organik birleşenlerin yoğunluğunda artışa sebep olmaktadır. Bu artış korozyon ve kireçlenme gibi sorunlara sebebiyet veren birikmelere yol açmaktadır. Bu sebeple ‘blowdown’ olarak adlandırılan işlemle sistemden su dışarı atılmakta ve buharlaşma, blowdown gibi nedenlerle meydana gelen su kaybının önüne geçmek için

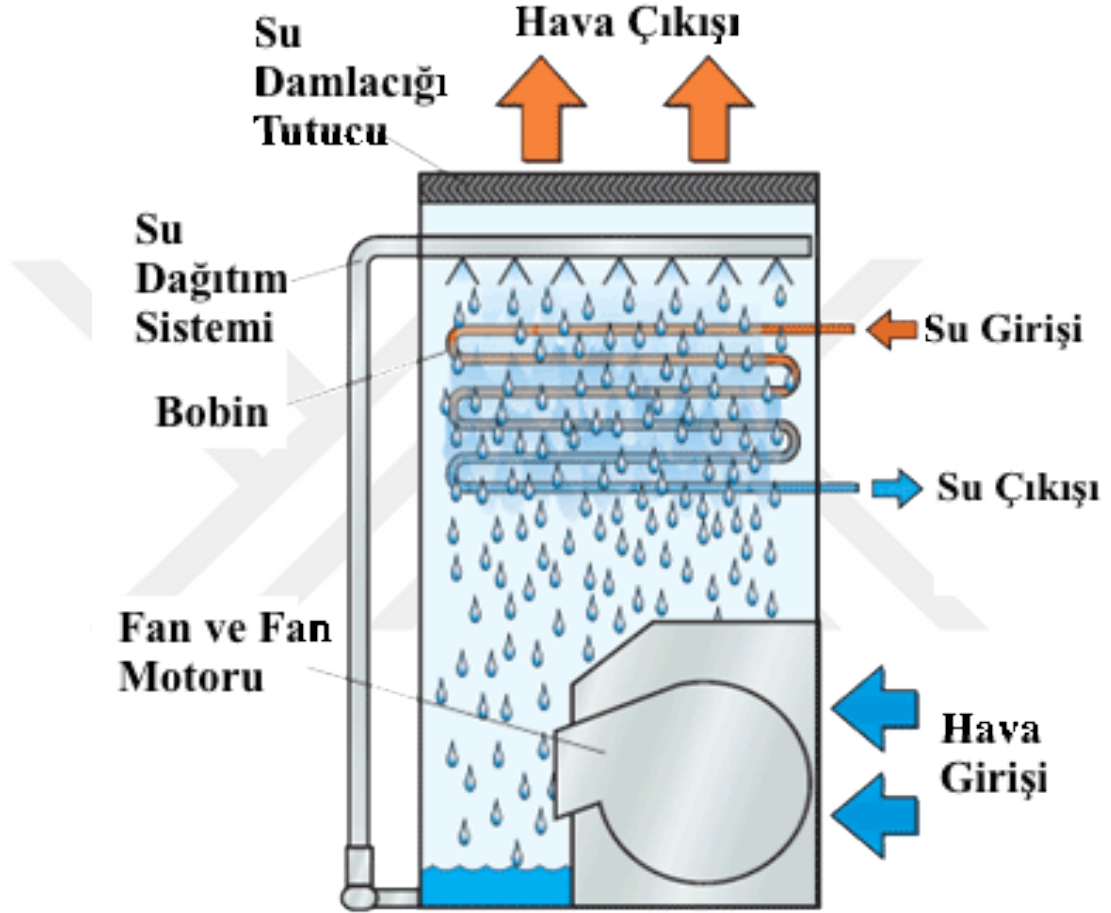
‘make up’ adı verilen işlem ile sisteme taze su eklenmesi gerekmektedir (Ludensky, 2005; Kara, 2010; ASHRAE Guideline, 2000; Bruijs ve Jenner, 2012).



Şekil 2.2: Açık devre soğutma kulesi şeması (www.evapco.com).

2.Kapalı devre soğutma kulesi: Kapalı tip soğutma kulesi tek bir nokta dışında çalışma prensibi olarak açık sisteme benzemektedir. Söz konusu bu fark kapalı sistemlerde kullanılan işlem sıvısının hava ile doğrudan temas halinde olmamasından kaynaklanmaktadır. Kapalı sistemde iki tane sirküle halde sıvı bulunmaktadır. Bu tür soğutma kulesinde ısınan su ikinci bir akışkan ile temas ederek soğutulmakta ve atmosfer ile temas etmeden tekrar sisteme dönmektedir. İç devre sıvısı olarak adlandırılan ve soğutulan işlem sıvısı, dış devre olarak adlandırılan ikinci sıvı ve hava ile doğrudan temas etmemektedir. Bu tip soğutma kulesinde su, kulenin üst kısmına pompalanmakta ve kulenin üst kısmında bulunan su dağıtım sistemi ile işlem sıvısının yer aldığı bobinlere püskürtülmektedir. Bu esnada kulenin sahip olduğu fan ile sisteme giren hava üst

kısımlara ileilmektedir. Sistem içinde meydana gelen hava - su karşılaşması buharlaşma yoluyla işlem suyunun soğutulmasını sağlamaktadır. Kule boyunca aşağıya akan su, kulenin tabanında birikmekte ve soğumuş olarak tekrar yukarı pompalanmaktadır (Ludensky, 2005; Kara, 2010; ASHRAE Guideline, 2000).



Şekil 2.3: Kapalı devre soğutma kulesi şeması (www.evapco.com).

Soğutma kuleleri kimya endüstrisi, petrol üretimi, petrokimya endüstrisi, metal işleme endüstrisi, elektrik üretim istasyonları, soğutma ve iklimlendirme tesisleri, kağıt hamuru ve kağıt fabrikaları, çelik fabrikaları, ilaç endüstrisi, gıda endüstrisi gibi endüstriyel alanların yanı sıra otel, hastane ve alışveriş merkezi gibi pek çok alanda ısının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Soğutma suyu sistemleri soğutma suyu şebekesi, soğutma kulesi ve pompalama sistemi olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır (Ludensky, 2005; Ortega ve diğ., 2010; Mouchtouri ve diğ., 2010; Kara, 2010).

2.3.2. Soğutma Kulesinde Biyofilm Oluşumunun Önemi

Soğutma kuleleri mikrobiyal büyüme için ideal üreme koşulları sağlamaktadır. Geniş sıcaklık ve pH aralıkları, sürekli havalandırmanın yanı sıra organik ve inorganik besin bolluğu ve güneş ışığı varlığı soğutma kulelerini birçok biyolojik türün çoğalması için ideal bir yer haline getirmektedir (Ludensky, 2005). Genel olarak soğutma kulesi içinde pH 7-9, sıcaklık ise 20-40°C arasında olup mikrobiyal üreme için yeteri miktarda çözünmüş oksijen ve besin bulunmaktadır. Bunun sonucunda soğutma kulesi içinde geniş çeşitlilikte mikrobiyal popülasyonlar gelişebilmektedir (Xu ve diğ., 2012). Soğutma sistemlerinde mikrobiyolojik kirliliğinin kaynağı sisteme gelen make up suyu, hava ve yağmur suyunda bulunan mikroorganizmalardır. Make up suyu olarak yeraltı suyu veya musluk suyu kullanılması giren mikroorganizma sayısının daha az olmasına sebep olurken geri dönüşüm sularının kullanılması daha fazla mikroorganizma girişine sebep olmaktadır. Özellikle açık tip soğutma kulelerinde havadan gelen mikroorganizmalar sistem içindeki mikroorganizmaların üremesinde önemli rol oynamaktadır (Xu ve diğ., 2012).

Soğutma sistemlerinde bulunan planktonik fazdaki biyolojik gelişim aerosol oluşumuna bağlı olarak çevresel ve halk sağlığı riski oluşturmaktan dolayı oldukça önemlidir. Biyofilm yapısında biyolojik gelişimin yetersiz kontrolü, sirkülasyon halinde bulunan suya sürekli olarak bakteri geçişine sebep olmakta ve böylece soğutma sistemlerinde biyolojik üreme kontrolüne engel olmaktadır (Chien ve diğ., 2012).

Soğutma kuleleri bakteriler, algler, mantarlar, protozoa ve virüsler dahil olmak üzere pek çok mikroorganizmanın çoğalması için ideal ortam sağlamaktadır. Soğutma kulesinde mevcut olan mikroorganizmaların çoğunluğunu besin ve enerji kaynağı olarak ortamdaki organik karbona ihtiyaç duyan heterotrofik bakteriler oluşturmaktadır. *Legionella* bakterisi de soğutma kulesinden yaygın olarak izole edilen bakterilerin başında gelmektedir (Critchley ve Bentham, 2009). Soğutma kulesinde bulunan bakterilerin % 60-70'lik kısmını *Pseudomonas* ve *Aerogenes* cinsi bakteriler oluşturmaktadır. Ayrıca 55-60°C gibi yüksek sıcaklık ve pH 5-10 gibi geniş pH aralığında hayatta kalabilme özelliğine sahip olan ve anaerobik ortamda gelişen, korozyonla ilişkili bakteri olarak tanımlanan sülfat indirgeyen bakteriler de aerobik bakterilerin altındaki anaerobik alanda gelişim göstererek soğutma kulesi içinde bulunabilmektedir (Xu ve diğ., 2012).

Soğutma kulesinde mikroorganizmalar tarafından kolonize edilen yerlerin başında soğutma suyu giriş boruları, menfezler, pompa odaları ve ısı değiştirici kısımlar yer almaktadır. Bu noktalarda biyofilm oluşumu, soğutma kulesinde bulunan ısı değiştiricide ısı transfer direncinin artmasına, bölgesel tıkanmalara, kondansatör tüplerindeki su dolaşımının kısıtlanmasına, ısı değiştirici tüplerde kopmalara ve bunun sonucunda enerji kayıplarına, metal yüzeylerde korozyona, ahşap bileşenlerde bozulmalara ve ek olarak Lejyoner hastalığına yol açan bakterilerin kolayca üremesine sebep olmaktadır (Xu ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2013; Ludensky, 2005).

Lejyoner hastalığı salgınları ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, *Legionella* bakterisini içeren aerosol halindeki damlacıkların solunmasının Lejyoner hastalığına yakalanmada birincil etken olduğunu ortaya çıkarmıştır (Nguyen ve diğ., 2006). Salgınlar ile ilgili olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tutulan kayıtlarda Lejyonelloz salgınlarının önemli bir kısmının kaynağının soğutma kuleleri olduğu belirtilmiştir (Walser ve diğ., 2014). Soğutma kuleleri, bakteri içeren aerosoller rüzgar yardımıyla uzak mesafelere kadar iletebilmeleri dolayısıyla yüzlerce geniş ölçekli salgından sorumludurlar (Nguyen ve diğ., 2006).

Seyahat İlişkili Lejyoner Hastalığı Avrupa Gözetim Programı ve *Legionella* Enfeksiyonları Avrupa Çalışma Grubu (EWGLI), seyahat ilişkili Lejyoner hastalığının kontrol ve önlemesini amaçlayan yönergeler yayınlamıştır. Bu yönergeler soğutma kulelerinde *Legionella* yayılma riskini kontrol etmek için tasarım, işletme ve yönetim önlemlerini içermektedir. WHO, soğutma kulelerinden kaynaklı enfeksiyon riskini kontrol etmek amacıyla su güvenlik planları uygulayarak tehlike analizi yapılmasını önermektedir. Söz konusu su güvenlik planları su kaynağı, ısı dönüştürücü, dağıtım sistemi ve soğutma kulelerinde dezenfeksiyon, gözlem ve bakımı kapsamaktadır (Mouchtouri ve diğ., 2010).

2.3.3. Soğutma Kulesinde Kullanılan Biyofilm Kontrol Teknikleri

Soğutma kulesinde biyofilm ile mücadelede fiziksel, kimyasal ve her iki yöntemin birlikte kullanılması sonucunda geliştirilen mücadele teknikleri kullanılmaktadır.

Fiziksel kontrol

Teorik olarak soğutma kulesinde ısı değıştirici üzerinden yüksek hızda su geçirmek biyofilm üzerine uygulanan kaldırma kuvvetini arttırarak biyofilm kaldırımını kolaylaşmaktadır. Ancak bu teknik basınç düşüşünün üstesinden gelmek için yüksek oranda enerji gerektirmesinden dolayı pratik bir uygulama değildir (Bott, 2009). Bunun dışında soğutma kulesinde meydana gelen biyofilmi kaldırmak için kauçuktan yapılmış sünger topların sistem içinden döndürölerek geçirilmesi, tüplerin içine aşınma ve türbölans yaratarak biyofilmi yüzeyden kaldırmaya yarayan uçların yerleştirilmesi, sıvı ve katı bileşenleri rahatsız eden ultrasonik ses dalgaları kullanımı, sistem içinde polimer liflerin dolaştırılması, < 253.7 nm dalga boylu UV ışık kullanımı, yüksek enerjili elektrik şoku veya düşük seviyeli akım gibi elektrik alanları uygulamaları, su filtrasyonu, > 70°C sıcaklık uygulaması, çeşitli bileşenlerle yüzeylerin kaplanması gibi fiziksel teknikler kullanılmaktadır (Bott, 2009; Rajagopal ve diğ., 2012).

Kimyasal kontrol

Okside edici ve okside edici olmayan şeklinde 2 gruba ayrılan pek çok kimyasal, biyosit için temel olarak kullanılmaktadır. Okside edici ajanlara klor, ozon ve hidrojen peroksit örnek verilirken; okside edici olmayan ajanlara ise ağır metal bileşenleri ve aldehitler örnek verilebilir. Soğutma suyuna kimyasal ilavesi üç şekilde yapılabilir:

1.Sürekli: Bu yöntemde amaç sirkölasyon halinde bulunan suda sabit biyosit konsantrasyonunun devamlılığını sağlamaktır. Bu amaçla kullanılacak doz sistemde bulunan mikroorganizmaların konsantrasyonuna ve türüne bağlıdır.

2.Şok: Bu yöntemde 24 saat içinde sadece 1 kez olmak üzere yüksek dozda biyosit uygulaması yapılmaktadır.

3.Kesikli dozlama: Bu yöntemde her saatte bir kez gibi şok dozlamaya oranla daha yüksek sıklıkta ve sabit zaman aralıklarıyla biyosit uygulaması yapılmaktadır (Bott, 2009).

Soğutma kulesinde mikrobiyal gelişmeyi kontrol etmek için uygulanan en yaygın teknik biyosit kullanımıdır. Bu amaçla dünya çapında en çok kullanılan dezenfektan klordur.

Ancak biyositler planktonik mikroorganizmaları öldürürken biyofilm üzerinde tam anlamıyla etki gösterememektedir (Wang ve diğ., 2013).

Sıkı mevzuatlar ve artan çevre bilinci endüstriyel alanların biyolojik kirlilik kontrol stratejilerini değiştirmelerine sebep olmuştur. Çünkü biyofilmde bulunan bakterilerin öldürülmesi bu bakterilerin yüzeyden kaldırılmasını sağlamamaktadır. Çünkü ölü biyofilmler yeniden gelişimi ve yüzeyde birikimi teşvik ettiğinden dolayı sistem için zararlıdırlar. Bu durum biyofilmi kaldırmanın biyofilmdeki bakterileri öldürmekten daha önemli olduğunu göstermektedir. Bu sebeple yüzey aktif bileşenler gibi biyolojik olarak bozulabilen ve daha az toksik bileşenler içeren ‘dağıtıcı’ ya da ‘biyo-dağıtıcı’ olarak isimlendirilen sentetik sürfaktanlar geliştirilmiştir. Anyonik yapıda olanlar mikrobiyal hücre duvarının geçirgenliğini azaltarak hücre içine girerken katyonik yapıda olanlar hücre membranına tutunmakta ve hücre duvarındaki negatif yüklü iyonlarla etkileşime girerek etkilerini göstermektedirler. Bu dağıtıcıların endüstriyel konsantrasyonları yüzey gerilimini azaltarak bakteriyel tutunmayı engellemekte veya yüzeyden kopmayı teşvik etmektedir (MacDonald ve diğ., 2000).

Fiziksel ve kimyasal tekniklerin kombinasyonu ile kontrol

Bu kontrol tekniği, tekniklerin tek başına kullanılmasına oranla daha etkili sonuçlar vermektedir. Bu amaçla uygulanan kombinler ozon ve ultrasonik ses dalgaları kullanımı; biyosit ve açıcı uç kullanımlarından oluşmaktadır (Bott, 2009).

Soğutma kulesinde biyolojik gelişim indikatör kriteri olarak heterotrofik bakteri popülasyonu dikkate alınmaktadır. Soğutma Kulesi Enstitüsü (CTI), soğutma kulelerinde biyolojik gelişim kontrol kriteri olarak planktonik bakteriler için $10^4/\text{ml}$; tutunmuş halde bulunan bakteriler için ise $10^5/\text{cm}^2$ olarak belirlemiştir. Ancak bu kriter ısıtma, havalandırma ve klima sistemlerinde halk sağlığını garanti altına almak adına *Legionella* türlerinin kontrolü için geliştirilmiş olup çalışmalarda tutunmuş halde bulunan bakteriler için $10^4/\text{cm}^2$ değeri kriter olarak belirlenmiştir (Chien ve diğ., 2012).

2.3.4. Biyofilm Geliştirilmesinde Kullanılan Model Sistemler

Biyofilmlerin doğada, endüstriyel sistemlerde ve klinik yüzeyler gibi pek çok yerde meydana gelmesi, bu farklı ortamlarda ilgili biyofilmleri elde etmek için çok sayıda

laboratuvar ölçekli reaktör tasarımlarının gerekli olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır (Goeres, 2006). Döner disk reaktörü, halka şeklindeki reaktör, akış hücresi, modifiye Robbins cihazı, damla akışlı reaktör, gözenekli ortam sütunu, boru içinde biyofilm gelişimi, sabit derinlikli reaktörler, statik reaktörler olup ortam sürekli akış halinde bulunmaktadır. Bu durumun sağladığı avantaj kararlı durum biyofilmi elde edilmesini mümkün kılmasıdır. Diğerleri ise geleneksel araştırma metotlarının modifiye edilmesi ile geliştirilmiş olan sistemlerdir. Koloni biyofilmi, mikrotitre plakası, Calgary cihazı, bir biyofilm kolonisi üstüne yerleştirilen cam kupon üzerinde büyümüş biyofilm, kültürde asılı bir kupon üzerinde yetiştirilen biyofilm bu sistemlere örnek verilebilir (Goeres, 2006; Goeres ve diğ., 2005). Bu tür sistemlerde ortam sabit veya sürekli akış halindedir. Bu sistemler genel olarak, biyofilm oluşumunu değerlendirmek için kolonizasyondan sonra çıkarılarak analiz edilebilecek bir yüzey içermektedirler (Goeres ve diğ., 2005).

İdeal bir biyofilm model sisteminin sahip olması gereken pek çok özellik bulunmaktadır. İdeal bir model sistemde su fazı ve biyofilm örnekleri sistemden kolayca alınabilmelidir. Geliştirilen sistemde kullanılan malzemeler gerçek sistem ile aynı olmalıdır. Mikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde etkilediğinden dolayı sistemin sıcaklığı sabit tutulabilmelidir. Farklı biyofilm örnekleri meydana getirilebilmelidir. Sistemin hidrolik koşulları doğru bir şekilde belirlenmeli ve söz konusu bu koşullar kontrol edilebilir olmalıdır. Güvenilir bir süreç elde etmek adına farklı parametrelerin yerinde izlenebilmesi için sistem içine ekipmanlar yerleştirilebilmelidir. Örneğin iletkenlik, oksijen konsantrasyonu, bulanıklık gibi parametrelerin izlenebilmesi sağlanmalıdır (Boe-Hansen ve diğ., 2003).

Biyofilm için oluşturulan iyi bir izleme sistemi, biyofilm oluşumunu ve olgunlaşmasını kontrol etmek adına etkili stratejiler geliştirilmesi için bir önkoşuldur. Soğutma kulesi suyunu izlemek için kullanılan koloni oluşturan birim ve ATP (adenozin trifosfat) ölçümleri biyofilm oluşumu için uygun parametreler değildir, çünkü su fazındaki mikroorganizma konsantrasyonundaki artış her zaman biyofilm kütlesini etkilemeyebilir (Tanji ve diğ., 2007). Soğutma suyu sistemlerindeki etkileşimleri araştırmak için soğutma kulesi ve diğer sistem bileşenlerini içeren bir soğutma suyu model sistemi gerekmektedir. Soğutma kulesi model sistemi bu tür sistemler için bir temeldir (Kim ve Smith, 2001).

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda dental ünite su dağıtım sistemi, içme suyu dağıtım sistemi, sıhhi tesisat sistemi, su sirkülasyon sistemleri gibi farklı endüstriyel

alanlarda kullanılan ekipmanlarda da biyofilm gelişimini gözlemek amacıyla model sistemler geliştirildiği tespit edilmiştir. Dental ünite sistemleri için geliştirilen model sistem, besiyeri akışının olduğu ve bakterilerin eklendiği bir kemostat iken (Walker ve diğ., 2003), içme suyu dağıtım model sistemi, içinden içme suyunun akış halinde geçirildiği sistemlerden oluşmaktadır (Martiny ve diğ., 2003). Sıhhi tesisat model sisteminde ise suyun % 95'inin sistem içinde sirküle olduğu açık sistem kullanılmış olup test organizması olan *L. pneumophila* sisteme sonradan ilave edilmiştir (Liu ve diğ., 2006). Model sistemlerde mikrobiyal analizler, sistem içine biyofilm oluşturma amacıyla yerleştirilen çeşitli yüzeylerin sistemden çıkarılması veya yüzeyden eküvyonlar aracılığıyla sürüntü örneklerinin alınması ile gerçekleştirilmektedir (Walker ve diğ., 2003; Martiny ve diğ., 2003; Liu ve diğ., 2006; Kanematsu ve diğ., 2012; Tanji ve diğ., 2007).

Biyofilm oluşumu için geliştirilen model sistemler sadece endüstriyel alanlardaki biyofilm gelişiminin takibi için kullanılmamaktadır. Endüstriyel alanların dışında medikal cihazlarda meydana gelen biyofilmleri takip etmek için de model sistemler geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen model sistemlere örnek olarak iğnesiz merkezi venöz kateter konnektörlerinin iç lümeni üzerinde biyofilm oluşumunun takibini sağlayan sistem verilebilir. Geliştirilen bu açık tip model sistem, kan komponentlerinin sağladığı şartlandırılmış yüzeyin in vitro sistemlerde biyofilm gelişimini teşvik ettiği sonucuna ulaşılmasını sağlamıştır (Murga ve diğ., 2001).

Biyofilmler, sebep olduğu kronik hastalıklar, korozyon, kırık ve çatlak gibi mekanik ve fonksiyonel zararlarının dışında, biyofilm reaktörleri içinde gerçekleştirilen metallerin ayrıştırılarak yeniden kazanılması gibi faydalı süreçler de dahil olmak üzere pek çok alanda önemli yer tutmaktadırlar. Bu sebeple de laboratuvar ölçeğinde biyofilm davranışı, yapısı gibi özelliklerin araştırılması ve bunların yanı sıra faydalı olmak üzere çeşitli amaçlar için kullanımlarının sağlanması oldukça önemlidir. Bu sebeple de laboratuvar ölçeğine uygun deneysel sistemlerin geliştirilmesi çok yönlü işleve sahip olması açısından önemlidir (Kanematsu ve diğ., 2012).

2.4. STRES FAKTÖRLERİNİN BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ VE BAKTERİLER TARAFINDAN VERİLEN YANITLAR

2.4.1. Sıcaklık Stresi Etkisi ve Bakteriyel Yanıt

Sıcaklık mikroorganizmaların üremesi ve yaşamlarını devam ettirebilmesini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Mikroorganizmalar dünya üzerindeki hemen hemen her ekolojik nişte bulunmaktadır. Mikrobiyal habitatların sıcaklık derecesi -10°C 'den 80°C 'nin üstüne kadar çıkabilmektedir. Hatta söz konusu mikroorganizmalar arke olduklarında bu skala daha da genişleyebilmektedir. Genellikle mikrobiyal faaliyetlerde enzim aktivitesi önemli olduğundan dolayı canlılığın devamı için uygun ortam sıcaklığı $20-42^{\circ}\text{C}$ arasında değişmektedir (Patil ve diğ., 2010).

Her organizma için minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklıkları mevcut olup bu değerlerin hepsine birden kardinal sıcaklıklar adı verilmektedir. Optimum sıcaklık üremenin en üst seviyede gerçekleştiği sıcaklıktır ve genel olarak maksimum sıcaklığa yakın bir değere sahiptir. Maksimum gelişme sıcaklığı hücrede bulunması zorunlu olan bir ya da birkaç proteinin denaturasyon sıcaklığını ifade etmektedir. Gelişme için minimum sıcaklık ise sitoplazmik zarın sertleşmesine sebep olan sıcaklık değeridir. Sitoplazmik zarda meydana gelen sertleşme besin taşınması ve proton itici gücün oluşması gibi yaşamsal faaliyetleri engelleyeceğinden dolayı canlılığın devamı için oldukça önemlidir (Madigan ve Martinko, 2010). Sıcaklıkta meydana gelen düşüş ile hücreler membranındaki doymamış yağ asitlerinin miktarı ve membrandaki yağ asitlerinin uzunluklarını arttırılmakta ve böylece soğuk şoku etkisiyle azalma riski olan membran akışkanlığının devamlılığı sağlanmaktadır (Russell ve diğ., 1995).

Biyofilm oluşumu, hücrelere uygun olmayan ortamlarda yaşama, stres koşulları ile mücadele etme ve yeni nişler kolonize etmede korumalı bir yaşam tarzı sağlamaktadır. Soğuk ortamlar, bakteri yaşamının yanı sıra fiziksel ve biyokimyasal hücresel süreci olumsuz yönde etkilediğinden dolayı yeni ekolojik niş kolonizasyonunu sınırlayan stresli yaşam alanlarıdır. Soğuk koşullara maruz kalmak çözünürlük, reaksiyon kinetiği, membran akışkanlığı, hücresel bozulma, protein stabilitesi, konformasyon ve gen anlatımında değişikliklere sebep olmaktadır. Bu durumla başa çıkabilmek için, soğuk koşullar altında yaşayan bakteriler çeşitli fizyolojik uyarlamalara sahip olmalıdırlar.

Bakterilerin stresli ortam koşulları ile başa çıkmada biyofilm oluşturma yoluna gitmeleri bilinen en yaygın stratejilerin başında gelmektedir (Tribelli ve Lopez, 2011).

Evrensel stres proteinleri (USPs) bakterilerin stres yanıtlarına katılan ve bakteriyel proteinler içinde evrimsel süreçte korunmuş aile olarak tanımlanan proteinlerdir. Bu proteinler aynı zamanda *E. coli*'de RecA (Rekombinant protein)-bağlı DNA koruma ve onarım sistemlerinin üyesidirler. USP ailesi proteinlerinin biyofilm oluşumunda düzenleyici bir rol oynaması, biyofilm oluşumunun bakterilerin çevresel streslere karşı bir yanıtı olarak değerlendirilmesine sebep olmaktadır. Optimal koşullar dışındaki sıcaklıklarda evrensel stres proteinlerinin kodlanmasında görevli *uspA* geninin anlatımının biyofilm oluşumu ile paralel olarak arttığı ve bu yolla bakterinin yaşanan strese daha dirençli hale geldiği tespit edilmiştir (Chen ve diğ., 2006). Benzer durum yüksek sıcaklık ile muamele sonucunda da meydana gelmekte olup soğuk şokunda olduğu gibi yüksek sıcaklık uygulaması karşısında bakterilerin biyofilm oluşumunda artışa gittikleri tespit edilmiştir (Farhat ve diğ., 2010).

Bakteriler çok sayıda çevresel uyarıyı anlama yeteneğinde olup çevresel şartlarda meydana gelen değişimlere gen anlatımlarında düzenlemeler yaparak adapte olmaktadır. Bakterilerin gen ifadesini düzenlediği en önemli durumların başında sıcaklığa yanıt bulunmaktadır. Bu yolla örneğin mezofilik bakteriler 42°C'nin üzerinde sıcaklık şoku; 15°C'nin altında soğuk şoku yanıtı sergilemektedirler. Bu durum en yaygın olarak *E. coli* bakterisinde gözlenmiş olup soğuk şoku genlerindeki artışın ani sıcaklık düşüşüne yanıt olarak meydana geldiği ve bu yolla düşük sıcaklık koşullarında mikroorganizmaların hayatlarına devam edebildiği ortaya çıkmıştır (White-Ziegler ve diğ., 2008).

Biyofilm oluşumunun yanı sıra mikroorganizmalar düşük sıcaklık koşullarına adapte olabilmek için soğuk şoku proteinleri (CSP) ve soğuk ortama alışma proteinleri (CAP) sentezlemekte, membran lipid kompozisyonları ile ozmolit ve oligopeptit alımlarında değişiklik yapmaktadırlar. Soğuk şoku proteinleri ve soğuk ortama alışma proteinleri, mikroorganizmaların üremeleri için gerekli olan optimum sıcaklık değeri düştüğünde anlatımında artış gözlenen proteinler olarak tanımlanmaktadır. Soğuk şoku proteinleri genel olarak düşük sıcaklığa uzun süreli maruz kalma durumunda yüksek seviyelerde anlatımının yapılmaya devam edildiği proteinlerdir (Chan ve diğ., 2007).

E. coli, *Bacillus subtilis* ve *Listeria monocytogenes* gibi pek çok bakteride soğuk şoku proteinleri tespit edilmiştir. Soğuk şoku proteinleri küçük, yüksek oranda korunmuş ve yapısal olarak çeşitli mikrobiyal fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rolleri olan nükleik asit bağlayıcı proteinlerdir. CSP'ler, DNA ve RNA'ya bağlanmakta ve bakteri hücreleri içinde replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi işlemlerin kontrolünü kolaylaştırmaktadır (Schmid ve diğ., 2009).

Sıcaklık artışı da bakteriler tarafından karşılaşılan en önemli çevresel streslerden birini oluşturmaktadır. Tüm organizmalar ani bir sıcaklık artışına belirli bir grup polipeptitlerin sentezini indükleyerek yanıt vermektedirler. Bu proteinler sıcaklık şoku proteinleri olarak adlandırılmakta olup verilen yanıt sıcaklık şoku yanıtı denir. Bu yanıt bütün canlı hücrelerde bulunan evrensel, yüksek oranda korunmuş ve düzenleyici bir ağıdır (Gophna ve Zon, 2003). Sıcaklık şoku proteinleri GroEL, DnaK, DnaJ, GroES, ClpB, ClpA, ClpX, küçük sıcaklık şok proteinleri (HSPs) ve proteazlardan oluşmaktadır. Protein denaturasyonu ve katlanması, yüksek sıcaklıklardan kaynaklanan hücre hasarının temel türleridir. Şaperonlar denature olmuş proteinlerin doğru katlanmalarını sağlarken proteazlar geri dönüşümü olmayacak şekilde hasar görmüş proteinlerin yıkımını gerçekleştirmektedirler. Bu şaperonların aktivitesi sıcaklık şoku sırasında hücrenin hayatta kalması ve sonrasında geri kazanılması için gereklidir. Sıcaklık şoku proteinleri yüksek sıcaklık karşısında organizmaların canlılığını korumanın yanı sıra patojenitesine de katkıda bulunmaktadır (Grover ve diğ., 2011).

Örneğin sıcaklık şoku proteinlerinden olan GroEL şaperonunun sentezinin *L. pneumophila*'da insan monositlerinin içinde üreme esnasında arttığı ve enfeksiyondan sonraki 17. saatte en baskın protein olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık şoku genlerinin indüksiyonu sadece konağa giriş aşamasında ve ön kolonizasyonda sınırlı değildir. Makrofaj enfeksiyonu sonrasında artan sıcaklık şoku proteinlerinin bakteri hücrelerini oksidatif stres ve düşük pH'tan da koruduğu düşünülmektedir (Gophna ve Zon, 2003).

2.4.2. pH Stresi Etkisi ve Bakteriyel Yanıt

Her organizmanın gelişmesi için uygun olan ve genel olarak net bir şekilde tanımlanmış bir pH değeri vardır. Çoğu organizmanın kendi içinde gelişebildiği pH aralığı 2-3 pH birimlik değişimi kapsamaktadır. pH'daki 1 birimlik değişiklik hidrojen iyon

konsantrasyonundaki 10 kat değişiklik sonucunda meydana gelmektedir. Optimum gelişim için gerekli pH, hücre dışındaki ortamın pH değerini ifade etmektedir. Hücre içindeki pH ise hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin hasar görmesini engellemek adına nötrale yakın ve değişmeden kalmak durumundadır (Madigan ve Martinko, 2010).

Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar ortam pH'ındaki değişimlere sahip oldukları çeşitli mekanizmalarla birlikte direnç gösterebilmektedirler. Bu konuda ağız içinde biyofilm meydana getiren en önemli mikroorganizmaların başında gelen *Streptococcus mutans* ile ilgili pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Ağız içi ortamda meydana gelen biyofilmlerin karşılaştıkları en önemli stres faktörlerinin başında düşük pH gelmektedir. Asidik koşullar altında *S. mutans* hayatta kalmak için çeşitli şekillerde kendi fizyolojisini değiştirmektedir. Strese yanıt veren proteinlerin sentezi, glikolitik aktivite artışı, hücre içi pH'ı düzenleyen protein translokasyon ATPaz artışı kapsayan bu değişikliklere asit tolerans yanıtı adı verilmektedir (Welin-Neilands ve Svensater, 2007).

S. mutans, hücre membranına bağlı olarak bulunan F-ATPaz aktivitesi ile düşük pH koşullarıyla mücadele edebilmektedir. Aniden düşen pH ile birlikte ATP seviyesinde önce hızlı bir artış ardından da hızlı bir düşüş meydana gelmektedir. Bu sayede asidin öldürücü etkisinden korunmaktadırlar. Ayrıca ATPaz inhibitörlerinin kullanılması ile birlikte artan ATP, ATP sentazı aktive etmekte ve böylece iki yönlü rolü bulunmakta ve hücreden protonları dışarı çıkararak asidik koşullarla mücadele edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca düşük pH varlığında moleküler şaperonların, proteazların ve DNA onarımından sorumlu enzimlerin anlatımlarının da 5-7 arasındaki pH'a oranla daha yüksek oranda yapıldığı tespit edilmiştir (Lemos ve Burna, 2008).

İkincil taşıyıcılar olarak adlandırılan zıt yönlü taşıma yapan taşıyıcı kanallar da hücre içi pH homeostazı için büyük önem taşımaktadırlar. Bu taşıyıcılar solunumla sitoplazmik zardan üretilen proton itici güçten faydalanmakta ve çoğu zaman, eş zamanlı olarak proton alımı ile hücre dışına toksik sodyum (Na^+) iyonlarını pompalamaktadırlar. Örneğin *B. subtilis*'te Na^+ potasyum/hidrojen (K^+/H^+) taşıyıcılarını kodlayan genlerin varlığı tespit edilmiştir. Bu yol ile bakterinin ortam pH'ındaki artışa söz konusu genlerin anlatımlarındaki artış ile beraber direnç geliştirebildiğı ortaya çıkmıştır (Wiegert ve diğ., 2001).

Biyofilmle mücadelede hedef alınan noktalardan biri de çeşitli uygulamalar sonucunda biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar arasındaki iletişim sistemini bloke etmeye yöneliktir. Bu sayede iletişimin olmaması mikroorganizmaları zayıflatacağından dolayı biyofilmin giderilmesinde önemli olacağı düşünülmektedir. Ancak yapılan farklı pH değeri uygulamaları sonucunda bile çoğunluğu algılama sinyal moleküllerinin etkilenmediği ve bu ortamda mikroorganizmaların iletişimlerini devam ettirebilmeleri sebebiyle dirençli hale gelmelerinin engellenemediği ortaya çıkmıştır (Naam ve diğ., 2008).

Hücre dışı polisakkaritler biyofilm yapısının önemli bir kısmını oluşturmakla birlikte biyofilm ve EPS üretimi, çoğunluğu algılama iletişimi sonucu oluşturulan proteinler tarafından düzenlenmektedir. EPS'deki polisakkarit ve protein konsantrasyonu pH 5'ten 3'e düştüğünde hızlı bir şekilde azalmaktadır. Düşük pH yani yüksek H⁺, hücre zarında düşük pH dengeleyicilerinin zarar görmesine sebep olmakta bu durum uçucu yağ asit anyonlarının hücre içinde birikmesine yol açmaktadır. Ayrıca düşük pH bakteri DNA'sına da zarar vermektedir. Düşük pH'tan dolayı bakterilerin inaktive olması polisakkarit ve protein konsantrasyonunu azaltmaktadır. Ancak yüksek pH'da polisakkarit ve protein konsantrasyon değişimleri düşük pH'a oranla daha ılımlıdır. Bu durumun sonucunda yüksek pH'ın çoğunluğu algılama sisteminin teşviki için kritik konsantrasyon gradientini arttırmasına bağlı olarak sağlanan iletişimin canlılığının devamında önemli olduğu düşünülmektedir (Zhou ve diğ., 2014).

2.4.3. Dezenfeksiyon Stresi Etkisi ve Bakteriyel Yanıt

Dezenfeksiyon amacıyla kullanılan biyositler okside edici ve okside edici olmayan olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Okside edici olanlar hücre içinde makromoleküllerin halojenlenmesiyle aktivite göstermekte olup klor dioksit, hidrojen peroksit gibi serbest radikaller üretmektedirler. Çevre ve insanlar üzerinde daha az toksik olması, güvenli ve kullanımlarının kolay olması nedeniyle özellikle soğutma kulesinde kullanılan biyositler bu gruba girmektedirler. Klor, brom, klor temelli bileşikler, ozon bu gruba örnek olarak verilebilir. Okside edici olmayan biyositler ise alg, sülfat indirgeyen bakteri ve mantarlar karşısında daha etkili olmakla birlikte yarı ömürlerinin uzun olması ve yüksek etkinlikleri nedeniyle tercih edilmektedirler. Ancak balık ve diğer organizmalar üzerinde toksik

etkilerinin bulunması dikkatli kullanılmalarını gerektirmektedir. Kuaterner amonyum bileşikleri, glutraldehit gibi biyositler bu gruba örnek verilebilir (Ludensky, 2003).

Etkili biyosit seçiminde dikkat edilmesi gereken pek çok ölçüt bulunmaktadır. Geniş bir yelpazedeki mikroorganizmalara karşı etkinliği kanıtlanmış olmalı, biyofilm içine iyi nüfuz edebilmeli, fiziksel ve kimyasal ürünlerle uyumlu olmalıdır (korozyon inhibitörleri, pH gibi). Güvenli olmalı, kullanımı kolay olmalı ve uzun süreli saklamaya uygun olmalıdır. Biyolojik bozunma açısından uygun olmalıdır. Potansiyel olarak zararlı dezenfeksiyon yan ürünleri oluşturmamalı ve uygun maliyetli olmalıdır (Bachmann ve Edyvean, 2006).

Yapılan çalışmalar biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik formlara oranla dezenfektanlar karşısında 1000 kat daha dirençli olduklarını göstermektedir. Ticari dezenfektanların planktonik hücreler üzerine etkinliği tespit edilmiş olmasına rağmen bu dezenfektanlar ile biofilm hücrelerini yok etmek mümkün değildir. Biyofilmle mücadelede doğru kontrol stratejisinin belirlenebilmesi için biyofilmin dezenfektanlar karşısında sergilediği direnç mekanizmalarının bilinmesi oldukça önemlidir (Abdallah ve diğ., 2014). Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmaların dezenfektanlara gösterdiği direncin başında biyofilm içine dezenfektan girişinin sınırlı olması gelmektedir. EPS üretiminin artırılması, elektrostatik etkileşimler (+ yüklü biyositler periferde birikirken yüksüz olanlar biyofilme daha kolay girebilmektedir), hidrofobik etkileşimler ve biyositlerin degradasyonu aracılığıyla biyositin biyofilm içine girişini kısıtlamaktadır. Örneğin katalaz ve peroksidaz gibi enzimlerin hidrojen peroksit gibi oksitleyici ajanlara karşı korumayı arttırdığı tespit edilmiştir (Abdallah ve diğ., 2014; Bridier ve diğ., 2011).

Diğer bir direnç mekanizması ise biyofilm hücrelerinin biyofilm fenotipi geliştirerek ortama adapte olmasıdır. Biyofilm yapısında bulunan hücreler gen anlatımında değişiklikler yaparak planktonik formlarından farklı bir fenopit kazanmaktadırlar. Bu yapı 'biyofilm fenotipi' olarak adlandırılmaktadır. Gen anlatımındaki değişiklikler üretilen proteinleri de değiştirmekte ve bu sayede stresle mücadelede kullanılan çeşitli proteinler, metabolik enzimler ve düzenleyici proteinler üretilmektedir (Abdallah ve diğ., 2014; Bridier ve diğ., 2011). Gen anlatımının teşvik edilmesi ile kazanılan dirençlerin bir tanesi de efflux pompalarının üretilmesidir. Bu akış pompaları toksik bileşenlerin dışarı atılmasını sağlayarak bakterinin bu bileşenlerin bulunduğu ortamda hayatta kalmasını

sağlamaktadır (Bridier ve diğ., 2011; Acker ve diğ., 2014). Ayrıca biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar yatay gen transferi yaparak aktardıkları plazmit, transpozon ve intergonlar ile metabolik kapasitelerini, virulans faktörlerini ve antimikrobiyal dirençlerini arttıran fenotipler geliştirerek mikrobiyal adaptasyonlarını sağlayabilmektedirler (Bridier ve diğ., 2011).

Diğer bir direnç ise biyofilm yapısındaki hücrelerin üreme hızlarını düşürerek veya tamamen durdurarak biyosit alımını kısıtlamalarıdır. Yapılan çalışmalar üreme oranının artmasının duyarlılığı da arttırdığını, yavaş üreme gösteren hücrelerin antimikrobiyaller karşısında daha dirençli hale geldiğini göstermektedir (Abdallah ve diğ., 2014; Szomolay ve diğ., 2005; Donlan, 2000). Aynı zamanda yapılan çalışmalar çok türden oluşan biyofilmlerin tek türlerden oluşan biyofilmlere oranla dezenfektanlara daha dirençli olduklarını ortaya çıkarmıştır (Otter ve diğ., 2015). Bu durumun nedeni olarak biyofilm yapısına katılan türlerin varyasyonu, her türün rolü, bir veya iki anahtar türün direnci gösterilmektedir (Shakeri ve diğ., 2007). Ayrıca antimikrobiyal uygulamalar karşısında ileri derecede tolerans geliştiren mikroorganizmaların varlığı da biyofilmlerin biyosit direncini arttırmada önemlidir (Abdallah ve diğ., 2014).

Biyofilmle mücadelede yaygın olarak kullanılan dezenfektanların başında klor gelmektedir. 19. yüzyıldan beri dezenfektan olarak kullanılan klor özellikle içme suyu kalitesini sağlamak için yaygın olarak tercih edilmektedir. Klorun bu kadar çok tercih edilmesinin nedeni rezidual (kalıntı) klor olarak suda kalabilmesi ve bu yolla hem uygulama noktası hem de dağıtım noktalarında su kalitesinin mikrobiyolojik anlamda kontrol edilmesine imkan tanımasıdır. Klor bileşenleri, çok hedefli reaktifler olarak değerlendirilmektedirler. Bu bileşenler protein ve bazlar üzerinde oksidatif hasara sebep olmakta ve böylece membran, taşıma sistemi, solunum ve DNA sentezi üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Klor, hidrojen ile yer değiştirerek bakteriler için önemli olan enzimlerin geri dönüşümsüz olarak inaktive olmasına sebep olmaktadır. Sulu çözeltiler içinde klorun en aktif bileşeni hipokloröz asit (HOCl) 'dir. Hipokloröz asit proteinlerde yan zincirlerin değiştirilmesi, proteinin parçalanması, dimerizasyon gibi işlemlerle oksidatif hasara sebep olmaktadır (Bodet ve diğ., 2012).

Bakterilerin inaktif hale gelmesi ve baskılanması için kalıntı dezenfektan olarak en az 3 ppm klor gerekli olmaktadır ki bu oran evlerde kullanılan suya ulaşan değerden çok daha

fazladır. Kalıntı dezenfektanı sabit bir oranda tutmak, eve gelen suyun kalitesindeki ve akış oranındaki değişiklikler, biyofilmden ve sistem materyalinden meydana gelen kopmalar nedeniyle oldukça zordur (Carducci ve diğ., 2010).

Biyofilmle mücadelede yaygın olarak kullanılan dezenfektanların başında klor gelmesine rağmen klor ile ilgili yapılan çalışmalar klorun biyofilm meydana geldiğinde mikroorganizmaları öldürmede yetersiz bir dezenfektan olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni ise hücre dışı polimerik maddelerin klorla reaksiyona girmesi ve klor konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak aktivitesinin azalmasıdır. Çünkü klor seçici olmayan bir reaktant olup organik ve inorganik bileşenlerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek inaktive olmaktadır (Connell, 1996). Aynı zamanda EPS tabakasının serbest klor karşısında mikroorganizmalara sağladığı fiziksel direncin dışında pek çok bakteri türü EPS sentezini arttırarak da oksidatif stresle mücadele etmektedir (Helbling ve Vanbriesen, 2007).

Günümüzde serbest klor yerine pek çok alternatif dezenfektan kullanılmaktadır. Kloraminler bu alternatiflere bir örnektir. Bir kloramin türü olan monokloramin, 1916 yılından bu yana içme sularının dezenfeksiyonunda kullanılan, amonyak ve serbest klorun sudaki reaksiyonu sonucu meydana gelen bir dezenfektan türüdür. Monokloramin, yüksek sıcaklık ve pH'da dahi kararlı bir yapı sergilemesinden dolayı su sistemlerinde uzun süreli olarak kalabilmektedir. Bu durum monokloraminin rezidual dezenfektan olarak kullanılmasına neden olmakta ve dağıtım sisteminin uygulama noktasının uzak mesafelerine kadar ve uzun süreli olarak dezenfekte edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca monokloraminin, serbest klordan daha kolay bir şekilde biyofilm içine girebilmekte, biyofilm eliminasyonunda klora oranla daha olumlu sonuçlar vermektedir (Kool ve diğ., 1999). Ayrıca monokloramin uygulaması sonucunda klora oranla dezenfektan yan ürün oluşumu daha düşük oranda gerçekleşmektedir. Monokloramin, mikroorganizmaların hücre duvarından bozulmadan geçerek aminoasitlerle reaksiyona girmekte ve hücre metabolizmasını bozarak bakterileri inaktif hale getirmektedir. Böylece su dağıtım sistemlerinde monokloraminin daha kararlı olduğu ve bakteriyel üremeyi klordan daha iyi kontrol ettiği tespit edilmiştir (Connell, 1996).

Klorlama genellikle musluk veya yüzey suyu kullanarak soğutma sistemlerinde biyolojik büyümeyi kontrol etmek için kullanılmaktadır. Bu amaçla sodyum hipoklorit serbest klor

elde etmek için yeterli bir miktarda dozajlanmaktadır. Bununla birlikte hipoklorit ve organik maddeler arasında meydana gelen reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerin ekosistem ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Yapılan çalışmada atık arıtımında kullanılan soğutma kulesindeki make up suyunda monokloraminle muamelenin klordan daha etkili bir dezenfeksiyon sağladığı tespit edilmiştir. Bu amaçla kalıntı dezenfektan olarak monokloramin dozunun make up suyunda 3 mg/l (3 ppm) olması gerektiği ortaya çıkmıştır (Chien ve diğ., 2012).

Biyofilm içinde *Legionella* gelişimini kontrol etmede kullanılan temel yöntemlerin başında dezenfeksiyon yöntemi tavsiye edilmektedir. Bu konuda antimikrobiyal maddelerin aktivitesine müdahale eden iki ana faktör bulunmaktadır. Bunlardan ilki EPS içine girişte başarısız olmaları veya *Legionella*'ya bağlanmadan inaktive olmaları iken diğeri ise *Legionella*'nın geleneksel kimyasallara karşı dirençli hale gelmesidir. Klorlama, su sistemlerinde *Legionella* kontrolü için en sık kullanılan dezenfektan olmakla birlikte sürekli olmayan klor kullanımı ile meydana gelen ihmaller biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmaların klora dirençli hale gelmesine sebep olmaktadır. Nispeten düşük okside edici aktivitesine rağmen monokloramin, klor gibi oksidatif dezenfektanlardan daha etkilidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar biyofilme giriş açısından monokloraminin klordan 170 kat daha hızlı olduğunu göstermiştir. Diğer oksidatif dezenfektanlara kıyasla monokloraminin nötral pH'da daha uzun bir rezidual etkisi olduğu tespit edilmiştir. Monokloramin organik materyallerle oldukça düşük oranlarda reaksiyona girmektedir. Organik bileşenlerle reaksiyonlar sonucu oluşan dezenfeksiyon yan ürün oranı monokloraminde oldukça düşüktür (Coniglio ve diğ., 2015).

Biyofilm ve dezenfeksiyon üzerine yapılan çalışmalar biyofilm yapısında bulunan EPS varlığının bakterisidal faaliyetlere karşı bakteriyel canlılığı arttırdığını ortaya koymuştur (Liu ve diğ., 2007; Mitchell ve diğ., 2008). Pek çok bakteri türünün oksidatif stresle mücadele edebilmek için EPS miktarını artırma yoluna gittikleri ayrıca klorun da hücre zarının geçirgenliğini bozarak hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Ancak söz konusu biyofilm yapısı olduğunda bu maddeler hücreye ulaşmadan inaktive olmaktadır. *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine yapılmış bir çalışma sonucunda EPS üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların, dezenfeksiyon uygulaması sonucunda

canlı kalan mikroorganizma sayılarının, EPS üretmeyenlere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca biyofilm yapısında bulunan *P. aeruginosa* gibi bakterilerin ürettikleri alginat temelli EPS'lerin, monokloramin ile hücre duvarının etkileşimini engellediği ortaya çıkmıştır. Ek olarak EPS içinde monokloraminin ilerlemesi de daha yavaş olmaktadır. Buradan hareketle EPS ya dezenfektana zarar vererek ya da onun canlı hücreye ulaşmasını engelleyerek dezenfeksiyonda etkili rol oynamaktadır (Xue ve diğ., 2013).

İkincil dezenfektan olarak monokloramin uygulaması dezenfeksiyon yan ürünlerinin oluşumunu azaltması ve su dağıtım sistemlerinin dezenfeksiyonu açısından Amerika Birleşik Devletleri tarafından önerilmektedir. Ancak çalışmalar diğer dezenfektanlara oranla monokloraminin biyofilm içine daha yüksek oranda girmesine rağmen biyofilm gelişimini azaltmakta tam olarak etkili olamadığını göstermektedir. Ayrıca monokloramin uygulaması ile dezenfektanın yapısında bulunan amonyağın sisteme girişi ile *Nitrospira* ve *Nitrosomonas* türleri gibi amonyak okside eden bakterilerin gelişimini teşvik edebilmektedir. Bu bakteriyel nitrifikasyon da monokloraminin bozunma hızını artırarak hem uzun ömürlü oluşunu hem de etkinliğini azaltmaktadır (Baron ve diğ., 2014).

L. pneumophila ve monokloramin ile yapılan farklı çalışmalar monokloramin uygulamasının sistemde bulunan *L. pneumophila*'nın % 99'unun elimine edilmesinde başarılı olduğunu fakat uygulamanın bitimini takiben kalan düşük orandaki canlı bakterinin çok hızlı bir üreme göstererek sayısını kısa sürede arttırdığını ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte monokloramin uygulamasının bakterileri VBNC fazına girmeleri yönünde teşvik ettiği yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Söz konusu sayının yeniden arttırılması *L. pneumophila*'nın VBNC fazına girmiş olması, biyofilm ve amip varlığının sağladığı koruma ile açıklanmaktadır (Jakubek ve diğ., 2013; Chiao ve diğ., 2014; Donlan ve diğ., 2005; Cunliffe, 1990).

2.4.4. Ozmotik Konsantrasyon Stresi Etkisi ve Bakteriyel Yanıt

Su varlığı bilimsel alanlarda 'su aktivitesi' terimi ile ifade edilmektedir. 0-1 arasında değişen ve a_w ile gösterilen su aktivitesi havadaki buhar basıncının saf suyun buhar basıncına oranıdır. Su, çözünen konsantrasyonun yüksek olduğu (su aktivitesinin düşük olduğu) bölgeden düşük olduğu bölgeye doğru hareket etme eğilimindedir. Çevresel

ortamın çözünen konsantrasyonunun artması sitoplazmadan dış ortama su çıkışına sebep olmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010).

Ortamın ozmotik konsantrasyonunda meydana gelen yükselme belirli enzimleri ve taşıyıcıları aktive ederek veya devre dışı bırakarak ayrıca su dengesini korumak için gen anlatımını değiştirerek hücreyi, kendi fizyolojisini değiştirmek için zorlamaktadır. Ancak, pek çok bakteri hücre turgorunu korumak için aktif su taşıma mekanizmalarına sahip değildir ancak bunun yerine hiperozmotik stres koşullarında hayatta kalmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (Abranches ve diğ., 2006). Hücreler düşük su aktivitesine sahip bir ortamla karşı karşıya kaldıklarında bu durumla baş edebilmek için hücre içinde ‘uyumlu çözünen’ olarak adlandırılan bileşiklerin konsantrasyonunu arttırmaktadırlar (Madigan ve Martinko, 2010).

Bakterilerin hipertonic strese yanıtları genel olarak su alımında görevli aquaporinler ve durağan faz sigma faktörü (RpoS) tarafından düzenlenen fonksiyonlar gibi bir dizi mekanizmayı kapsamaktadır. Bu konuda en sık karşılaşılan yanıt ise nötral yapıda, polar ve küçük moleküller ile hiperozmotik stresle başa çıkabilmeleridir. Söz konusu bu moleküller, mikroorganizmaları çevreleyen ortamdan alınarak biriktirilen veya hücre içinde sentezlenen uyumlu çözünenler olup, biyofilm yapısındaki mikroorganizmalar tarafından en yaygın olarak kullanılanları glisin betain, prolin, trihaloz ve ektoindir (Mukhopadhyay ve diğ., 2006).

Hiperozmotik stres ile mücadelede hücrenin içinde bulunduğu üreme dönemi de oldukça önemlidir. Hiperozmotik koşullar karşısında aktif üreme fazında olan mikroorganizmaların daha hassas oldukları buna karşın durağan fazda ise duyarlılığın önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu sebeple hücrelerin hiperozmotik stresle karşılaşmaları durumunda metabolik aktivitelerini azaltarak özellikle de taşıma metabolizmalarını azaltarak strese yanıt verdikleri tespit edilmiştir (Troussellier ve diğ., 1998).

Mikroorganizmaların tuz stresi karşısındaki durumlarını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalar *L. pneumophila*’nın tuz uygulaması karşısında hayatta kalabildiği (Heller ve diğ., 1998); *S. aureus* biyofilminin tuz uygulaması ile arttığı (Lim ve diğ., 2004) ve *L. monocytogenes*’in ise tuz uygulaması karşısında biyofilm oluşumunu arttırmasının yanı

sıra biyofilm yapısında olan mikroorganizmaların planktonik formlara oranla tuz stresi karşısında daha dirençli olduklarını ortaya çıkarmıştır (Pan ve diğ., 2010).

Biyofilm yapısında bulunan EPS tabakasının, hücreleri tuz stresi karşısında koruduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. Biyofilmlerin yararlı anlamda kullanıldığı atık arıtım süreçlerinde, karşılaştıkları tuz stresine karşı yapısında bulunan bakterileri koruması arıtım süreci için önemlidir. Süreç nitrifikasyon-denitrifikasyon ile azotun biyolojik olarak giderimini kapsamakta olup zaman ile ortamdaki tuz miktarında artışa sebep olmaktadır. Atık arıtım tesislerinde kullanılan aktif çamur yapısında bulunan EPS içeriğindeki polisakkaritlerin, artan tuz stresi karşısında miktarının arttığı tespit edilmiştir. Bu durum atık arıtım sürecinde kullanılan ve tuz stresinden normal koşullarda etkilenen nitrat okside eden bakterileri koruyarak atık arıtımının başarılı bir şekilde devam ettirilmesine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Zhang ve diğ., 2011).

Biyofilm yapısındaki bakterilerin tuz stresi karşısında gösterdikleri direnç, klinik alanda meydana gelen biyofilmler açısından da oldukça önemlidir. Bu bakterilerden biri de bağırsak enfeksiyonlarından sorumlu olan, bağırsak epitel hücrelerine tutunarak burada biyofilm meydana getiren bir aneorop olan *Bacteroides fragilis*'tir. Yapılan çalışmalar normal koşullarda deterjan benzeri etkisi ile bakteri yüzey membranının geçirgenliğini arttırarak ölümüne sebep olan safra tuzlarının, bakterinin konak bağırsak hücrelerine tutunarak biyofilm oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir. Aynı zamanda safra tuzları sadece bağırsak epiteline değil polivinil klorür (PVC) yüzeye tutunarak biyofilm artışına sebep olduğu da yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmada safra tuzlarının bakteride fimbria oluşumu arttırdığı ve istenmeyen bileşenlerin hücre dışına atılmasından sorumlu efflux pompalar'ının üretiminden sorumlu genlerin anlatımında da artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Pumbwe ve diğ., 2007). Benzer çalışmalar *E.coli* üzerinde de gerçekleştirilmiş olup, safra tuzlarının fimbria üretimindeki artış ile yüzeye tutunmayı arttırdığı tespit edilmiştir (De Jesus ve diğ., 2005).

2.4.5. Kuruluk Stresi Etkisi ve Bakteriyel Yanıt

Kuruluk toleransı pek çok prokaryot için hayatta kalma stratejisidir (Hingston ve diğ., 2013). Biyofilm yapısında bulunan EPS tabakası sahip olduğu fazla su potansiyeli dolayısıyla kuruluk kinetiğinde değişikliklere sebep olmaktadır. Çalışmalar biyofilm

yapısında bulunmanın kuruluk toleransını attırdığını ve bu durumun biyofilm yapısında bulunan hücrelerin metabolizmasında meydana gelen dönüşümler, hücreleri çevreleyen EPS kompozisyonu ve matriksin koruyucu etkisine bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Bulgular EPS yapısında bulunan hücre dışı DNA'ların ve N-asetilglukoazminin yüksek hidrofilik özellik sağladığı ve kuruluğa karşı korumada önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır (Hansen ve Vogel, 2011).

Kuru gıdalarda meydana gelen mikrobiyal gelişim, mikroorganizmaların kuruluk karşısında sergilediği dirençten kaynaklanmakta olup halk sağlığı açısından oldukça önemli bir konudur. Bebek maması gibi kuru bir ortamda bakterinin hayatta kalması ozmotik ve/veya kuruluk stresine karşı geliştirilen direnç mekanizması sayesinde olmaktadır. Genel olarak bakteriler ozmotik stres koşullarında hücre içinde K^+ iyonu biriktirmelerini takiben prolin, glisin betain ve trihaloz birikimi ile kendilerini koruma altına almaktadırlar. Ozmotik basıncın aşırı bir formu olarak görülen kuruluk durumunda hücreler biyolojik bütünlüklerini koruma ihtiyacı duymaktadırlar. Su değişim teorisine göre trihaloz gibi polihidroksil bileşikler makromoleküllerin etrafındaki su kabuğu yerine geçmekte ve bu yolla hücrelerin zarar görmesini engellemektedir (Breeuwer ve diğ., 2003).

Kuruluğa direnç konusunda su değişim teorisinin dışında diğer fizyolojik mekanizmalar da etkili olmaktadır. Kuruluk durumunda serbest radikaller, zar fosfolipitlerindeki yağ asitlerinin ester bağlarında kopmalara sebep olmaktadır. Serbest yağ asitleri genellikle, yaşlanma sırasında kurumaya duyarlı hücreler içerisinde toplanmakta ve membran bütünlüğünde azalmaya sebep olmaktadır. Kuruma öncesinde solunum hızı kuru fazdaki serbest radikal sayısı ile ilişkilidir. Solunum hızındaki azalmanın kuruluk esnasında zar bütünlüğünün korunması ve kuruluk toleransının muhafaza edilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar durağan fazda bulunan hücrelerin yapısal, fizyolojik ve fonksiyonel olarak logaritmik fazda olanlardan farklı olduğunu göstermektedir. Durağan fazdaki *E. coli* hücrelerinde hava ile kurutma sonucunda dirençte belirgin bir artış gözlenmektedir. Durağan faz hücrelerinin tüm translasyon aktivitelerinde azalma, membran fosfolipitlerindeki yağ asitlerinde meydana gelen değişimler gibi bazı özellikleri direnç gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Potfıs, 1994).

Bakteri hücreleri sukroz, trihaloz gibi eriyikleri hücre içinde biriktirme eğilimindedirler. Bu durumda söz konusu bileşenler bir gözlük gibi davranırlar. Gözlüğün önemi prensip olarak bakteriyel hücreleri camın erime noktasının altındaki sıcaklıklarda dehidrasyondan korumasıdır. Bazı bakteri hücreleri karmaşık yapıdaki EPS'leri göze çarpan miktarda biriktirebilmektedirler. Sol ve jel özellikler açısından oldukça çeşitli olan bu tabaka diğer doğal ve sentetik cam oluşturu polimerler için tarif edilen gözlük özelliklerine sahiptir. Kuruluk anında bakteri kolonileri daha kırılğan hale gelmektedir. Camsı fazda reaksiyonlar çok daha yavaş halde meydana gelmekte ve bu durum bakteri hücrelerinin kurutulmuş bir ortamda canlı kalmalarını sağlamaktadır. Suda bulunan mikroorganizmalar kuruluk anında cam fazına geçerek hareketsiz kalmaktadırlar. Bunun sonucunda gözlenen cam görünümlü sitoplazma sayesinde uzun süreli olarak durağan fazda kalabilmektedirler (Potfis, 1994).

Kuruluk karşısında bakterilerin gösterdiği doğrudan direnç dışında bu dirence sahip mikroorganizmaların diğer stres faktörleri karşısında da dirençli oldukları gösterilmiştir. *Salmonella enterica* dünya çapında yüksek morbidite ve ekonomik kayıplara neden olan gıda kaynaklı yaygın bir patojendir. Gıda ve yüzeyler üzerinde mevcut suyun azaltılması, bakteri büyümesini kontrol etmek için uzun zamandır üzerinde düşünülen bir metottur. Yapılan laboratuvar modelleri kuruluk veya çözünen eklenmesi sonucunda azalan su aktivitesinin sıcaklığa karşı direnci arttırdığını ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışma sonucunda kuruluğa maruz bırakılmış *S. enterica* hücrelerinin kuruluğa maruz bırakılmamış olanlara oranla ölümcül koşullar karşısında daha dirençli oldukları bulunmuştur. Ek olarak düşen su aktivitesi ve kuru çevrenin *S. enterica*'nın sodyum hipoklorit ve etanol direncini de arttırdığını ortaya koymuştur. Yapılan çalışma sonucunda tek bir strese maruz kalmanın diğer streslere karşı çapraz toleransı arttırdığı tespit edilmiştir (Gruzdev ve diğ., 2011).

Akarsularda biyofilmler çeşitli yapı ve kompozisyonlarda olmak üzere kaya, çakıl, kum, su bitkileri ve batık ahşapların yüzeyinde meydana gelmektedirler. Yaz dönemlerinde Akdenizde meydana gelen kuraklık birkaç hafta ya da birkaç ay arasında değişirken biyofilm yapısını ve işleyişini de etkilemektedir. Yapılan çalışmada biyofilmin özellikle orta ve dip kısmında bulunan heterotrofların su akışının kesilmesi ile oluşan kuraklık koşullarına dayanıklı olduğu ortaya çıkmıştır. Kuraklık koşullarının meydana geldiği 112

gün boyunca canlı bakteri sayısında yalnızca %20 oranında azalma tespit edilmiştir. Özellikle kumlu substratların sahip oldukları yüksek nem içeriğinin, biyofilmde canlılığın devamında katkısı olduğu düşünülmektedir. Biyofilmde gözlenen canlı bakteri sayısındaki düşüşün ortam koşulları normale döndüğünde kısa süre içinde eski sayıya ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bu eski sayıya ulaşmanın su stresine direnç veya biyofilm yapısında bulunan mikrobiyal topluluk kompozisyonunun değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum dirençli suşların seçilerek hayatta kalması ve kuraklık koşulları ortadan kalktığında eski sayıya ulaşmada önemli rol oynamasından kaynaklanmaktadır (Timoner ve diğ., 2012).

2.4.6. Açlık Stresi Etkisi ve Bakteriyel Yanıt

Besinsizlik stresi altında bakteriler, verimli adaptif düzenleyici mekanizmalar geliştirerek metabolik aktivitelerini biyosentezden uzaklaştırıp mevcut biyolojik fonksiyonlar için üreme ve enerji eldesi için kullanmaktadırlar. Besinler biyofilmde bakteri gelişimi ve sağ kalımı üzerine büyük bir etkiye sahiptirler. Besinsizliğin biyofilm bakterileri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar biyofilm yapısında bulunmanın bakterileri açlık stresine karşı koruduğunu ortaya çıkarmıştır (Shen ve diğ., 2010).

Biyofilm yapısı tutunma, üreme ve kopma süreçlerinin dengesi sonucunda meydana gelmektedir. Bu açıdan biyofilm oluşumunda tutunma aşaması olduğu kadar kopma aşaması da önemlidir. Besinsizliğin biyofilm üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada biyofilm oluşan ve sürekli akışın olduğu ortamlarda, biyofilmlerde kopmanın bir süre sonra durduğu tespit edilmiştir. Buna karşın düşük besin içeriği ve akış durumunda ise biyofilm kopmasının devam ettiği belirlenmiştir. Sadece akış durumunda bakterilerin % 90'ı yüzeyde kalırken açlık durumunda %70'lik bir azalma elde edilmiştir. Çalışmada olgun biyofilm 3 gün boyunca glukoz açlığına maruz bırakılmıştır. Devam eden akış, kopmayı durdurucu sinyal moleküllerinin birikimini engellemiştir. Bununla birlikte sinyal moleküllerinin sentezinde de azalma meydana gelmiş olup bu durumun azalan karbondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Saf su ile yapılan besinsizlik çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar biyofilm kopmasının besinsizliğe yanıt olduğunun göstergesidir (Hunt ve diğ., 2004).

Evrimsel süreçte uygulanan baskılar neticesinde bakteriler genotipik ve fenotipik çeşitli

mekanizmalarla besin açlığına adapte olmuşlardır. *Vibrio* türleri gibi pek çok denizel mikroorganizma, hücre morfoloji ve fizyolojisinde geçirdikleri değişimler sonucunda açlık koşullarında uzun süre canlılıklarını muhafaza edebilmektedir. Ancak bunların dışında özellikle insanda patojen olan *Vibrio cholera*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Aeromonas salmonicida* ve *Campylobacter jejuni* de açlık koşullarında VBNC fazına geçerek uzun süre canlı kalabilmektedir. Stress üzerine yapılan çalışmalar besin azlığının patojen bakterilerin VBNC fazına girmelerinin temel nedenlerden biri olduğunu göstermektedir (Jiang ve Chai, 1996).

Açlık durumunda hücreler boyutlarındaki sürekli küçülme yoluyla küçük sferoitlere dönüşmektedirler. Bu yapıların endojen metabolizmasında hızlı ve şiddetli bir düşüş gözlenmekte ve bu durum haftalar boyunca olumsuz devam eden koşullarda mikroorganizmaların hayatta kalabilmelerini sağlamaktadır. Yapılan benzer çalışma açlık koşullarında olan hücrelerin normal koşullarda olan hücrelere kıyasla daha fazla olarak yüzeye tutunduklarını göstermektedir. Hidrofilik bakteriler besin azlığı olan yüzeylerde daha küçük hale gelirken hidrofobik bakterilerin boyutunda sıvı fazda daha hızlı bir küçülme gözlenmektedir. Bu durum daha sıkı bağlanmış hücrelerin oluşturduğu yakın temastan kaynaklanabilmekte ve yüzeyde bulunan moleküllerin daha iyi alımını sağlamaktadır. Tutunan bakterilerin sıvı fazda bulunan bakterilere göre metabolik olarak daha aktif olduğu ve düşük besleyici ortam içindeki atıl tanelerin varlığının yüzeye tutunan bakterilerin büyümesine izin verdiği tespit edilmiştir (Kjelleberg ve diğ., 1983).

Biyofilm üzerine yapılan çalışmalar biyofilm yapısındaki bakterilerin antibiyotiğe karşı gösterdikleri direncin sebebi olarak bakterilerin besin alımını azaltarak antibiyotik alımının da önüne geçtiklerini ve bu yolla antibiyotiklere karşı dirençli olduklarını göstermektedir. *K. pneumoniae* biyofilmi ve planktonik formunun kullanıldığı çalışmada planktonik formun biyofilme oranla antibiyotiklere daha duyarlı olduğu; glukoz ve azot eskiliğinde planktonik fazın antibiyotik direncinin arttığını; durağan fazdaki hücrelerin besin eksikliği olmasa da antibiyotiğe daha dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Biyofilm yapısında bulunan *K. pneumoniae* için ise biofilmden süspanse edilen bakterilerin antibiyotiğe biyofilmdaki bakterilere oranla daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır. Durağan faz karakteri olan katalaz aktivitesine bakılması sonucunda ise biyofilm oluşumunun başlangıcında üremenin daha hızlı olduğunu, 16 saatten sonra üremenin

oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun planktonik faza oranla biyofilmin çok daha çabuk durağan faza geçtiğini ve bu hızın da antibiyotiklere dirençte etkili olduğunu göstermektedir. Elektron mikroskobu kullanıldığında ise biyofilmin üst kısmında olan hücrelerin glikozu kullandığı alttaki hücrelere glikozun ulaşmadığı buna bağlı olarak da üstteki hücrelerin antibiyotikten etkilendiği alttakilerin glikoz alımının azalmasına paralel olarak antibiyotik almadığı ve dirençli oldukları tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda biyofilm yapısındaki bakterilerin açlık ile karşılaştıklarında üremelerini azaltıp durdurduklarını bu durumda dışarıdan molekül alımına kendilerini kapattıkları ve bunun sonucunda açlık durumuna dayanabilirken aynı zamanda antibiyotik alımına kapatmaları sonucunda antibiyotiklere karşı da dirençli hale geldikleri ortaya çıkmıştır (Anderl ve diğ., 2003).

2.4.7. UV Stres Etkisi ve Bakteriyel Yanıt

Radyasyon boşlukta veya materyal ortamda enerjinin dalgalar halinde yayılmasıdır. Radyasyon çeşitleri iyonizan olmayan ve iyonizan radyasyonlar olarak üzere iki grup altında toplanmaktadır. UV-mor ötesi ışınlar iyonizan olmayan radyasyon grubuna girmektedir. UV ışınlarının kuantum enerjisi düşük olduğundan dolayı maddelerin atomlarından elektron koparma yetenekleri yoktur. Bu sebeple iyonizasyona sebep olmazlar ancak moleküllerde ekzitasyonlar meydana getirirler. Ekzitasyon, elektronlar arasındaki aktivasyonu arttırarak yüksek enerji oluşumudur. UV ışınlarının proteine ve özellikle de nükleik asitlere karşı sahip oldukları özel afiniteleri bu moleküllere kolayca tutunmalarını sağlamaktadır. Bu işlemlerin sonucunda da DNA'da yan yana konumlanmış olan timin bazları arasında bağ oluşmasına (timin dimerleri) sebep olarak DNA'nın normal yapısını bozmaktadırlar. Bu bozulma DNA'nın replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonuna etki ederek başta protein sentezi olmak üzere diğer yaşamsal faaliyetlerin bozulmasına sebep olmakta ve bu durum hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Arda, 2011).

UV ışığı 200 ile 400 nm arasında değişen elektromanyetik spektrumun bir parçası olup kısa dalga boylu UV (UV C / 200-280 nm); orta dalga boylu UV (UV B / 280-320 nm) ve uzun dalga boylu UV (UV A / 320-400 nm) olmak üzere üç bölgeye ayrılmıştır. UV esas olarak genetik materyal üzerinden mikrobiyal inaktivasyondan sorumlu olmasına rağmen, protein gibi diğer hücre bileşenlerine de zarar verebilmektedir. UV C en yüksek

oranda mikrop öldürücü (germisidal) tür olup maksimum etkinliği DNA absorpsiyonunun en yüksek değere ulaştığı 260-265 nm dalga boylarında meydana gelmektedir. UV C absorpsiyonu siklobütan pirimidin dimerleri ve pirimidin 6-4 pirimidon foto ürünleri oluşumunu teşvik etmekte, bu ürünler de replikasyon ve transkripsiyonu engelleyerek mutasyon veya hücre ölümüne sebep olmaktadır. Geleneksel olarak, UV ışık uygulaması hava, yüzey ve su dekontaminasyonu için dezenfektan olarak kullanılmaktadır (Gayan ve diğ., 2014).

Son zamanlarda gıda endüstrisinde sıvı ve katı gıda yüzeylerinde UV dezenfeksiyonu kullanılmaya başlanmıştır. UV uygulaması, geniş bir yelpazedeki bozulmaya sebep olan ve patojen mikroorganizmaların etkili bir şekilde inaktivasyonunu sağlaması, gıdaların besin ve duyu kalite kaybını minimal düzeyde tutması, uygulama artıklarının toksik etkilerinin olmaması, diğer termal ve termal olmayan pastörizasyon süreçlerine oranla daha düşük enerji tüketimi nedeniyle oldukça avantajlı bir teknolojidir (Gayan ve diğ., 2014).

Su dezenfeksiyonunda UV radyasyonu için civa lambalarının iki türü kullanılmaktadır. İlki düşük basınçlı civa buharlı lambalar olup pik yaptığı 253.7 nm’de tek renk dalga boyuna sahiptir. Diğer tür ise orta basınçlı civa lambasıdır. Çok renkli dalga boylarına sahiptir ve 200-300 nm arasında germisidal aktivite göstermektedir (Lakretz ve diğ., 2011).

UV C, su dağıtım sistemleri gibi su sistemlerinin dezenfeksiyonunda kullanımı yaygın hale gelmiş bir uygulamadır. UV C aynı zamanda hastane gibi ortamlarda havadaki patojenlerin öldürülmesinde de kullanılmaktadır. Katater dezenfeksiyonunda tıp dünyasında yaygın olarak UV C ışınları kullanılmaktadır. Planktonik bakterilerle mücadelenin dışında yüzeyde oluşan biyofilm tabakasının kalınlığını inceltmek amacıyla da UV C uygulanabilmektedir. UV C ışınları dış bir ışık kaynağından gelerek kataterin iç kısmına kadar ulaşabilmekte ve lokal bölgelerin dezenfeksiyonunda kullanılabilmektedir. Ancak biyofilm bakterilerini öldürmek için gerekli olan doz, planktonik bakterileri öldürmek için gerekli olandan daha fazla olmalıdır. UV ışınlarının katater dezenfeksiyonunda kullanımına yönelik yapılan bir çalışmada, katater örnekleri farklı sürelerde UV C ışınlarına maruz bırakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda dakikalar içinde yaklaşık % 100’e yakın oranda öldürme elde edilmiştir (Bak ve diğ., 2009).

UV dezenfeksiyonunda başarılı sonuçların elde edilmesinde kullanılacak ışığın dozu önemli yer tutmaktadır. Düşük dozlarda öldürme oranı iki sebepten dolayı olumsuz etkilere sahiptir. İlki biyofilm kalınlığının öldürme oranı üzerine azaltıcı etkisinin oluşudur. Kalın bir biyofilm tabakası UV C geçirgenliğini azaltmaktadır. Bunun sonucunda da biyofilmin dip kısmında bulunan hücreler canlılıklarını koruyabilmektedirler. İkinci sebep ise bakteri metabolizmasında meydana gelen değişiklikler ve DNA onarım sisteminin devreye girmesidir. Bakteriler sahip oldukları onarım mekanizması sonucunda ışınların DNA üzerinde meydana getirdikleri hasarı onarabilmektedirler. Çalışma sonucunda biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktoniklere oranla en az 100-1000 kat daha dayanıklı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Biyofilm kalınlığı ve bileşenleri de UV C kullanılarak elde edilen öldürme oranlarını değiştirebilmektedir. Bunun durumun EPS, protein ve su dışındaki biyofilm komponentleri tarafından UV C emiliminin azaltılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek hücre yoğunluğu ve onların yüksek DNA içerikleri hem emme hem de ışık saçma açısından UV C'nin emilimini azaltmaktadır (Bak ve diğ., 2009).

UV uygulaması canlı hücrelerin DNA'sında direkt ya da indirekt olarak hasar meydana getirmektedir. Örneğin komşu pirimidin bazları arasında fotodimerizasyon, sitozin fotohidrolizasyonu ve zincir içi ve arasında bazı çapraz bağlanmalara sebep olmaktadır. Genel olarak 250-280 nm arası dalga boyuna sahip ışınlar dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaktadır. Buna karşın yapılan çalışmalarda su sistemlerinde meydana gelmiş biyofilm tabakası üzerine UV dezenfeksiyon uygulamasının ardından bakterilerin etkin bir şekilde çoğalabildikleri ortaya çıkmıştır (Schwartz ve diğ., 2003).

Yapılan çalışmalar UV'nin genomda meydana getirdiği hasarın RecA (rekombinant protein A) proteini tarafından onarıldığını göstermektedir. RecA, DNA hasarına yol açan stres şartları altında, DNA stabilitesi ve onarımında merkezi role sahip bir proteindir. Stres koşulları altında biyofilm üretimindeki artışın hasarlı DNA'ya sahip bakterilerin onarım mekanizmaları vasıtası ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Ben Said ve diğ., 2011). Yapılan farklı bir çalışma sonucunda da biyofilmde organizmaların üremeleri esnasında hızlı bir genetik çeşitlenmenin meydana geldiği gösterilmiş olup bu genetik değişikliklerin, RecA-bağımlı mekanizma yoluyla olduğu ortaya çıkarılmıştır (Boles ve diğ. 2004).

Yapılan benzer bir çalışma sonucunda da RecA'dan yoksun *Streptococcus pneumoniae*'nin çevresel stresler karşısında daha duyarlı olduğunu ve daha az miktarda biyofilm meydana getirdiğini ortaya çıkarmıştır. Ek olarak konfokal lazer mikroskop kullanılarak elde edilen sonuçlar RecA'dan yoksun olan mikroorganizmalar tarafından üretilen biyofilmin normal mikroorganizmalar tarafından üretilen biyofilme oranla daha az sayıda canlı hücre içerdiğini göstermiştir. Bu sonuçlar RecA ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Inagaki ve diğ., 2009).

2.4.8. Stres Koşulları ve VBNC Fazı

Bakteriler, besin açlığı, oksijen tükenmesi, pH ve iyonik güç değişimi, sıcaklık artış yada düşüşü, yüksek basınç, ozmotik konsantrasyon değişiklikleri, ağır metaller ve hatta beyaz ışığın bazı yoğunlukları gibi olumsuz çevresel koşullarla karşılaştıklarında metabolik olarak daha yavaş olan formlara dönüşmektedirler. Bu yapı VBNC form olarak adlandırılmaktadır. VBNC, stres adaptasyonu amaçlı geçici bir uyku durumu olup hücrelerde önemli bir küçülme ve kültür ortamında ürememe durumu olarak karakterize edilmektedir. Ancak VBNC hücreleri canlıdırlar, metabolik aktivitelerini belli bir seviyede korumaktadırlar ve uygun uyarımlar ile kültüre edilebilen duruma yeniden canlandırılabilirler (Zandri ve diğ., 2012; Nyström, 2001; Oliver, 1999).

VBNC, bakterilerin standart kültür ortamında üremedikleri ancak hücresel bütünlük, metabolik aktivite, virulans gibi canlı hücrelere ait olan özelliklerini korudukları fizyolojik bir fazdır. VBNC fazı ile ilgili iki farklı görüş bulunmaktadır. İlk görüş VBNC fazının olumsuz koşullara uzun süreli maruz kalma sonucunda mikroorganizmalar tarafından geliştirilen adaptif bir yanıt olduğunu savunmakta ve adaptif VBNC (A-VBNC hücreler) olarak tanımlanmaktadır. Diğer görüşe göre ise bu faz, canlı hücrelerin bazı özelliklerini devam ettirmelerine rağmen hücresel hasar sonucunda hücrelerin ölümüne sebep olan faz olarak değerlendirmekte ve hasarlı VBNC (D-VBNC hücreler) olarak adlandırılmaktadır (Ducret ve diğ., 2014).

E. coli, *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Campylobacter jejuni*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella spp.* gibi 70'den fazla bakteri türünün VBNC fazına girdiği tespit edilmiştir (Sardesai, 2005; Pinto ve diğ.,

2011). Çalışmalar spor oluşturmeyen bakteriler için VBNC fazının zarar verici çevresel koşullarla mücadele etmede adaptasyon stratejisi olduğunu ifade etmektedir (Pinto ve diğ., 2011). VBNC fazındaki hücreler yeniden kültüre edilebilmektedirler. VBNC fazından kültüre edilebilir faza olan bu dönüşüm ‘yeniden canlanma’ olarak adlandırılmaktadır (Oliver, 2010; Desnues ve diğ., 2003; Sardesai, 2005; Pinto ve diğ., 2011).

VBNC fazının hücrelerde önemli değişikliklere sebep olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. VBNC fazındaki hücrelerin besin alımını ve metabolik aktivitelerini azalttıkları tespit edilmiştir. Ayrıca bu fazdaki hücrelerin boylarında küçülme meydana gelmekte ve oval forma benzemektedirler. Membran yapıları, protein kompozisyonları ve ribozomal içeriklerinde de değişiklik meydana gelmektedir (Sardesai, 2005). Ayrıca makromolekül sentezi ve solunum oranı azalmakta, plazmit ve ATP seviyesinde ise artış gözlenmektedir. Hem Gram + hem de Gram – bakterilerde peptidoglikan tabakasında düzenlenme olmakta, antibiyotiklerin spesifik hedefi olan D-alanin sentezi durmaktadır. VBNC fazının olumsuz koşulların üstesinden gelmek için programlanmış genetik yanıt olduğu düşünülmektedir (Oliver, 2010).

V. vulnificus ile yapılan çalışmalarda VBNC fazına giren hücrelerin boyutlarında genel olarak küçülme meydana geldiği ve bu küçülmenin membran yapısı, protein kompozisyonu, ribozomal içerik ve DNA düzenlenmesini önemli ölçüde değiştirdiği tespit edilmiştir. Sıcaklık düşmesi durumunda hücrelerde DNA, RNA ve protein miktarının azaldığı buna karşın normal sıcaklık koşullarında sentezlenmeyen 50 proteinin sentezlendiği tespit edilmiştir. Ayrıca hücrelerin uyku fazına girmesiyle membran yağ asitlerinin, besin alımının, solunum oranının da azaldığı tespit edilmiştir (Oliver, 1999).

VBNC fazına giren hücrelerden biri de *L. pneumophila*’dır. *L. pneumophila* çevresel streslere maruz kaldığında ve/veya biyofilm yapısında bulunduğunda VBNC fazına girebilmektedir (Abdel-Nour ve diğ., 2013). Bakterinin açlık, sıcaklık değişimleri, yüksek tuz konsantrasyonu, klor, monokloramin ve hipoklorik asit gibi biyosit uygulamaları sonucunda VBNC fazına girdiği belirlenmiş olup *Acanthamoeba castellanii* veya *Acanthamoeba polyphaga* gibi amipler ile bir araya getirildiğinde yeniden canlandığı tespit edilmiştir. Bu durum kültüre edilemeyen *L. pneumophila*’da amip enfeksiyonu ve çoğalma özelliklerinin korunduğunu göstermektedir (Ducret ve diğ., 2014; Pecastaing ve

diğ., 2010; Epalle ve diğ., 2015). Amip ile makrofaj enfeksiyonlarının aynı yol ile gerçekleşmesinden yola çıkarak VBNC'nin makrofaj enfeksiyonunu etkilemediği sonucuna ulaşılabilir. Tüm bu sebeplerde dolayı VBNC bir halk sağlığı sorunu olabilmektedir (Alleron ve diğ., 2008).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. SU SİRKÜLASYON TANKI VE İŞLETİM KOŞULLARI

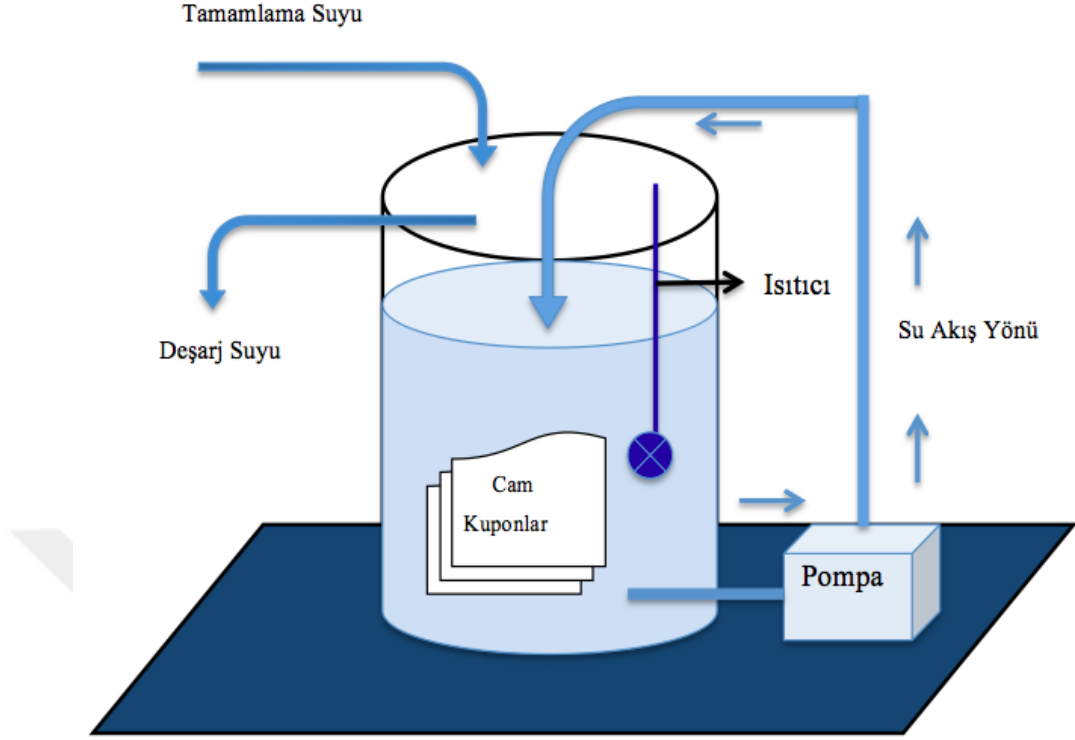
Çalışmada 100 cm yüksekliğinde, 45 cm çaplı ve 100 litre hacimli PE100'den (yüksek yoğunluklu polietilen) üretilmiş kapalı devre su sirkülasyon sistemi kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan 72 saat önce sistem 100 ppm'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile 24 saat süreyle dezenfekte edilmiştir. Dezenfeksiyon işleminin ardından nötralizasyon amacıyla 0.1 Normal (N) sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - STS) çözeltisi sisteme eklenerek 24 saat süreyle sirkülasyonu sağlanmıştır. Nötralizasyon işlemi sonunda sistem tamamen boşaltılarak üzeri steril bir kapakla örtülmüş ve 24 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır (Şanlı-Yürüdü, 2009). Deney sistemine su sirkülasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 550 W (Watt) gücünde ve 40 l/dk hızında çalışan pompa eklenmiştir. Bu yolla sabit, türbülansa sebep olmayan akış sağlanmıştır (Reynolds sayısı (Re), 2000). Akış için 1000'in altında Reynolds sayısı, laminar akış; 10000 üzerinde Reynolds sayısı ise türbülanslı akış olarak sınıflandırılmaktadır (Liu ve diğ., 2006).

$$Re = \frac{V \times D_{\text{boru çapı}}}{\nu} \quad (3.1)$$

V: Akış hızı

$D_{\text{boru çapı}}$: Boru çapı

ν : Suyun kinematik vizkozitesi ($0.01 \text{ cm}^2/\text{s}$, 25°C)



Şekil 3.1: Model su sirkülasyon sisteminin şematik diyagramı.

Deney sistemine su sirkülasyonunu yapan pompanın yanı sıra su sıcaklığını 32°C’de sabit tutmak amacıyla ısıtıcı yerleştirilmiştir. Çalışmada biyofilm oluşturulmasını sağlayacak yüzey olarak 2 mm kalınlığında ve 18 cm² (9x2) alana sahip cam kuponlar kullanılmıştır. Sistem içindeki kuponların su hareketine bağlı olarak herhangi bir yüzeye ve birbirlerine değmeden durabilmeleri amacıyla pleksiglass malzemeden imal edilmiş kupon tutucular kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılacak kuponlar su sirkülasyon tankına konmadan önce deterjan kullanılarak çeşme suyunda yıkanmış ve distile su ile durulanmıştır. Kuponlar havada kurutulduktan sonra % 70’lik etanole daldırılmalarının ardından havada kurutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Bloomfield ve diğ., 1993). Pleksiglas malzemeden üretilmiş olan kupon tutucular ise deterjan kullanılarak çeşme suyunda yıkanıp distile su ile durulanmalarının ardından steril kabin içinde 24 saat süreyle 254 nm dalga boylu UV ışık altında steril edilmiştir. Cam kuponların ve kupon tutucularının hazırlık işlemlerinin eş zamanlı olarak tamamlanmasının ardından kuponlar, steril kabin içinde % 70’lik etanole daldırılarak alevden geçirilme yoluyla steril edilmiş pens aracılığıyla kupon

tutuculara yerleştirilmiştir. Ardından üzeri steril alüminyum folyo ile sarılarak deney düzeneğine taşınmıştır.

Hazırlanan kuponlar, kupon tutucular aracılığıyla içine 100 l şebeke suyu doldurulmuş model sisteme yerleştirilmiştir. Ardından 3 gün üst üste olmak koşulu ile McFarland 1'e ayarlanmış 10 ml *L. pneumophila* Serogrup 1 (ATCC 33152) suşu 100 l şebeke suyuna deneysel olarak eklenmiştir. Tüm bileşenlerin sisteme eklenmesinin ardından biyofilm tabakasının doğal olarak oluşması için sistem çalıştırılmıştır. Çalışma, biyofilm tabakasının en yüksek kalınlığa ulaştığı 14 haftalık biyofilm tabakası ile gerçekleştirilmiştir (Vatansever, 2011). Çalışma kapsamında model sistemin çalıştırıldığı süre boyunca 4 hafta aralıklarla 3 gün arka arkaya olmak üzere McFarland 1'e ayarlanmış 10 ml *L. pneumophila* Serogrup 1 (ATCC 33152) suşu ilave edilmiştir. Çalışma boyunca 4 haftalık periyotlarda sistem içinde bulunan suyun toplam çözünmüş madde (TÇM) miktarı, çözünmüş oksijen (ÇO), sıcaklık ve pH değerleri ölçülmüştür. Su sisteminde 'blowdown' olarak adlandırılan sürecin yanı sıra suyun sirkülasyonu ve deşarjı ile sistemdeki suyun azalması, sistem içinde kontaminantların birikmesine neden olmaktadır. Bu sebeple deney süresince azalan su miktarı sistemde bulunan suyun % 3'ünü oluşturacak şekilde günlük 3 litre şebeke suyu ilavesi ile tamamlanmıştır (Bruijs ve Jenner, 2012). 'Make-up' olarak bilinen bu işlem ile gerek buharlaşma gerekse blowdown sebebiyle azalan suyun sistem içindeki TÇM miktarını arttırmasının önüne geçilmiştir. Aksi takdirde artan TÇM miktarı, suyun pH değerinin, konsantrasyonunun ve elektrolitik özelliğinin yükselmesine yol açmaktadır (Gleeson ve Gray, 1997). Bu sebeple ilave edilen su, sistemde bulunan partikül ve bakteri artışını engellemesi açısından önemlidir.

Çalışma sıcaklık, pH, dezenfektan, ozmotik konsantrasyon ile kuruluk, UV ve açlık uygulamalarını kapsayacak şekilde 5 adımda gerçekleştirilmiştir. Ancak sistem içine tüm uygulamalarda kullanılacak olan kuponlar eş zamanlı olarak yerleştirilmemiştir. Çalışmanın ilk adımını sıcaklık uygulaması oluşturmaktadır. Bu sebeple de sistem içine öncelikli olarak sıcaklık uygulaması deneylerinde kullanılacak olan kuponlar yerleştirilmiş ve 14 haftalık biyofilm oluşturulması süreci başlatılmıştır.

Sıcaklık uygulaması için sisteme kuponların eklenmesinden 4 hafta sonra pH uygulamasında kullanılacak olan kuponlar sisteme ilave edilmiş ve 14 haftalık biyofilm

oluşturulması süreci başlatılmıştır. pH uygulaması için sisteme kuponların eklenmesinden 4 hafta sonra dezenfektan uygulamasında kullanılacak olan kuponlar sisteme ilave edilmiş ve 14 haftalık biyofilm oluşturulması süreci başlatılmıştır. Dezenfektan uygulaması için sisteme kuponların eklenmesinden 4 hafta sonra ozmotik konsantrasyon uygulamasında kullanılacak olan kuponlar sisteme ilave edilmiş ve 14 haftalık biyofilm oluşturulması süreci başlatılmıştır. Ozmotik konsantrasyon uygulaması için sisteme kuponların eklenmesinden 4 hafta sonra kuruluk, UV ve açlık uygulamasında kullanılacak olan kuponlar sisteme ilave edilmiş ve 14 haftalık biyofilm oluşturulması süreci başlatılmıştır. Sisteme eklenen her çalışma grubu kuponlarıyla birlikte *L. pneumophila* serogrup 1 aşılması da 3 gün boyunca olmak üzere yapılmıştır. Aşılama işlemine kuponların sisteme ilavesinin tamamlanmasının ardından yine 4 haftalık periyotlarda olmak üzere devam edilmiştir.

14 haftalık biyofilm oluşturma süreci ilk tamamlanan grup, sisteme ilk eklenen sıcaklık uygulaması kuponları olup kuponlar steril pens aracılığıyla sistemden çıkarılarak steril şalelere alınmıştır. Planktonik faz çalışmaları için ise sistem suyu steril Falcon tüplerine alınmıştır. Diğer uygulama deneyleri için de sırasıyla, pH, dezenfektan, ozmotik konsantrasyon ve kuruluk, UV ve açlık uygulama kuponlarının sisteme eklenme periyodu takip edilmiş ve 14 haftalık sürenin her bir deney grubu için tamamlanmasının ardından söz konusu uygulama için gerekli olan kuponlar ve su fazı örnekleri alınmıştır.

Tablo 3.1: Toplam deney süresince sisteme ilave edilen ve sistemden çıkarılan kuponların süreleri.

Sisteme ilave edilen kupon grubu	Kupon grubunun sisteme ilave edildiği hafta	Biyofilm oluşumu için inkübasyon süresi	Kupon grubunun sistemden çıkarıldığı hafta
Sıcaklık	0.hafta	14 hafta	14. hafta
pH	4. hafta	14 hafta	18. hafta
Dezenfektan	8. hafta	14 hafta	22. hafta
Ozmotik konsantrasyon	12. hafta	14 hafta	26. hafta
Kuruluk, Açlık, UV	16. hafta	14 hafta	30. hafta

3.2. STRES FAKTÖRLERİNİN UYGULANMASI

3.2.1. Sıcaklık Uygulaması

Çalışma kapsamında 4°C, 37°C ve 65°C olmak üzere 3 ayrı sıcaklık uygulaması gerçekleştirilmiştir. Her bir uygulama için sıcaklık değerlerinin 1, 4 ve 24 saatlik etki süreleri çalışılmıştır.

3.2.1.1. *Biyofilm Örneklerine Sıcaklık Uygulaması*

Biyofilm örneklerine sıcaklık uygulaması için 2 adet kontrol olmak üzere toplam 20 adet cam kupon sistemden çıkarılarak her şaleye 2 kupon olacak şekilde steril şalelere alınmış ve şalelerin içine sistemden alınan su ilave edilmiştir. Kapağı kapatılan şaleler çalışmada uygulanacak olan sıcaklık derecelerinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sıcaklık değerlerinden 4°C için buzdolabı; 37°C için sıcaklığı ayarlanmış inkübatör ve 65°C için su banyosu kullanılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak 2 adet kupon ise herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir. Sıcaklık uygulama işleminde inkübasyon süreleri biten örnekler oda sıcaklığına alınmıştır.

3.2.1.2. *Planktonik Faz Örneklerine Sıcaklık Uygulaması*

Planktonik faz örneklerine sıcaklık uygulaması için deney sistemine ait sudan 10 adet 50 ml hacimli steril Falcon tüpüne 40 ml; 10 adet 50 ml hacimli steril Falcon tüpüne ise 45 ml su fazı alınmıştır. Su fazını içeren bu Falcon tüplerinden 40 ml örnek içeren tüpten 1 adet ve 45 ml örnek içeren tüpten 1 adet olmak üzere 2 tanesi kontrol çalışmalarında kullanılmak amacıyla herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir. Kalan 18 Falcon tüpünden ise 3 adedi 40 ml; 3 adedi 45 ml hacimli örnek içeren Falcon tüpleri 6'lı gruplar halinde 4°C, 37°C ve 65°C sıcaklık uygulamaları için sırasıyla buzdolabı, inkübatör ve su banyosuna alınarak inkübasyona bırakılmıştır. Sıcaklık uygulama işleminde inkübasyon süreleri biten örnekler oda sıcaklığına alınmıştır.

3.2.2. pH Uygulaması

Çalışma kapsamında pH 3 ve pH 11 olmak üzere 2 ayrı pH uygulaması gerçekleştirilmiştir. Her bir uygulama için pH değerlerinin 1, 4 ve 24 saatlik etki süreleri çalışılmıştır.

3.2.2.1. Biyofilm Örneklerine pH Uygulaması

Biyofilm örneklerine pH uygulaması için 2 adet kontrol olmak üzere toplam 14 adet cam kupon sistemden çıkarılarak her şaleye 2 kupon olacak şekilde steril şalelere alınmıştır. pH 3 asit stresine maruz bırakılacak kuponların bulunduğu şalelere pH'ı 3'e ayarlanmış fosfat tampon çözeltisi (PBS) koyulmuş ve kapağı kapatılan şaleler 1, 4 ve 24 saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Aynı işlem pH 11 stresine maruz bırakılacak kuponların bulunduğu şalelere de uygulanmıştır. İçinde 2'şer adet cam kupon bulunan şalelere pH'ı 11'e ayarlanmış PBS eklenerek kapakları kapatılmış ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak 2 adet kupon herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir. pH uygulama işleminde inkübasyon süreleri biten cam kuponlar şale içinde bulunan pH 3 ve pH 11'lik çözeltiden alınarak pH'ı 7.4 olan PBS içine konulmuştur.

3.2.2.2. Planktonik Faz Örneklerine pH Uygulaması

Planktonik faz örneklerine pH uygulaması için deney sistemine ait sudan 7 adet 50 ml hacimli steril Falcon tüpüne 40 ml; 7 adet 50 ml hacimli steril Falcon tüpüne ise 45 ml su fazı alınmıştır. Su fazını içeren bu Falcon tüplerinden 40 ml örnek içeren tüpten 1 adet ve 45 ml örnek içeren tüpten 1 adet olmak üzere 2 tanesi kontrol çalışmalarında kullanılmak amacıyla herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir. pH 3 asit muamelesi için 12 Falcon tüpünden 6 tanesi alınmış ve steril kabin içinde daha önceden hazırlanarak steril edilmiş 1 Molar (M) ve 3M Hidroklorik asit (HCl) çözeltisi kontrollü olarak steril damlalık aracılığıyla su örneklerine eklenmiştir. Bu sırada yapılan pH ölçümü ile su fazının pH'ı deney parametresi olan pH 3'e ayarlanmıştır. Aynı işlem pH 11 uygulaması için de gerçekleştirilmiştir. Kalan Falcon tüplerinde bulunan örneklerin üzerine steril kabin içinde daha önceden hazırlanarak steril edilmiş 1M Potasyum hidroksit (KOH) ve 3M KOH çözeltisi kontrollü olarak steril damlalık aracılığıyla su örneklerine eklenmiştir. Bu sırada yapılan pH ölçümü ile su fazı pH'ının deney parametresi olan pH 11'e ayarlanması sağlanmış olup tüm örnekler 1, 4 ve 24 saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. pH uygulama işleminde inkübasyon süreleri biten örneklerden pH 3 ile muamele edilenlere 1M KOH ve 3M KOH; pH 11 ile muamele edilenlere 1M HCl ve 3M HCl steril kabinde kontrollü olarak ilave edilmiş ve son pH'ları 7.4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3. Dezenfeksiyon Uygulaması

Çalışma kapsamında 2 ppm klor, 10 ppm klor, 2 ppm monokloramin ve 10 ppm monokloramin olmak üzere 4 farklı dezenfeksiyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Her bir uygulama için dezenfektan türlerinin 1, 4 ve 24 saatlik etki süreleri çalışılmıştır.

3.2.3.1. *Biyofilm Örneklerine Dezenfeksiyon Uygulaması*

Biyofilm örneklerine dezenfeksiyon uygulaması için 2 adet kontrol olmak üzere toplam 26 adet cam kupon sistemden çıkarılarak her şaleye 2 kupon olacak şekilde steril şalelere alınmıştır. Şalelerden 3 tanesinin içine 3 farklı saat uygulaması için önceden hazırlanan 2 ppm klor; 3 tanesinin içine 10 ppm klor; 3 tanesinin içine 2 ppm monokloramin; 3 tanesinin içine önceden hazırlanan 10 ppm monokloramin eklenerek kapakları kapatılmış ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak 2 adet kupon herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir. Dezenfeksiyon uygulama işleminde inkübasyon süreleri biten cam kuponlar şale içinde bulunan dezenfektandan ayrılmış ve nötralizasyon amacıyla %0.5'lik sodyum tiyosülfat içine alınarak 20 dk'lık muamele ile nötralizasyon gerçekleştirilmiştir (Şanlı-Yürüdü, 2009).

3.2.3.2. *Planktonik Faz Örneklerine Dezenfeksiyon Uygulaması*

Planktonik faz örneklerine dezenfeksiyon uygulamasında öncelikle kontrol çalışması için 3 tane steril Falcon tüpünün 1 tanesinin içine 45 ml; diğer ikisinin içine 40 ml su fazı alınmıştır. Su fazını içeren bu Falcon tüpleri kontrol çalışmalarında kullanılmak amacıyla herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir. Dezenfeksiyon uygulaması için ise her bir dezenfektan ve bu dezenfektanın her bir saat uygulaması için ayrı olmak üzere 4 adet Falcon tüpü kullanılarak sistemden örnek alınmıştır. Planktonik fazın dezenfektan çalışmalarında örnekler üzerine eklenecek 1/1 oranında dezenfektan ve 1/1 oranındaki nötralizan Falcon tüplerinde bulunan örnekleri 4 kat sulandırmaktadır. Bu sebeple tüm çalışma kapsamındaki planktonik faz örneklerinden elde edilecek olan direkt, 10^{-1} , 2 kat ve 4 katlık sulandırımalar için, örnekler dezenfektanlarla bir araya getirilmeden önce gerekli görülen oranda yoğunlaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Kullanılan 4 adet Falcon tüpünden ilkinde 10^{-1} sulandırımı elde etmek için 0.625 ml su fazı örneği alınmış üzerine 1.875 ml PBS eklenmiş ve böylece 2.5 kat sulandırılarak (dezenfektan ve nötralizan da 4 kat sulandıracağından) son hacim olan 2.5 ml örnek elde edilmiştir. Direk uygulama için sistemden 10 ml örnek alınmış soğutmalı santrifüj cihazında 10 dakika

boyunca 6000 devirde santrifüj işlemi uygulanmıştır (Zhang ve diğ., 2010; Megharaj ve diğ., 2002). Santrifüj işleminin sonucunda sıvı fazdan 7.5 ml örneğin dışarı atılmasıyla 4 kat yoğunlaştırılarak (dezenfektan ve nötralizan da 4 kat sulandıracağından) son hacim olan 2.5 ml elde edilmiştir. 2 kat yoğunlaştırılmış uygulama için sistemden 20 ml örnek alınmış öncelikle santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj işleminin sonucunda sıvı fazdan 17.5 ml örneğin dışarı atılmasıyla 8 kat yoğunlaştırılarak (dezenfektan ve nötralizan da 4 kat sulandıracağından) son hacim olan 2.5 ml elde edilmiştir. 4 kat yoğunlaştırılmış uygulama için sistemden 40 ml örnek alınmış öncelikle santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işleminin sonucunda sıvı fazdan 37.5 ml örneğin dışarı atılmasıyla ile 16 kat yoğunlaştırılarak (dezenfektan ve nötralizan da 4 kat sulandıracağından) son hacim olan 2.5 ml elde edilmiştir. Ardından tüm örneklerin üzerine 2.5 ml olarak dezenfektanlar ilave edilmiştir. Ancak örnek ile bir araya geldiğinde dezenfektanların ppm değerleri değişeceğinden son değer 2 ve 10 ppm klor, 2 ve 10 ppm monokloramin olması için 4 ve 20 ppm klor, 4 ve 20 ppm monokloramin hazırlanarak eklenmiştir. Oda sıcaklığında gerçekleşen dezenfeksiyon işleminin ardından Falcon tüplerine 5 ml olarak % 0.5'lik sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk'lık muamele ile nötralizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu durum da dezenfektanda olduğu gibi nötralizanın değerini değiştireceğinden son değer % 0.5'lik sodyum tiyosülfat olması için % 1'lik sodyum tiyosülfat hazırlanarak eklenmiştir.

3.2.4. Ozmotik Konsantrasyon Uygulaması

Çalışma kapsamında hipotonik ortamı temsilen % 0.1 NaCl ve hipertonic ortamı temsilen % 3'lük NaCl süspansiyonları olmak üzere 2 farklı ozmotik konsantrasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Her bir uygulama için tuz süspansiyonlarının 1, 4 ve 24 saatlik etki süreleri çalışılmıştır.

3.2.4.1. Biyofilm Örneklerine Ozmotik Konsantrasyon Uygulaması

Biyofilm örneklerine ozmotik konsantrasyon uygulaması için 2 adet kontrol olmak üzere toplam 14 adet cam kupon sistemden çıkarılarak her şaleye 2 kupon olacak şekilde steril şalelere alınmıştır. Şalelerden 3 tanesinin içine önceden hazırlanarak steril edilen % 3'lük NaCl; diğer 3 tanesinin içine de yine önceden hazırlanarak steril edilen % 0.1'lük NaCl eklenerek kapakları kapatılmış ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol

amacıyla kullanılacak 2 adet kupon herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir.

3.2.4.2. Planktonik Faz Örneklerine Ozmotik Konsantrasyon Uygulaması

Planktonik faz örneklerine ozmotik konsantrasyon uygulaması için öncelikle kontrol çalışması için 4 tane steril Falcon tüpünün 1 tanesinin içine 5 ml; diğer üçünün içine 20 ml su fazı alınmıştır. Su fazını içeren bu Falcon tüpleri kontrol çalışmalarında kullanılmak amacıyla herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir. Ozmotik konsantrasyon uygulaması için ise deney sistemine ait sudan tüm konsantrasyon uygulamaları ve her birine ait olan 3 farklı saatlik etki analizleri için toplamda 24 adet 50 ml hacimli steril Falcon tüpüne 20 ml su fazı alınmıştır. Falcon tüplerinde 12 tanesinin içine 1/1 oranını elde etmek adına 20'şer ml hazırlanan hipertonic tuz çözeltisinden eklenmiştir. Ancak bu noktada örnek ile bir araya geldiğinde tuz çözeltisinin konsantrasyon değeri değişeceğinden final konsantrasyonunun % 3'lük NaCl olması için % 6'lık NaCl tuz çözeltisi hazırlanmıştır. Kalan 12 adet Falcon tüpülerinde bulunan örneklerin üzerine de 1/1 oranını elde etmek adına 20'şer ml hazırlanan hipotonik tuz çözeltisinden eklenmiştir. Aynı şekilde örnek ile bir araya geldiğinde çözeltinin konsantrasyon değeri değişeceğinden son hacim % 0.1'lük NaCl olması için % 0.2'lik NaCl şekilde tuz çözeltisi hazırlanmıştır. Farklı ozmotik konsantrasyona sahip tuz çözeltileriyle bir araya getirilen örnekler oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.5. Kuruluk Uygulaması

Çalışma kapsamında kuru ortam koşulları için sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmış etüv kullanılmıştır. Kuruluğun sebep olduğu stres koşullarının 1, 4 ve 24 saatlik etki süreleri çalışılmıştır.

3.2.5.1. Biyofilm Örneklerine Kuruluk Uygulaması

Biyofilm örneklerine kuruluk uygulaması için 2 adet kontrol olmak üzere toplam 8 adet cam kupon sistemden çıkarılarak her şaleye 2 kupon olacak şekilde steril şalelere alınmıştır. Kuruluk deneyinde kullanılacak 3 farklı saat uygulaması için 3 ayrı şalenin içinde bulunan cam kuponlar şalenin kapağı kapalı olarak sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmış inkübatör içinde inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak 2 adet kupon herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir.

3.2.5.2. Planktonik Faz Örneklerine Kuruluk Uygulaması

Planktonik faz örneklerine kuruluk uygulaması için sistemden her bir saat ve kontrol deneyi için ayrı Falcon tüplerine olmak üzere 20 ml örnek alınmıştır. Alınan bu örnekler, önce kaynar distile su ardından soğuk distile suyun filtre edilmesi ve bu işlemlerin ardından alevden geçirilerek steril edilen filtrasyon cihazına yerleştirilen 0.45 µm por çaplı polikarbonat filtreden süzölmüştür. Üzerinde bakteri bulunan filtreler her bir saat için ayrı olmak üzere steril Petri kutularına alınmış ve kapakları kapatılarak 25°C'ye ayarlanmış inkübatör içinde inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak olan bir adet Falcon tüpünde bulunan 20 ml su fazı örneğinin filtrasyonu ile hazırlanan örnek, herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir.

3.2.6. Açlık Uygulaması

Çalışma kapsamında açlık koşulları için önce filtrasyon daha sonra otoklavlanarak steril edilen içme suyu kullanılmıştır. Açlığın sebep olduğu stres koşullarının 1, 4 ve 24 saatlik etki süreleri çalışılmıştır.

3.2.6.1. Biyofilm Örneklerine Açlık Uygulaması

Biyofilm örneklerine açlık uygulaması için 2 adet kontrol olmak üzere toplam 8 adet cam kupon sistemden çıkarılarak her şaleye 2 kupon olacak şekilde steril şalelere alınmıştır. Açlık deneyinde kullanılacak 3 adet saat uygulaması için 3 ayrı şalenin içinde bulunan cam kuponların üzerine önce filtrasyon daha sonra otoklavlanarak steril edilen içme suyu eklenerek kapakları kapatılmış ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak 2 adet kupon herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir.

3.2.6.2. Planktonik Faz Örneklerine Açlık Uygulaması

Planktonik faz örneklerine açlık uygulaması için sistemden her bir saat ve kontrol deneyi için ayrı Falcon tüplerine olmak üzere 20 ml örnek alınmıştır. Alınan bu örnekler önce kaynar distile su ardından soğuk distile suyun filtre edilmesi ve bu işlemlerin ardından alevden geçirilerek steril edilen filtrasyon cihazına yerleştirilen 0.45 µm por çaplı polikarbonat filtreden süzölmüştür. Üzerinde bakteri bulunan filtreler içinde 5 ml steril içme suyu bulunan poşete alınarak önce stomacher cihazı ile 90 sn boyunca homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından 90 sn boyunca elle çitilenmek yoluyla filtre

yüzeyinde bulunan bakterilerin steril içme suyu ile homojenize olması sağlanmıştır. Bu yolla sistemden alınan örneğin 4 kat yoğunlaştırılması sağlanmıştır. 4 kat yoğun halde bulunan süspansiyondan alınan 1 ml örnek, içinde 1 ml içme suyu bulunan tüpe aktarılarak 2 kat yoğun bakteri; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.5 ml örnek, içinde 1.5 ml içme suyu bulunan tüpe aktarılarak direk; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.05 ml örnek, içinde 1.95 ml içme suyu bulunan tüpe aktarılarak 10^{-1} konsantrasyonları elde edilmiştir. Elde edilen konsantrasyonlar oda sıcaklığında 1, 4 ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak olan bir adet Falcon tüpünde bulunan 20 ml su fazı örneğinin filtrasyonu ile hazırlanan örnek, herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir.

3.2.6. UV Uygulaması

Çalışma kapsamında UV uygulaması için steril kabin içinde bulunan 254 nm dalga boylu ışık veren UV lambası kullanılmıştır. UV'nin sebep olduğu stres koşullarının 1 ve 4 saatlik etki süreleri çalışılmıştır.

3.2.6.1. Biyofilm Örneklerine UV Uygulaması

Biyofilm örneklerine UV uygulaması için 4 adet kontrol olmak üzere (UV ışığının giriciğinin az olmasından dolayı tek yüzeyden örnek toplanmıştır.) toplam 12 adet cam kupon sistemden çıkarılarak her bir kupon steril Petri kutusuna alınmıştır. UV deneyinde kullanılacak 2 adet saat uygulaması için 8 ayrı Petri kutusunun içinde bulunan cam kuponlar, petri kutularının kapağı açık olarak içinde bulunan UV lambası açılmış biyogüvenlik kabini içinde inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak 4 adet kupon herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir.

3.2.6.2. Planktonik Faz Örneklerine UV Uygulaması

Planktonik faz örneklerine UV uygulaması için sistemden her bir saat ve kontrol deneyi için ayrı Falcon tüplerine olmak üzere 20 ml örnek alınmıştır. Alınan bu örnekler önce kaynar distile su ardından soğuk distile suyun filtre edilmesi ve bu işlemlerin ardından alevden geçirilerek steril edilen filtrasyon cihazına yerleştirilen 0.45 μm por çaplı polikarbonat filtreden süzölmüştür. Üzerinde bakteri bulunan filtreler her bir saat için ayrı olmak üzere steril Petri kutularına alınmış ve kapakları açık olarak içinde bulunan UV lambası açılmış biyogüvenlik kabini içinde inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla

kullanılacak olan bir adet Falcon tüpünde bulunan 20 ml su fazı örneğinin filtrasyonu ile hazırlanan örnek, herhangi bir işleme maruz bırakılmadan hemen analiz edilmiştir.

3.3. BAKTERİYOLOJİK ANALİZLER

3.3.1. Sıcaklık Uygulama Örneklerinin Hazırlanması

3.3.1.1. *Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması, Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila'nın İzolasyon ve Sayımı*

Biyofilm örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, sıcaklık uygulaması için de söz konusu uygulama sıcaklığı ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda oda sıcaklığına getirilmelerini takiben biyofilm örnekleri, her bir uygulama için kullanılan 2 adet kupon yüzeyinden 4 adet eküvyon kullanılarak steril şartlar altında toplanmış ve 20 ml PBS bulunan poşetler içerisinde stomacher (UIL Instrument, 200 vuruş/dk) cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir (Gagnon and Slawson, 1999). 20 ml PBS ile süspanse edilen biyofilm örnekleri, içinde 45 ml PBS bulunan şişelere 5 ml örnek transferi ile seri sulandırım yapılarak 10^{-3} 'e kadar sulandırılmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmalardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A (Reasoner's 2A) Agar (Oxoid, CM0906) besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere Drigalski çubuğuyla yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır (Singh ve diğ., 2003; Reasoner, 1990). *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmalardan alınan örneklerden BCYE Agar (Oxoid, CM0655; Oxoid, SR0110C) besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere Drigalski çubuğuyla yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır (Walker ve diğ., 2000; Yamamoto ve diğ., 1996; British Standard, 1998).

3.3.1.2. *Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila'nın İzolasyon ve Sayımı*

Planktonik faz örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, sıcaklık uygulaması için de söz konusu uygulama sıcaklığı ve gerekli inkübasyon

sürelerinin sonunda oda sıcaklığına getirilmelerini takiben 45 ml örnek bulunan tüpten alınan 5 ml'lik örnek, içinde 45 ml PBS bulunan şişelere alınarak 10^{-1} sulandırım elde edilmiştir. Kalan 40 ml örnekten 20 ml'si başka bir Falcon tüpüne alınmış, kalan 20 ml örnek direk olarak kullanılmıştır. Alınan 20 ml örnek, soğutmalı santrifüj cihazında 10 dk boyunca 6000 devirde santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminin sonucunda sıvı fazdan 10 ml örneğin dışarı atılmasıyla 2 kat yoğunlaştırılmış süspansiyonlar hazırlanmıştır. Diğer 40 ml'lik örneğe de santrifüj işlemi uygulanmış ve işlemin sonucunda sıvı fazdan 30 ml örneğin dışarı atılmasıyla 4 kat yoğunlaştırılmış süspansiyonlar hazırlanmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmalardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmalardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.2. pH Uygulama Örneklerinin Hazırlanması

3.3.2.1. *Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila'nın İzolasyon ve Sayımı*

Biyofilm örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, pH uygulaması için de söz konusu uygulama değeri ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda pH uygulama solüsyonundan ayrılan biyofilm örnekleri, her bir uygulama için kullanılan 2 adet kupon yüzeyinden 4 adet eküvyon kullanılarak steril şartlar altında toplanmış ve 20 ml PBS bulunan poşetler içerisinde stomacher cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir. 20 ml PBS ile süspanse edilen biyofilm örnekleri, içinde 45 ml PBS bulunan şişelere 5 ml örnek transferi ile seri sulandırım yapılarak 10^{-3} 'e kadar sulandırılmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmalardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler

sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırılmalardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C’de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.2.2. Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve *L. pneumophila*’nın İzolasyon ve Sayımı

Planktonik faz örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, pH uygulaması için de söz konusu uygulama sıcaklığı ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda pH değerlerinin uygun solüsyonlarla 7.4’e getirilmelerini takiben 45 ml örnek bulunan tüplerden alınan 5 ml’lik örnek, içinde 45 ml PBS bulunan şişelere alınarak 10^{-1} sulandırım elde edilmiştir. Kalan 40 ml örnekten 20 ml’si başka bir Falcon tüpüne alınmış, kalan 20 ml örnek direk olarak kullanılmıştır. Alınan 20 ml örnek soğutmalı santrifüj cihazında 10 dakika boyunca 6000 devirde santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminin sonucunda sıvı fazdan 10 ml örneğin dışarı atılmasıyla 2 kat yoğunlaştırılmış süspansiyonlar hazırlanmıştır. Diğer 40 ml’lik örneğe de santrifüj işlemi uygulanmış ve işleminin sonucunda sıvı fazdan 30 ml örneğin dışarı atılmasıyla 4 kat yoğunlaştırılmış süspansiyonlar hazırlanmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırılmalardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırılmalardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C’de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.3. Dezenfeksiyon Uygulama Örneklerinin Hazırlanması

3.3.3.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve *L. pneumophila*’nın İzolasyon ve Sayımı

Biyofilm örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, dezenfeksiyon uygulaması için de söz konusu dezenfektan, nötralizan ve gerekli inkübasyon sürelerinin biyofilm örnekleri, her bir uygulama için kullanılan 2 adet kupon

yüzeyinden 4 adet eküvyon kullanılarak steril şartlar altında toplanmış ve 20 ml PBS bulunan poşetler içerisinde stomacher cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir. 20 ml PBS ile süspanse edilen biyofilm örnekleri içinde 45 ml PBS bulunan şişelere 5 ml örnek transferi ile seri sulandırım yapılarak 10^{-3} 'e kadar sulandırılmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmılardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmılardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.3.2. Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve *L. pneumophila*'nın İzolasyon ve Sayımı

Planktonik faz örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, dezenfeksiyon uygulaması için de söz konusu dezenfektan, nötralizan ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda sonucunda Bölüm 3.2.3.2.'de anlatılan dezenfeksiyon uygulamasına başlanmadan önce yapılan sulandırım ve santrifüj işlemlerinden dolayı planktonik bakteriler için tüm deneylerde standart olarak uygulanmış olan 10^{-1} , direk, 2 kat ve 4 kat'lık süspansiyonlar elde edilmiştir.

Hazırlanan tüm sulandırmılardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmılardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.4. Ozmotik Konsantrasyon Uygulama Örneklerinin Hazırlanması

3.3.4.1. *Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila'nın İzolasyon ve Sayımı*

Biyofilm örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, ozmotik konsantrasyon uygulaması için de söz konusu uygulama değeri ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda tuz solüsyonundan ayrılan biyofilm örnekleri, her bir uygulama için kullanılan 2 adet kupon yüzeyinden 4 adet eküvyon kullanılarak steril şartlar altında toplanmış ve 20 ml PBS bulunan poşetler içerisinde stomacher cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir. 20 ml PBS ile süspense edilen biyofilm örnekleri içinde 45 ml PBS bulunan şişelere 5 ml örnek transferi ile seri sulandırım yapılarak 10^{-3} 'e kadar sulandırılmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmılardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmılardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.4.2. *Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila'nın İzolasyon ve Sayımı*

Planktonik faz örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, ozmotik konsantrasyon uygulaması için de söz konusu tuz solüsyonu ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda 10^{-1} çalışmasında kullanılacak Falcon tüpünde bulunan örnek, soğutmalı santrifüj cihazında 10 dk boyunca 6000 devirde santrifüj işlemine maruz bırakılmıştır. Üst sıvının uzaklaştırılması ile gerçekleştirilen yıkama işleminin ardından 20 ml PBS ilave edilerek ile yapılan toplama işleminin ardından Falcon tüpünden alınan 4 ml örnek içinde 36 ml PBS bulunan tüpe alınarak 10^{-1} 'e sulandırım hazırlanmıştır. Direk deney Falcon tüpünde bulunan örnek de santrifüj ve yıkama işlemine tabi tutularak dipteki çökelti 20 ml PBS ile toplanarak süspense edilmiştir. Diğer iki Falcon tüpünde bulunan örnekler de soğutmalı santrifüj cihazında 10 dk boyunca 6000 devirde santrifüj işlemine maruz bırakılmıştır. Falcon tüpünde yapılan yıkama işlemi sonucunda dipteki

örnekler sırasıyla 10 ml PBS ile toplanarak 2 kat; diğer Falcon tüpünde bulunan dipteki örnek de 5 ml PBS ile toplanarak 4 kat yoğunlaştırılmış süspansiyonlar hazırlanmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmılardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmılardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C’de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.5. Kuruluk Uygulama Örneklerinin Hazırlanması

3.3.5.1. *Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila’nın İzolasyon ve Sayımı*

Biyofilm örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, kuruluk uygulaması için de söz konusu kuruluk koşulları ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda biyofilm örnekleri, her bir uygulama için kullanılan 2 adet kupon yüzeyinden 4 adet eküvyon kullanılarak steril şartlar altında toplanmış ve 20 ml PBS bulunan poşetler içerisinde stomacher cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir. 20 ml PBS ile süspense edilen biyofilm örnekleri içinde 45 ml PBS bulunan şişelere 5 ml örnek transferi ile seri sulandırım yapılarak 10^{-3} ’e kadar sulandırılmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmılardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmılardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C’de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.5.2. *Planktonik Faz örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila’nın İzolasyon ve Sayımı*

Planktonik faz örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, kuruluk uygulaması için de söz konusu kuruluk koşulları ve gerekli inkübasyon

sürelerinin sonunda Petri kutuları içerisinde kuruluğa maruz bırakılan filtreler, içinde 5 ml PBS bulunan steril poşete alınarak önce stomacher cihazı ile 90 sn boyunca homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından 60 sn boyunca elle çitilenmek yoluyla filtre yüzeyinde bulunan bakterilerin PBS ile homojenize olması sağlanmıştır. Bu yol ile sistemden alınan örneğin 4 kat yoğunlaştırılması sağlanmıştır. 4 kat yoğun halde bulunan süspansiyondan alınan 1 ml örnek, içinde 1 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak 2 kat yoğun bakteri; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.5 ml örnek, içinde 1.5 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak direk; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.05 ml örnek, içinde 1.95 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak 10^{-1} konsantrasyonları elde edilmiştir.

Hazırlanan tüm sulandırmalardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmalardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.6. Açlık Uygulama Örneklerinin Hazırlanması

3.3.6.1. Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve *L. pneumophila*'nın İzolasyon ve Sayımı

Biyofilm örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, açlık uygulaması için de söz konusu açlık koşulları ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda biyofilm örnekleri, her bir uygulama için kullanılan 2 adet kupon yüzeyinden 4 adet eküvyon kullanılarak steril şartlar altında toplanmış ve 20 ml PBS bulunan poşetler içerisinde stomacher cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir. 20 ml PBS ile süspense edilen biyofilm örnekleri içinde 45 ml PBS bulunan şişelere 5 ml örnek transferi ile seri sulandırım yapılarak 10^{-3} 'e kadar sulandırılmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmalardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmalardan alınan

örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C’de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.6.2. Planktonik Faz örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve *L. pneumophila*’nın İzolasyon ve Sayımı

Planktonik faz örneklerinin hazırlanmasında kontrol çalışması için filtrasyon ve homojenizasyon sonucunda elde edilen ve üzerinde bakteri bulunan filtre, 5 ml PBS bulunan steril poşete alınarak önce stomacher cihazı ile 90 sn boyunca homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından 90 sn boyunca elle çitilenmek yoluyla filtre yüzeyinde bulunan bakterilerin PBS ile homojenize olması sağlanmıştır. Bu yol ile sistemden alınan örneğin 4 kat yoğunlaştırılması sağlanmıştır. 4 kat yoğun halde bulunan süspansiyondan alınan 1 ml örnek, içinde 1 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak 2 kat yoğun bakteri; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.5 ml örnek, içinde 1.5 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak direk; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.05 ml örnek, içinde 1.95 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak 10^{-1} konsantrasyonları elde edilmiştir. Açlık uygulaması için sistemden çıkarılan su örneklerine Bölüm 3.2.6.2.’de anlatılan açlık uygulamasına başlanmadan önce yapılan filtrasyon, homojenizasyon ve sulandırım işlemlerinden dolayı planktonik bakteriler için tüm deneylerde standart olarak uygulanmış olan 10^{-1} , direk, 2 kat ve 4 kat’lık süspansiyonlar elde edilmiştir.

Hazırlanan tüm sulandırımlardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırımlardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C’de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.7. UV Uygulama Örneklerinin Hazırlanması

3.3.7.1. *Biyofilm Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila'nın İzolasyon ve Sayımı*

Biyofilm örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, UV uygulaması için de söz konusu UV koşulları ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda biyofilm örnekleri, her bir uygulama için kullanılan 4 adet kupon yüzeyinden 4 adet eküvyon kullanılarak steril şartlar altında toplanmış ve 20 ml PBS bulunan poşetler içerisinde stomacher cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir. 20 ml PBS ile süspense edilen biyofilm örnekleri içinde 45 ml PBS bulunan şişelere 5 ml örnek transferi ile seri sulandırım yapılarak 10^{-3} 'e kadar sulandırılmıştır.

Hazırlanan tüm sulandırmalardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırmalardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.3.7.2. *Planktonik Faz Örneklerinin Hazırlanması Aerobik Heterotrofik Bakteriler ve L. pneumophila'nın İzolasyon ve Sayımı*

Planktonik faz örneklerinin hazırlanmasında kontrol için sistemden çıkarılmasını takiben, UV uygulaması için de söz konusu UV koşulları ve gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda Petri kutuları içerisinde kuruluğa maruz bırakılan filtreler, içinde 5 ml PBS bulunan steril poşetlere alınarak önce stomacher cihazı ile 60 sn boyunca homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından 60 sn boyunca elle çitilenmek yoluyla filtre yüzeyinde bulunan bakterilerin PBS ile homojenize olması sağlanmıştır. Bu yol ile sistemden alınan örneğin 4 kat yoğunlaştırılması sağlanmıştır. 4 kat yoğun halde bulunan süspansiyondan alınan 1 ml örnek, içinde 1 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak 2 kat yoğun bakteri; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.5 ml örnek, içinde 1.5 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak direkt; 4 kat bakteri bulunan örnekten alınan 0.05 ml örnek, içinde 1.95 ml PBS bulunan tüpe aktarılarak 10^{-1} konsantrasyonları elde edilmiştir.

Hazırlanan tüm sulandırımardan alınan örnekler aerobik heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyerine 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 27°C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterisi için ise yine tüm sulandırımardan alınan örneklerden BCYE Agara 0.1 ml ve 3 tekrarlı olmak üzere yayma ekimler yapılmış ve 37°C’de 10 günlük inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır.

3.4. EPİFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME

3.4.1. CTC-DAPI BOYA UYGULAMASI

3.4.1.1. Uygulamanın Prensibi

Redüklenmiş CTC boyası çevresel örneklerdeki aktif solunum yapan canlı hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır. Okside CTC boyası renksiz olup floresan ışıma yapma özelliğinde değildir. Ancak elektron transport zinciri tarafından indirgenmesiyle canlı hücre içerisinde çözünmeyen floresan özellikli formazan kristallerine dönüşerek birirmektedir (Randler ve diğ., 2010). DAPI, çift zincirli DNA’nın Adenin ve Timin bazlarınca zengin bölgelerine bağlanabilen, kararlı ve çok daha yoğun floresan ışıma yapan interkalasyon ajanıdır (Saby ve diğ., 1997). DAPI ve CTC’nin farklı emisyon aralıklarına sahip olması eş zamanlı olarak kullanılabilir olmalarına olanak tanımaktadır (Randler ve diğ., 2010). DAPI 420-480 nm; CTC ise 650-710 nm dalga boyları arasında en iyi emisyon sağlamaktadır (Douglas ve diğ., 2010). CTC içeren örneklerle DAPI eklenmesiyle birlikte aynı preparat üzerinde canlı ve toplam bakteri sayıları tespit edilebilmektedir. Aktif sonulum yapan hücreler CTC’den dolayı kırmızı floresan renkli görünürken, solunum yapmayan hücreler yalnızca DAPI ile boyanmakta ve mavi floresan renkli görünmektedirler (Rodriguez ve diğ., 1992; Kim ve diğ., 2008).

3.4.1.2. Örneklerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında biyofilm örneklerinin CTC-DAPI uygulaması için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirilen, her bir uygulama için 2 adet kupon yüzeyinden toplanarak 20 ml fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra elde edilen

direk sulandırım örneğinden 900 µl biyofilm homojenatı boyama işlemine tabi tutulmak üzere steril tüp içine alınmıştır.

Planktonik faz örneklerinin CTC-DAPI uygulaması için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirilen, uygulanan santrifüj, filtrasyon gibi işlemlerin ardından elde edilen 4 kat yoğunlaştırılmış örnekten 900 µl örnek boyama işlemine tabi tutulmak üzere steril tüp içine alınmıştır.

3.4.1.3. Boyama ve İnceleme

Çalışma kapsamında Bölüm 3.4.1.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanan 900 µl örneklerin üzerine öncelikli olarak karanlık ve steril koşullar altında 100 µl CTC (Sigma-Aldrich, 94498) boyası eklenmiştir. Boya ile örneğin bir araya getirilmesinin ardından ışık almaması için üzerine alüminyum folyo sarılan tüpler 30 sn süreyle örnek ve boyanın homojen bir şekilde karışması için vortekslenmiştir. Ardından 28°C'de 4 saat süreyle karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. CTC boyasının 4 saatlik inkübasyon süresinin bitiminde örnek üzerine karanlık ve steril koşullar altında 110 µl DAPI (ThermoFisher Scientific, D1306) boyası eklenerek tüpler 30 sn süreyle örnek ve boyanın homojen bir şekilde karışması için vortekslenmiştir. Ardından 28°C'de 1 saat süreyle karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (Rodriguez ve diğ., 1992, Türetgen, 2008; Sanlı-Yürüdü ve Kimiran-Erdem, 2015). İnkübasyonun ardından örnek üzerine reaksiyonu durdurmak ve homojenizasyonu sağlamak amacı ile filtreden geçirilerek steril edilmiş 3 ml bidistile su eklenip 30 sn süreyle vortekslenmiştir. Ardından elde edilen karışım filtrasyon cihazı aracılığıyla 0.22 µm por çaplı siyah polikarbonat filtreden (Merck Millipore, Isopore™ Membrane Filters) geçirilmiştir (Araya ve diğ., 2002). Filtre karanlık koşullar altında havada kurutulmuş ve işlemin ardından lam üzerine yerleştirilerek üzerine bir damla floresan özellikte olmayan immersiyon yağı eklenmiştir. Yağ üzerine lamel koyulmuş ve üzerine bir damla daha floresan özellikte olmayan immersiyon yağı eklenmiştir. Yağın koyulmasının ardından 100'lük objektifte DAPI için 330-380 nm, CTC için 450-490 nm dalga boyunda epifloresan mikroskopta (NIKON 80i, Japon) inceleme yapılmıştır.

Polikarbonat membran filtre epifloresan mikroskopta incelenip 10 farklı alandan fotoğraflar çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan alınan kırmızı (CTC-Canlı) ve mavi (DAPI-Ölü) renkli sinyaller sayılarak ortalamaları alınmıştır. Daha sonra canlı ve toplam

mikroorganizma sayılarına ulaşmak amacıyla ortalamalar katsayılarla çarpılarak biyofilm örnekleri için santimetrekaredeki; planktonik faz örnekleri için mililitredeki mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir. Söz konusu mikroorganizma sayıları aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (Schwartz ve diğ., 2003; Türetgen, 2008).

$$N = \frac{S \times n}{C \times V} \times D \quad (3.2)$$

N= Mililitredeki mikroorganizma sayısı

S= Filtrasyon alanı

n= İncelenen alandaki ortalama mikroorganizma sayısı

C= Mikroskobik alan

V= Filtre edilen örnek hacmi

D= Örneğin sulandırma oranı

Biyofilm homojenatı boyanmasının direk örnekten yapılmasına karşın planktonik faz boyamasında 4 kat yoğunlaştırılmış örnek kullanılmasının nedeni, su fazında bakteri yoğunluğunun az olabileceği ve mikroskop inceleme alanındaki sinyallerin yakalanma şansını arttırmak olup incelemenin ardından elde edilen sinyallerin sayılmasının ardından veriler biyofilm örnekleriyle uyumlu olması için 4'e bölünmüştür. Daha sonra toplam sayıya ulaşmak amacıyla alınan ortalamalar katsayılarla çarpılarak planktonik faz örnekleri için mililitredeki mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir.

3.4.2. LIVE/DEAD KİT UYGULAMASI

3.4.2.1. Uygulamanın Prensibi

Uygulama canlı ve ölü hücreleri floresan mikroskop altında aynı anda gözlemlemek ve hücrelerin canlılığını doğrulamak için kullanılmaktadır. Söz konusu prosedür sayesinde hücre canlılığı hızlı bir şekilde anlaşılabilir. Çalışma kapsamında SYTO 9 ve propidyum iyodür olmak üzere iki adet DNA'ya bağlanabilen boya içeren LIVE/DEAD Backlight L-7012 (Invitrogen) test kiti kullanılmıştır (Li ve Bashir, 2002; Gopinath ve diğ., 2015; Kim ve diğ., 2008; Shen ve diğ., 2010). Söz konusu boyalar spektral özellikleri ve canlı bakteri hücrelerine girebilme yetenekleri açısından farklılıklar göstermektedirler. Kit içerisinde bulunan boyalardan ilki SYTO 9 olup, tüm bakterilerin membranından geçebilmekte ve hücreleri yeşile boyamaktadır. Buna karşın propidyum iyodür sadece hücre membranı hasar görmüş hücrelerin içine girerek bu hücrelerin floresan ışık altında

kırmızı renkli görülmesini sağlamaktadır (Boulos ve diğ., 1999; Shen ve diğ., 2010; Li ve Bashir, 2002). Propidyum iyodür SYTO 9'dan nükleik asitlere bağlanması açısından daha yüksek afiniteye sahip olması nedeniyle iki boyanın birlikte hücre içinde bulunması SYTO 9'u nükleik asitten kaldırmakta ve hücrelerin floresan ışık altında kırmızı renkli görülmesini sağlamaktadır (Netuschil ve diğ., 2014). Bu yolla her iki boyanın aynı örneğe uygulanması sonucunda örnek içindeki canlı ve toplam bakteri sayıları tek adımda tespit edilebilmektedir. Boyaların floresan yoğunluğunun yüksek olması, kırmızı ve yeşil hücreler arasında kontrast farkının yüksek olması ve arka planın floresanının düşük olması prosedürü avantajlı hale getirmektedir (Boulos ve diğ., 1999). İşlem sonucunda canlı olan hücreler yeşil renkli görülürken ölü hücreler kırmızı renkli görülmektedirler.

3.4.2.2. Örneklerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında biyofilm örneklerinin LIVE/DEAD kit uygulaması için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirilen, her bir uygulama için 2 adet kupon yüzeyinden toplanarak 20 ml fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra elde edilen direk sulandırım örneğinden 1000 µl biyofilm homojenatı boyama işlemine tabi tutulmak üzere steril tüp içine alınmıştır.

Planktonik faz örneklerinin LIVE/DEAD kit uygulaması için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirilen, uygulanan santrifüj, filtrasyon gibi işlemlerin ardından elde edilen direk sulandırımından 1000 µl su fazı örneği boyama işlemine tabi tutulmak üzere steril tüp içine alınmıştır.

3.4.2.3. Boyama ve İnceleme

Çalışma kapsamında Bölüm 3.4.2.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanan 1000 µl örneklerin üzerine karanlık ve steril koşullar altında 1.5 µl SYTO 9 ve 1.5 µl propidyum iyodür boyası eklenmiştir (Giao ve diğ., 2009; Li ve Bashir, 2002). Boya ile örneğin bir araya getirilmesinin ardından ışık almaması için üzerine alüminyum folyo sarılan tüpler 30 sn süreyle örnek ve boyanın homojen bir şekilde karışması için vortekslenmiştir. Ardından oda sıcaklığında 15 dk süreyle karanlıkta bırakılmıştır (Chen ve Chang, 2009; Giao ve diğ., 2010; Gopinath ve diğ., 2015; Nostro ve diğ., 2009). İnkübasyonun ardından örnek üzerine reaksiyonu durdurmak ve homojenizasyonu sağlamak amacı ile filtreden

geçirilerek steril edilmiş 3 ml bidistile su eklenip 30 sn süreyle vortekslenmiştir. Ardından elde edilen karışım filtrasyon cihazı aracılığıyla 0.22 µm por çaplı siyah polikarbonat filtreden geçirilmiştir. Filtre karanlık koşullar altında havada kurutulmuş ve işlemin ardından lam üzerine yerleştirilerek üzerine bir damla floresan olmayan immersiyeon yağı eklenmiştir. Yağ üzerine lamel kapatılmıştır (Giao ve diğ., 2010; Wahman ve diğ., 2009) ve üzerine bir damla daha floresan özellikte olmayan immersiyeon yağı eklenmiştir. Yağın koyulmasının ardından 100'lük objektifte 480 nm dalga boylu ışık altında inceleme yapılmıştır (Besinis ve diğ., 2014).

Polikarbonat membran filtre epifloresan mikroskopta incelenip 10 farklı alandan fotoğraflar çekilmiştir (Verhagen ve diğ., 2011; Wahman ve diğ., 2009). Çekilen fotoğraflardan alınan yeşil (SYTO 9-Canlı) ve kırmızı (Propidyum iyodür-Ölü) renkli sinyaller sayılarak ortalamaları alınmıştır. Daha sonra canlı ve toplam mikroorganizma sayılarına ulaşmak amacıyla ortalamalar katsayılarla çarpılarak biyofilm örnekleri için santimetrekaredeki; planktonik faz örnekleri için mililitredeki mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir. Söz konusu mikroorganizma sayıları Bölüm 3.4.1.3.'de anlatılan formül kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5. ALAMAR BLUE BOYAMA YÖNTEMİ

3.5.1. Uygulamanın Prensibi

Alamar blue boyası, bakteri, mantar ve memeli hücre çalışmalarında kullanılan, tek adımlık prosedürden oluşan, metabolik aktiviteye dayalı olarak hücre canlılığının belirlenmesini sağlayan bir kimyasaldır. Boya, FMNH₂, FADH₂, NADH, NADPH ve sitokromlar tarafından indirgenmeye bağlı olarak canlı hücrelerin tespit edilebildiği resazurin içeren bir kittir (Pettit ve diğ., 2009; Peeters ve diğ., 2008; Rampersad, 2012). Mavi renkli okside form olan resazurin floresan özellikli olmamakla birlikte canlı bakteri olması durumunda floresan özellikteki pembe renkli rezofurine indirgenmektedir. Bu sayede canlı mikroorganizmalar tarafından indirgenen boya miktarı, çıplak gözle okunabilmesinin yanı sıra daha yüksek hassasiyet amacıyla floresan temelli veya absorbans temelli cihazlar aracılığıyla da tespit edilebilir. Bu durum canlı hücrelerin kantitatif olarak belirlenebilmesini sağlamaktadır (Rampersad, 2012; Peeters ve diğ., 2008; Osaka ve Hefty; 2013). Toksik olmaması, suda çözünbilmesi, hücre membranından

kolayca geçebilmesi, hücre üremesine dayalı işlemlerdeki gibi yıkama, fiksasyon, ekstraksiyon gibi adımları gerektirmemesi, kararlı olması gibi özellikleri canlılık çalışmalarında yaygın olarak kullanımını sağlamaktadır (Pettit ve diğ., 2009; Rampersad, 2012; Peeters ve diğ., 2008).

3.5.2. Örneklerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında biyofilm örneklerinin Alamar blue boyama yöntemi için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirilen, her bir uygulama için 2 adet kupon yüzeyinden toplanarak 20 ml fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra elde edilen direk sulandırım örneğinden 100 µl biyofilm homojenatı boyama işlemine tabi tutulmak üzere 96 kuyucuklu mikropalakaya çift tekrarlı olarak koyulmuştur.

Planktonik faz örneklerinin Alamar blue boyama yöntemi için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirilen, uygulanan santrifüj, filtrasyon gibi işlemlerin ardından elde edilen direk sulandırımından 100 µl su fazı örneği boyama işlemine tabi tutulmak üzere 96 kuyucuklu mikropalakaya çift tekrarlı olarak koyulmuştur.

3.5.3. Boyama ve Ölçüm

Çalışma kapsamında Bölüm 3.5.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanan 100 µl örneklerin üzerine karanlık ve steril koşullar altında 5 µl Alamar blue (Sigma, R7017) boyası eklenmiştir (Molhoek ve diğ., 2011; Pettit ve diğ., 2009). Boya ile örneğin homojen bir şekilde karışması için 3 kez pipetaj işlemi yapılmıştır. Ardından kontamine olmaması için üzerine steril cam kapak kapatılan ve ışık almaması için alüminyum folyo sarılan mikropalaka 37°C'de 1 s süreyle karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (Rampersad, 2012; Molhoek ve diğ., 2011; Pettit ve diğ., 2009). İnkübasyonun ardından ELISA (Enzim bağlı immünosorbent deney) okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go) mavi renkli boyanın pembe renge indirgenmesine bağlı olarak 570 nm (redüksiyon) ve 600 nm (oksidasyon)'de yapılan ölçümde elde edilen redüksiyon ve oksidasyon değerleri ile stres koşullarının uygulamasının ardından kontrol örneklerine göre mikroorganizmaların canlılık durumlarındaki % cinsinden azalma belirlenmiştir (Osaka ve Hefty; 2013; Pettit ve diğ., 2009).

$$\% Azalma = \frac{(\epsilon_{OX})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A\lambda_2 \text{ of test örneği}}{(\epsilon_{RED})\lambda_2 A^\circ\lambda_1 - (\epsilon_{RED})\lambda_1 A^\circ\lambda_2 \text{ of kontrol örneği}} \times 100 \quad (3.3)$$

ϵ_{OX} = Alamar Blue oksitlenmiş formunun molar tükenme katsayısı (mavi)

ϵ_{RED} = Alamar Blue redüklenlenmiş formunun molar tükenme katsayısı (pembe)

A = Test örneği absorbans değeri

A° = Kontrol örneği absorbans değeri

λ_1 = 570nm

λ_2 = 600nm

3.6. EMA-QPCR YÖNTEMİ

3.6.1. Uygulamanın Prensibi

L. pneumophila'nın tespiti için klasik kültürde sıcaklık ve asit uygulaması, immünolojik yöntemler, FISH, qPCR gibi çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler yüksek oranda hassas olmalarına rağmen kompleks su sistemlerinde sıklıkla karşılaşılan inhibe edici bileşikler tarafından engellenmektedirler. Ayrıca qPCR tekniği örneklerde bulunan canlı bakteri sayısının gerçek tahminini yapamamaktadır. Ancak EMA-qPCR gibi geliştirilen yeni PCR çalışmaları bu sorunun üstesinden gelmektedir (Allegra ve diğ., 2011). EMA, etidyum bromürün fotoreaktif analogudur ve yapısında 8. pozisyonundaki amino grubu yerine azit grubu içermektedir (Rueckert ve Morgan, 2007).

EMA-qPCR tekniği EMA ile muameleden sonra gerçekleştirilen DNA izolasyonu ve Real Time PCR işlemi olup, etidyum mono azit hücre membranı zarar görmüş hücrelerin içine girerek fotoaktivasyonun ardından kovalent olarak nükleik asitlere bağlanmaktadır. Bu süreç azit grubun uzun dalga boylu ışık altında fotoaktivasyon ile aktive olmasını takiben nitrin aracılığı ile nükleik asitlerle çapraz bağlanması ile sonuçlanmaktadır. Bu yolla EMA'nın kovalent olarak bağlandığı nükleik asitlerde meydana gelen kırıklar dolayısıyla bu hücrelere ait nükleik asidin PCR işlemi ile çoğaltılması engellenirken sadece canlı hücrelere ait DNA çoğaltılmaktadır. Bu yolla örnekte bulunan canlı ve ölü hücreler ayrılabilen ve yalnızca canlı hücrelerin sayısının tespit edilmesi mümkün olmaktadır (Shi ve diğ., 2011; Loozen ve diğ., 2011; Chang ve Chou, 2011; Minami ve diğ., 2010; Rueckert ve Morgan, 2007; Inoue ve diğ., 2015).

3.6.2. EMA optimizasyon işlemi

Çalışma kapsamında kullanılacak EMA boyasının kullanımı ile ilgili olarak yapılan literatür araştırması sonucunda farklı EMA konsantrasyonları, karanlık ve ışık altında inkübasyon süreleri ve ışığa uzaklık mesafelerine rastlanılmıştır (Qin ve diğ., 2012; Khamisse ve diğ., 2012; Loozen ve diğ., 2011; Shi ve diğ., 2011; Chang ve Chou, 2011; Minami ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2009; Viscoglios ve diğ., 2009; Rueckert ve Morgan, 2007; Lee ve Levin, 2006; Rudi ve diğ., 2005; Chen ve Chang, 2010). Bu sebeple de çalışmada kullanılacak EMA (Sigma-Aldrich E2018) için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon deneylerinde daha önceki çalışmalarda sıklıkla kullanılan EMA konsantrasyonu olarak; 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml; karanlıkta bekleme süresi olarak 5 ve 10 dk; halojen lamba altında bekleme süresi olarak 1, 5, 10 ve 15 dk; ışığa uzaklık olarak 10 ve 20 cm koşulları denenmiştir. Bunların yanı sıra EMA muamelesi sonucunda santrifüj işlemi ile EMA'nın yıkama yapılarak ortamdan uzaklaştırılması ve yıkama yapılmadan EMA varlığında deneye devam etme, biyofilm ve planktonik fazdaki bakterilerin sayılarının az olabileceğinden kit ile tespit edilmesinin zor olması ihtimaline karşılık direk ve 10 kat yoğunlaştırılan örnekler denenmiştir. Ayrıca deney sistemi dışında 1/1 oranında canlı ve ölü bakteri karıştırılarak, sadece canlı ve sadece ölü bakterilerden oluşan süspansiyonlar kullanılarak da optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde farklı koşullara maruz bırakılmalarının ardından (farklı EMA konsantrasyonu, süreler, uzaklıklar vs) qPCR işlemi sonucunda en yüksek sonuçların alındığı değerler göz önüne alınmış olup deney prosedürü olarak örneklerin 10 kat yoğunlaştırılmasına, 1 ml örnek için 5 mg/ml'lik EMA solusyonundan alınan 1 µl ile (5 µg/ml) ile bir araya getirilip karanlıkta 5 dk süreyle inkübe edilmesinin ardından 600 Watt'lık halojen lamba altında lambaya 20 cm uzaklıkta olmak üzere 10 dk inkübasyonuna, uygulamanın ardından örneklerin 3 kez olmak üzere 16000 g'de 5 dk santrifüj edilerek PBS ile yıkanmasına karar verilmiştir.

3.6.3. Örneklerin Hazırlanması ve EMA ile Muamele

Çalışma kapsamında biyofilm örneklerinin EMA-qPCR yöntemi için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirildiği gibi her bir uygulama için 2 adet kupon yüzeyinden toplanarak 20 ml fosfat tamponu ile homojenize edilmiştir. Ardından

elde edilen biyofilm homojenatı soğutmalı santrifüj cihazında 10 d boyunca 6000 g'de santrifüj edilmiş ve çökelti 2 ml PBS ile toplanarak 10 kat yoğunlaştırılmıştır. Planktonik faz örnekleri de EMA-qPCR yöntemi için gerek kontrol gerekse tüm stres koşulları ve bu stres koşullarının tüm saatlerini kapsayan muamelenin ardından bakteriyolojik analiz için gerçekleştirildiği gibi uygulanan santrifüj, filtrasyon gibi işlemler ile 10 kat yoğunlaştırılmıştır.

EMA muamelesi için biyofilm ve planktonik faz örneklerinin elde edilen 10 kat yoğunlaştırılmış konsantrasyonlarından alınan 1000 µl'lik örnek, 5g/ml'lik EMA solüsyonundan alınan 1 µl ile bir araya getirilerek ışık almaması için üzeri alüminyum folyo ile sarılmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 5 dk süreyle inkübe edilmiştir. Karanlıkta gerçekleşen inkübasyonun ardından EMA ile karışmış halde bulunan örnek 600 Watt'lık halojen lamba altında, lambaya 20 cm uzaklıkta olmak üzere 10 dk süreyle ışığa maruz bırakılmıştır. Uygulamanın ardından EMA'nın uzaklaştırılması amacıyla örnek 3 kez olmak üzere 16000 g'de 5 dk santrifüj edilerek PBS ile yıkanmış ve son hacim olan 1000 µl elde edilmiştir.

3.6.4. DNA İzolasyonu ve PCR İşlemi

DNA izolasyonuna başlanmadan önce Bölüm 3.6.3.'te anlatıldığı üzere elde edilen 1000 µl bakteri süspansiyonu 9 ml PBS ile karıştırılmış ve örnek 0.2 µm por çaplı polikarbonat filtreden (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membranes) süzölmüştür. Bu yolla örnek içinde bulunan bakterilerin filtre yüzeyinde tutunması sağlanmıştır. Bundan sonra gerçekleştirilen izolasyon işlemi, üzerinde bakterilerin bulunduğu filtrenin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında su örneklerinde bulunan bakterilerin DNA izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla ticari olarak hazırlanmış olan test kiti kullanılmıştır (Aquadien™ DNA Extraction Kit Bio-Rad 357-8121). İzolasyon adımları kit içinde bulunan kimyasallar ve önerilen adımlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Su örneğinden izole edilerek saflaştırılan DNA'nın Real Time kantitatif PCR işlemi için ticari olarak hazırlanmış olan test kiti kullanılmıştır (iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* kits Bio-Rad 357-8103). PCR işlemi öncesinde kit içinde bulunan kimyasallar önerilen adımlar doğrultusunda izole edilen DNA ile bir araya getirilmiştir. Real-Time PCR işlemi

sırasında başlangıç denatürasyonu için 95°C’de 2 dakikanın ardından 50 siklus olarak denatürasyon için 95°C’de 15 sn, bağlanma için 50°C’de 20 sn ve uzama için 72°C’de 30 sn uygulanmıştır. Final uzaması için 72°C’de 5 dk beklenmiştir (Bonetta ve diğ., 2009; Reischl ve diğ., 2006; Petzold ve diğ., 2013) İşlem, Agilent MX3005p Real-Time QPCR System cihazında gerçekleştirilmiş olup kit üretici firma tarafından belirlenen formül ile genomik birim hesaplanmıştır.

$$X = \frac{5 \mu\text{l örnekte PCR sonucu okunan değer} \times Z \times D}{\text{Filtre edilen örnek miktarı}} \quad (3.4)$$

X:1 litre örnekte bulunan genomik birim

Z:İzolasyon katsayısı

D: Sulandırım faktörü (Bio-Rad, iQ-Check™ Quanti *L.pneumophila* Kit, Cat: 357-8103)

3.7. SU SİRKÜLASYON TANKI İŞLETİM KOŞULLARI ÖLÇÜMLERİ

3.7.1. Toplam Çözünmüş Madde Ölçümü

Çalışma sırasında model sistem içerisindeki suda bulunan TÇM analizi yapılmıştır. Sistemdeki TÇM ölçümü 4 haftalık periyotlar halinde gerçekleştirilmiştir. İşlem dijital iki kanallı multimetre (HACH-LANGE HQ40D) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm yapılmadan önce cihaz distile su ile kalibre edilmiştir. Sirkülasyon sistemlerinde su saf olarak buharlaşırken, mineraller gibi çözünmeyen bileşikler sistem içerisinde çözünmüş olarak artmaya başlamaktadırlar. Bu durum deşarj yapımını gerektirmektedir. Soğutma kuleleri için yapılması gereken deşarj işlemi, konsantrasyon oranı hesabı ile belirlenmektedir. Sistemden deşarj olan suyun kalitesi ve kaybolan suyun yerini tamamlamak için eklenen suyun kalitesi arasındaki ilişki ‘konsantrasyon oranı’ veya ‘konsantrasyon devri’ olarak tanımlanmaktadır. Deşarj suyunun TÇM değerinin şebeke suyu TÇM değerine oranı tank suyunun konsantrasyon oranını vermektedir. En etkili kullanım, konsantrasyon oranı arttırılıp sistemden uzaklaşan su oranı azaldığında gerçekleşmektedir (Gleeson ve Gray, 1997).

3.7.2. Çözünmüş Oksijen Ölçümü

Çalışma sırasında model sistem içerisindeki suda bulunan çözünmüş oksijen miktarı oksimetre cihazı (WTW - Oxi 330) ile ölçülmüştür. Cihaz her kullanımdan önce distile su kullanılarak kalibre edilmiştir. Sistemdeki çözünmüş oksijenin ölçümü 4 haftalık periyotlar halinde gerçekleştirilmiştir.

3.7.3. Sıcaklık ve pH Ölçümü

Çalışma sırasında model sistem içerisindeki suyun sıcaklık ve pH değerleri HACH-LANGE HQ40D cihazı ile ölçülmüştür. Cihaz her kullanımdan önce distile su kullanılarak kalibre edilmiştir. Sistemdeki suyun sıcaklık ve pH ölçümü 4 haftalık periyotlar halinde gerçekleştirilmiştir.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışma kapsamında farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerdeki her bir stres koşul grubu (sıcaklık, pH vs) için ayrı olmak üzere, uygulanan stres koşul değeri (4°C, 37°C ve 65°C; pH 3 ve pH 5 vs) uygulama saati ve kullanılan teknikler açısından aerobik heterotrofik bakteri sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analiziyle incelenmiştir. İki yönlü varyans analizi sonucunda ortalamaların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğu sonuçlara ulaşılmıştır. Devamında gerçekleştirilen Post-Hoc (Çoklu karşılaştırma) analiziyle ile de hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD (En düşük anlamlı fark) testi kullanılmıştır. Aynı adımlar takip edilerek planktonik faz örneklerinin de istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir.

Yukarıda bahsi geçen analizlerin dışında farklı stres koşullarına maruz bırakılan örneklerdeki her bir stres koşul grubu ve teknik için ayrı olmak üzere, uygulanan stres koşul değeri, uygulama saati ve gruplar (biyofilm ve planktonik faz) açısından aerobik heterotrofik bakteri ve *L. pneumophila* sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analiziyle incelenmiştir. İki yönlü varyans analizi sonucunda ortalamaların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğu sonuçlara ulaşılmıştır. Devamında gerçekleştirilen Post-Hoc analiziyle ile de hangi parametre, saat ve gruplardaki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

EMA-qPCR işleminde her analizde sonuç elde edilememiş olması ve örnek sayısının analiz için az (< 12) olması nedeniyle istatistiksel analiz uygulanmamıştır.

3.9. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.9.1. R2A Agar

Aerobik heterotrofik bakterilerin izolasyon ve sayımı amacıyla kullanılan besiyerinin bileşimi;

Maya özütü	0.5 g
Trypton	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 g
Distile su	1000 ml

121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.2. CYE (Charcoal yeast extract) Agar

Legionellaceae familyasında bulunan bakterilerin izolasyon ve sayımı amacıyla kullanılan besiyerinin bileşimi;

Aktif kömür	2 g
Maya özütü	10 g

Agar	13 g
Distile su	1000 ml

121°C’de 15 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından 45-50°C’ye soğutulan CYE Agar üzerine sıcaklığı 45-50°C’ye yükseltilen BCYE besiyeri katkı maddesi ilave edilmiştir.

3.9.3. BCYE Besiyeri Katkısı

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

ACES tampon/Potasyum hidroksit	5 g
Ferrik pirofosfat	0.125 g
L-sistein HCL	0.20 g
α - ketoglutarat	0.50 g
Steril distile su	50 ml

Steril distile su ilavesi ile içeriğin çözülmesi sağlanmış ve ardından su banyosunda sıcaklığı 45-50°C’ye yükselterek CYE Agara ilave edilmiştir.

3.9.4. Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)

Biyofilm bakterilerinin cam kupon yüzeylerinden kaldırılması, deney örneklerinin sulandırılması, asidik ve bazik stres koşullarının hazırlanması sırasında hücreler için izotonik ortam sağlaması amacıyla kullanılan solusyonun bileşimi;

Sodyum klorür	8 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'e ayarlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.5. 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)

CTC boyası örnekteki aktif olarak solunum yapan hücrelerin epifloresan mikroskopta floresan ışık altında görünür hale gelerek sayılabilmesi için kullanılmıştır.

50 mM stok solusyon için 50 mg boya içeren tüpe 3209 µl filtre edilmiş steril bidistile su eklenmiş ve hazırlanan solusyon 150 µl hacimlerde Eppendorf tüplerine paylaştırılarak -20°C'de saklanmıştır.

3.9.6. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

DAPI boyası DNA'ya bağlanma özelliği dolayısıyla örnekteki toplam hücre sayısının epifloresan mikroskopta floresan ışık altında görünür hale gelerek sayılabilmesi için kullanılmıştır.

1 mg/ml stok solusyon için 50 mg DAPI boyası 50 ml filtre edilmiş bidistile su içinde çözülmüş ve ardından filtre edilmiş bidistile su ile 50 kat sulandırım yapılarak çalışma süspansiyonu olan 20 mg/l değeri elde edilmiştir. Elde edilen bu süspansiyon 1000 µl hacimlerde Eppendorf tüplerine paylaştırılarak -20°C'de saklanmıştır.

3.9.7. Etidyum Monoazid Bromür (EMA)

EMA örnekteki canlı bakterilerin qPCR işleminde ölü bakterilerden ayrılmasını sağlamak için kullanılmıştır.

5 g/ml'lik stok solusyon için 5 g stok EMA içeren tüpe 1000 µl filtre edilmiş steril bidistile su eklenmiş ve 20 µl hacimlerde Eppendorf tüplerine paylaştırılarak -20°C'de saklanmıştır.

3.9.8. pH Çözeltilerinin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan pH 3 ve pH 11'lik süspansiyonlar için Bölüm 3.9.4.'te belirtildiği gibi fosfat tamponu hazırlanmıştır. İşlemin ardından hazırlanan 1M ve 3M'lık HCl ile 1M

ve 3M'lık KOH çözeltilerinin steril koşullarda eklenmesiyle uygun pH değerleri elde edilmiştir.

3.11.8.1. 1M HCl Çözeltisi

HCl 36.46 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.8.2. 3M HCl Çözeltisi

HCl 109.38 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.8.3. 1M KOH Çözeltisi

KOH 56.1 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.8.4. 3M KOH Çözeltisi

KOH 168.3 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9. Dezenfektan Çözeltilerinin Hazırlanışı

Çalışmada dezenfeksiyon etkisinin test edilmesi amacıyla kullanılan dezenfektanların içeriği;

3.9.9.1. 2 ppm Klor Çözeltisi

%5'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit / Ticari çamaşır suyu / 50000 ppm klor) 0.04 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9.2. 4 ppm Klor Çözeltisi

%5'lik NaOCl 0.08 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9.3. 10 ppm Klor Çözeltisi

%5'lik NaOCl 0.2 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9.4. 20 ppm Klor Çözeltisi

%5'lik NaOCl 0.4 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9.5. 2 ppm Monokloramin Çözeltisi

Amonyum klorür 0.01 g

Sodyum karbonat 0.008 g

%5'lik NaOCl 0.096 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

1 N Sodyum hidroksil (NaOH) ile pH 9'a ayarlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9.6. 4 ppm Monokloramin Çözeltisi

Amonyum klorür 0.02 g

Sodyum karbonat	0.016 g

%5'lık NaOCl	0.192 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

1 N NaOH ile pH 9'a ayarlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9.7. 10 ppm Monokloramin Çözeltisi

Amonyum klorür	0.05 g

Sodyum karbonat	0.04 g

%5'lık NaOCl	0.48 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

1 N NaOH ile pH 9'a ayarlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.9.8. 20 ppm Monokloramin Çözeltisi

Amonyum klorür	0.1 g

Sodyum karbonat	0.08 g

%5'lık NaOCl	0.95 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

1 N NaOH ile pH 9'a ayarlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.10. Sodyum Tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) Çözeltilerinin Hazırlanışı

3.9.10.1. %0.5'lik Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi

Klor ve monokloramin nötralizasyonu için kullanılmıştır.

Sodyum tiyosülfat 5 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.10.2. %1'lik Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi

Klor ve monokloramin nötralizasyonu için kullanılmıştır.

Sodyum tiyosülfat 10 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.11. Tuz Çözeltilerinin Hazırlanışı

Çalışmada ozmotik konsantrasyon etkisinin test edilmesi amacıyla kullanılan tuz süspansiyonlarının içeriği;

3.9.11.1. %0.1'lik Tuz Çözeltisi

NaCl 1 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.11.2. %0.2'lik Tuz Çözeltisi

NaCl 2 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.11.3. %3'lük Tuz Çözeltisi

NaCl 30 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.9.11.4. %6'lık Tuz Çözeltisi

NaCl 60 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dk steril edilmiştir.



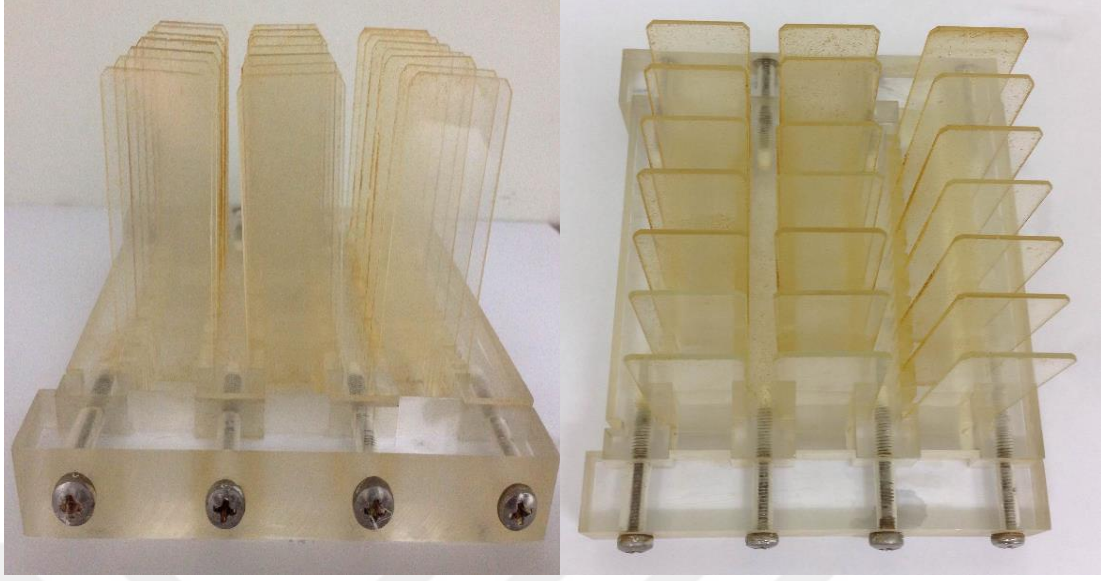
4. BULGULAR

Çalışma kapsamında aylık olarak sistem suyunun pH, çözünmüş oksijen ve toplam çözünmüş madde değerler ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda sistem pH'ı 7.34-8.44 arasında değişmiş olup, söz konusu değerler soğutma kulesinde tespit edilen değerler ile uyumludur. Çözünmüş oksijen değerinde ilerleyen zamanla birlikte azalma tespit edilmiştir. Toplam çözünmüş madde değeri 3.1'de anlatıldığı üzere 'make up' prensibi ile taze su eklemesinin ardından 316- 576 mg/l arasında değişim göstermiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Toplam deney süresince ölçülen pH, çözünmüş oksijen ve TÇM miktarları.

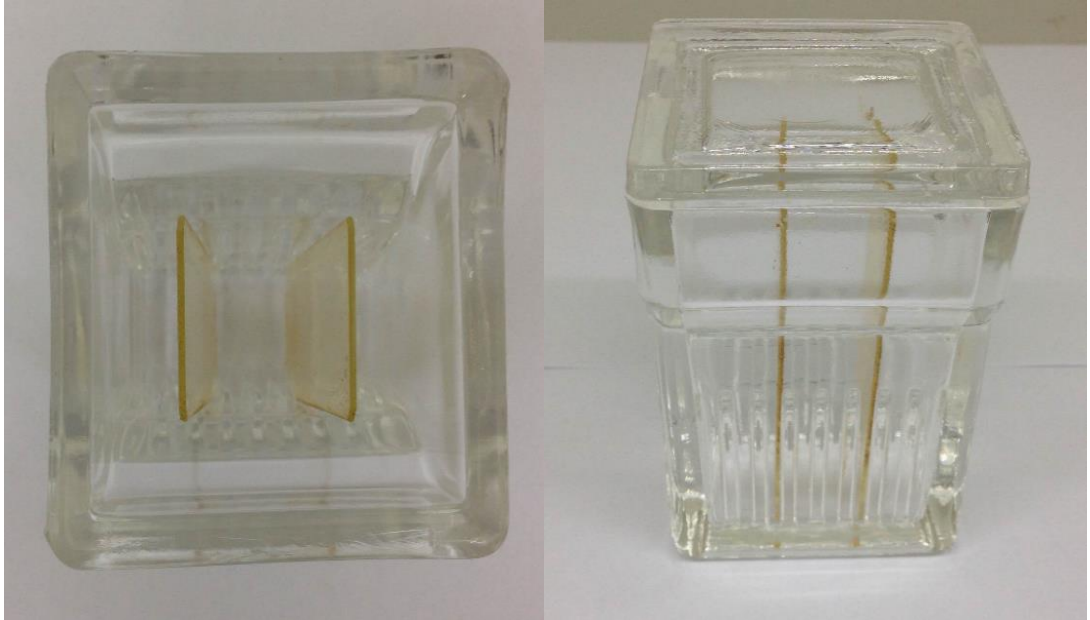
Aylar	pH	Çözünmüş Oksijen (mg/l)	TÇM (mg/l)
1	7.34	7.94	316
2	7.97	7.93	412
3	7.84	7.46	430
4	8.08	7.29	576
5	8.05	6.76	514
6	8.34	6.57	496
7	8.44	6.52	320
8	8.25	6.50	316

Soğutma kulesi model sistemi içinde 14 haftalık biyofilm oluşumu periyodu sonucunda, sistemden çıkarılan kuponların yüzeyinde çıplak gözle görülebilecek oranda biyofilm meydana gelmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: 14 haftalık biyofilm oluşum süreci sonunda parametrelerle muamele edilmek üzere sistem çıkarılan cam kuponlar.

Sistemden çıkarılan cam kuponlar steril koşullar altında deney parametre solüsyonları ile bir araya getirilmiş ve deney süreleri olan 1, 4 ve 24 saat süreyle steril şalelerde kapakları kapalı olarak inkübe edilmişlerdir (Şekil 4.2).



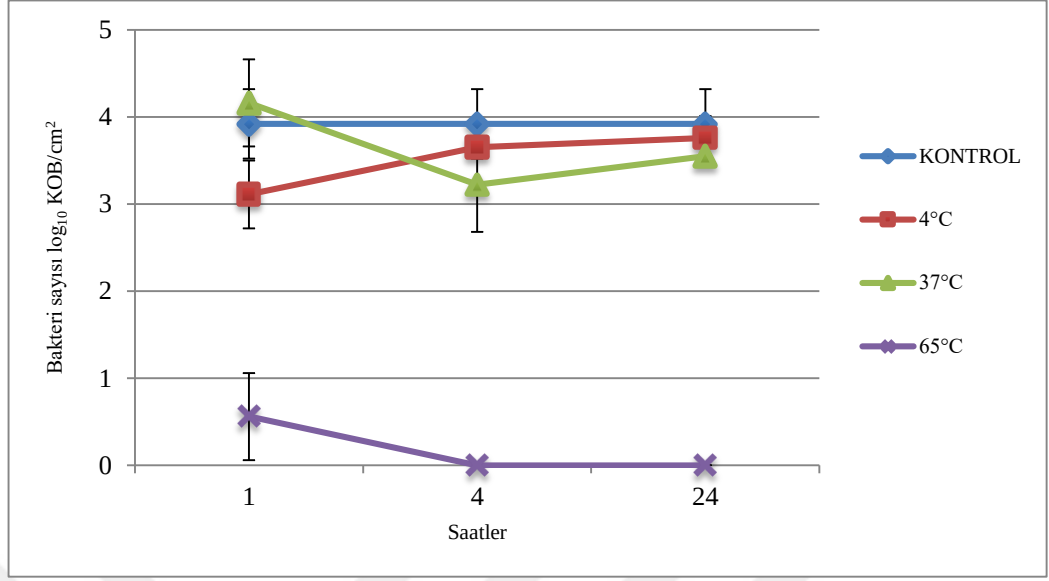
Şekil 4.2: Kuponların parametre solüsyonları ile inkübasyonu.

4.1. SICAKLIK UYGULAMA SONUÇLARI

4.1.1. Sıcaklık - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde ise artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. saatte azalma, 24. saatte ise artış gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.3).

Sıcaklığın biyofilmde bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.16 log'luk azalma ile elde edilen 3.76 değeri ile 4°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazındaki aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın üremenin gözlenmediği 65°C'nin 4 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

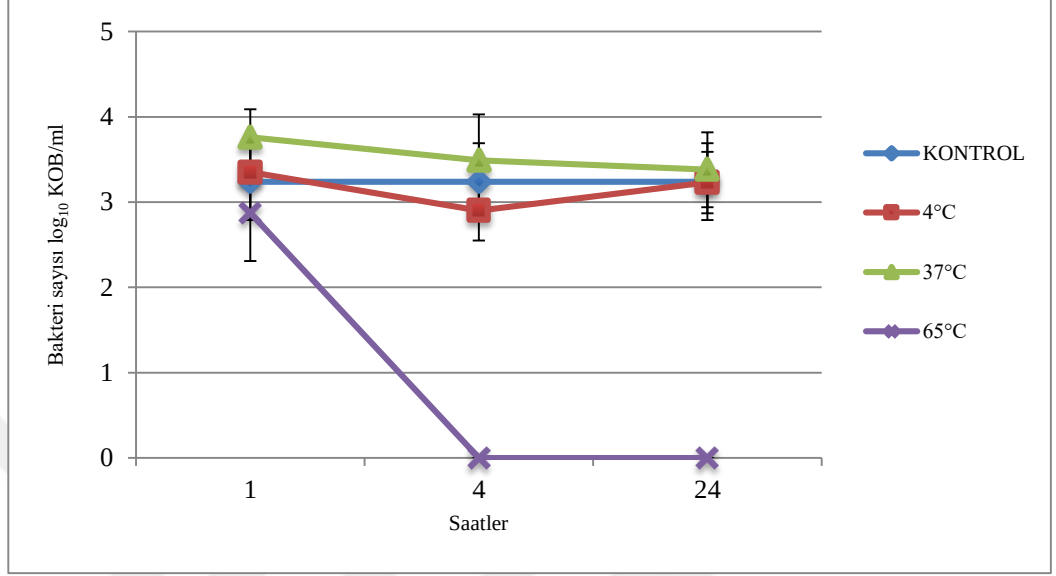
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda, uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.1.2. Sıcaklık - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda gözlenen artışın ardından 4. saatin sonunda azalma, 24. saatte ise artış gözlenmiştir. 37°C için 24 saatlik deney süresince kontrol örneğine kıyasla daha fazla mikroorganizma elde edilmesine karşın ilerleyen zamanla birlikte azalma meydana gelmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.4).

Sıcaklığın planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.01 log'luk azalma ile elde edilen 3.23 değeri ile 4°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazdaki aerobik heterotrofik

bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın üremenin gözlenmediği 65°C'nin 4 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

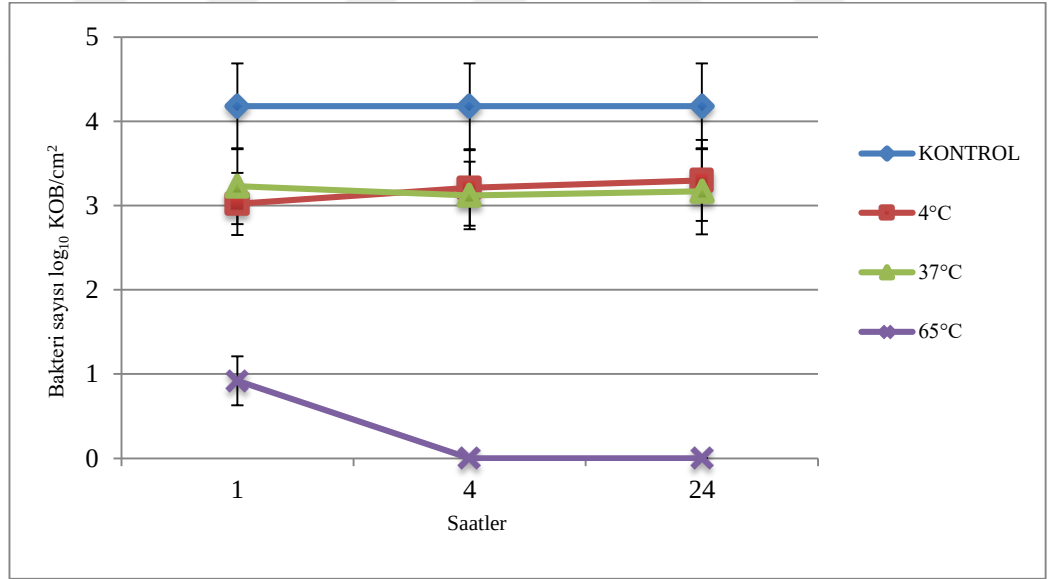
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı sıcaklık değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

Hangi parametre ve hangi saatlerin birbirinden anlamlı olarak farklılaştığının incelendiği Post-Hoc analizi ve bunun için gerçekleştirilen LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün 37°C'den anlamlı olarak farklılaşmadığı ama diğer iki sıcaklık değerinden anlamlı olarak farklılaştığı; 4°C ve 65°C'nin de birbirinde anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaşmadığı; 4. saatin 1. saatten anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin 4. saatten anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. 24. saatin ise kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.1.3. Sıcaklık - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* bakterilerinde 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde ise artış gözlenmiştir. 37°C için 1. ve 4. saatlerin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 24. saatte ise artış gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.5).

Sıcaklığın biyofilmde bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneklerine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.88 log'luk azalma ile elde edilen 3.3 değeri ile 4°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan *L. pneumophila* üzerinde en etkili uygulamanın üremenin gözlenmediği 65°C'nin 4 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

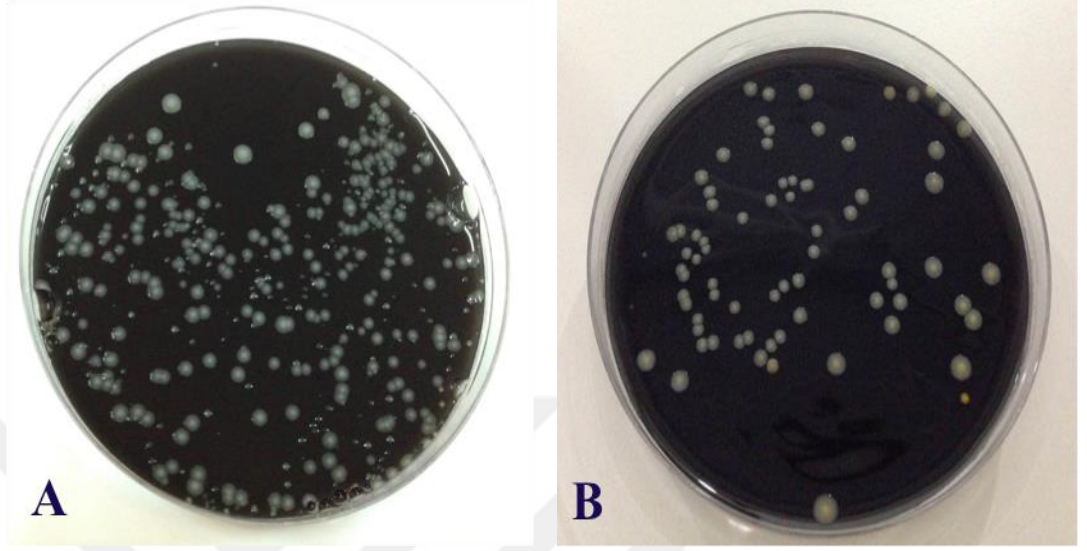


Şekil 4.5: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında

anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

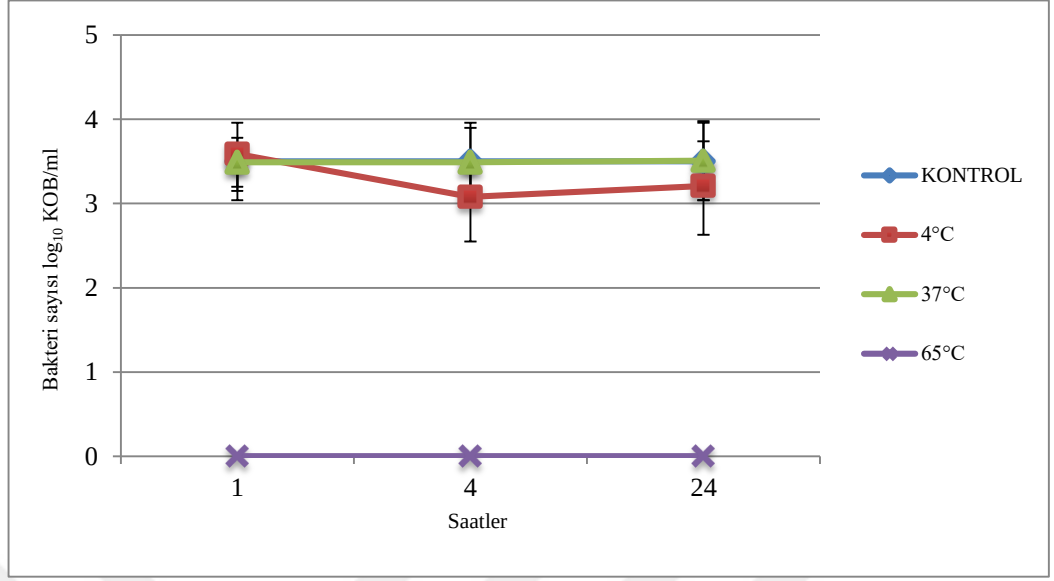


Şekil 4.6: BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* koloni görüntüleri. A) Kontrol örneği B) 65°C sıcaklık ile 1. saatlik muamele örneği.

4.1.4. Sıcaklık - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* sayısında 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış gözlenirken 4. saatin sonunda azalma, 24. saatin sonunda ise yeniden artış gözlenmiştir. 37°C için 1., 4. ve 24. saatlerde kontrol örneğine yakın değerler elde edilmiştir. 65°C için 1., 4. ve 24. saatte üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.7).

Sıcaklığın planktonik fazda bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 1., 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise kontrol ile aynı değer elde edildiği 3.51 değeri ile 37°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan *L. pneumophila* üzerinde en etkili uygulamanın üremenin gözlenmediği 65°C'nin 1 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı sıcaklık değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

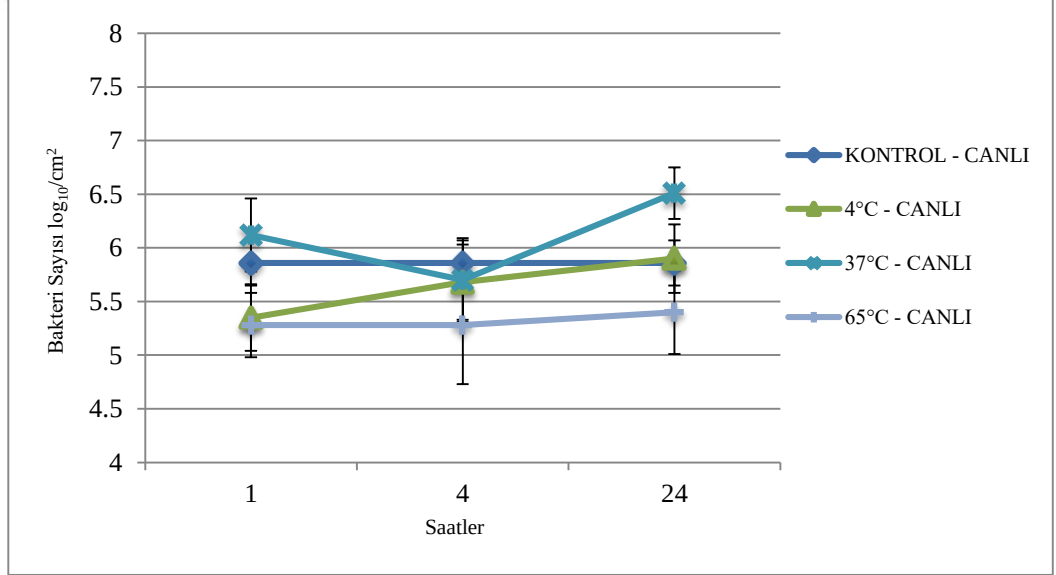
LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrol ve 65°C'nin tüm sıcaklık değerlerinden anlamlı olarak farklılaştığı; 4°C'nin de 65°C'den anlamlı olarak farklılaştığı ancak 37°C'den anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.1.5. Sıcaklık - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. saatte

azalma, 24. saatte ise artış gözlenmiştir. 65°C için 1. ve 4. saatlerin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir (Şekil 4.8).

Sıcaklığın biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.58 log'luk azalma ile elde edilen 5.28 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 1. ve 4. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.16 log'luk azalma ile elde edilen 5.7 değeri ile 37°C uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).

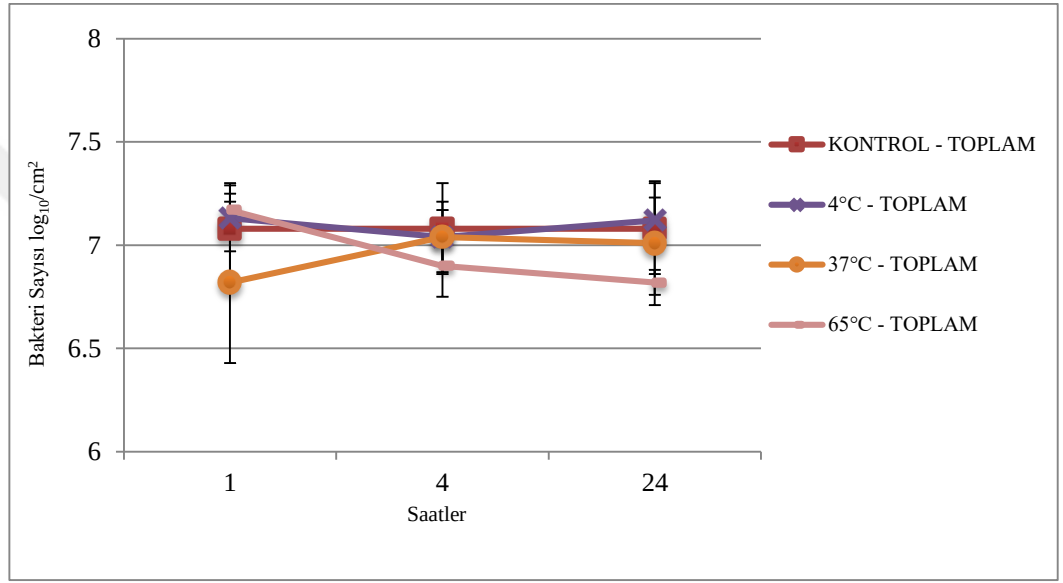


Şekil 4.8: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. saatte azalma, 24. saatte ise yeniden artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. saatte artış, 24. saatte ise azalma gözlenmiştir. 65°C için ise 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Sıcaklığın biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine kıyasla en yüksek düşüş 0.26 log'luk azalma ile elde edilen 6.82 değeri ile 37°C uygulaması sonucunda 1. saatte ve 65°C uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. 65°C sıcaklık uygulaması sonucunda 1. saatte kontrol örneğine kıyasla 0.09 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.17 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

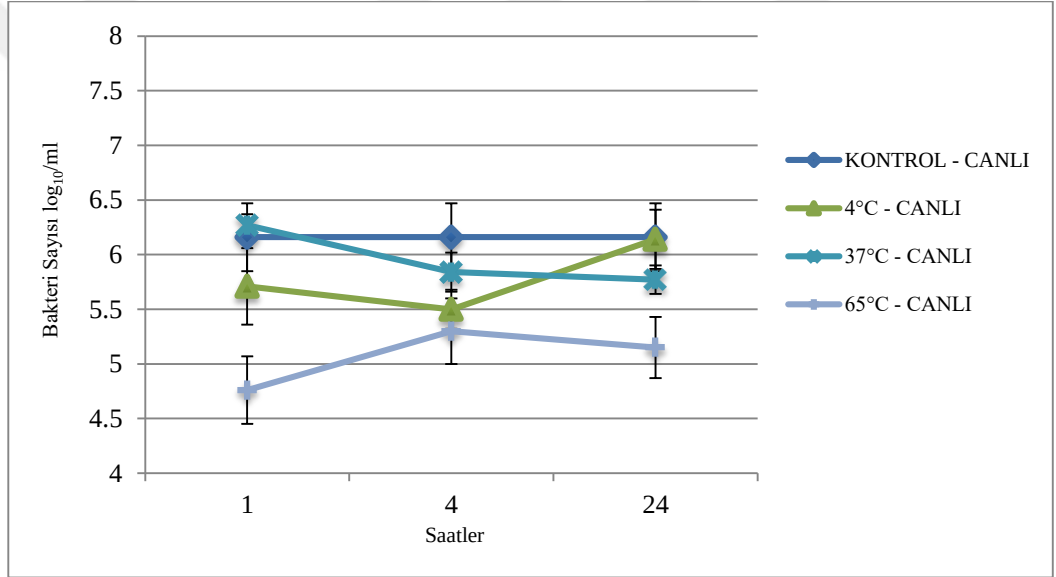
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.1.6. Sıcaklık - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 4°C için 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma gözlenirken 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış gözlenirken 4. ve 24. saatlerde azalma

gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. saate artış, 24. saatten itibaren yine bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.10).

Sıcaklığın planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.4 log'luk azalma ile elde edilen 4.76 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.02 log'luk azalma ile elde edilen 6.14 değeri ile 4°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



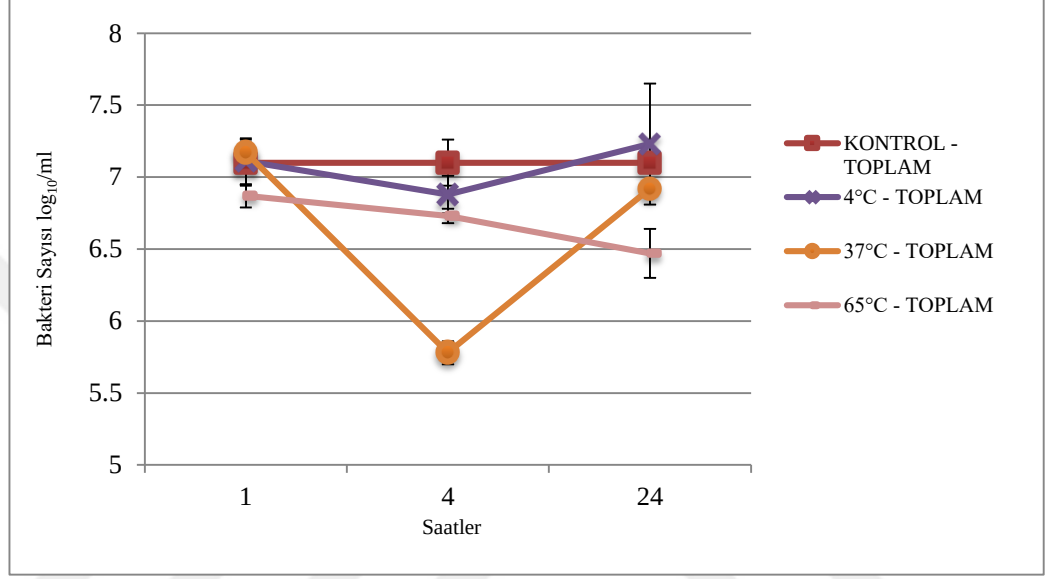
Şekil 4.10: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 4°C ve 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla artış meydana gelirken, 4. saatin sonunda azalma ve 24. saatin sonunda ise yeniden artış gözlenmiştir. 65°C için ise toplam bakteri sayısında zamanla azalma gözlenmiştir (Şekil 4.11).

Sıcaklığın planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.32 log'luk azalma ile elde edilen 5.78 değeri ile 37°C

uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. 4°C sıcaklık uygulaması sonucunda 24. saatte kontrol örneğine oranla 0.13 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.23 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

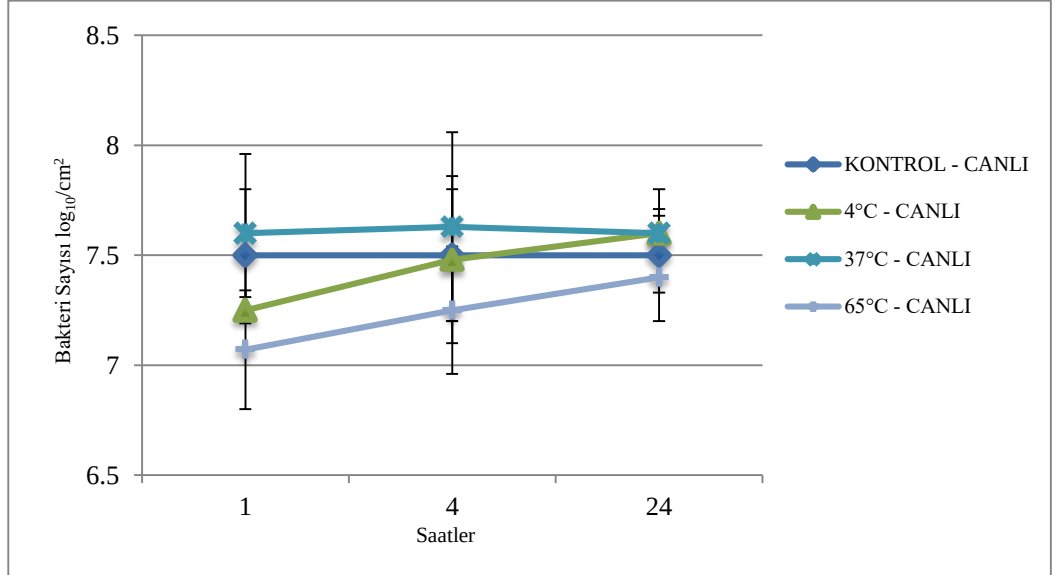
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı sıcaklık değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrol ve 37°C'nin birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı; 65°C ve 4°C'nin hem kontrolden hem de birbirlerinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD tablosuna bakıldığında saatler açısından tüm saatlerin birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı; ancak 24. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir.

4.1.7. Sıcaklık - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. saatte artış, 24. saatte ise azalma gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir (Şekil 4.12).

Sıcaklığın biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.43 log'luk azalma ile elde edilen 7.07 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.2 log'luk azalma ile elde edilen 7.48 değeri ile 4°C uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12).



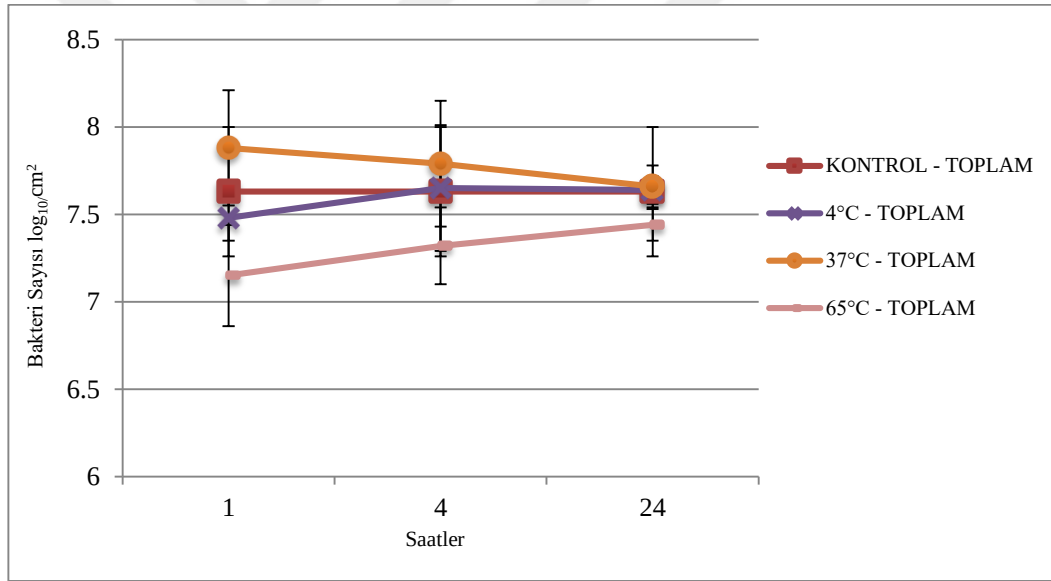
Şekil 4.12: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda

kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. saatte artış, 24. saatte azalma gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde ise azalma gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Sıcaklığın biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.48 log'luk azalma ile elde edilen 7.15 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. 37°C sıcaklık uygulaması sonucunda 1. saatte kontrol örneğine oranla 0.25 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.88 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

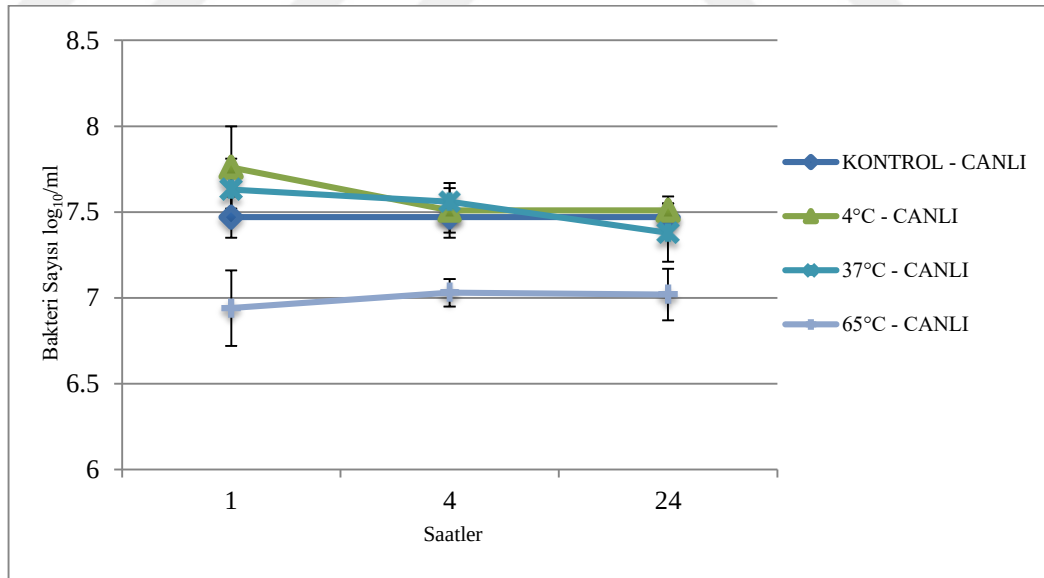
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan incelendiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.1.8. Sıcaklık - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. saatte azalma, 24. saatte ise artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde ise azalma gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. saatte artış, 24. saatte ise azalma gözlenmiştir (Şekil 4.14).

Sıcaklığın planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneklerine oranla en yüksek düşüş 0.53 log'luk azalma ile elde edilen 6.94 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneklerine oranla en az düşüş ise 0.09 log'luk azalma ile elde edilen 7.38 değeri ile 37°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



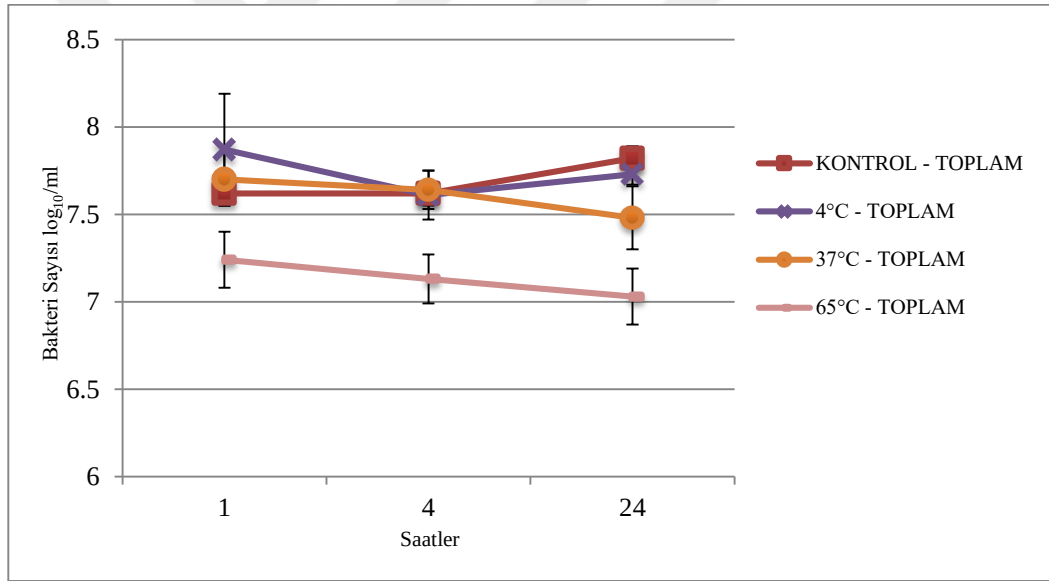
Şekil 4.14: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda

kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. saatte azalma, 24. saatte ise artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla artış meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde ise azalma gözlenmiştir. 65°C için ise toplam bakteri sayısında zamanla azalma gözlenmiştir (Şekil 4.15).

Sıcaklığın planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneklerine oranla en yüksek düşüş 0.79 log'luk azalma ile elde edilen 7.03 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. 4°C sıcaklık uygulaması sonucunda 1. saatte kontrol örneğine oranla 0.25 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.87 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

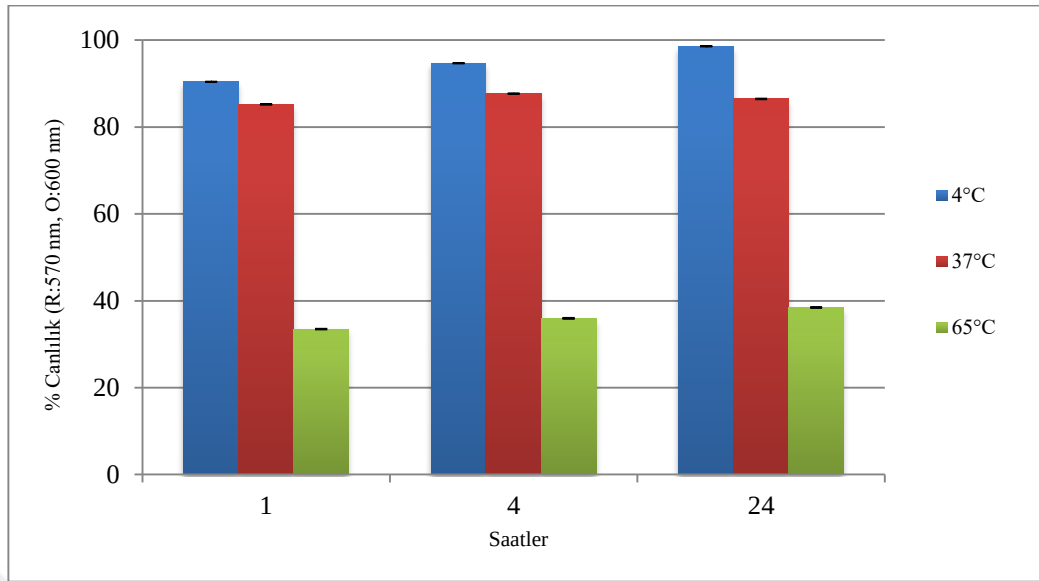
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı sıcaklık değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından 65°C'nin tüm sıcaklık değerlerinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Kontrol ve 4°C'nin ise birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından hiçbir saatin anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir.

4.1.9. Sıcaklık - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde 4°C için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerin sonunda artış gözlenmiştir. 37°C için 1. saatteki azalmayı 4. saatte artış izlemiş olup 24. saatte azalma gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir (Şekil 4.16).

Sıcaklığın biyofilm fazında bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 66.54'lük azalma ile elde edilen % 33.46 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 1.43'lük azalma ile elde edilen % 98.57 değeri ile 4°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

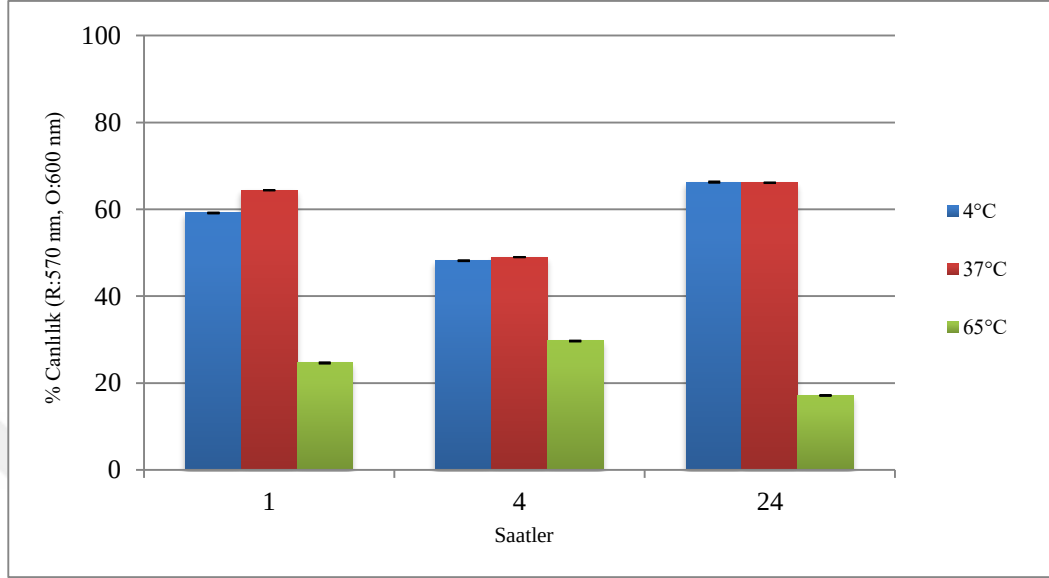
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.1.10. Sıcaklık - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde 4°C için 1. ve 4. saatlerde azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. 37°C için 1. ve 4. saatlerde azalma meydana gelmiş olup 24. saatte artış gözlenmiştir. 65°C için 1. saatin sonunda azalma meydana gelmiş olup 4. saatin sonunda artış, 24. saatin sonunda tekrar azalma gözlenmiştir (Şekil 4.17).

Sıcaklığın planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 82.83'lük azalma ile elde edilen % 17.17 değeri ile 65°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 33.76'lık azalma ile elde edilen % 66.24 değeri ile 4°C uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan

bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın 65°C muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan sıcaklık değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı sıcaklık değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrol ve 65°C'nin tüm sıcaklık değerlerinden anlamlı olarak farklılaştığı; 4°C'nin kontrol ve 65°C'den anlamlı olarak farklılaştığı ancak 37°C'den anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından tüm saatlerin birbirinden ve 24. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

Sıcaklık uygulaması kapsamında hem biyofilm hem de planktonik bakteriler için uygulanan teknikler arasında çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre biyofilm ve planktonik faz

örnekleri için LIVE/DEAD tekniği ile diğer tüm teknikler arasında anlamlı fark bulunmuştur. Kültür, CTC-DAPI ve Alamar blue teknikleri arasında ise anlamlı fark bulunmamıştır. LIVE/DEAD tekniği, diğer tekniklere oranla daha yüksek sayıda canlı bakterinin tespit edilmesini sağladığından dolayı en güvenilir teknik olarak belirlenmiştir.

4.1.11. Sıcaklık - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm fazı örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında 65°C uygulaması sonucunda 1. saatte elde edilen canlı bakteri sayısının 4°C uygulaması sonucu 24. saatte elde edilen canlı bakteri sayısından daha az olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Farklı sıcaklık koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU(Genomik birim)/cm²).

	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	0	0	0
4°C	0	0	0.82
37°C	0	0	0
65°C	0.39	0	0

4.1.12. Sıcaklık - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında 37°C uygulaması sonucunda zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir. 65°C uygulamasında ise 1. saatin sonunda tespit edilen canlı bakteri sayısının 4°C uygulamasının 24. saatinde elde edilen canlı bakteri sayısından daha az olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Farklı sıcaklık koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).

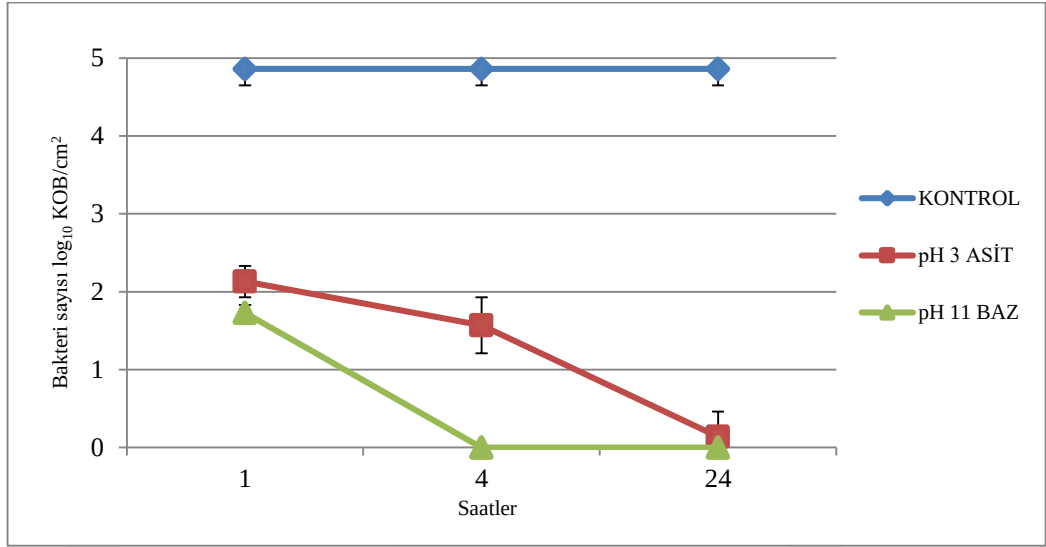
	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	0	0	0
4°C	0	0	8.6
37°C	5.06	1.18	0
65°C	1.34	0	0

4.2. PH UYGULAMA SONUÇLARI

4.2.1. pH - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde pH 3 asit için 1., 4. ve 24. saatlerin sonunda giderek artan bir azalma meydana gözlenmiştir. pH 11 baz için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.18).

pH'ın biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneklerine oranla en az düşüş ise 2.73 log'luk azalma ile elde edilen 2.13 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın üremenin görülmemesine bağlı olarak pH 11 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

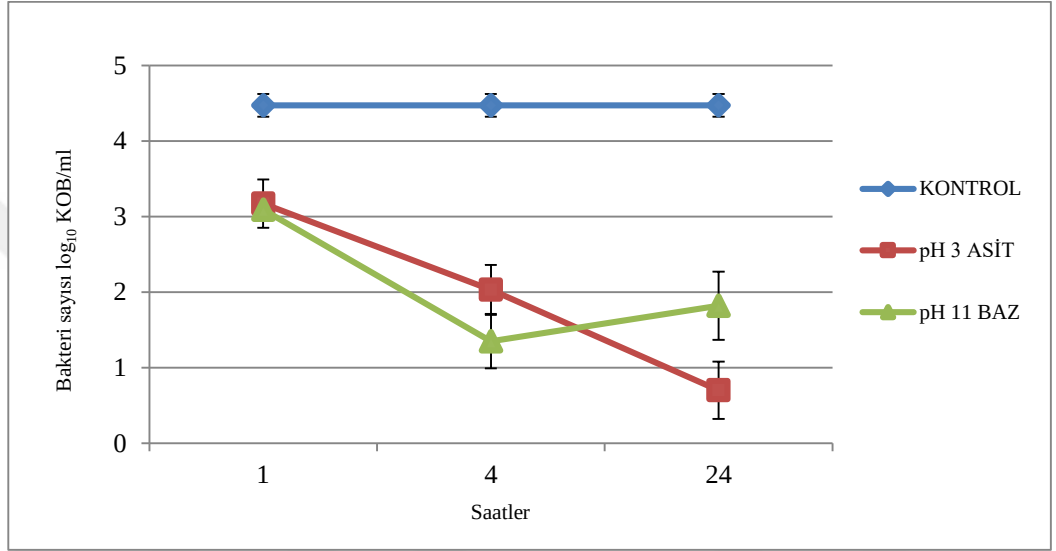
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.2.2. pH - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde pH 3 için 1., 4. ve 24. saatlerin sonunda azalma meydana gelmiştir. pH 11 için ise 1. ve 4. saatin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 24. saatte üremede artış gözlenmiştir (Şekil 4.19).

pH'ın planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 3.77 log'luk azalma ile elde edilen 0.7 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 1,3 log'luk azalma ile elde edilen 3.17 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 3 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19).

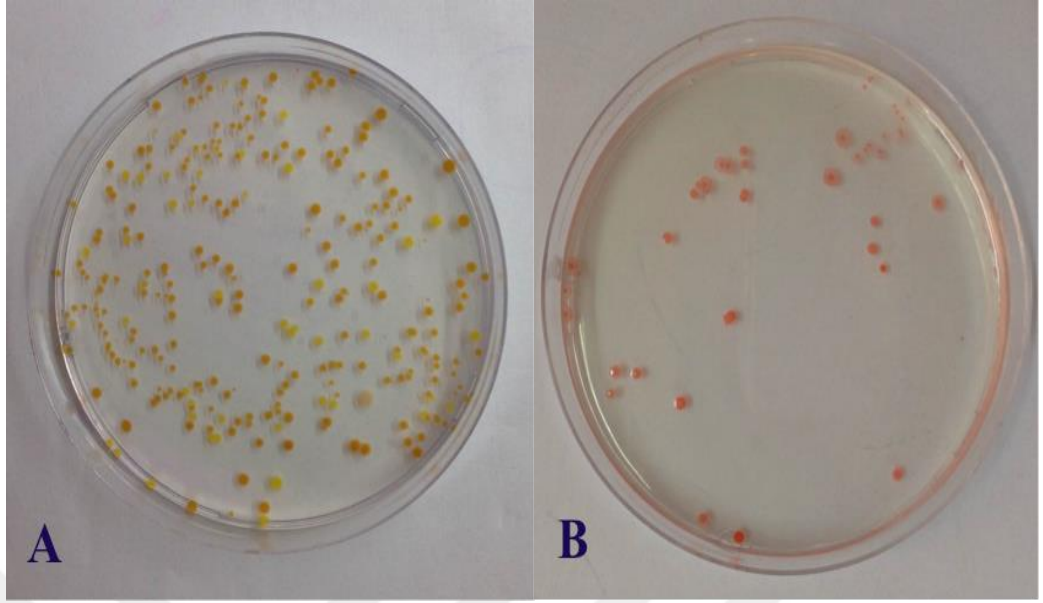
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı pH değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.19: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki pH değerinden de anlamlı olarak farklılaştığı; pH 3 ve pH 11'in ise birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

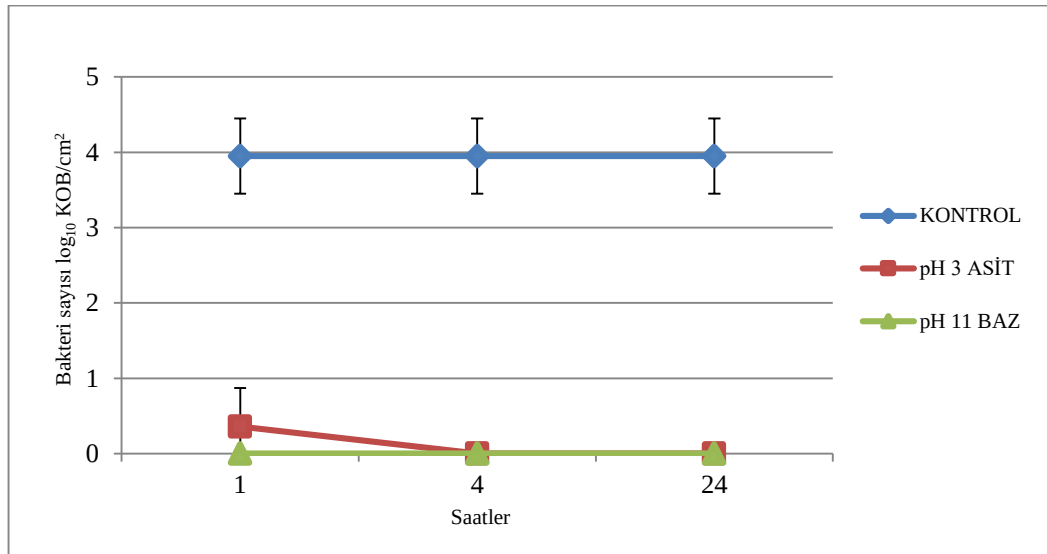


Şekil 4.20: R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakteri koloni görüntüleri. A) Kontrol örneği, B) pH 3 ile 24. saatlik muamele örneği.

4.2.3. pH - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* sayısında pH 3 için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir. pH 11 için ise her üç saatte de üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.21).

pH'ın biyofilm fazında bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 1., 4. ve 24. saatlerde; pH 11 uygulaması sonucunda da 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 3.59 log'luk azalma ile elde edilen 0.36 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan *L. pneumophila* üzerinde daha etkili olan uygulamanın üremenin görülmemesine bağlı olarak pH 11'in 1 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

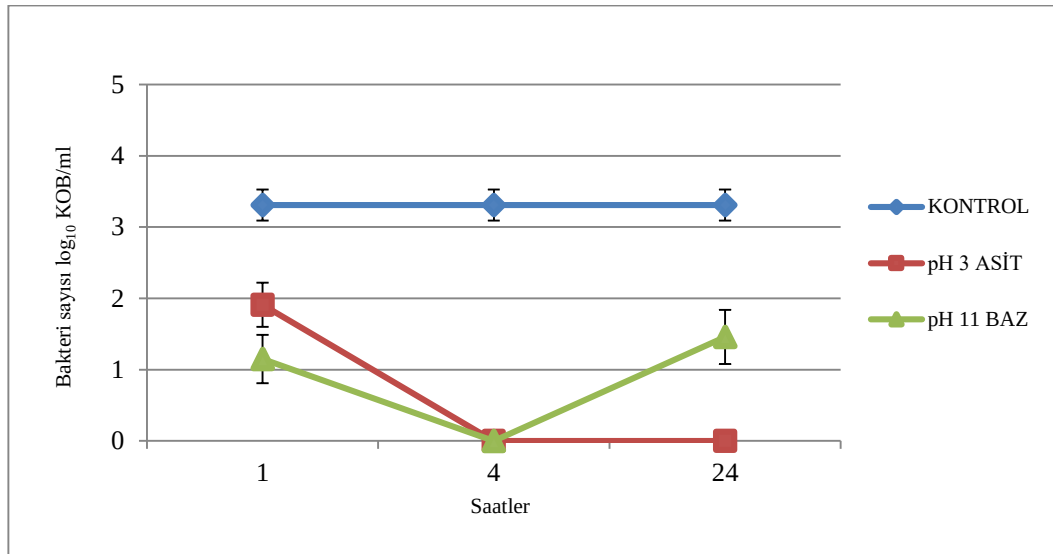
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.2.4. pH - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* sayısında pH 3 için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla üremede azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir. pH 11 için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken, 4. Saatte üreme olmamış olup 24. saatte üremede artış gözlenmiştir (Şekil 4.22).

pH'ın planktonik fazda bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 4. ve 24. saatlerde; pH 11 uygulaması sonucunda da 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 1.4 log'luk azalma ile elde edilen 1.91 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan *L. pneumophila* üzerinde daha etkili olan uygulamanın üremenin görülmemesine bağlı olarak pH 3 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

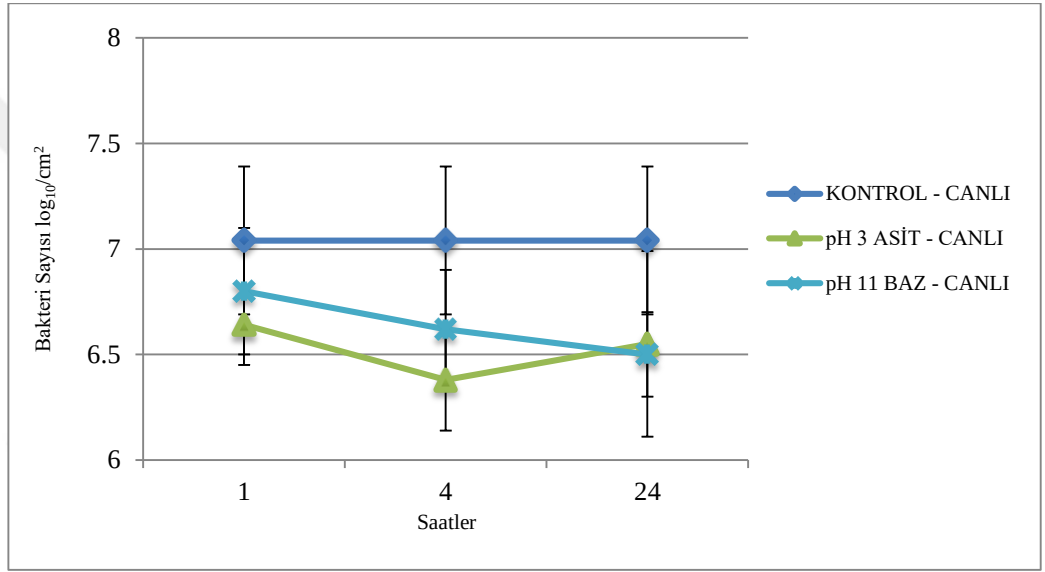
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı pH değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki pH değerinden de anlamlı olarak farklılaştığı; pH 3 ve pH 11'in ise birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.2.5. pH - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyası kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. pH 11 için ise her üç saatte de tespit edilen canlı bakteri sayılarında zamanla azalma gözlenmiştir (Şekil 4.23).

pH'ın biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.66 log'luk azalma ile elde edilen 6.38 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.24 log'luk azalma ile elde edilen 6.8 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde pH 3 ve pH 11 muamelesinin 24. saatinin benzer oranda azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



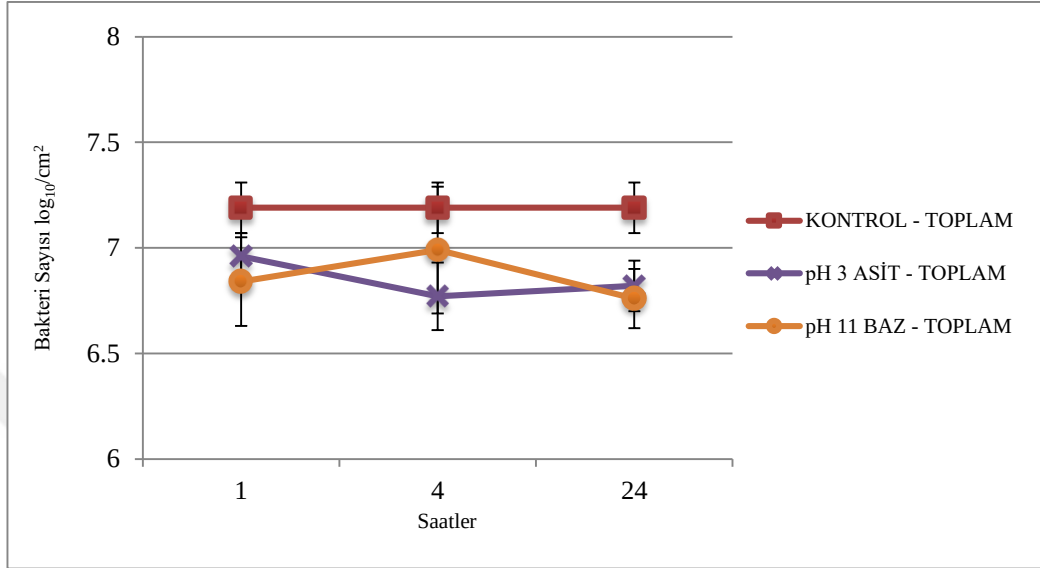
Şekil 4.23: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyası kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatlerin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. pH 11 için ise 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. saatte artış, 24. saatte ise yeniden azalma gözlenmiştir (Şekil 4.24).

pH'ın biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.43 log'luk azalma ile elde edilen 6.76 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.20 log'luk azalma ile elde edilen 6.99 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 4.

saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 11 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

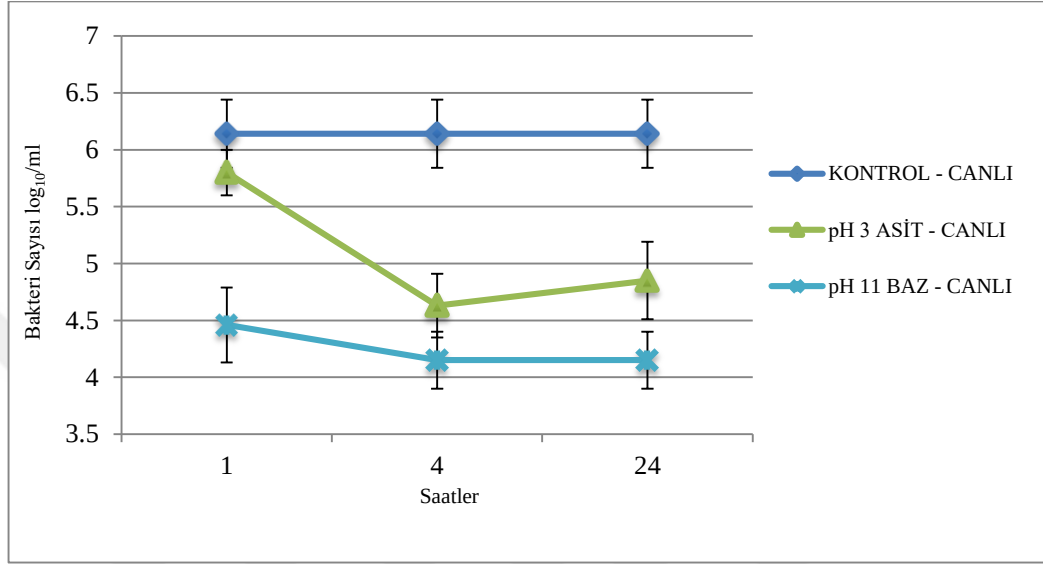
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.2.6. pH - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyası kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. pH 11 için ise 1. ve 4. saatin sonunda canlı bakteri sayısında azalma gözlenmiş olup 24. saatte 4. saatteki sayısının aynısına ulaşmıştır (Şekil 4.25).

pH'ın planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.99 log'luk azalma ile elde edilen 4.15 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise

0.84 log'luk azalma ile elde edilen 5.3 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan canlı bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 11 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

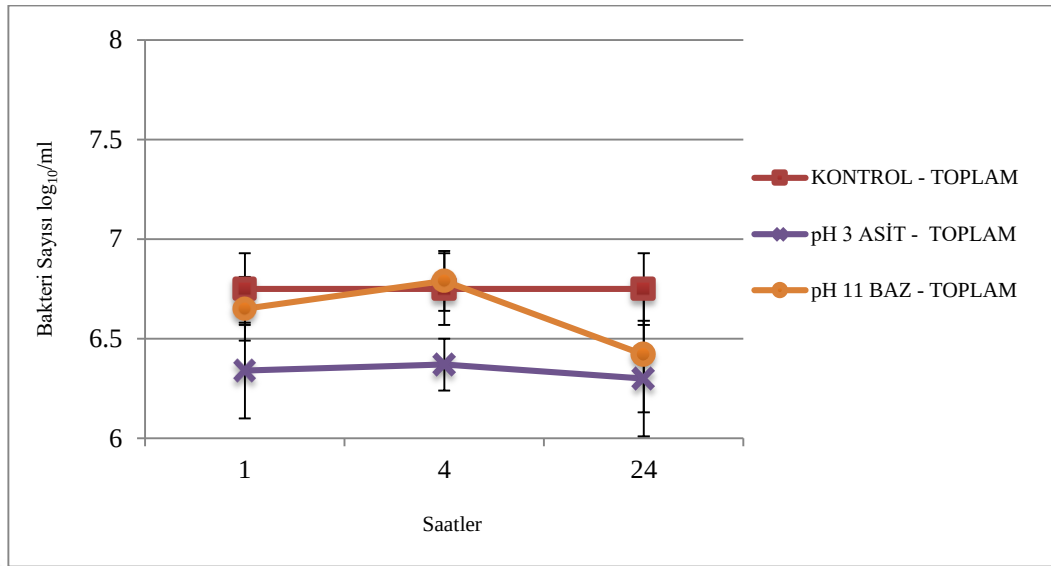


Şekil 4.25: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyası kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde pH 3 ve pH 11 için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. saatte artış, 24. saatte ise yeniden azalma gözlenmiştir (Şekil 4.26).

pH'ın planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.45 log'luk azalma ile elde edilen 6.30 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. pH 11 uygulaması sonucunda 4. saatte kontrol örneğine oranla 0.04 log'luk artış ile en yüksek değer olan 6.79 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan toplam bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 3 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

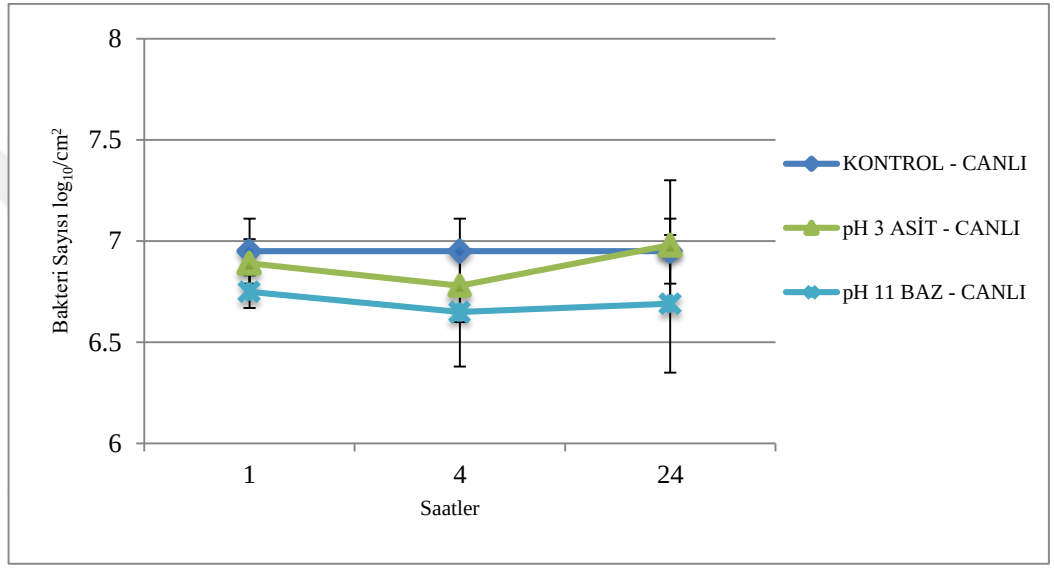
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı pH değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki pH değerinden de anlamlı olarak farklılaştığı; pH 3 ve pH 11'in ise birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.2.7. pH - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. pH 11 için ise 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatte canlı bakteri sayısında artış gözlenmiştir (Şekil 4.27).

pH'ın biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.3 log'luk azalma ile elde edilen 6.65 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.06 log'luk azalma ile elde edilen 6.89 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan tüm bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 11 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



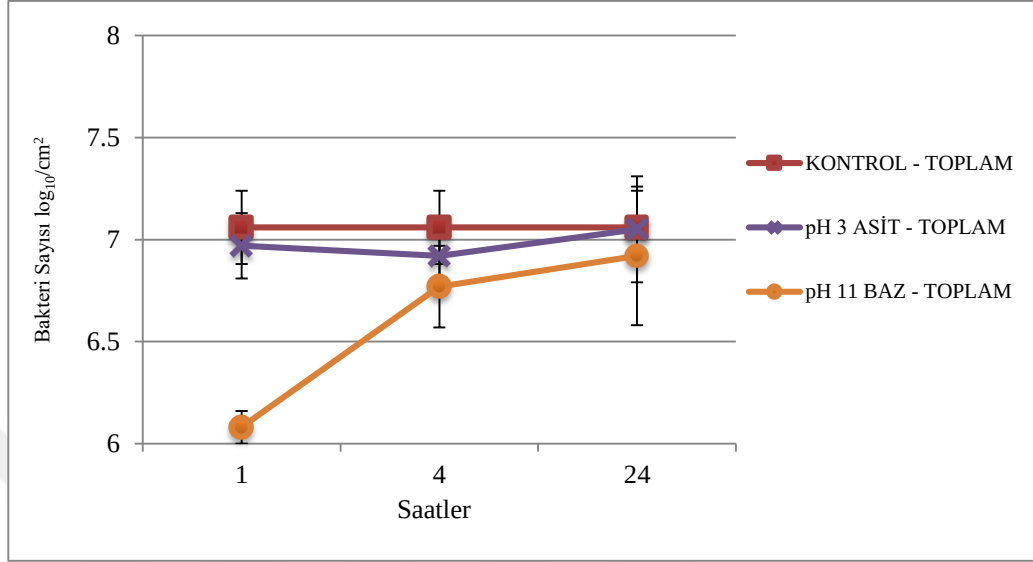
Şekil 4.27: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE-DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. pH 11 için ise 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde toplam bakteri sayısında artış gözlenmiştir (Şekil 4.28).

pH'ın biyofilm fazında bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.98 log'luk azalma ile elde edilen 6.08 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.01 log'luk azalma ile elde edilen 7.05 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam

bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 11 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE-DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

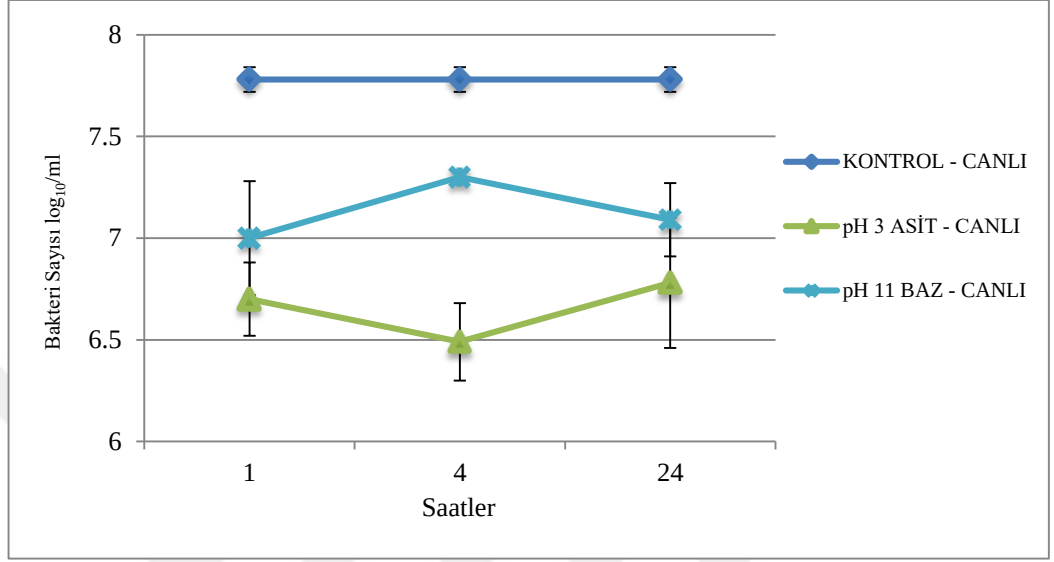
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.2.8. pH - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatlerin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. pH 11 için ise 1. saatin sonunda canlı bakteri sayısındaki azalmayı 4. saatte artış 24. saatte ise azalma takip etmiştir (Şekil 4.29).

pH'ın planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.29 log'luk azalma ile elde edilen 6.49 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.48 log'luk azalma ile elde edilen 7.30 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 4.

saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan tüm bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 3 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29).

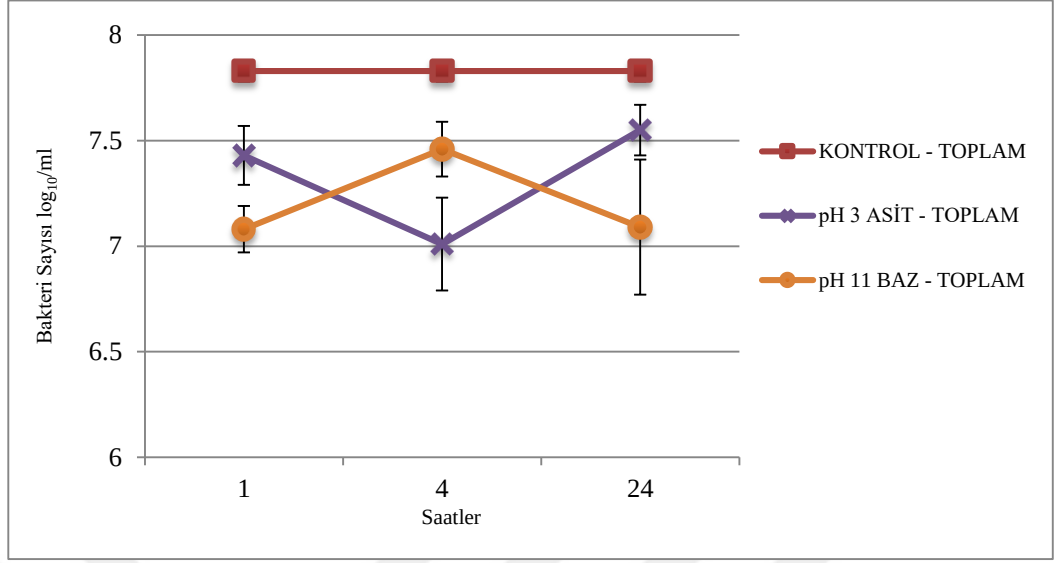


Şekil 4.29: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE-DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatlerin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. pH 11 için ise 1. saatin sonunda canlı bakteri sayısındaki azalmayı 4. saatte artış, 24. saatte ise azalma takip etmiştir (Şekil 4.30).

pH'ın planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.82 log'luk azalma ile elde edilen 7.01 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.28 log'luk azalma ile elde edilen 7.55 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan toplam bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 11 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE-DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

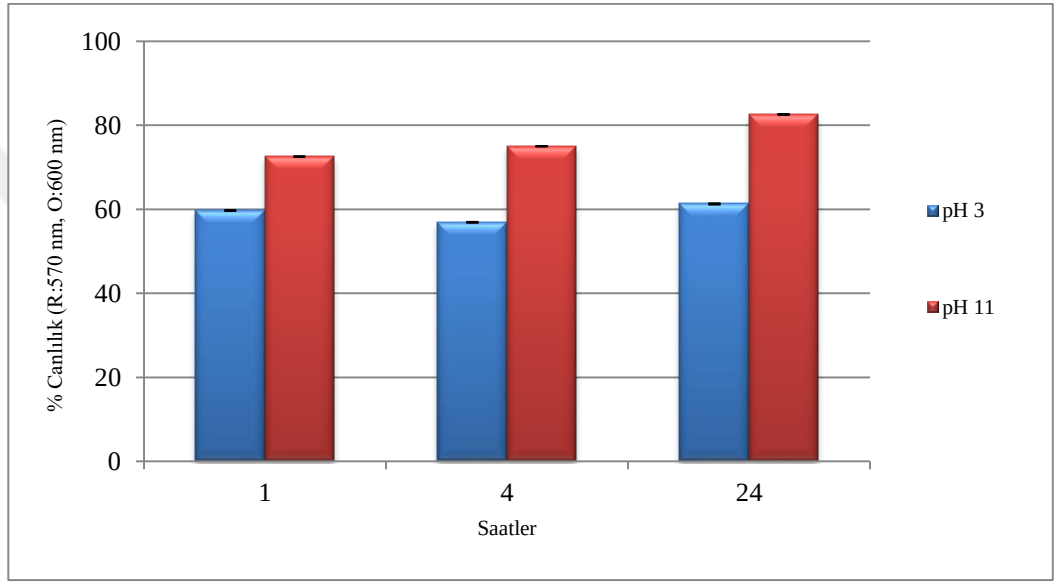
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı pH değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki pH değerinden de anlamlı olarak farklılaştığı; pH 3 ve pH 11'in de birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.2.9. pH Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. pH 11 için 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir (Şekil 4.31).

pH'ın biyofilm fazında bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 43.13'lük azalma ile elde edilen % 56.87 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 17.41'lik azalma ile elde edilen % 82.59 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 24. saatte elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 3 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar Blue).

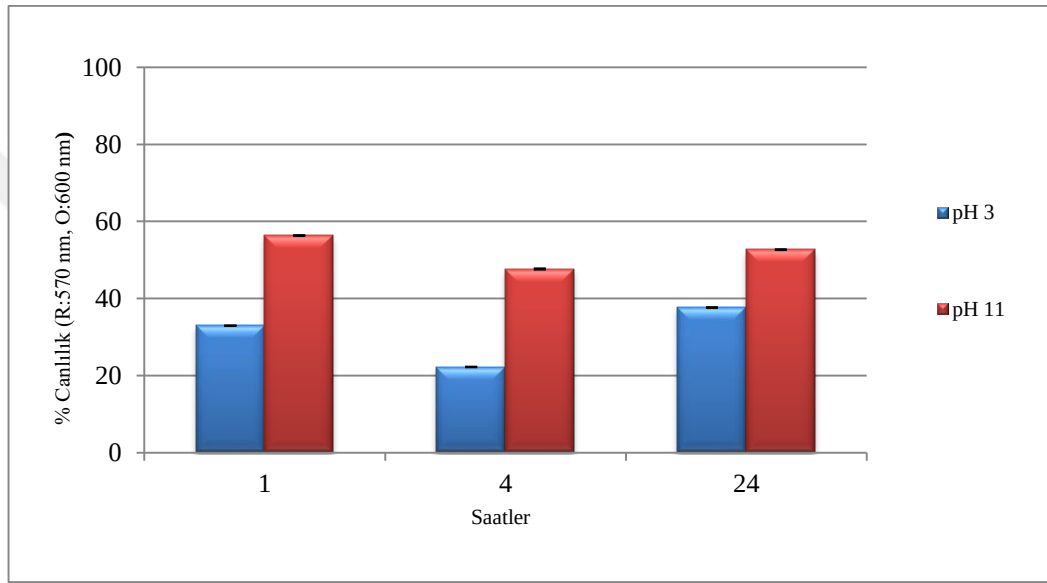
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.2.10. pH - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde pH 3 için 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. pH 11 uygulaması sonucunda ise 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda artış elde edilmiştir (Şekil 4.32).

pH'ın planktonik fazda bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 77.76'lık azalma ile elde edilen % 22.24 değeri ile pH 3 uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 43.62'lik azalma ile elde edilen % 56.38 değeri ile pH 11 uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın pH 3 muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32: Farklı pH değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar Blue).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan pH değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı pH değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün pH 3'den anlamlı olarak farklılaştığı ancak pH 11'den anlamlı olarak farklılaşmadığı; pH 3 ve pH 11'in ise birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından tüm saatlerin sırasıyla birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

pH uygulaması kapsamında hem biyofilm hem de planktonik bakteriler için uygulanan teknikler arasında çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre biyofilm ve planktonik faz örnekleri için LIVE/DEAD tekniğinin diğer tüm tekniklerden anlamlı olarak farklılaştığı bulunmuştur. Kültür tekniğinin ise Alamar blue tekniğinden anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur. LIVE/DEAD tekniği, diğer tekniklere oranla daha yüksek sayıda canlı bakterinin tespit edilmesini sağladığından dolayı en güvenilir teknik olarak belirlenmiştir.

4.2.11. pH - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm fazı örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak canlı *L. pneumophila* varlığı tespit edilememiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Farklı pH koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm²).

	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	0	0	0
pH 3 Asit	0	0	0
pH 11 Baz	0	0	0

4.2.12. pH - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı pH değerlerine maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında pH 11 uygulaması sonucunda 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısının pH 3 uygulaması sonucu 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısından daha az olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Farklı pH koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).

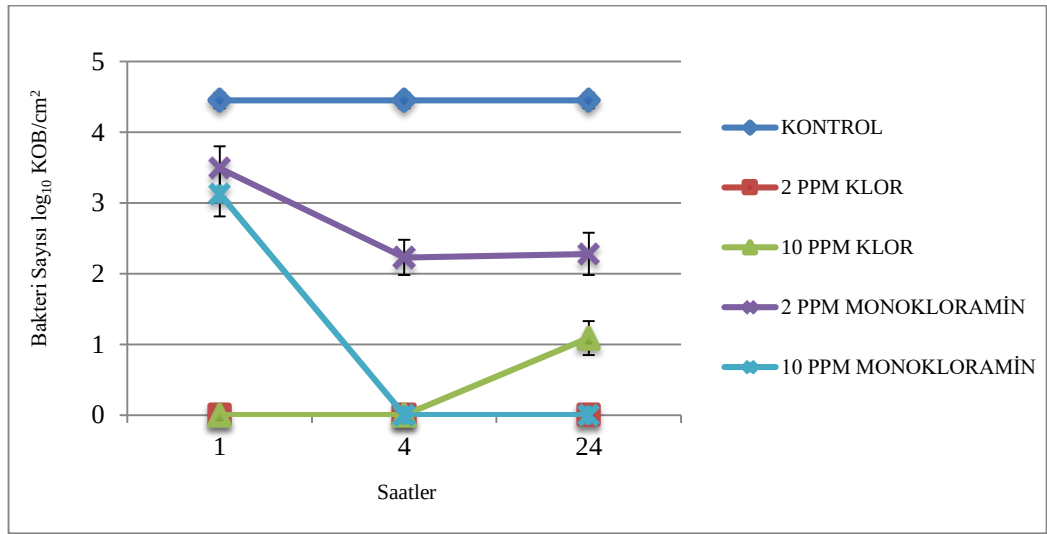
	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	3.39	3.39	3.39
pH 3 Asit	0	13.18	0
pH 11 Baz	0	4.45	0

4.3. DEZENFEKTAN UYGULAMA SONUÇLARI

4.3.1. Dezenfektan - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı dezenfektanlara maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde 2 ppm klorda hiçbir saatte üreme gözlenmezken, 10 ppm klorda 1. ve 4. saatlerin sonunda üreme olmayıp 24. saatte 1.09 log'luk bir üreme gözlenmiştir. 2 ppm monokloraminde 1. ve 4. saatlerde kontrol örneğine kıyasla artarak ilerleyen bir azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda ufak bir artış gözlenmiştir. 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda ise 1. saatin sonunda üremede azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.33).

Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 1. 4. ve 24. saatlerde, 10 ppm monokloramin uygulaması ile 4. ve 24. saatlerde elde edilmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.96 log'luk azalma ile elde edilen 3.49 değeri ile 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar üreme gözlenmemesine bağlı olarak 2 ppm klor ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

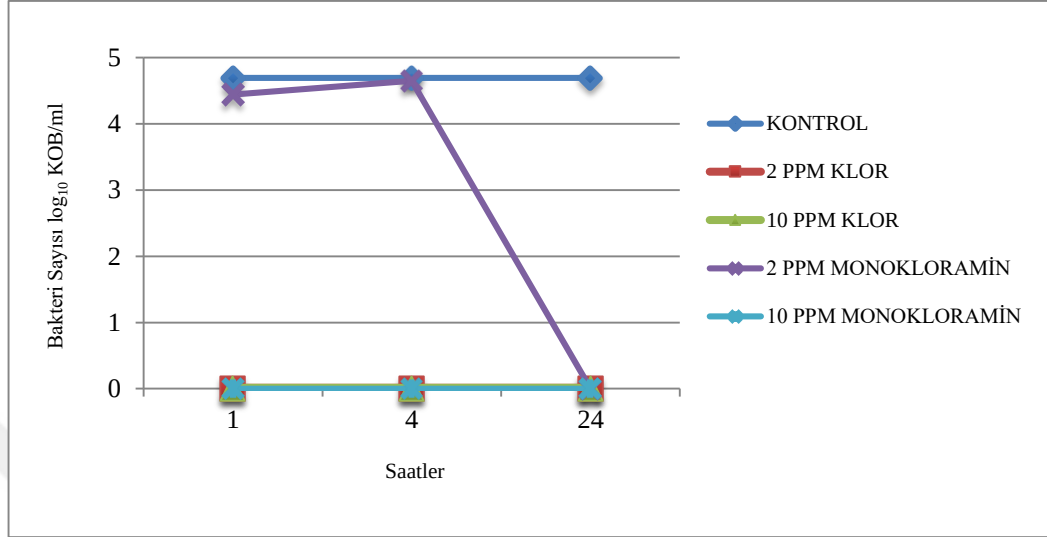
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.3.2. Dezenfektan - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakteri sayısında 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin uygulamaları sonucunda üreme gözlenmezken, 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte kontrol örneğine oranla azalma, 4. saatin sonunda artış gözlenmiş olup, 24. saatte üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.34).

Dezenfeksiyonun planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 2 ppm klor; 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin uygulamaları sonucunda 1. 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.25 log'luk azalma ile elde edilen 4.44 değeri ile 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakteriler

üzerinde en etkili dezenfektanlar üreme gözlenmemesine bağlı olarak 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı dezenfektan değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

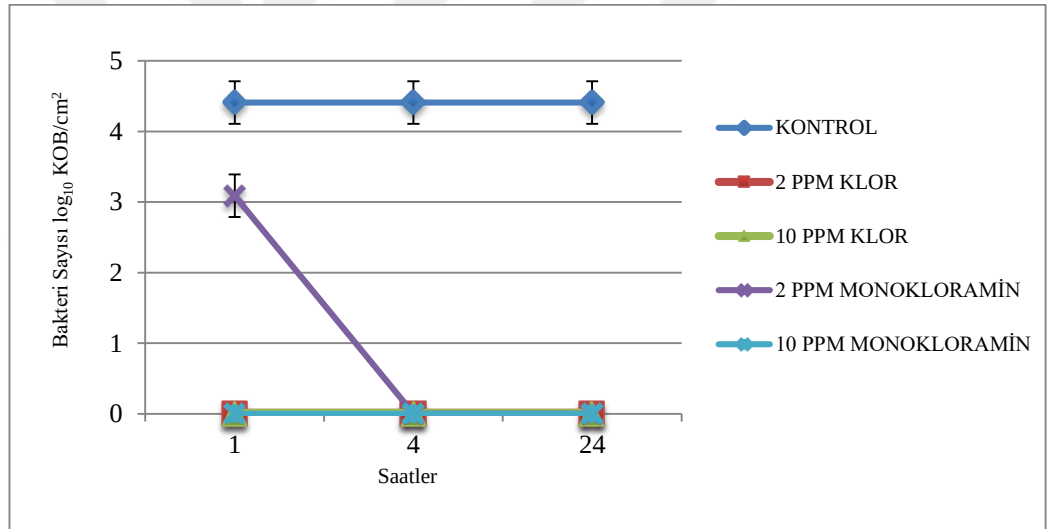
LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün tüm dezenfektanlardan anlamlı olarak farklılaştığı; 10 ppm klorun 10 ppm monokloraminden anlamlı olarak farklılaşmadığı; 2 ppm monokloraminin 10 ppm monokloraminde anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.3.3. Dezenfektan - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* bakterilerinde 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10 ppm

monokloramin uygulamaları sonucunda üreme gözlenmezken, 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte kontrol örneğine oranla azalma meydana gelmiş olup, 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.35).

Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 2 ppm klor; 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin uygulamaları sonucunda 1. 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 1.32 log'luk azalma ile elde edilen 3.09 değeri ile 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan *L.pneumophila* üzerinde en etkili dezenfektanlar üreme gözlenmemesine bağlı olarak 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

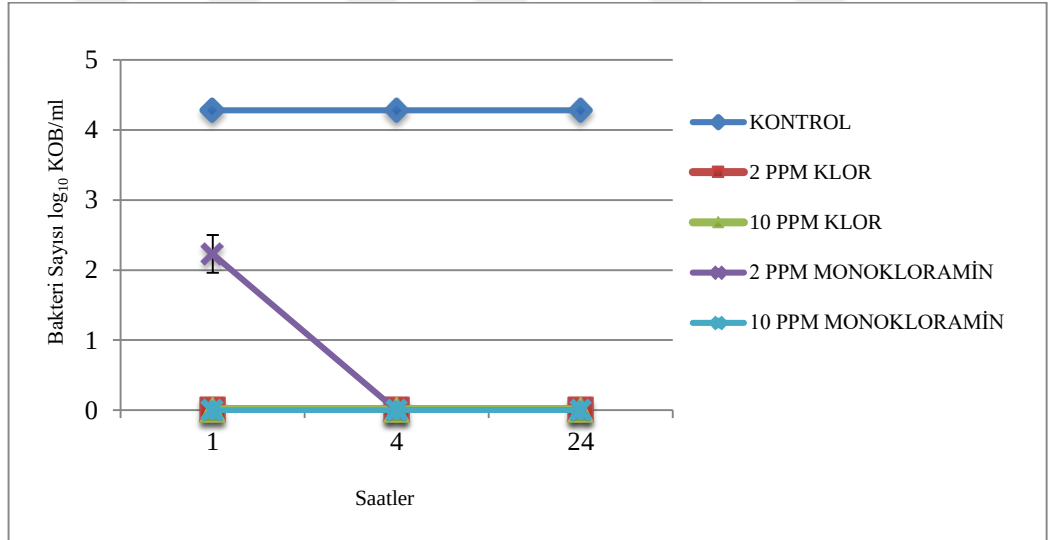
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.3.4. Dezenfektan - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* sayısında 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10ppm monokloramin uygulamaları sonucunda üreme gözlenmezken, 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte kontrol örneğine oranla azalma meydana gelmiş olup, 4. ve 24. saatlerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.36).

Dezenfeksiyonun planktonik fazda bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 2 ppm klor; 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin uygulamaları sonucunda 1., 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 2.05 log'luk azalma ile elde edilen 2.23 değeri ile 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan *L.pneumophila* üzerinde en etkili dezenfektanlar üreme gözlenmemesine bağlı olarak 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda

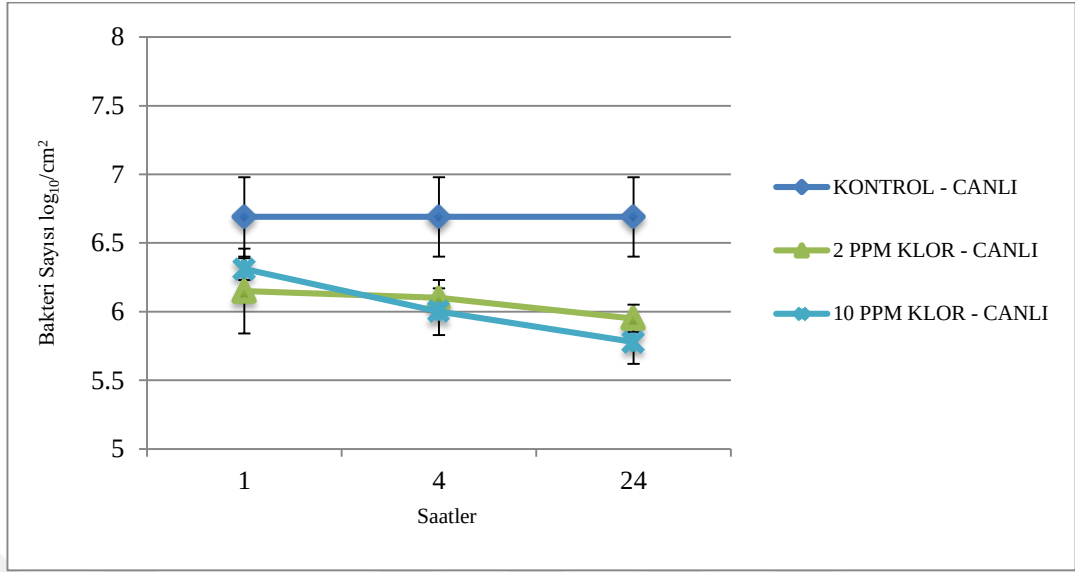
uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı dezenfektan değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün tüm dezenfektanlardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD tablosuna bakıldığında saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.3.5. Dezenfektan - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm

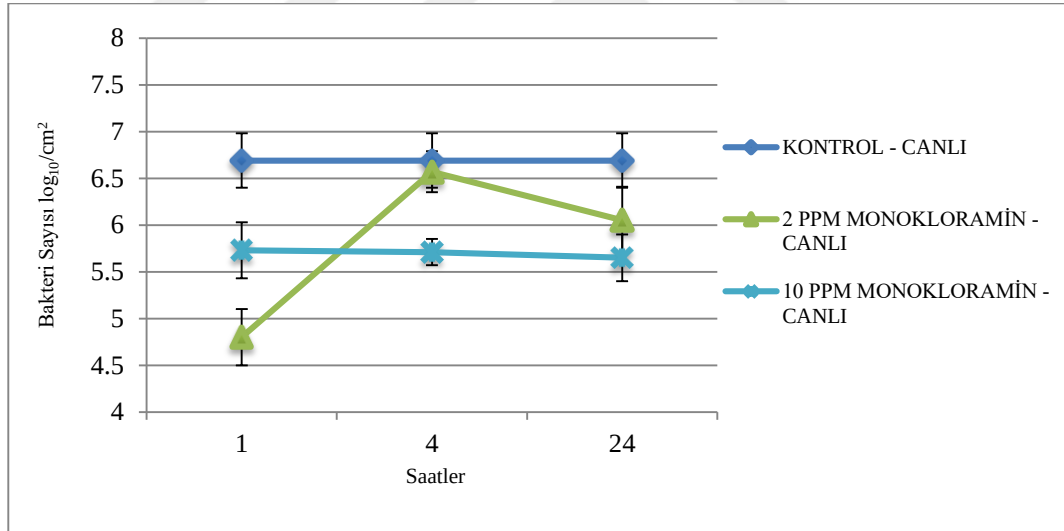
Biyofilm örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10 ppm monokloraminle muamele sonucunda zamanla canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. 2 ppm monokloraminle muamele sonucunda ise 1. saatteki azalmayı 4. saatte artış izlemiş olup 24. saatin sonunda canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.37, Şekil 4.38).

Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.89 log'luk azalma ile elde edilen 4.8 değeri ile 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.12 log'luk azalma ile elde edilen 6.57 değeri ile 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.37, Şekil 4.38).



Şekil 4.37: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir).



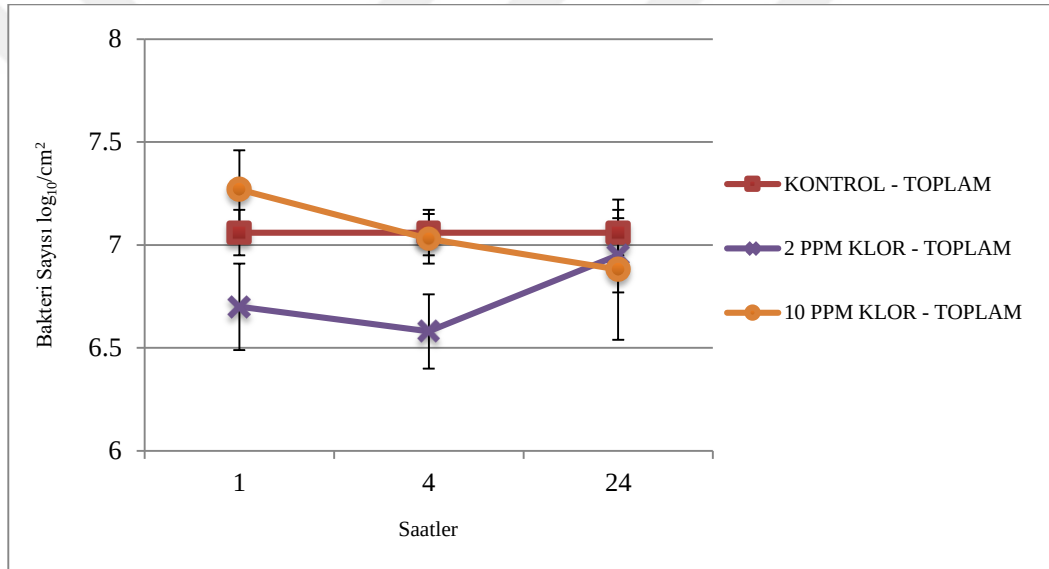
Şekil 4.38: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 2 ppm klor için 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. 10 ppm klor için ise zamanla azalma gözlenmiştir. 2 ppm monokloramin için 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. saatin sonunda artış, 24. saatin sonunda ise yeniden azalma

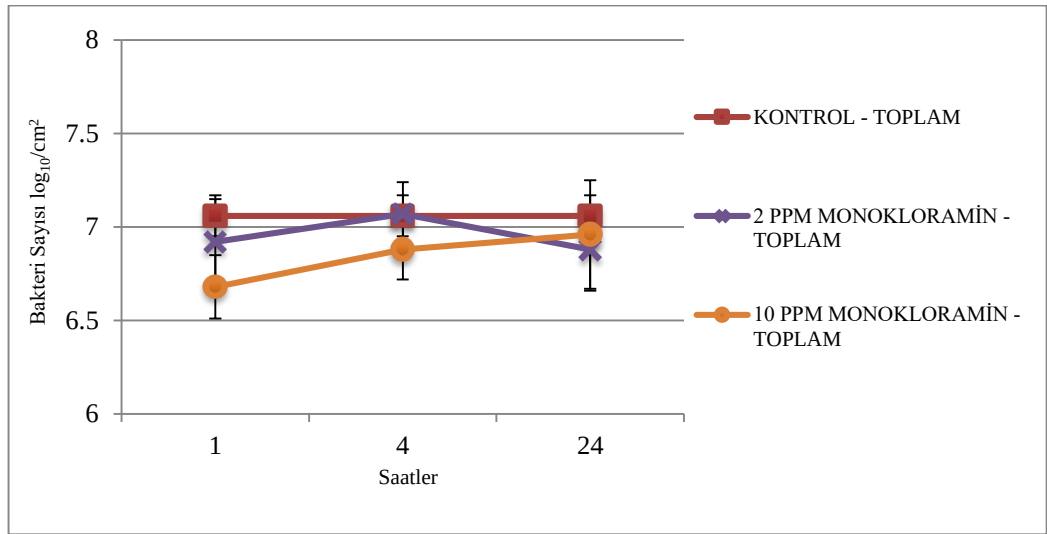
gözlenmiştir. 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda ise 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir (Şekil 4.39, Şekil 4.40).

Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.48 log'luk azalma ile elde edilen 6.58 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. 10 ppm klor uygulaması sonucunda 1. saatte kontrol örneğine oranla 0.21 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.27 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 10 ppm klor ve 2 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.39, Şekil 4.40).



Şekil 4.39: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)



Şekil 4.40: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

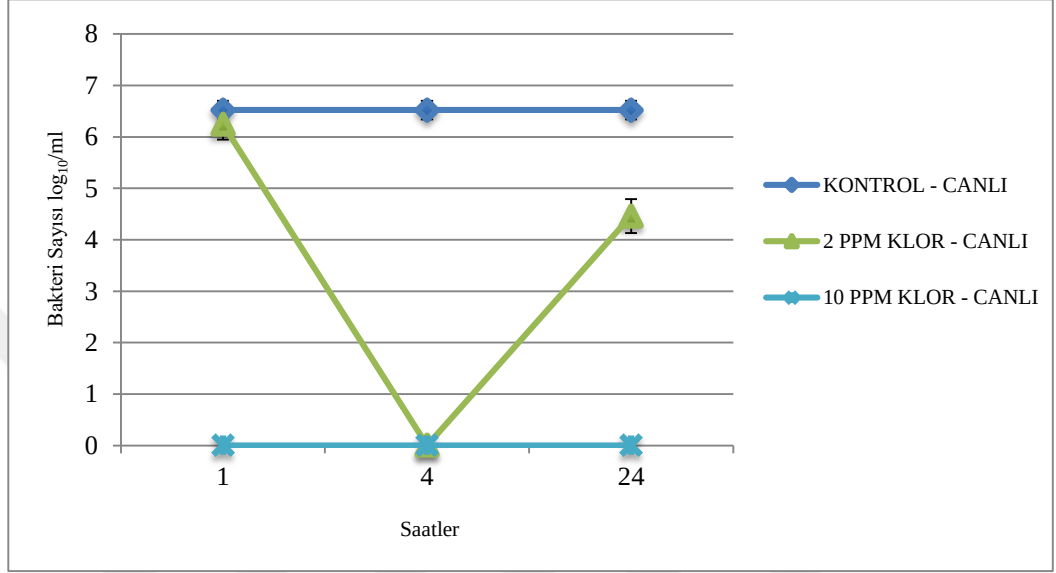
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.3.6. Dezenfektan - CTC-DAPI Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 10 ppm klor ile muamele sonucunda hiçbir saatte canlı bakteri tespit edilmemiştir. 2 ppm klor uygulama sonucunda 1. saatte kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. saatte üreme gözlenmemiş olup 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda ise 1. saatteki azalmayı 4. saatte artış izlemiş olup 24. saatin sonunda canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. 10 ppm monokloramin uygulama sonucunda 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. saatin sonunda artış, 24. saatin sonunda tekrar azalma gözlenmiştir (Şekil 4.41, Şekil 4.42).

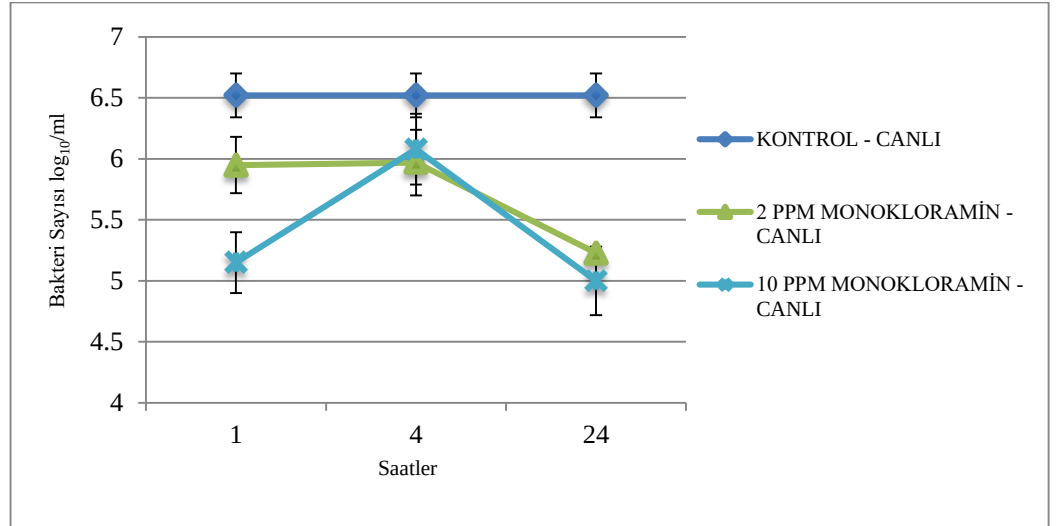
Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1., 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş

ise 0.28 log'luk azalma ile elde edilen 6.24 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan tüm bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.41, Şekil 4.42).



Şekil 4.41: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

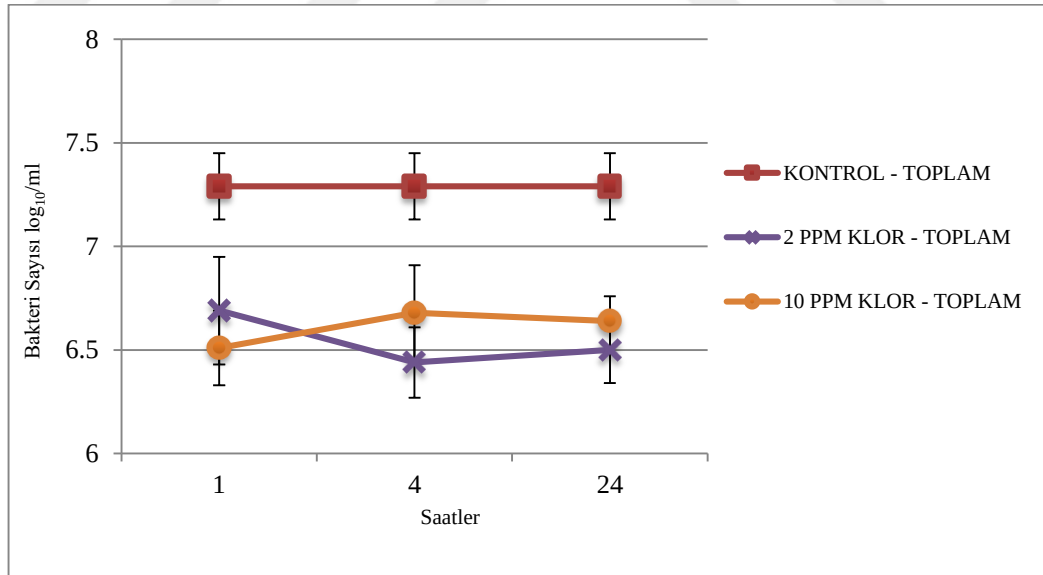


Şekil 4.42: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

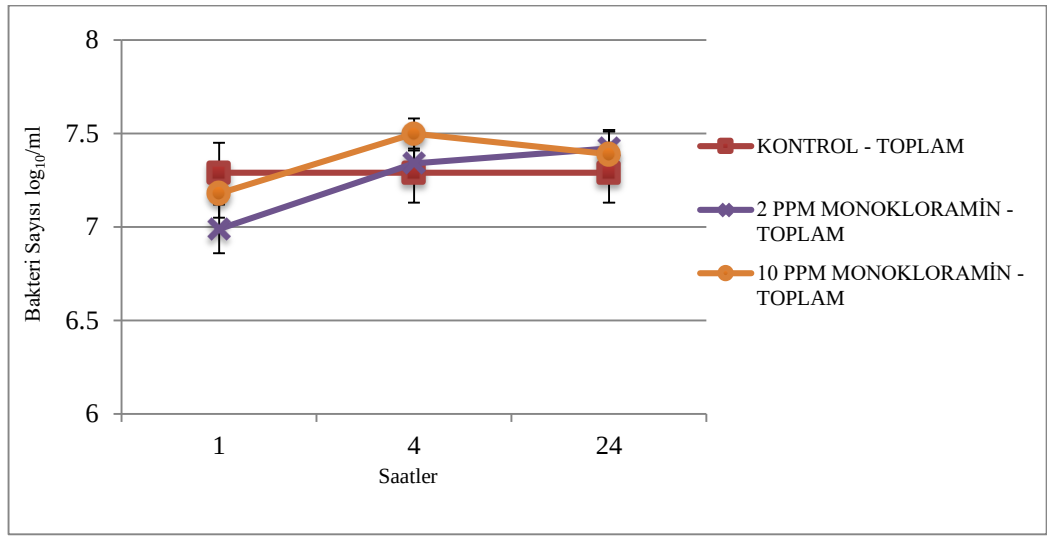
Planktonik faz örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 2 ppm klor için 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin için 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. saatin sonunda artış, 24. saatin sonunda ise yeniden azalma gözlenmiştir. 2 ppm monokloramin uygulaması için ise 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde ise yeniden artış gözlenmiştir (Şekil 4.43, Şekil 4.44).

Dezenfeksiyonun planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.85 log'luk azalma ile elde edilen 6.44 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 4. saatte kontrol örneğine oranla 0.21 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.50 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 2 ppm klor ve 10 ppm klor olarak belirlenmiştir (Şekil 4.43, Şekil 4.44).



Şekil 4.43: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)



Şekil 4.44: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

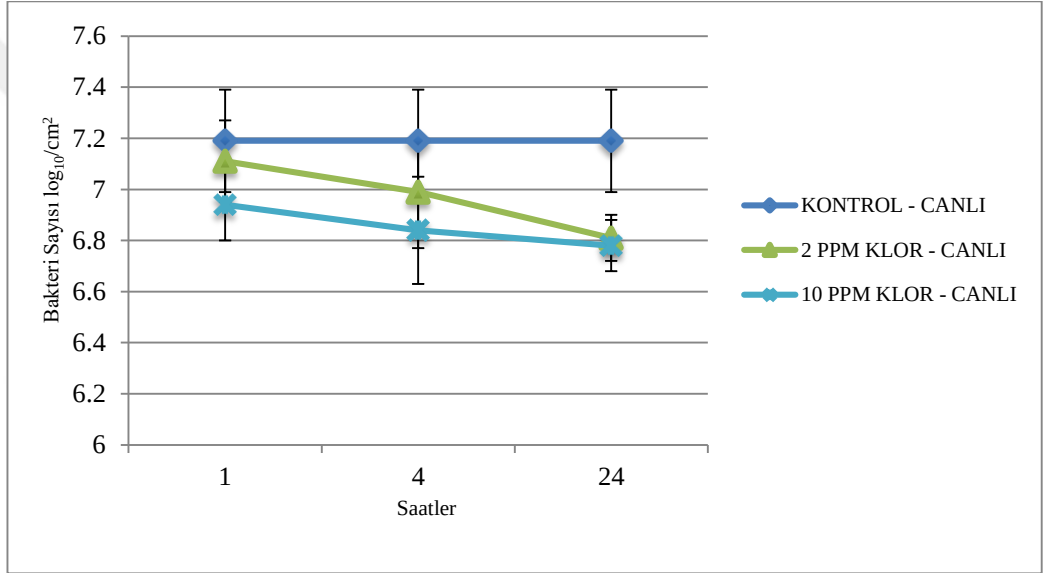
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı dezenfektan değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün diğer dezenfektanlardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. 10 ppm klorun 10 ppm monokloraminden anlamlı olarak farklılaşmadığı; 2 ppm monokloraminin 10 ppm monokloraminden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.3.7. Dezenfektan - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm

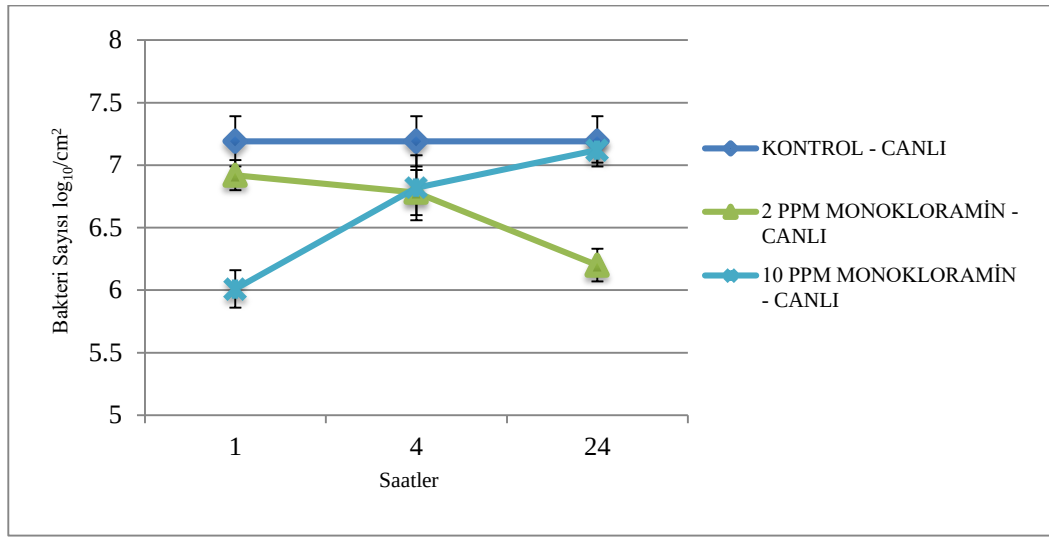
Biyofilm örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 2 ppm monokloramin için zamanla canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. 10 ppm monokloramin uygulamasında ise zamanla artış gözlenmiştir (Şekil 4.45, Şekil 46).

Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.18 log'luk azalma ile elde edilen 6.01 değeri ile 10 ppm monokloramin uygulamaları sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.08 log'luk azalma ile elde edilen 7.11 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 10 ppm klor ve 2 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.45, Şekil 4.46).



Şekil 4.45: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

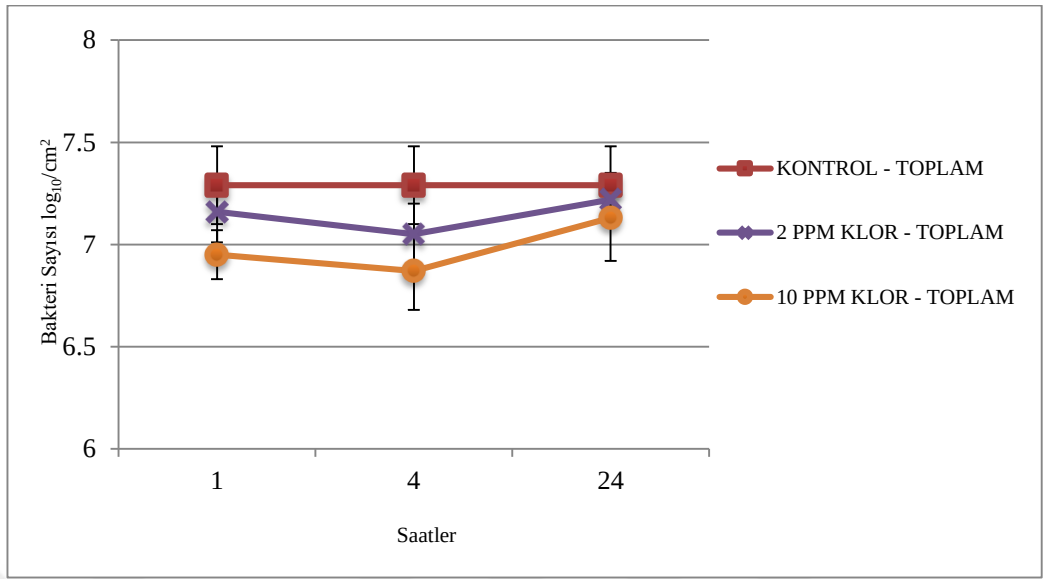


Şekil 4.46: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

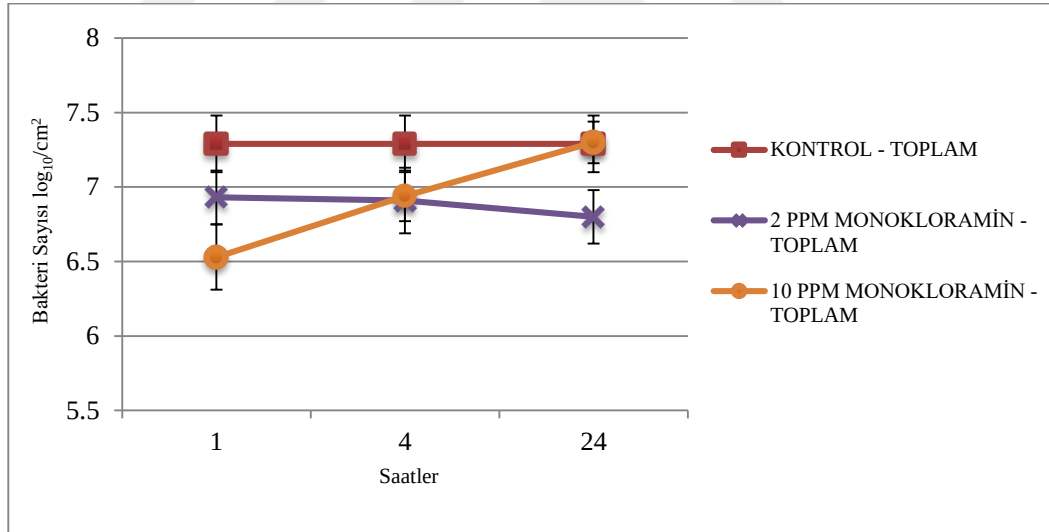
Biyofilm örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 2 ppm klor ve 10 ppm klor için 1. ve 4. saatlerde azalma meydana gelirken 24. saatte ise artış elde edilmiştir. 2 ppm monokloramin için zamanla azalma meydana gelmiştir. 10 ppm monokloramin için ise 1. saatte azalma, 4. ve 24. saatlerde ise artış gözlenmiştir (Şekil 4.47, Şekil 4.48).

Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.76 log'luk azalma ile elde edilen 6.53 değeri ile 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 24. saatte 0.01 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.3 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 10 ppm klor ve 2 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.47, Şekil 4.48).



Şekil 4.47: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

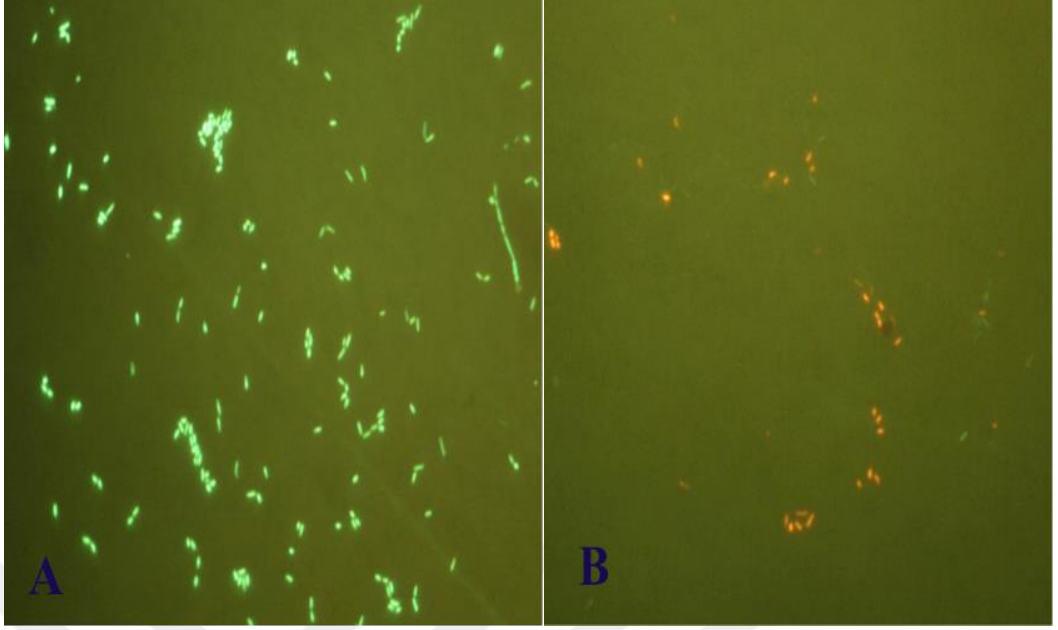
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)



Şekil 4.48: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

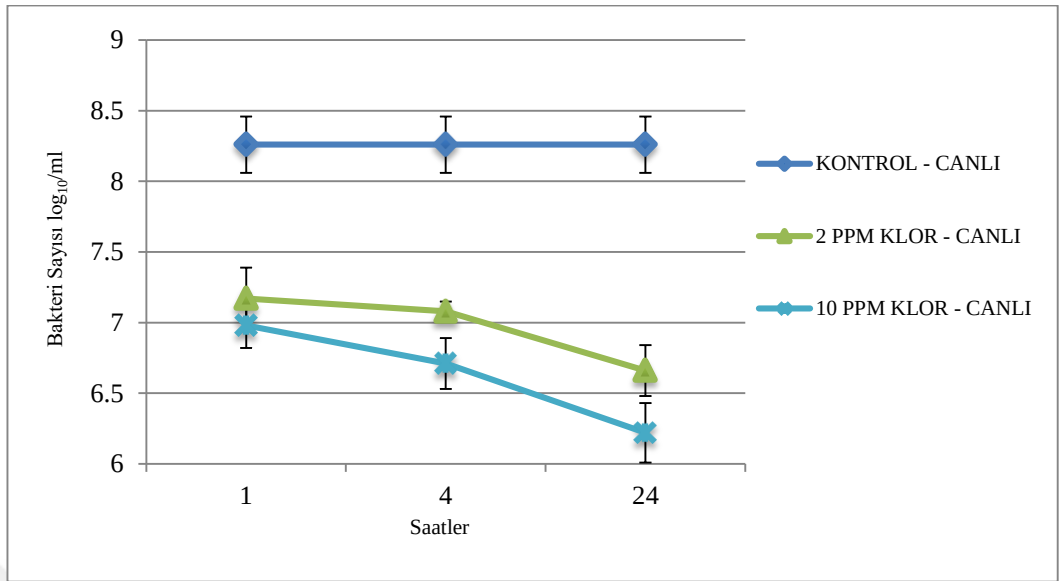


Şekil 4.49: LIVE/DEAD kit boyama tekniği epifloresan mikroskop görüntüleri. A) Kontrol örneği, B) 10 ppm monokloramin ile 24. saatlik muamele örneği.

4.3.8. Dezenfektan - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik

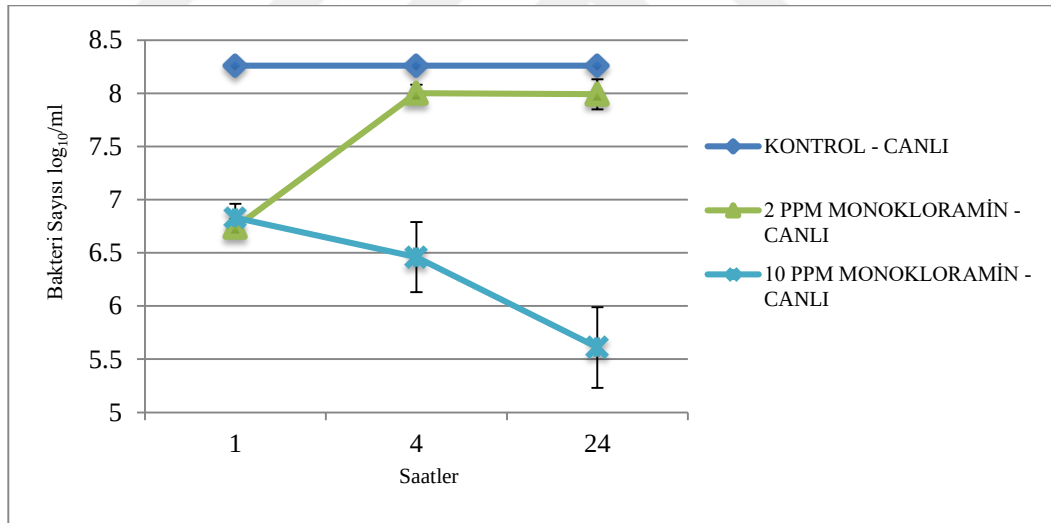
Planktonik faz örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 10 ppm monokloraminle muamele sonucunda zamanla canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir. 2 ppm monokloraminle muamele sonucunda ise 1. saatteki azalmayı 4. saatte artış izlemiş olup 24. saatin sonunda canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.50, Şekil 4.51).

Dezenfeksiyonun planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 2.65 log'luk azalma ile elde edilen 5.61 değeri ile 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 1.09 log'luk azalma ile elde edilen 7.17 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.50, Şekil 4.51).



Şekil 4.50: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)



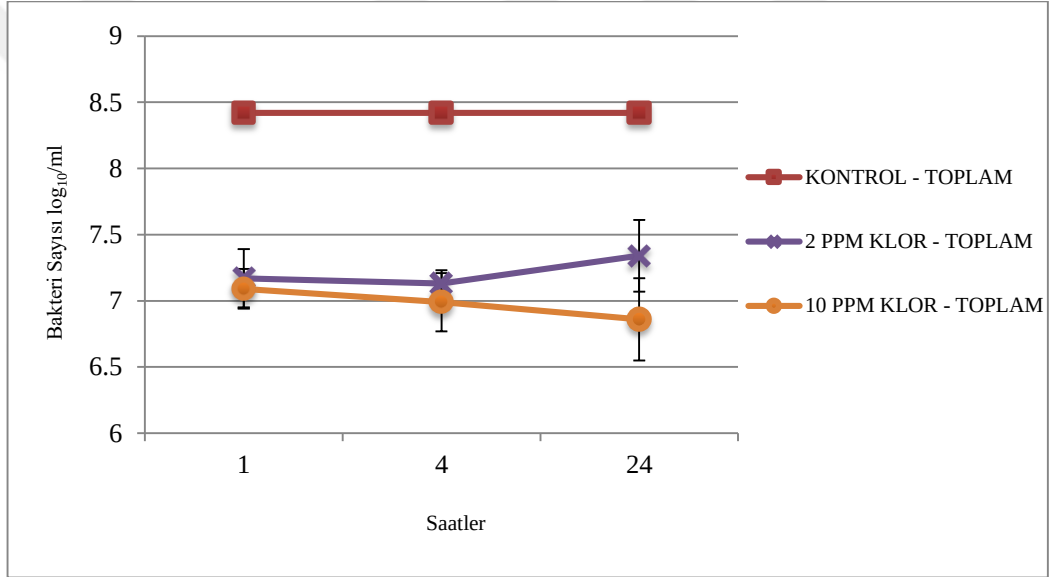
Şekil 4.51: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde 2 ppm klor ve 10 ppm monokloramin için 1. ve 4. saatlerde azalma meydana gelirken 24. saatte ise artış gözlenmiştir. 10 ppm klor için ise zamanla azalma meydana gelmiştir. 2 ppm

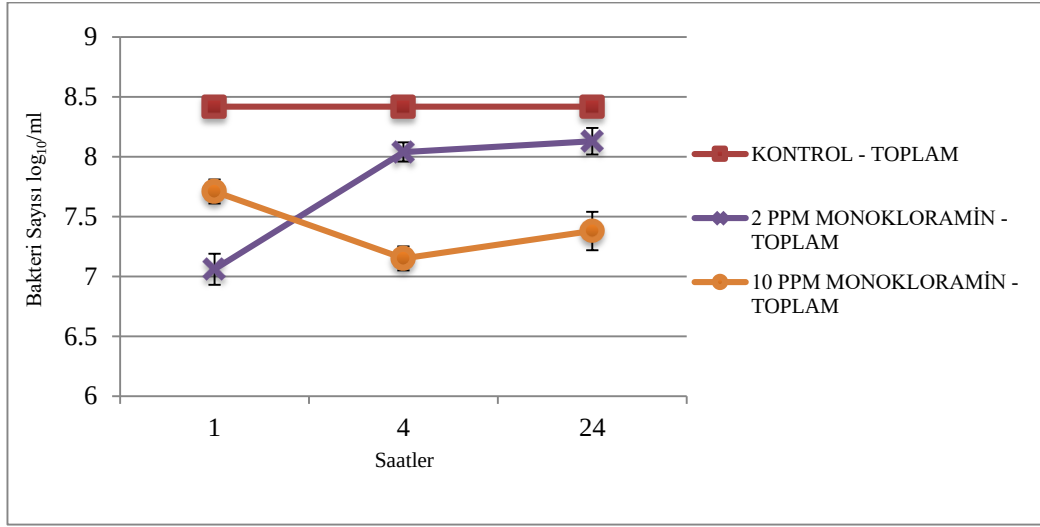
monokloramin için 1. saatte kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde ise artış gözlenmiştir (Şekil 4.52, Şekil 4.53).

Dezenfeksiyonun planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.56 log'luk azalma ile elde edilen 6.86 değeri ile 10 ppm klor uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir Kontrol örneğine oranla en az düşüş 0.38 log'luk azalma ile elde edilen 8.04 değeri ile 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 2 ppm klor ve 10 ppm klor olarak belirlenmiştir (Şekil 4.52, Şekil 4.53).



Şekil 4.52: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)



Şekil 4.53: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı dezenfektan değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

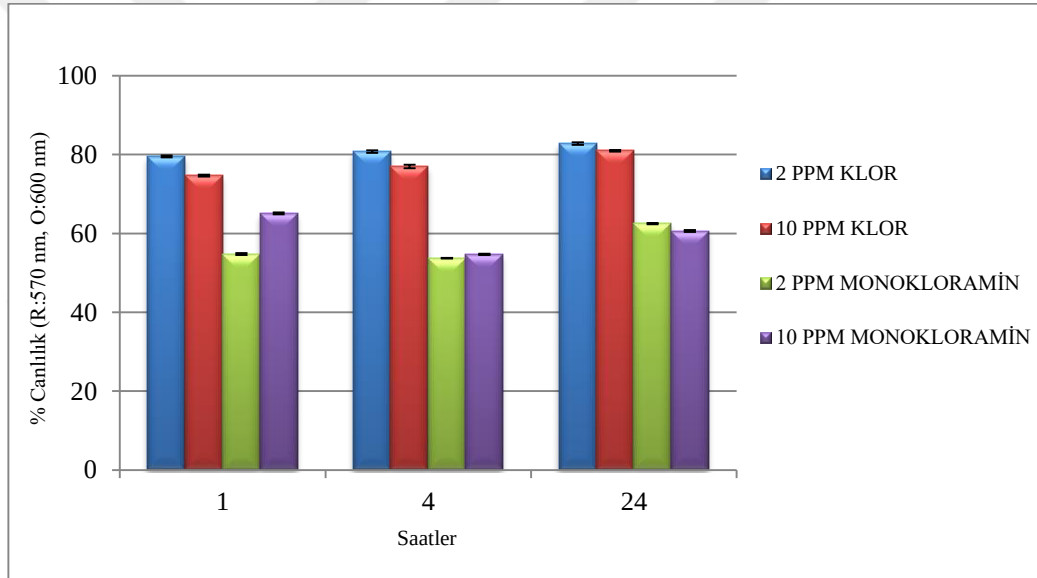
LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün diğer dezenfektanlardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. 10 ppm klorun 10 ppm monokloraminden anlamlı olarak farklılaşmadığı; 2 ppm monokloraminin 10 ppm monokloraminden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.3.9. Dezenfektan - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde 2 ppm klor, 10 ppm klor ve 2 ppm monokloramin uygulamasının 1. saatinin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış gözlenmiştir. 10 ppm

monokloramin uygulaması sonucunda ise 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken, 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.54).

Dezenfeksiyonun biyofilm fazında bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 45.24'lük azalma ile elde edilen % 54.76 değeri ile 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 17.21'lik azalma ile elde edilen % 82.79 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 2 ppm monokloramin ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.54).



Şekil 4.54: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

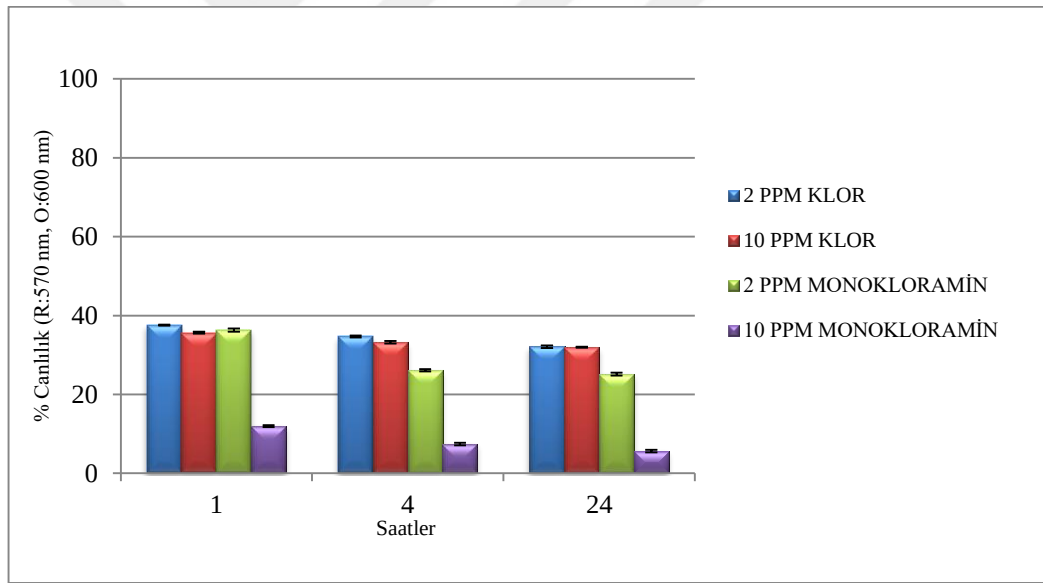
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.3.10. Dezenfektan - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde tüm dezenfektan uygulamaları sonucunda zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.55).

Dezenfeksiyonun planktonik fazda bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 94.4'lük azalma ile elde edilen % 5.6 değeri ile 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda 24. saatte elde edilmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 62.41'lik azalma ile elde edilen % 37.59 değeri ile 2 ppm klor uygulaması sonucunda 1. saatte elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan bakteriler üzerinde en etkili dezenfektanlar 2 ppm monokloramin ve 10 ppm monokloramin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.55).



Şekil 4.55: Farklı dezenfektan değerlerine maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan dezenfektan değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı dezenfektan değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün diğer dezenfektanlardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. 2 ppm monokloraminin 10 ppm monokloraminden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından kontrolün 1. saatten anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

Dezenfektan uygulaması kapsamında hem biyofilm hem de planktonik bakteriler için uygulanan teknikler arasında çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre biyofilm ve planktonik faz örnekleri için LIVE/DEAD tekniğinin diğer tekniklerden anlamlı olarak farklı olduğu bulunmuştur. Kültür ve Alamar blue tekniğinin birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur. LIVE/DEAD tekniği, diğer tekniklere oranla daha yüksek sayıda canlı bakterinin tespit edilmesini sağladığından dolayı en güvenilir teknik olarak belirlenmiştir.

4.3.11. Dezenfektan - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm fazı örneklerinin farklı dezenfektanlara maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında 10 ppm klor sonucunda 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısının 2 ppm ve 10 ppm monokloramin uygulaması sonucu 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısından daha az olduğu tespit edilmiştir. 2 ppm monokloramin uygulaması sonucunda ise zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Farklı dezenfektan koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm²).

	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	3.32	3.32	3.32
2 ppm klor	0	0	0
10 ppm klor	0	0.16	0
2 ppm monokloramin	2.88	0.44	0
10 ppm monokloramin	0	31.64	0

4.3.12. Dezenfektan - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı dezenfektanlara maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında 2 ppm klor uygulaması sonucunda 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısının 10 ppm klor ve 10 ppm monokloramin uygulaması sonucu 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısından daha az olduğu tespit edilmiştir. 10 ppm monokloramin uygulaması ile elde edilen canlı bakteri sayısında 4. saatte oranla 24. saatte azalma meydana gelmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Farklı dezenfektan koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).

	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	54.4	54.4	54.4
2 ppm klor	0	0	0
10 ppm klor	0	2.18	0
2 ppm monokloramin	0	1.88	0
10 ppm monokloramin	0	59.5	2.66

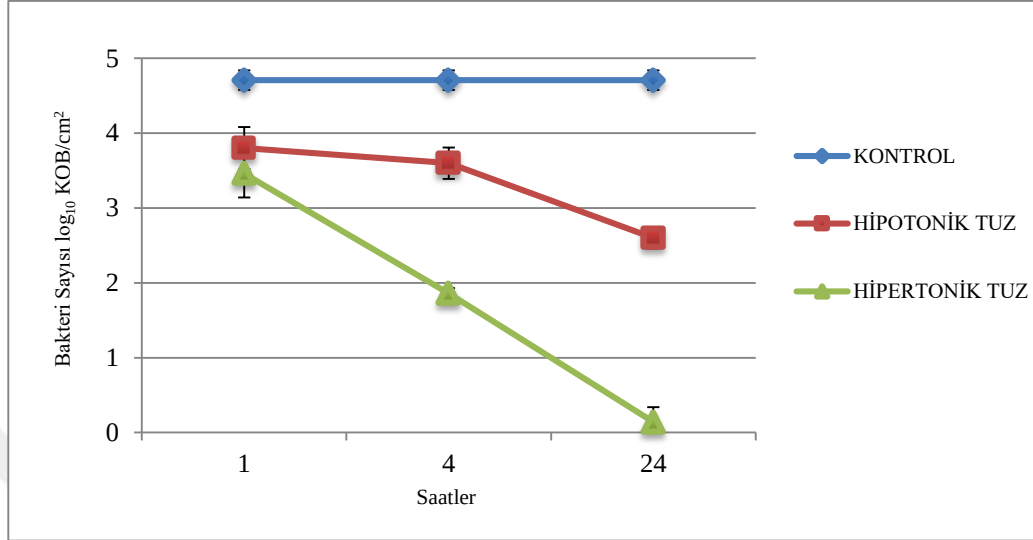
4.4. OZMOTİK KONSANTRASYON UYGULAMA SONUÇLARI

4.4.1. Ozmotik Konsantrasyon - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde her iki tuz konsantrasyonu için zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.56).

Ozmotik konsantrasyonun biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 4.57 log'luk azalma ile elde edilen 0.14 değeri ile hipertonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.91 log'luk azalma ile elde edilen 3.8 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuzun 24 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir.

Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

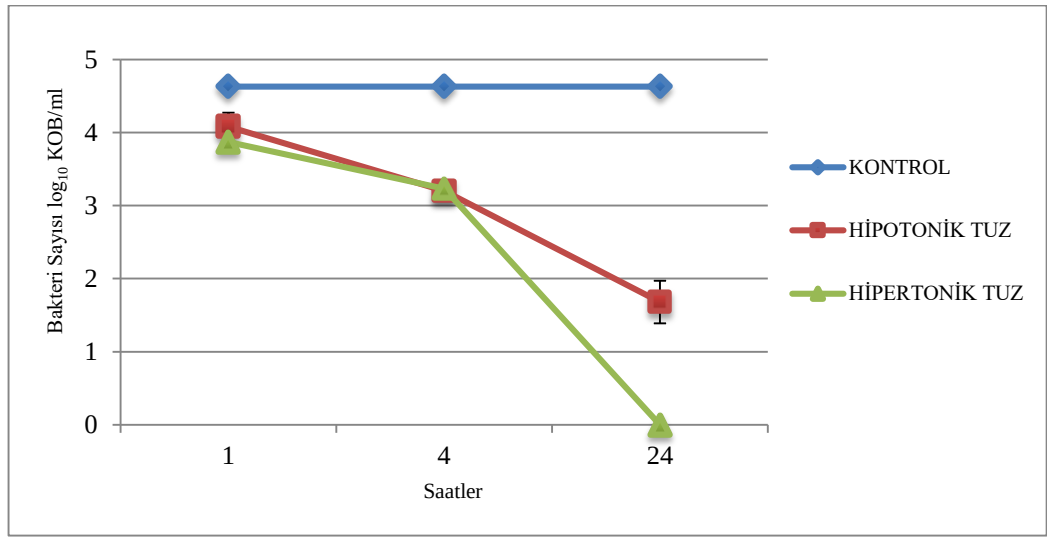
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.4.2. Ozmotik Konsantrasyon - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde her iki tuz konsantrasyonu için zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.57).

Ozmotik konsantrasyonun planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile hipertonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.55 log'luk azalma ile elde edilen 4.08 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuzun 24 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.57).



Şekil 4.57: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

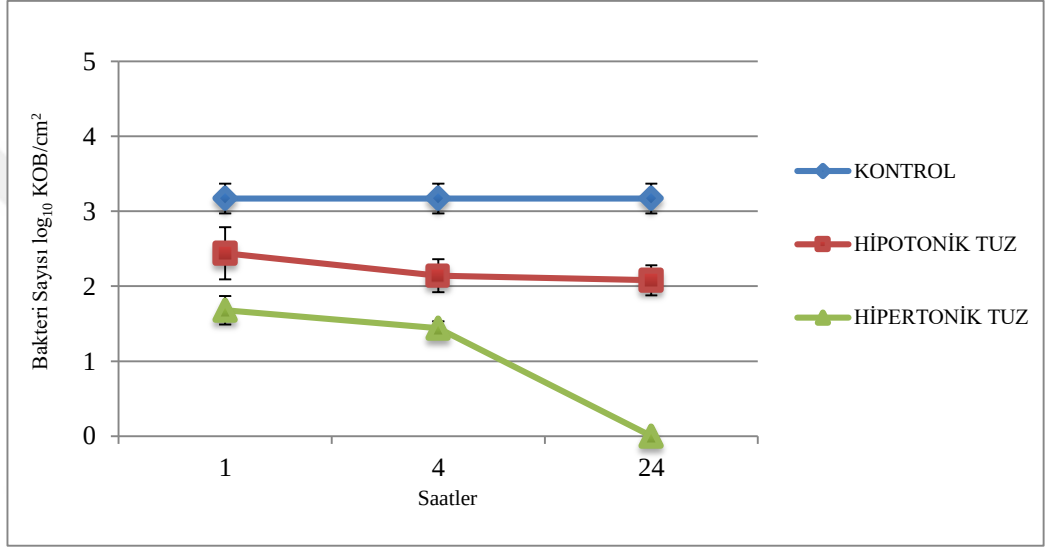
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı ozmotik konsantrasyon değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki ozmotik konsantrasyon uygulamasından anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Ancak hipotonik tuz ve hipertonik tuz çözeltisi uygulamalarının birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.4.3. Ozmotik Konsantrasyon - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* sayısında her iki tuz konsantrasyonu için zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.58).

Ozmotik konsantrasyonun biyofilm fazında bulunan *L.pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile hipertonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.73'log luk azalma ile elde edilen 2.44 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan *L.pneumophila* üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuzun 24 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.58).



Şekil 4.58: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

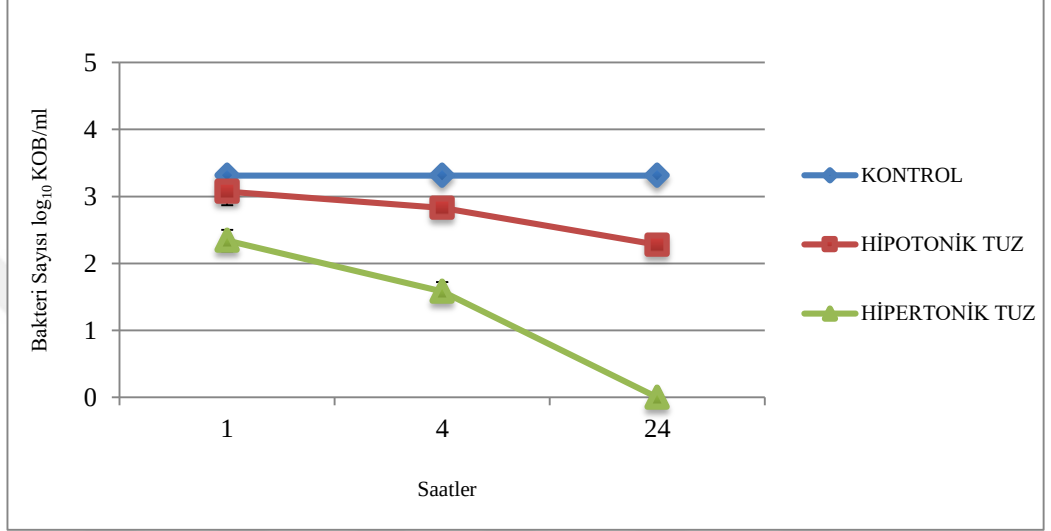
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.4.4. Ozmotik Konsantrasyon - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* sayısında her iki tuz konsantrasyonu için zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.59).

Ozmotik konsantrasyonun planktonik fazda bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile hipertonik tuz

uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.24 log'luk azalma ile elde edilen 3.07 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan *L.pneumophila* üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuzun 24 saatlik muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.59).



Şekil 4.59: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

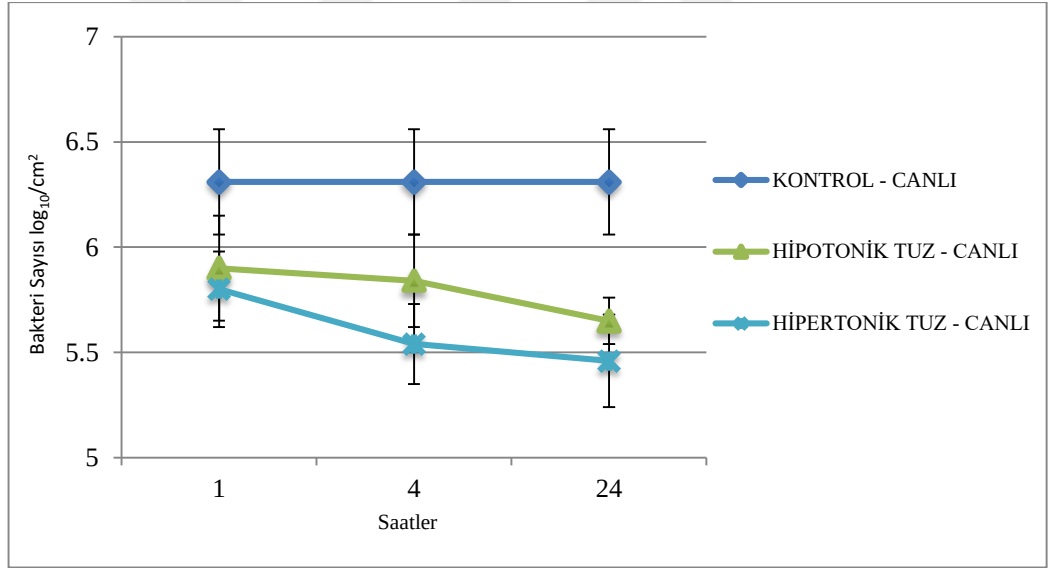
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı ozmotik konsantrasyon değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki ozmotik konsantrasyon uygulamasından anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca hipotonik tuz ve hipertonik tuz çözeltisi uygulamalarının da birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.4.5. Ozmotik Konsantrasyon - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde her iki tuz konsantrasyonunda da zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.60).

Ozmotik konsantrasyonun biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.85 log'luk azalma ile elde edilen 5.46 değeri ile hipertonic tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.41 log'luk azalma ile elde edilen 5.90 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonic tuzun muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.60).

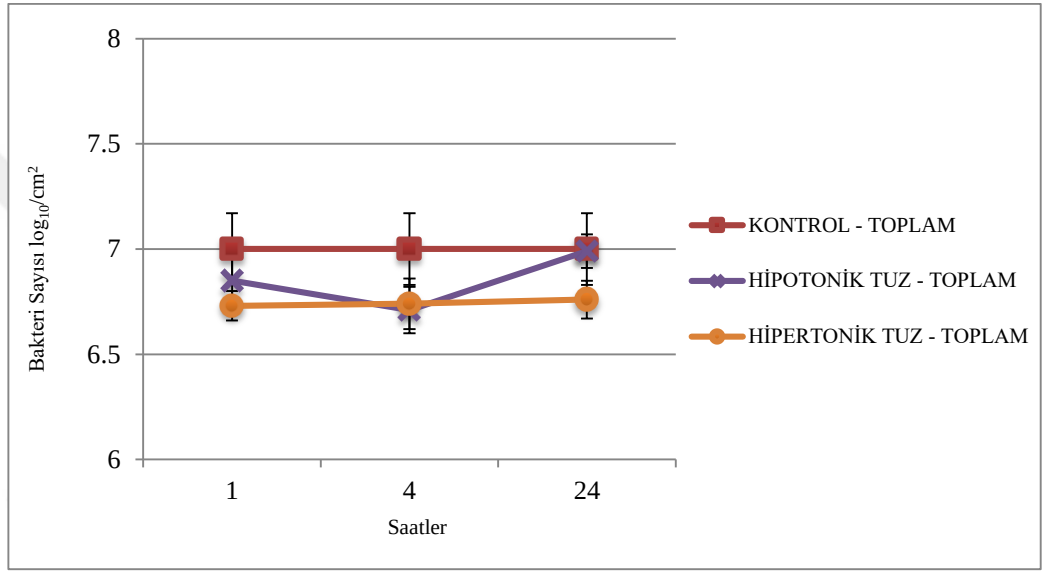


Şekil 4.60: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. ve 4. saatlerde azalma meydana gelirken 24. saatte artış gözlenmiştir. Hipertonik tuz uygulaması sonucunda ise toplam bakteri sayısında zamanla artış meydana gelmiştir (Şekil 4.61).

Ozmotik konsantrasyonun biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.29 log'luk azalma ile elde edilen 6.71 değeri ile hipotonik tuz uygulaması ile 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.01 log'luk azalma ile elde edilen 6.99 değeri ile hipotonik tuz uygulaması ile 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.61).



Şekil 4.61: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

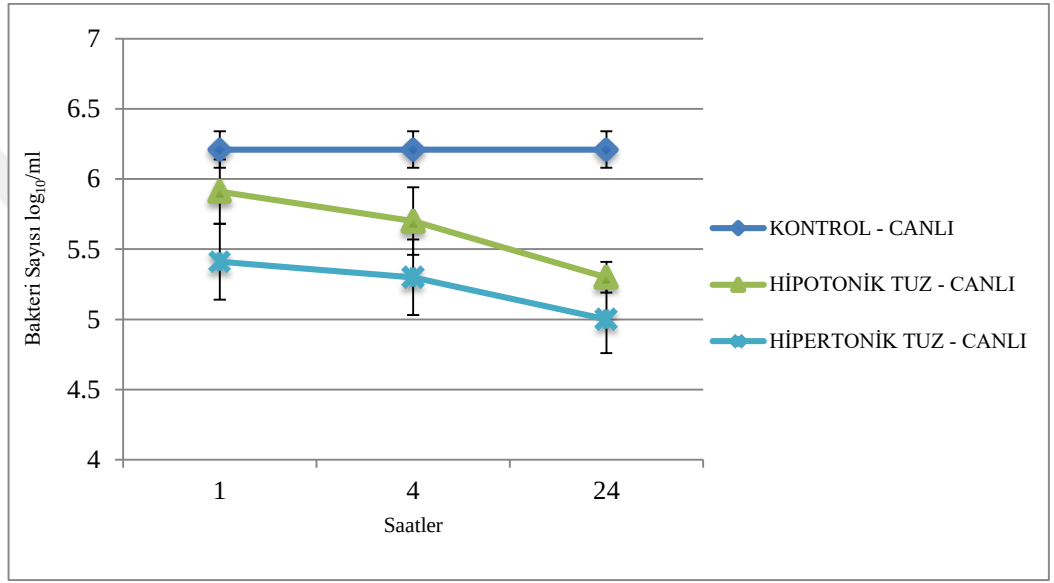
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.4.6. Ozmotik Konsantrasyon - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde her iki tuz konsantrasyonunda da zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.62).

Ozmotik konsantrasyonun planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.21 log'luk azalma ile elde edilen 5.00 değeri ile hipertonic tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.30 log'luk azalma ile elde edilen 5.91 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan canlı bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonic tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.62).



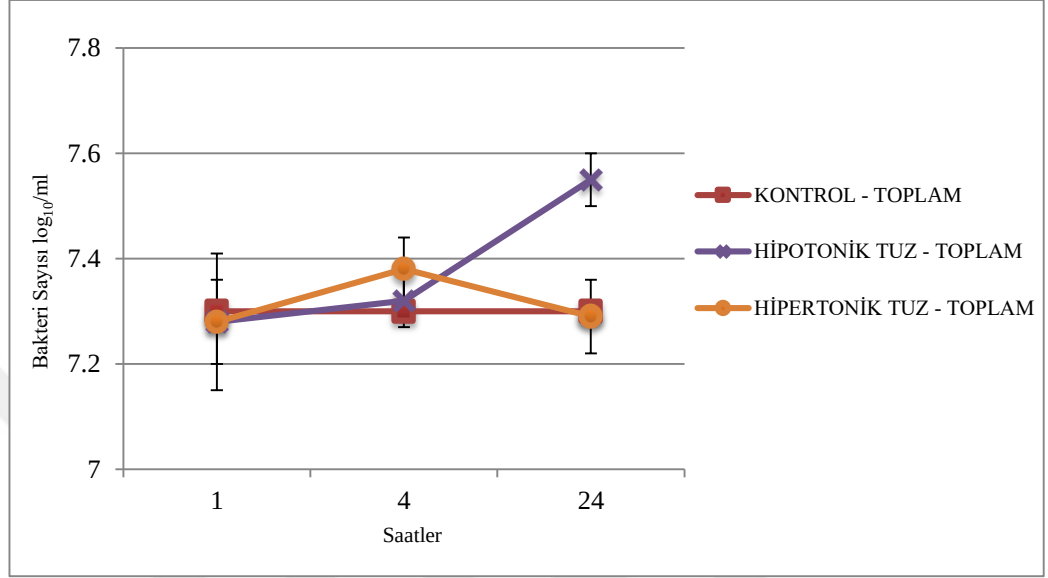
Şekil 4.62: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde hipotonik tuz uygulaması için 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. ve 24. Saatlerde artış gözlenmiştir. Hipertonik tuz uygulaması için ise 1. saatte kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken, 4. saatte artış, 24. saatte ise yeniden azalma gözlenmiştir (Şekil 4.63).

Ozmotik konsantrasyonun planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.02 log'luk azalma ile elde edilen 7.28 değeri ile hipotonik tuz ve hipertonik tuz uygulamaları sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Hipertonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte kontrol örneğine oranla 0.25 log'luk artış

ile en yüksek değer olan 7.55 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan toplam bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonic tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.63).

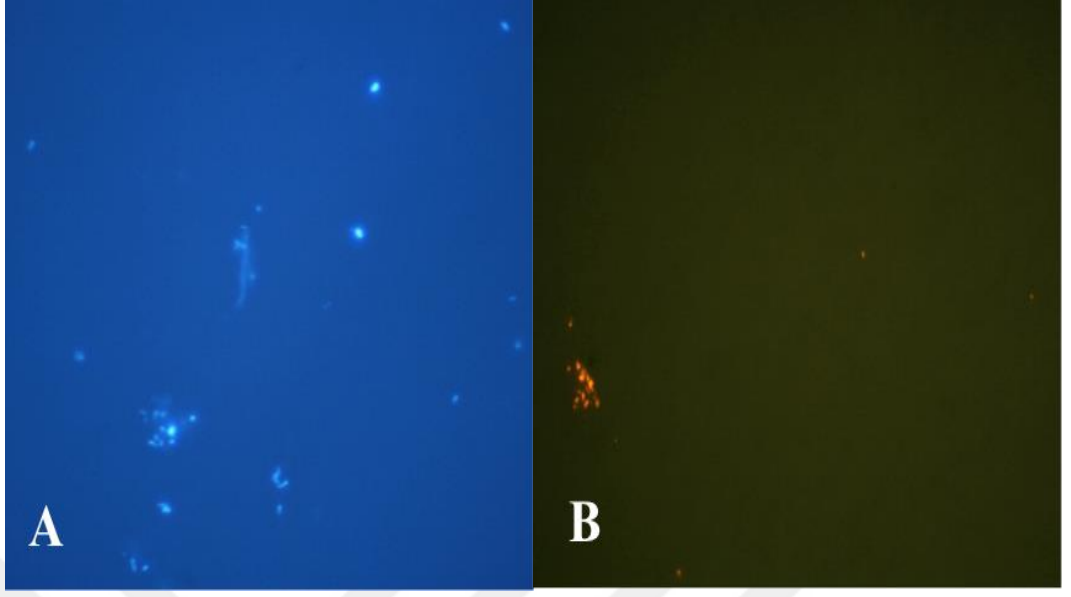


şekil 4.63: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata ubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı ozmotik konsantrasyon değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki ozmotik konsantrasyon uygulamasından anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca hipotonik tuz ve hipertonic tuz çözeltisi uygulamalarının da birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

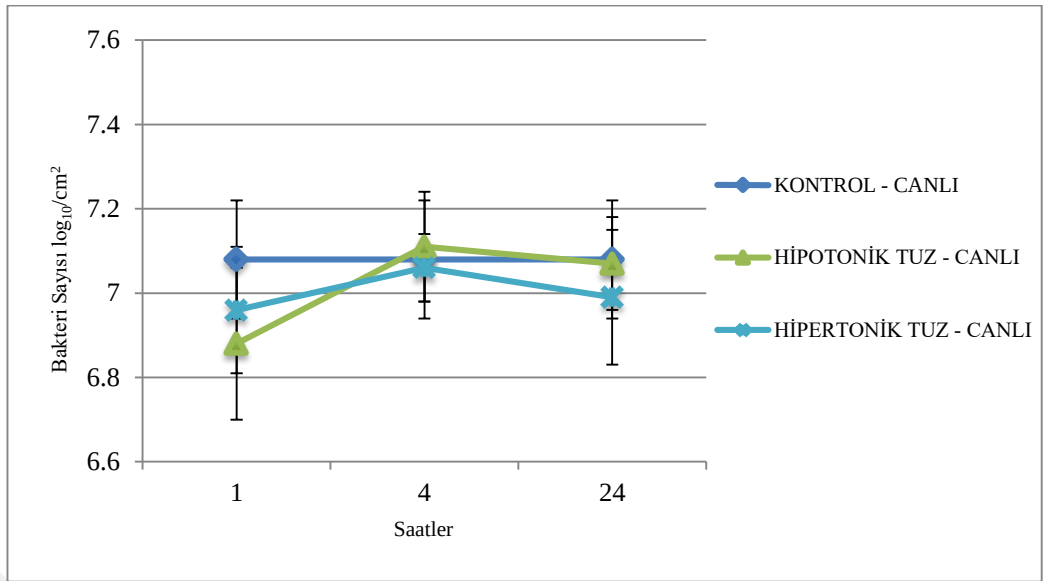


Şekil 4.64: CTC-DAPI boyama tekniği ile epifloresan mikroskop görüntüleri. A) Kontrol örneği, B) Hipertonik tuz ile 24. saatlik muamele örneği.

4.4.7. Ozmotik Konsantrasyon - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde her iki tuz konsantrasyonu için 1. saatteki azalmayı 4. saatte artış izlemiş olup 24. saatin sonunda canlı bakteri sayısında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.65).

Ozmotik konsantrasyonun biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.2 log'luk azalma ile elde edilen 6.88 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.01 log'luk azalma ile elde edilen 7.07 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.65).

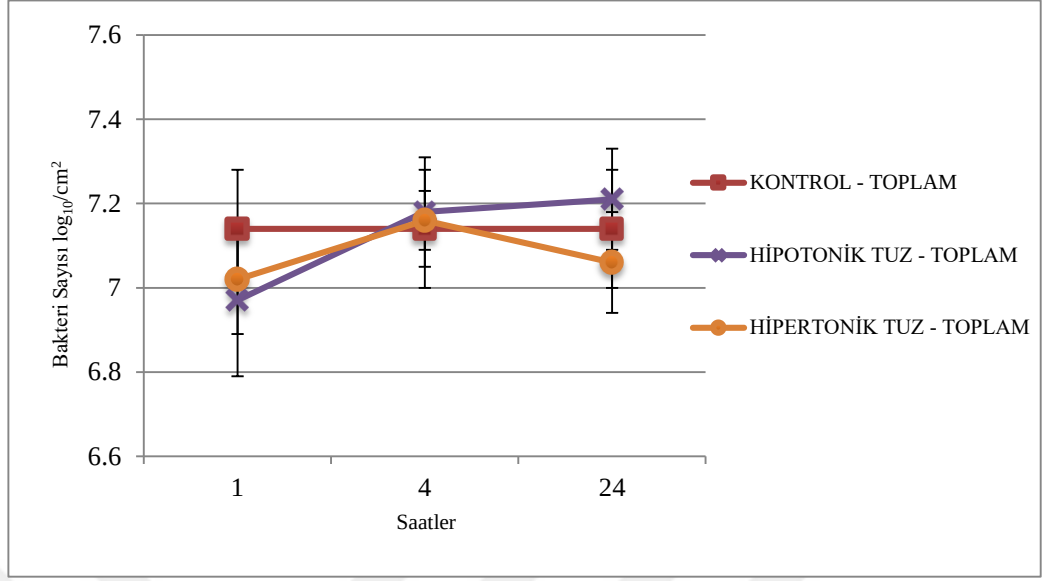


Şekil 4.65: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde hipotonik tuz uygulaması için toplam bakteri sayısında 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerde artış elde edilmiştir. Hipertonik tuz uygulaması için ise 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla azalma meydana gelirken 4. saatte artış, 24. saatte ise yeniden azalma gözlenmiştir (Şekil 4.66).

Ozmotik konsantrasyonun biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.17 log'luk azalma ile elde edilen 6.97 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Hipotonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte kontrol örneğine oranla 0.07 log'luk artış ile en yüksek değer olan 7.21 değeri elde edilmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.66).



Şekil 4.66: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

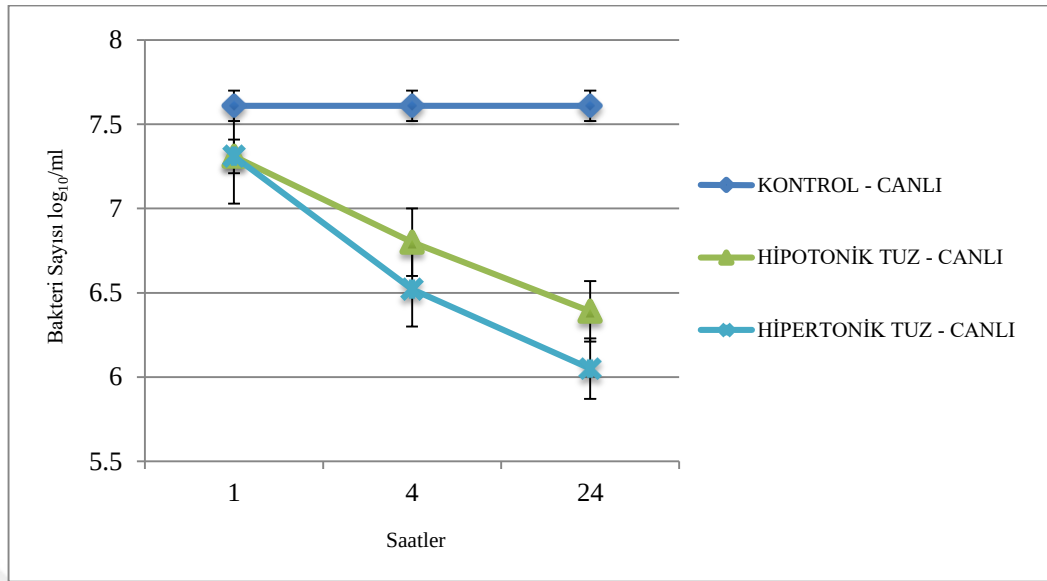
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.4.8. Ozmotik Konsantrasyon - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen canlı bakterilerde her iki tuz konsantrasyonunda da zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.67).

Ozmotik konsantrasyonun planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.56 log'luk azalma ile elde edilen 6.05 değeri ile hipertonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.18 log'luk azalma ile elde edilen 7.43 değeri ile hipertonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında canlı bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.67).

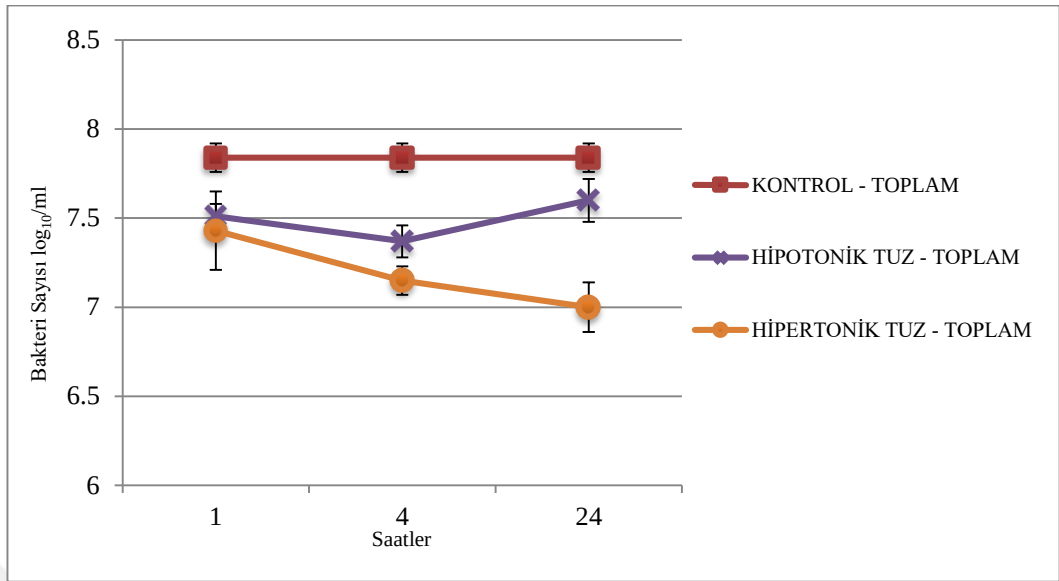


Şekil 4.67: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen toplam bakterilerde hipotonik tuz uygulaması için 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerin sonunda artış gözlenmiştir. Hipertonik tuz uygulaması sonucunda ise zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.68).

Ozmotik konsantrasyonun planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.84 log'luk azalma ile elde edilen 7 değeri ile hipertonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.24 log'luk azalma ile elde edilen 7.6 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında toplam bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.68).



Şekil 4.68: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı ozmotik konsantrasyon değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

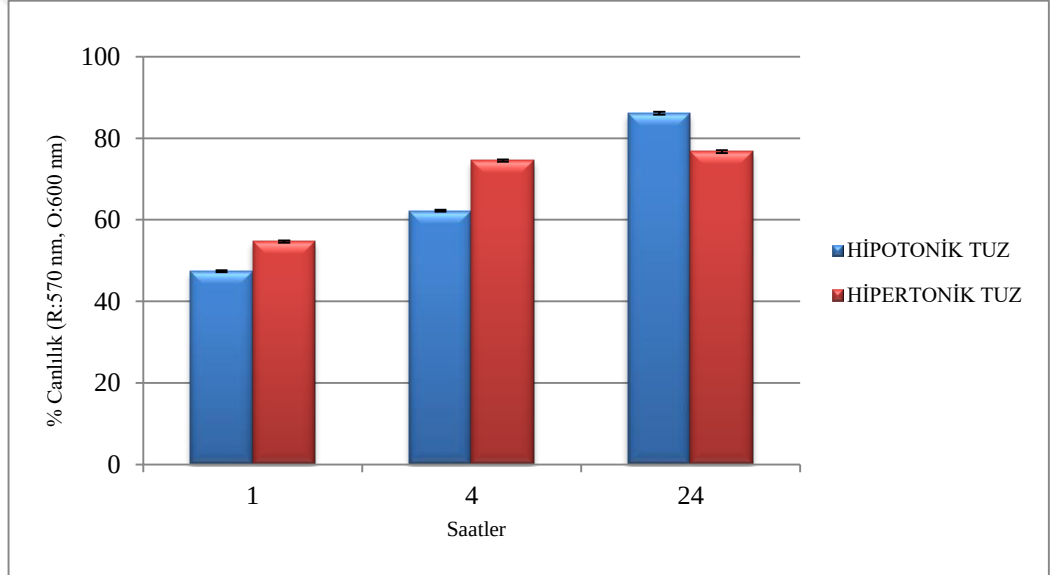
LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki ozmotik konsantrasyon uygulamasından anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Ancak hipotonik tuz ve hipertonik tuz çözeltisi uygulamalarının birbirinde anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.4.9. Ozmotik Konsantrasyon - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde hipotonik tuz çözeltisi ile muamele sonucunda kontrol örneğine kıyasla 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerin sonunda artış gözlenmiştir. Hipertonik tuz

çözeltisi ile muamele sonucunda ise 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla azalma meydana gelmiş olup, 4. saatin sonunda artış ve 24. saatin sonunda ise azalma gözlenmiştir (Şekil 4.69).

Ozmotik konsantrasyonun biyofilm fazında bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 52.63'lük azalma ile elde edilen % 47.37 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 13.90'luk azalma ile elde edilen % 86.10 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm yapısında bulunan bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.69).



Şekil 4.69: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

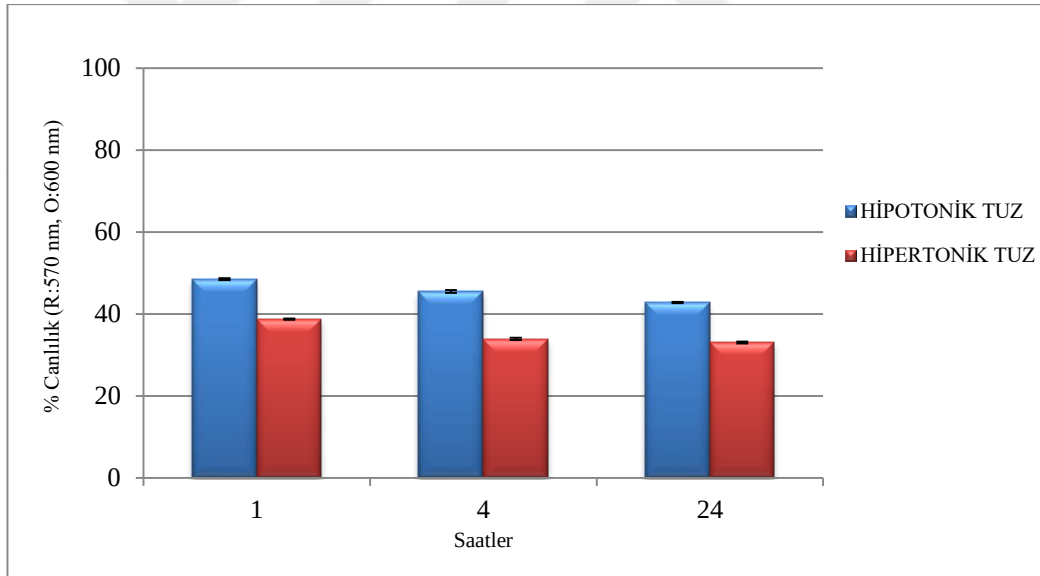
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.4.10. Ozmotik Konsantrasyon - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde hipotonik ve hipertonik tuz çözeltisi ile muamele sonucunda zamanla doğru orantılı olarak azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.70).

Ozmotik konsantrasyonun planktonik fazda bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 66.95'lik azalma ile elde edilen % 33.05 değeri ile hipertonik tuz uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 51.51'lik azalma ile elde edilen % 48.49 değeri ile hipotonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan bakteriler üzerinde daha etkili olan uygulamanın hipertonik tuz muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.70).



Şekil 4.70: Farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan ozmotik konsantrasyon değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı ozmotik konsantrasyon

değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün her iki ozmotik konsantrasyon uygulamasından anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca hipotonik tuz ve hipertonic tuz çözeltisi uygulamalarının da birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı ancak 4. saatin 1. saatten ve 24. saatin 4. saatten anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. 24. saatin ise kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

Ozmotik konsantrasyon uygulaması kapsamında hem biyofilm hem de planktonik bakteriler için uygulanan teknikler arasında çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre biyofilm ve planktonik faz örnekleri için LIVE/DEAD tekniğinin tüm tekniklerden anlamlı olarak farklılaştığı; Kültür ve Alamar blue tekniğinin birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LIVE/DEAD tekniği, diğer tekniklere oranla daha yüksek sayıda canlı bakteri tespit edilmesini sağladığından dolayı en güvenilir teknik olarak belirlenmiştir.

4.4.11. Ozmotik Konsantrasyon - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm fazı örneklerinin farklı ozmotik konsantrasyon değerlerine maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında hipertonik tuz uygulaması sonucunda 1. saatte elde edilen canlı bakteri sayısının hipotonik tuz uygulaması sonucu 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısından daha az olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Farklı ozmotik konsantrasyon koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm²).

	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	1.03	1.03	1.03
Hipotonik Tuz	0	13.3	0
Hipertonik Tuz	1.13	0	0

4.4.12. Ozmotik Konsantrasyon - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı ozmotik konsantrasyon değerlerine maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında hipotonik tuz uygulaması sonucunda 4. saatte elde edilen canlı bakteri sayısında 24. saatte azalma tespit edilmiştir. Hipertonik tuz uygulaması sonucunda ise 4. saatte gözlenen artışı 24. saatte azalma izlemiştir. 24 saatlik deney kapsamında hipotonik tuz uygulaması sonucunda elde edilen canlı *L. pneumophila* sayısının hipertonik tuz uygulaması sonucunda elde edilen canlı bakteri sayısından daha az olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: Farklı ozmotik konsantrasyon koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).

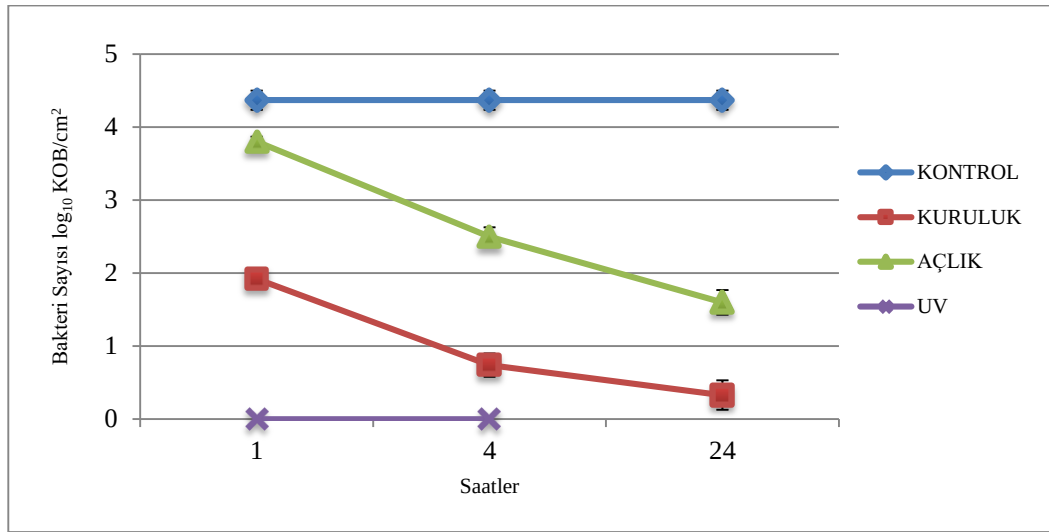
	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	0	0	0
Hipotonik Tuz	0	33.4	0.54
Hipertonik Tuz	12.5	147.2	6.14

4.5. KURULUK, AÇLIK VE UV UYGULAMA SONUÇLARI

4.5.1. Kuruluk, Açlık ve UV - R2A Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı stres koşullarına maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde UV muamelesi sonucunda hiçbir saatte üreme gözlenmezken, kuruluk ve açlık muamelesi sonucunda ise tüm saatlerin sonunda üremede azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.71).

Kuruluk, açlık ve UV'nin biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile UV uygulaması sonucunda 1. ve 4. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneklerine oranla en az düşüş ise 0.57 log'luk azalma ile elde edilen 3.8 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.71).



Şekil 4.71: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

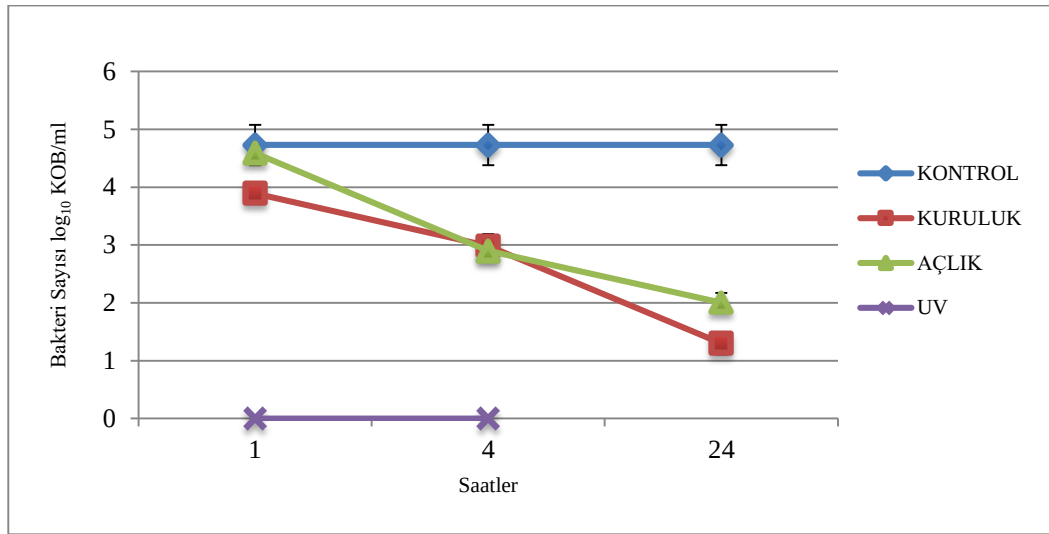
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.5.2. Kuruluk, Açlık ve UV - R2A Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı stres koşullarına maruz bırakılması sonucunda R2A Agarda üreyen aerobik heterotrofik bakterilerde UV muamelesi sonucunda hiçbir saatte üreme gözlenmezken, kuruluk ve açlık muamelesi sonucunda ise tüm saatlerin sonunda üremede azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.72).

Kuruluk, açlık ve UV'nin planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile UV uygulaması sonucunda 1. ve 4. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.14 log'luk azalma ile elde edilen 4.59 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.72).



Şekil 4.72: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayıları (R2A Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

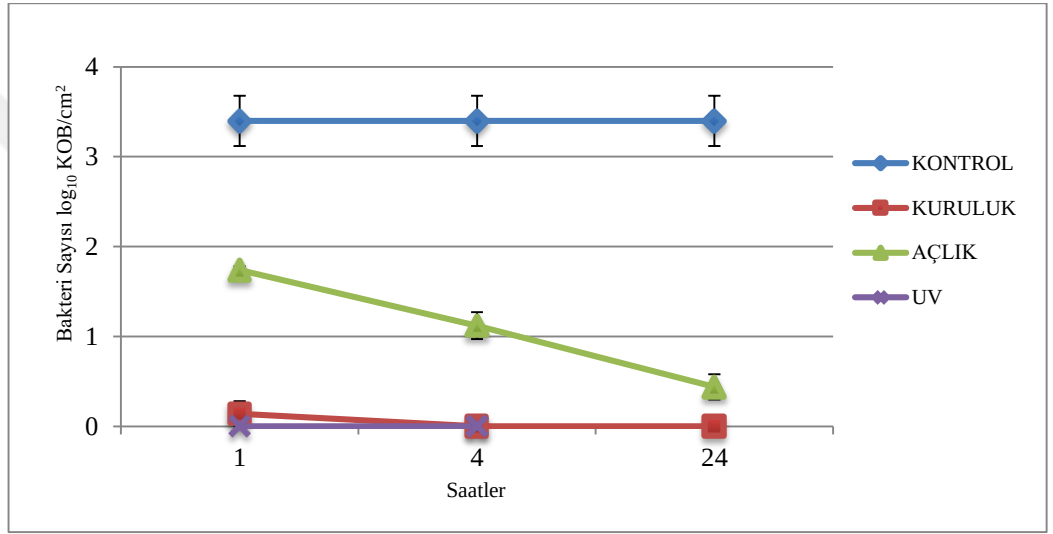
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı kuruluk, açlık ve UV değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün tüm uygulamalardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.5.3. Kuruluk, Açlık ve UV - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı stres koşullarına maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila* sayısında UV muamelesi sonucunda hiçbir saatte üreme gözlenmezken, kuruluk ve açlık muamelesi sonucunda ise tüm saatlerin sonunda üremede azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.73).

Kuruluk, açlık ve UV'nin biyofilm fazında bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile UV uygulaması sonucunda 1. ve 4. saatlerde ve kuruluk uygulaması sonucunda 4. ve 24. saatlerde meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 1.66 log'luk azalma ile elde edilen 1.74 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan *L. pneumophila* üzerinde en etkili uygulamaların UV ve kuruluk muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.73).



Şekil 4.73: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

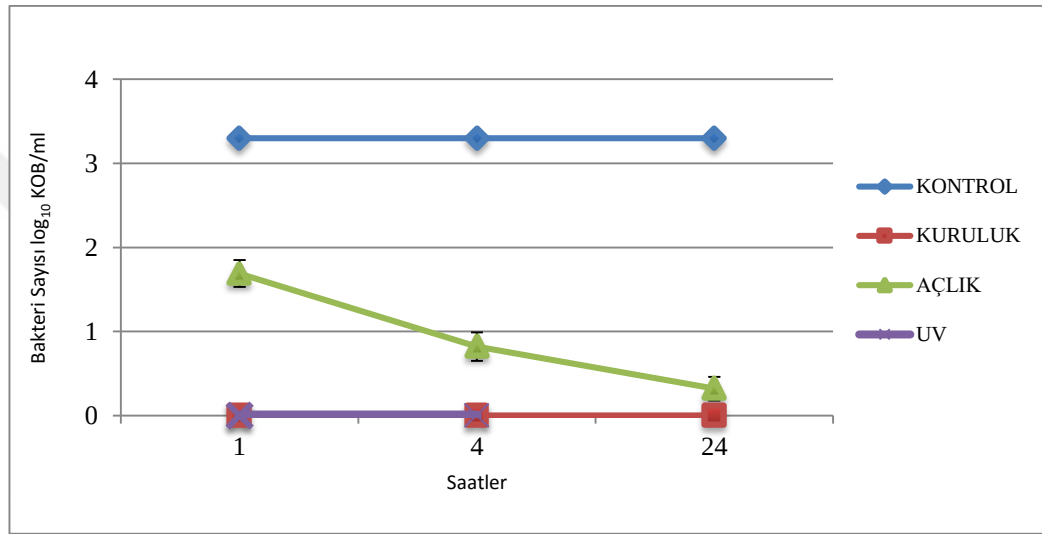
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.5.4. Kuruluk, Açlık ve UV - BCYE Agar Kültür Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı stres koşullarına maruz bırakılması sonucunda BCYE Agarda üreyen *L. pneumophila*'da kuruluk ve UV muamelesi sonucunda hiçbir saatte üreme gözlenmezken açlık muamelesi sonucunda ise tüm saatlerin sonunda üremede azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.74).

Kuruluk, açlık ve UV'nin planktonik fazda bulunan *L. pneumophila*'ya karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile UV ve kuruluk uygulamaları sonucunda meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 1.61 log'luk azalma ile elde edilen 1.69 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan *L. pneumophila* üzerinde en etkili uygulamaların UV ve kuruluk muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.74).



Şekil 4.74: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan *L. pneumophila* sayıları (BCYE Agar).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı kuruluk, açlık ve UV değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

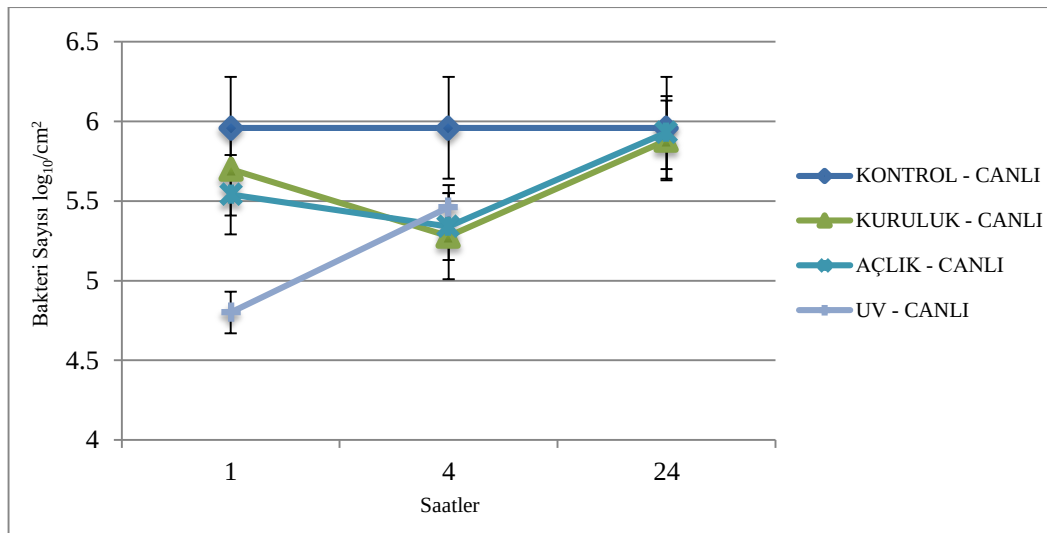
LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün tüm uygulamalardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Ancak parametrelerin birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin

kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.5.5. Kuruluk, Açlık ve UV - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen sonuçlara göre kuruluk ve açlık için canlı bakteri sayısında 1. ve 4. saatlerin sonunda azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda artış gözlenmiştir. Biyofilm örneklerinin UV ışığa maruz bırakılması sonucuna göre ise 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. saatin sonunda ise artış gözlenmiştir (Şekil 4.75).

Kuruluk, açlık ve UV'nin biyofilm fazında bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 1.16 log'luk azalma ile elde edilen 4.8 değeri ile UV uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.03 log'luk azalma ile elde edilen 5.93 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 24. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.75).

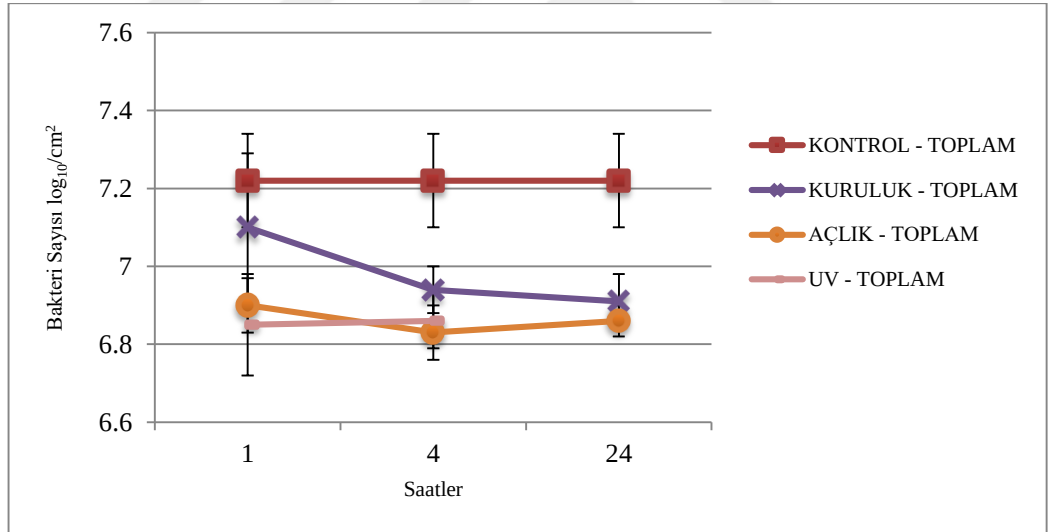


Şekil 4.75: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen sonuçlara göre toplam bakteri sayısında kuruluk için zamanla azalma meydana gelmiştir. Açlık için ise 1. ve 4. saatlerde meydana gelen azalmayı 24. saatte artış izlemiştir. Biyofilm örneklerinin UV ışığa maruz bırakılması sonucuna göre ise 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. saatin sonunda ise artış gözlenmiştir (Şekil 4.76).

Kuruluk, açlık ve UV'nin biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.39 log'luk azalma ile elde edilen 6.83 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.12 log'luk azalma ile elde edilen 7.1 değeri ile kuruluk uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.76).



Şekil 4.76: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

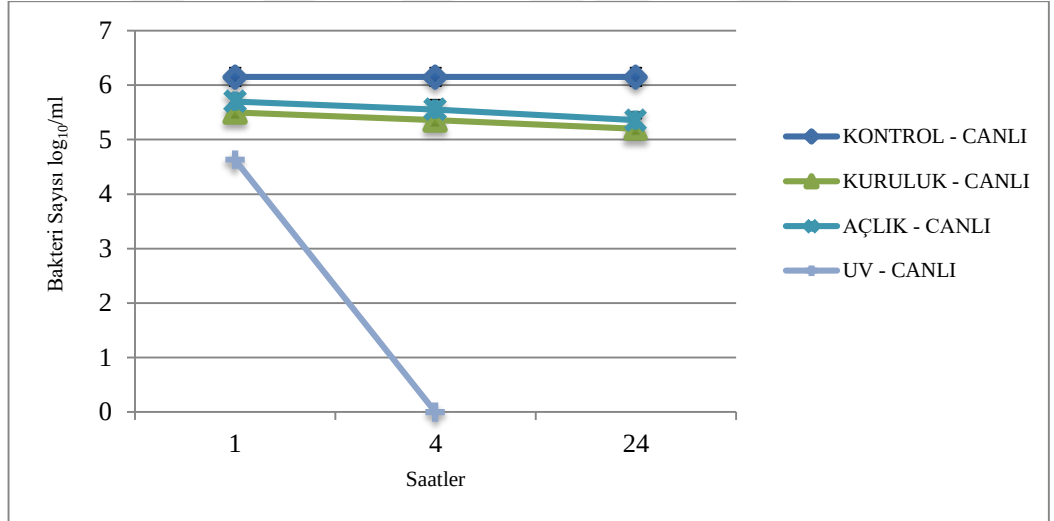
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.5.6. Kuruluk, Açlık ve UV - CTC-DAPI Boyama Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen sonuçlara göre kuruluk ve açlık için canlı bakteri sayısında 1., 4. ve 24. saatlerin sonunda zamanla azalma meydana gelmiştir. Planktonik faz örneklerinin UV ışığa maruz bırakılması sonucuna göre ise canlı bakteri sayısında 1. saatin sonunda azalma gözlenmiş olup 4. saatin sonunda üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.77).

Kuruluk, açlık ve UV'nin planktonik fazda bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile UV uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.45 log'luk azalma ile elde edilen 5.7 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.77).



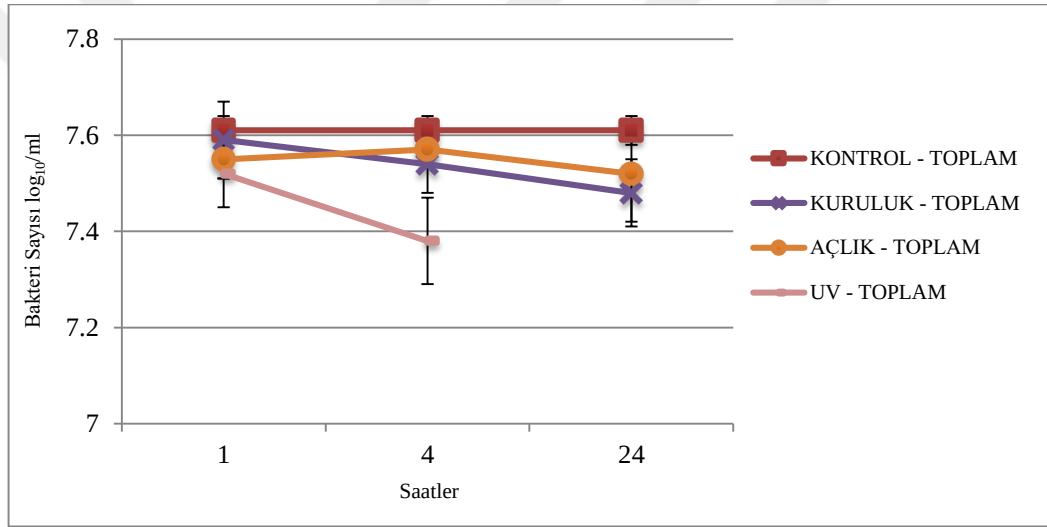
Şekil 4.77: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda CTC-DAPI boyaları kullanılarak belirlenen sonuçlara göre toplam bakteri sayısında kuruluk için zamanla azalma tespit edilmiştir. Açlık için ise 1. saatte kontrol örneğine oranla azalma meydana gelmiş olup 4. saatte artış, 24. saatte ise yeniden azalma gözlenmiştir.

Planktonik faz örneklerinin UV ışığa maruz bırakılması sonucuna göre ise toplam bakteri sayısında zamanla azalma gözlenmiştir (Şekil 4.78).

Kuruluk, açlık ve UV'nin planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.23 log'luk azalma ile elde edilen 7.38 değeri ile UV uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.02 log'luk azalma ile elde edilen 7.59 değeri ile kuruluk uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.78).



Şekil 4.78: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (CTC-DAPI).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

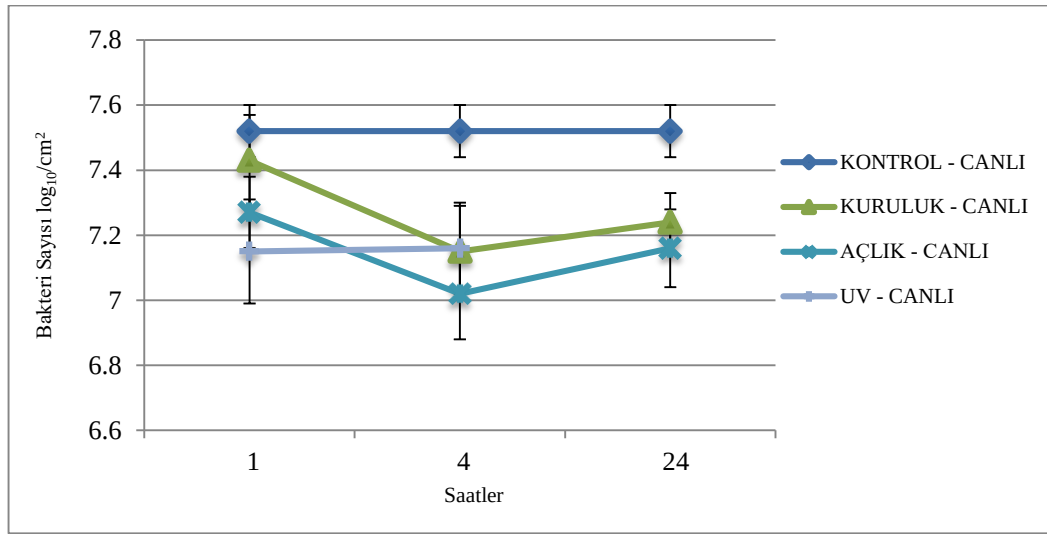
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı kuruluk, açlık ve UV değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrol ve UV uygulamasının diğer tüm uygulamalardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Ancak kuruluk ve açlığın birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.5.7. Kuruluk, Açlık ve UV - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen sonuçlara göre kuruluk ve açlık için canlı bakterilerde 1. ve 4. saatlerde azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda 4. saate göre artış gözlenmiştir. Biyofilm örneklerinin UV ışığa maruz bırakılması sonucunda ise canlı bakteri sayısında 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. saatin sonunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.79).

Kuruluk, açlık ve UV'nin biyofilm fazında bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.5 log'luk azalma ile elde edilen 7.02 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.09 log'luk azalma ile elde edilen 7.43 değeri ile kuruluk uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamaların UV ve açlık muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.79).

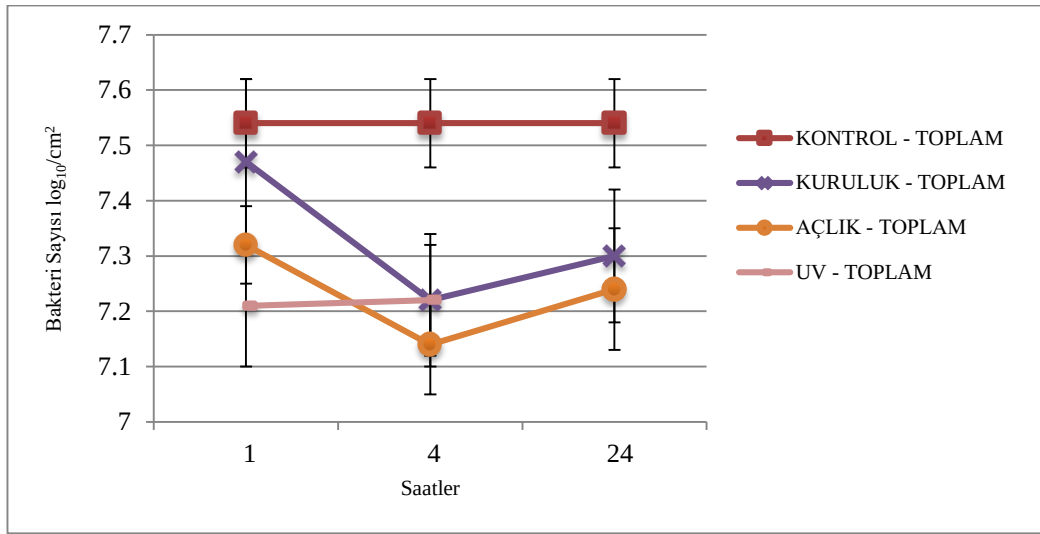


Şekil 4.79: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Biyofilm örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen sonuçlara göre kuruluk ve açlık için toplam bakterilerde 1. ve 4. saatlerde azalma meydana gelirken 24. saatin sonunda 4. saate göre artış gözlenmiştir. Biyofilm örneklerinin UV ışığa maruz bırakılması sonucunda ise toplam bakteri sayısında 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. saatin sonunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.80).

Kuruluk, açlık ve UV'nin biyofilm fazında bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.40 log'luk azalma ile elde edilen 7.14 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.07 log'luk azalma ile elde edilen 7.47 değeri ile kuruluk uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.80).



Şekil 4.80: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

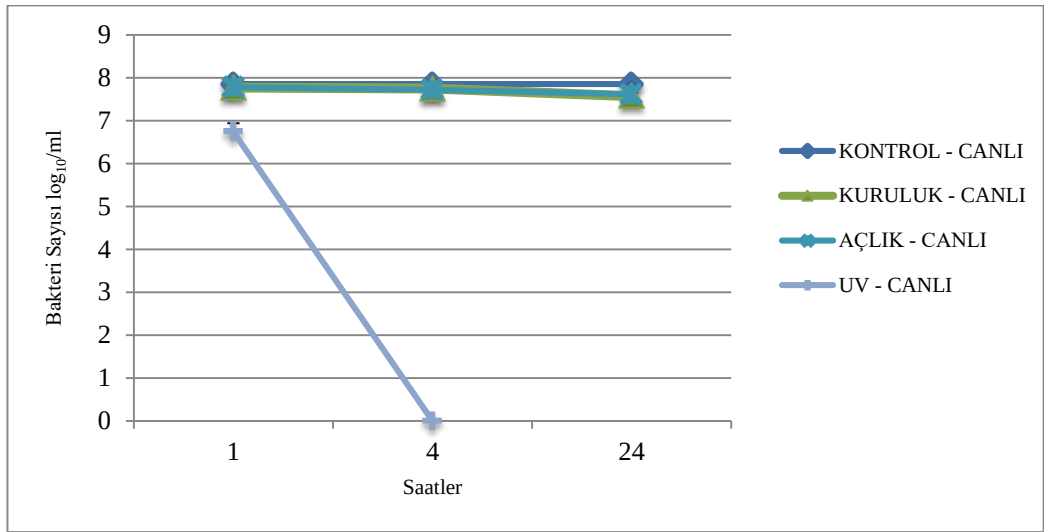
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.5.8. Kuruluk, Açlık ve UV - LIVE/DEAD Kit Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen sonuçlara göre kuruluk ve açlık için canlı bakteri sayısında zamanla azalma meydana gelmiştir. Planktonik faz örneklerinin UV ışığa maruz bırakılması sonucuna göre ise canlı bakteri sayısında 1. saatin sonunda azalma meydana gelmiş olup 4. Saatin sonunda ise canlı bakteriye rastlanmamıştır (Şekil 4.81).

Kuruluk, açlık ve UV'nin planktonik fazda bulunan canlı bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0 değeri ile UV uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.07 log'luk azalma ile elde edilen 7.78 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan canlı bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.81).

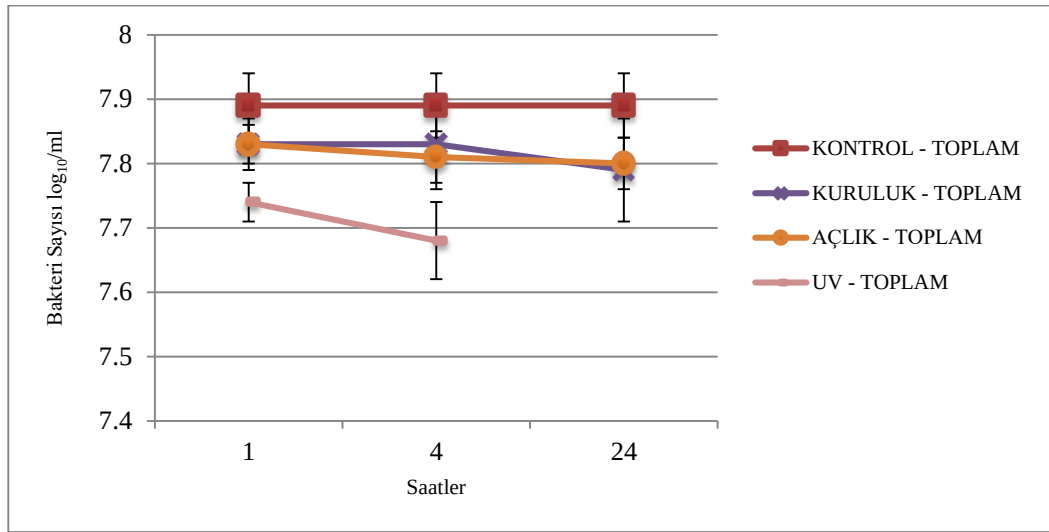


Şekil 4.81: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Planktonik faz örneklerinin kuruluk, açlık ve UV'ye maruz bırakılması sonucunda LIVE/DEAD kit kullanılarak belirlenen sonuçlara göre toplam bakteri sayısında tüm uygulamalar için zamanla azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.82).

Kuruluk, açlık ve UV'nin planktonik fazda bulunan toplam bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş 0.21 log'luk azalma ile elde edilen 7.68 değeri ile UV uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise 0.06 log'luk azalma ile elde edilen 7.83 değeri ile kuruluk uygulaması sonucunda 1. ve 4. saatlerde ve açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan toplam bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.82).



Şekil 4.82: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan toplam bakteri sayıları (LIVE/DEAD).

(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

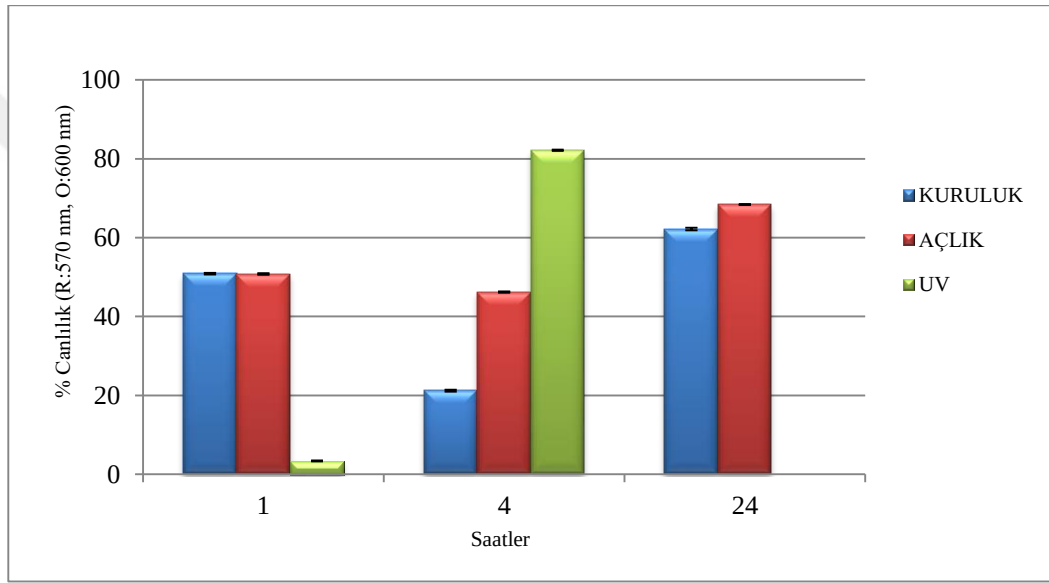
İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı kuruluk, açlık ve UV değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün ve tüm uygulamaların birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre saatler açısından kontrolün ve tüm saatlerin birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

4.5.9. Kuruluk, Açlık ve UV - Alamar Blue Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm örneklerinin farklı stres koşullarına maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde tüm stres faktörleri için 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken, 4. saatin sonunda kuruluk ve açlıkta azalma gözlenmiş olup UV uygulaması sonucunda ise artış meydana gelmiştir. 24. saatin sonunda ise kuruluk ve açlık uygulaması sonucunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.83).

Kuruluk, açlık ve UV'nin biyofilm fazında bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 96.63'lük azalma ile elde edilen % 3.37 değeri ile UV uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 17.87'lik azalma ile elde edilen % 82.13 değeri ile UV uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında biyofilm fazında bulunan bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın kuruluk muamelesi olduğu tespit edilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan bakteri sayısının biyofilm fazında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.83).



Şekil 4.83: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

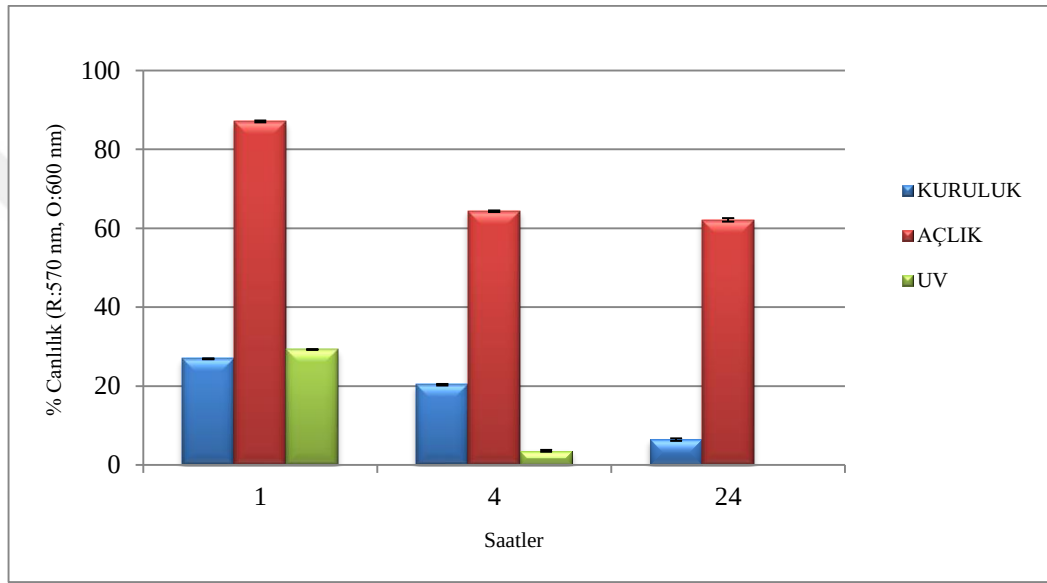
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

4.5.10. Kuruluk, Açlık ve UV - Alamar Blue Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin farklı stres koşullarına maruz bırakılması sonucunda Alamar blue boyasının indirgenmesine bağlı olarak belirlenen canlı bakterilerde tüm uygulama sonuçlarında zamanla doğru orantılı olarak azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.84).

Kuruluk, açlık ve UV'nin planktonik fazda bulunan bakterilere karşı etkinliğinde kontrol örneğine oranla en yüksek düşüş % 96.42'lik azalma ile elde edilen % 3.58 değeri ile UV uygulaması sonucunda 4. saatte meydana gelmiştir. Kontrol örneğine oranla en az düşüş ise % 12.89'luk azalma ile elde edilen % 87.11 değeri ile açlık uygulaması sonucunda 1. saatte meydana gelmiştir. Tüm değerler göz önüne alındığında planktonik fazda bulunan bakteriler üzerinde en etkili uygulamanın UV muamelesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.84).



Şekil 4.84: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakterilerin kontrol örneklerine oranla elde edilen canlılık yüzdeleri (Alamar blue).

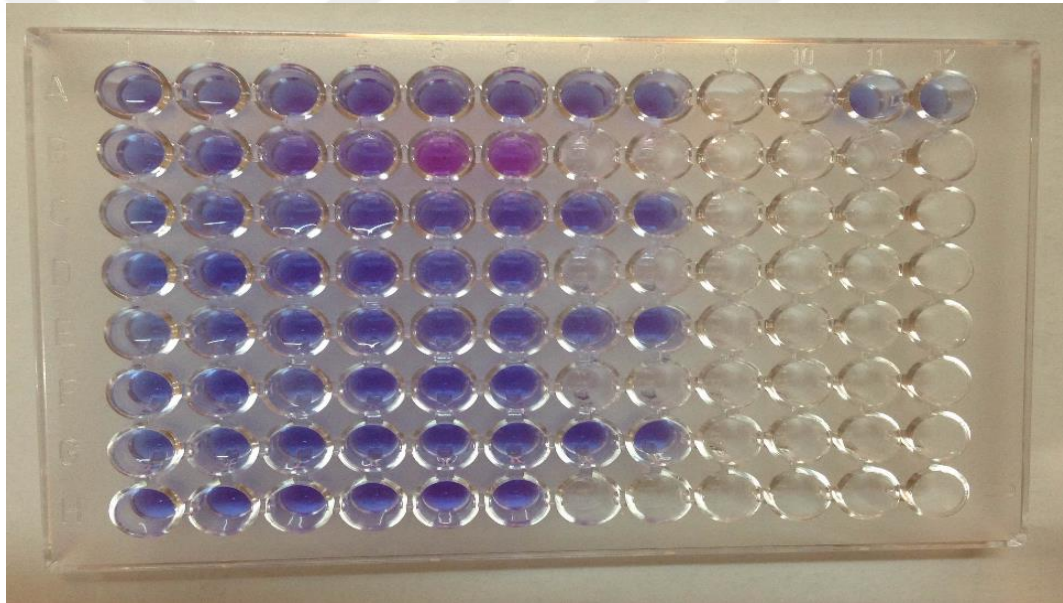
(Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan kuruluk, açlık ve UV değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı saatler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Mikroorganizma sayılarına dair dağılımlarda uygulanan farklı kuruluk, açlık ve UV değerleri ve saatler açısından biyofilm ve planktonik bakteri grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

LSD testi sonuçlarına göre parametre açısından kontrolün açlık dışındaki diğer tüm uygulamalardan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir. LSD testi sonuçlarına göre

saatler açısında 1. saatin kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı; 24. saatin de kontrolden anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir.

Kuruluk, açlık ve UV uygulaması kapsamında hem biyofilm hem de planktonik bakteriler için uygulanan teknikler arasında çift yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. LSD testi sonuçlarına göre biyofilm ve planktonik faz örnekleri için LIVE/DEAD tekniğinin tüm tekniklerden anlamlı olarak farklılaştığı kültür, CTC-DAPI ve Alamar blue tekniklerinin ise birbirinden anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur. LIVE/DEAD tekniği, diğer tekniklere oranla daha yüksek sayıda canlı bakteri tespit edilmesini sağladığından dolayı en güvenilir teknik olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.85: Alamar blue boyası ile 24 saatlik muamele sonucunda boyanın indirgenmesine bağlı olarak gözlenen renk değişimi.

4.5.11. Kuruluk, Açlık ve UV - EMA-qPCR Sonuçları - Biyofilm

Biyofilm fazı örneklerinin kuruluk koşullarına maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında 1. ve 4. saatlerin sonunda gözlenen azalmayı 24. saatin sonunda artış izlemiştir. Açlık ve UV uygulamaları sonucunda ise zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan biyofilm örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/cm²).

	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	78.93	78.93	78.93
Kuruluk	32.55	8.68	13.46
Açlık	35.91	9.88	0
UV	12.09	5.01	

4.5.12. Kuruluk, Açlık ve UV - EMA-qPCR Sonuçları - Planktonik

Planktonik faz örneklerinin kuruluk ve UV koşullarına maruz bırakılması sonucunda EMA-qPCR tekniği kullanılarak belirlenen canlı *L. pneumophila* sayısında zamanla azalma meydana gelmiştir. Açlık uygulaması ile 1. ve 4. saatlerde canlı bakteri sayısında gözlenen azalmayı 24. saatin sonunda artış izlemiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Farklı stres koşullarına maruz bırakılan planktonik faz örneklerinde bulunan canlı bakteri sayıları (EMA-qPCR) (GU/ml).

	1. saat	4. saat	24. saat
Kontrol	714.88	714.88	714.88
Kuruluk	102.27	90.18	81.89
Açlık	135.87	0	78.75
UV	10.53	0	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyofilmler son yıllarda endüstriyel ve evsel olmak üzere pek çok alanda görülmektedirler. Ne yazık ki biyofilm gelişimi genellikle zararlı sonuçlar doğurmaktadır. Birçok farklı sanayi kuruluşu, biyofilm gelişiminden kaynaklı bakım ve temizlik için maliyet artışı gibi olumsuz sonuçlara maruz kalmaktadır. Su sistemleri, dental üniteler, hastaneler ve gıda üretim ekipmanları biyofilmlerin meydana gelerek zararlı etkilere sebep olduğu alanların başında gelmektedir. Üründe bozulma, verimlilikte düşüş, ekipman arızaları ve korozyon endüstriyel alanlarda biyofilmden kaynaklı sorunların en önemlileridir. Endüstriyel alanlarda biyofilm kaynaklı hasarların sebep olduğu maliyet yıllık milyar doları aşmaktadır (Garret ve diğ., 2008; Denkhaus ve diğ., 2007).

Soğutma kuleleri biyofilm tabakasının meydana geldiği yüzeylerin başında yer almaktadır. Endüstriyel süreçlerde ısı uzaklaştırma aracı olarak kullanılan soğutma kuleleri sahip olduğu besin içeriği, uygun sıcaklık aralığı, geniş yüzey alanı, hava ve ışık gibi özellikleri dolayısıyla mikrobiyal üreme için ideal ortamlardır. Soğutma kulesinde meydana gelen biyofilm tabakası işletim ve ekipman zararına neden olmalarının yanı sıra aerosol üretimiyle sahip olduğu mikroorganizmaların uzak mesafelere yayılmalarını sağlayarak sağlık sorunlarına da sebep olmaktadır (Ludensky, 2005; Liu ve diğ., 2009).

Günümüzde su tesisatları, dağıtım sistemleri ve soğutma kuleleri gibi insan yapımı su sistemlerinde biyofilm yapısında ve planktonik fazda bulunan mikroorganizmaların kontrolü ve giderimi için fiziksel temizliğin yanı sıra kimyasal dezenfeksiyon, UV uygulaması, ultrasonik ses dalgaları, yüksek sıcaklık gibi sanitasyon uygulamaları yaygın olarak kullanılmaktadır (Canals ve diğ., 2015; Bott, 2009; Rajagopal ve diğ., 2012). Ancak biyofilm varlığının sağladığı direnç, stres koşulları karşısında mikroorganizmaların canlılıklarını devam ettirmelerine yardımcı olmakta ve böylece uygulanan mücadele stratejilerinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır.

Biyofilm varlığının gerek endüstriyel gerekse klinik alanlarda sebep olduğu zararlar göz

önüne alındığında biyofilmle mücadelede etkili stratejilerin belirlenmesi, üzerinde ısrarla durulması gereken bir konudur. Bu sebeple çalışmamız kapsamında soğutma kulesi model sisteminde *L. pneumophila* aşılması sonucunda oluşturulan 14 haftalık biyofilm ve planktonik faz bakterileri üzerine çeşitli stres faktörleri uygulanmıştır. Uygulamaların ardından kullanılan farklı tekniklerle aerobik heterotrofik bakteriler ve *L. pneumophila* bakterisinin stres koşulları karşısındaki canlılık durumları incelenmiştir.

Çalışmamız kapsamında kullanılan soğutma kulesi model sistemi gerçek soğutma kulesi işletim koşullarına en yakın olacak şekilde çalıştırılmıştır. Soğutma kulesi suyu için en önemli kriterlerin başında TÇM konsantrasyonu gelmektedir. TÇM miktarında meydana gelen artışın suyun pH, konsantrasyon ve elektrolit özelliğini arttırmasının yanı sıra korozyon etkisinin de olması nedeniyle kontrol edilmesi gerekmektedir (Gleeson ve Gray, 1997). TÇM değerini düşük seviyede tutmak için, sistem suyunun %3'lük değeri olarak tavsiye edilmesi dolayısıyla sisteme günlük 3 litre olarak taze şebeke suyu eklemesi yapılmıştır (Bruijs ve Jenner, 2012).

Çalışma kapsamında 4 haftalık periyotlarda TÇM, ÇO, pH ve sıcaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca sisteme uygulanan taze su eklenmesi sayesinde TÇM değerinin dengede tutulması sağlanmış olup aynı zamanda gerçek soğutma kulesi suyu için önerilen TÇM < 500 mg/l değerleri elde edilmiştir (Hilbert, 2006). Çalışmada sistemin 8 aylık çalışma periyodu sırasında elde edilen ortalama TÇM değeri 422.5 mg/l'dir. Benzer durum pH ölçümleri sonucunda da elde edilmiş olup gerçek soğutma kulesi için önerilen pH 7-9 değerleri çalışma boyunca korunmuştur (Electric Power Research Institute, 2003). Çalışmada sistemin 8 aylık çalışma periyodu sırasında ölçülen ortalama pH değeri 8.04'tür.

Aynı model sistemin kullanıldığı farklı çalışmalar, sistem içinde oluşturulan biyofilm tabakasının kültüre edilebilir heterotrofik canlı bakteri sayısı açısından gerçek soğutma kulesi biyofilmi ile benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Türetgen, 2004; Vatansever, 2011). Kültüre edilebilirlikteki tutarlı sonuçlar söz konusu model sistemin, mikrobiyolojik açıdan gerçek soğutma kulesini temsil ettiğini göstermesi dolayısıyla çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışma kapsamında 4 haftalık periyotlarda 3 gün arka arkaya olmak üzere McFarland 1'e ayarlanmış 10 ml *L. pneumophila* Serogrup 1 (ATCC 33152) suşu sisteme ilave edilmiştir. Bu uygulama sisteme periyodik olarak ilave edilen kuponlar ve şebeke suyu ile giriş yapan aerobik heterotrofik bakterilerin yanı sıra periyodik olarak yapılan TÇM, ÇO ve pH ölçümleri ile de uyumlu olması ve bu sayede tüm kupon ve tüm uygulamalar için aynı koşulların sağlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada 14 haftalık biyofilm ve planktonik faz örnekleri farklı stres koşullarına maruz bırakılmıştır. 14 haftalık örneklerin kullanılmasının nedeni aynı sistemde daha önce gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda biyofilmin 16. haftada dengeye ulaştığı ve olgun hale geldiği, bu haftadan sonra ise hem kültüre edilebilir bakteri hem de karbonhidrat miktarında azalma gözlenmesidir (Vatansever, 2011; Şanlı-Yürüdü, 2009). 14 haftalık biyofilm, biyofilmle mücadelede doğru uygulamaların tespit edilmesinde, dengeye ulaşmış ve olgun bir biyofilme dahi etkili olabilecek yöntemlerin belirlenmesi adına en doğru aşama olduğu düşünülmektedir.

Yüksek su akış hızından kaynaklanan stres, hücrelerin temiz ve pürüzsüz yüzeylere tutunmalarını engellemekte ve tutunmuş hücrelerin kopmasını teşvik etmektedir (Shen ve diğ., 2015). Bu sebeple de çalışma kapsamında kullanılan model sistemde sabit hızda çalışan su sirkülasyon motoru kullanılmış ve böylece su akışı, türbülansa sebep olmayacak aralık dahilinde kabul edilen Reynold sayısı 2000 olacak şekilde sabitlenmiştir (Liu ve diğ., 2006).

Çalışma kapsamında biyofilm oluşturulması amacıyla cam yüzeyler tercih edilmiştir. Bu durum cam yüzeyin polipropilen ve çelikten daha düzgün oluşu, metal yüzeylerde meydana gelen korozyonun biyofilm oluşumunu etkilemesi gibi sebeplerden dolayı kontrol edilmesi zor olan değişkenleri en aza indirmenin yanı sıra camın inert oluşu ve yüzeyinin düz oluşuna bağlı olarak örneklerin daha sağlıklı bir şekilde yüzeyden kaldırılarak analiz edilebilmesinin sağlanması açısından tercih edilmiştir (Heyde ve diğ., 1990).

Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar maruz kaldıkları çevresel stresler karşısında kendilerini biyofilm matriksi içindeki bileşenlerin yapısını değiştirme, difüzyon oranını azaltma, gen anlatımlarında değişiklik yapma ve üreme oranını düşürme

gibi çeşitli yollarla koruma sağlamaktadırlar. %97'nin üzerindeki su oranı başta kuruluk olmak üzere çeşitli çevresel streslerden hücreleri korumaktadır. Bu yolla biyofilm yapısındaki hücreler planktonik formlara kıyasla özellikle stres koşulları karşısında daha avantajlı hale gelmektedirler (Burmolle ve diğ., 2014).

Çalışmada uygulanan stres faktörlerinin ilk grubunu farklı sıcaklık uygulamaları oluşturmaktadır. Bu amaçla 4°C, 37°C ve 65°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık düzeyi biyofilm ve planktonik faz bakterileri üzerine 1, 4 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır.

Çalışmada uygulanan 4°C'lik düşük sıcaklık uygulaması soğuk şok stres koşulunu temsil etmektedir. Soğuk şoku ile karşılaşan hücrelerin verdiği yanıtı soğuk şoku yanıtı adı verilmektedir. Laboratuvar koşullarında soğuk şoku yanıtı normal üreme sıcaklığından daha düşük sıcaklıklara ani düşüş sonucunda meydana gelmektedir. Soğuk şoku ile karşılaşmanın ardından 3-6 saat boyunca üreme durmaktadır. Alışma fazı adı verilen bu fazda soğuk ile teşvik edilen proteinler dışındaki pek çok proteinin anlatımı durmaktadır. Bu fazın sonunda hücreler ortama alışmakta ve tekrar üremeye başlamaktadır (Barria ve diğ., 2013). Örneğin planktonik fazdaki *E. coli* için alışma fazı 4 saattir (Thieringer ve diğ., 1998). Çalışma kapsamında elde edilen kültür sonuçlarına göre 4°C soğuk şok uygulaması ile hem aerobik heterotrofik bakteriler hem de *L. pneumophila*'nın biyofilm örneklerinde 1. saatin sonunda bakteri sayısında azalma tespit edilirken ilerleyen saatlerde mikroorganizmaların sayılarında artış meydana gelmiştir. Benzer durum planktonik faz örnekleri için de geçerli olmakla birlikte azalma 4. saatin sonuna kadar devam etmiş ve 4. saat itibariyle sayıda artış gözlenmiştir. İlk saatlerde yaşanan azalmanın mikroorganizmaların alışma fazından kaynaklandığı ve daha sonraki saatlerde gözlenen artışın ise adaptasyonun ardından mümkün olduğu düşünülmektedir.

Mikroorganizmaların soğuk şok ile karşılaştıklarında girdikleri adaptasyon fazı soğuk şok proteinlerini sentezledikleri aşamadır. Soğuk şoku proteinleri tek zincirli nükleik asitlere bağlanabilen RNA şaperonları olup soğuk ortamın sebep olduğu zararlardan hücreyi korumaktadır (Wouters ve diğ., 1999). Soğuk şoku proteinleri düşük sıcaklığının sebep olduğu membran akışkanlığında ve enzim aktivitesinde azalma gibi stres koşullarından bakterinin korunmasına yardımcı olurken DNA ve RNA'nın ikincil yapısının kararlılığını arttırmakta ve böylece replikasyon, transkripsiyon ve translasyon etkinliğinin azaltılmasının önüne geçmektedir (Fonseca ve diğ., 2011). Ayrıca bu proteinler

translasyonu kolaylaştırmak amacıyla ribozomları da ortama uyarlamaktadır (Cairrao ve diğ., 2003).

E. coli (Yamanaka ve diğ., 1998), *B. subtilis* (Graumann ve diğ., 1997), *S. aureus* (Anderson ve diğ., 2006), *Lactococcus lactis* (Wouters ve diğ., 1998), *Streptococcus thermophilus* (Wouters ve diğ., 1999), *Vibrio parahaemolyticus* (Urmersbach ve diğ., 2015) gibi pek çok mikroorganizmada soğuk şoku proteinlerinin varlığı tespit edilmiş ve soğuk ortam koşullarında söz konusu proteinlerin anlatımlarındaki artış ile soğuk stresinden korunmayı sağladıkları belirlenmiştir. Çalışma kapsamında gerek kültür gerekse epifloresan mikroskop sonuçlarından elde edilen yüksek oranda canlı mikroorganizma varlığının, 4°C'lik soğuk şok uygulaması sonucunda anlatımı teşvik edilen soğuk şok proteinlerinin üretimine bağlı olarak mikroorganizmaların hayatta kalabilmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Soğuk şoku altında mikroorganizmalar, membran akışkanlığını korumak için doymamış yağ asitlerinin miktarı, trans izomerleri ve kısa zincirli yağ asitlerinin miktarında artış gibi membran fosfolipitlerinde değişiklikler yapmaktadırlar. *L. pneumophila*'da sıcaklık düşüşünün doymamış yağ asitlerinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *L. pneumophila*'da tip II hücre dışı proteinlerinin de soğuk ortama adaptasyonda katkısı olduğu tespit edilmiştir. Tip II bağımlı zar proteinlerinin düşük sıcaklıkta hücrenin büyümesini arttıran difüze edilebilir bir proteinin üretiminin artırılmasına aracılık ettikleri ortaya çıkarılmıştır (Söderberg ve diğ., 2004). Çalışma kapsamında gerçekleştirilen qPCR sonuçlarında hem biyofilm hem de planktonik fazda 4°C soğuk şok uygulaması sonucunda 24. saatte canlı mikroorganizma varlığının tespit edilebilmiş olmasının *L. pneumophila*'nın soğuk ortama adaptasyon amacıyla kullandığı mekanizmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kültür, epifloresan mikroskop ve Alamar blue sonuçlarına göre biyofilm yapısında soğuk koşullara adaptasyonun ardından gözlenen artış 1. saatin ardından başlarken, planktonik faz bakterilerinde gözlenen artış ise 4. saatin ardından başlamıştır. Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalarda daha hızlı bir şekilde yaşanan toparlanmanın biyoofilmin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Besin dağılımı ve oksijen konsantrasyonu gibi çevresel koşullar biyofilm içinde homojen

dağılmamaktadırlar. Dolayısıyla da biyofilm içinde gözlenen bu farklı lokal çevrelere adaptasyonda ‘mikrokoloni’ olarak adlandırılan alt popülasyonlar, farklı metabolik yollar, stres yanıtları ve özel aktiviteler sergilemektedirler. Biyofilm yapısında gözlenen bu heterojen yapı farklı gen anlatımlarının gerçekleştiğini göstermektedir. Bu anlatımlardaki farklılık biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar ile planktonik formları arasında genotipik farklılıkların meydana gelmesini sağlamaktadır ve genel olarak biyofilm hücreleri çevresel streslere planktonik türlerinden daha dirençli olmaktadır. Bu sonuçlar biyofilm oluşumunun zorlayıcı ortam koşullarında hayatta kalma stratejisi olarak görülmesini sağlamaktadır (Kuczynska-Wisnik ve diğ., 2010). Çalışmada uygulanan tüm teknikler dikkate alındığında istatistiksel analiz sonuçlarına göre de 4°C soğuk şok uygulaması karşısında biyofilm yapısında bulunan bakteriler ile planktonik faz örnekleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

E. coli’de biyofilm oluşumu ve sıcaklık stresinin ilişkisini inceleyen benzer bir çalışmada, sıcaklığın 23°C’ye düşürülmesinin, hem soğuk şoku genlerinin hem de biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerin anlatımının arttırılmasını teşvik ettiği ortaya çıkarılmıştır. Biyofilm oluşumu ile ilgili genlerin anlatımında ilk 24 saatlik periyotta artış gözlenmiştir. Bu durum sıcaklığın biyofilm oluşumunu etkilediğini göstermektedir. Soğuk şoku genlerindeki artışın ise ani sıcaklık düşüşüne yanıt olarak meydana geldiği ve uzun vadede gelişime aracılık ettiği ortaya çıkmıştır (White-Ziegler ve diğ., 2008). *L. monocytogenes* ile yapılan benzer bir çalışmada soğuk şoku altında bakterinin cam, paslanmaz çelik, polivinil klorür gibi yüzeylere tutunma yeteneğinin soğuk şokuna maruz bırakılmayan hücrelere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ben Slama ve diğ., 2012).

Antartika’da denizde yaşıyan bakterilerin soğuk ortam koşullarında EPS üretimlerini arttırdıkları ve biyofilm yapısında bulunan bakterilerin soğuk ortam koşullarına daha dirençli oldukları belirlenmiştir (Jeong ve diğ., 2014). *Pseudomonas extremaustralis* ile yapılan bir çalışmada, 10°C soğuk ortam koşullarında bakterinin EPS içeriğini arttırdığı ortaya çıkarılmıştır. Aynı zamanda hareket yeteneği de biyofilm oluşturmada oldukça önemli olup bu bakterilerin soğuk ortam koşullarında hareket yeteneklerini artırarak biyofilm oluşturma kapasitelerini arttırdıkları tespit edilmiştir (Tribelli ve Lopez, 2011).

Çalışma kapsamında soğuk şokun ardından kültür sonuçlarında tespit edilen canlı

mikroorganizma sayısında azalma ve daha sonrasında gözlenen artışın meydana geldiği saatler CTC-DAPI, LIVE/DEAD kit ve Alamar blue sonuçlarıyla uyumlu olmakla birlikte epifloresan mikroskop sonucunda elde edilen canlı bakteri sayısının kültür metodundan 2-3 log daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durumun soğuk koşullar altında mikroorganizmaların kültüre edilebilirliklerini kaybetmeleri sonucunda girdikleri VBNC fazından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Geçmiş yıllarda yapılan farklı bir çalışmada 4°C soğuk ortam koşulları karşısında biyofilm yapısında bulunan aerobik heterotrofik bakteriler ve *L. pneumophila* bakterisinin kültür sonuçlarında zamana bağlı olarak azalma tespit edilirken, epifloresan mikroskop analizleri önemli ölçüde canlı bakteri varlığını göstermiştir. Bu durum soğuk koşulların 6 aylık olgun biyofilmde dahi VBNC fazına girişte etkili olduğunu göstermektedir (Vatansever, 2011). *L. pneumophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholera*, *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Campylobacter spp.*, *Francisella tularensis*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* gibi pek çok önemli bakterinin VBNC fazına girdikleri tespit edilmiştir (Özçakır, 2007).

VBNC fazı sadece üremenin kısıtlanmasına değil aynı zamanda gen anlatımlarında da değişikliğe sebep olarak soğuk koşullarda hayatta kalmaya yardımcı olmaktadır. *V. cholerae* ile yapılan farklı çalışmalarda bakterinin, 4°C'lik soğuk koşullarda protein sentezi ve stres yanıtında görevli genlerinin VBNC fazında normal faza göre anlatımlarının arttığı tespit edilmiştir. 4°C'lik soğuk uygulaması sonucunda bakterinin 70 gün boyunca membran bütünlüğü, patojenite ve kolonizasyon yeteneğini muhafaza ettiği tespit edilmiştir. VBNC fazında bulunan bakterilerin 100 adet geninin anlatımının normal faza oranla 5 kat arttığı tespit edilmiştir ve bu genlerin büyük çoğunluğu hücresel süreçlerden sorumludur (Asakura ve diğ., 2006; Gonzalez-Escalona ve diğ., 2006).

Çalışmamız kapsamında uygulanan sıcaklık stresine ilişkin diğer bir stres faktörü 65°C'lik sıcaklık uygulamasıdır. 65°C'lik sıcaklık uygulaması sonucunda hem biyofilm hem planktonik fazda bulunan aerobik heterotrofik bakteriler ve *L. pneumophila* sayısında 1. saatin sonunda azalma meydana gelirken 4. ve 24. saatlerin sonunda kültürde üremeye rastlanmamıştır. Buna karşın epifloresan mikroskop analizleri sonucunda canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar mikroorganizmanın yüksek sıcaklık karşısında VBNC fazına girdiğini göstermektedir. Sıcak su dağıtım sistemlerinde

55°C'nin üstündeki sıcaklıklarda *L. pneumophila*'nın üremesini baskılayarak VBNC fazına girdiği qPCR sonuçları ile tespit edilmiştir (Mansi ve diğ., 2014). *Vibrio* türleri için 37°C'lik sıcaklığın, hücrelerin VNBC fazına girmesine neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu aşamada bakterilerin yüzeye kolonizasyonlarının azaldığı, virulans genlerinin baskılandığı ancak hayatta kalarak patojenite potansiyellerini koruduğu tespit edilmiştir (Iordache ve diğ., 2008). *E. coli*'nin de 45°C sıcaklık uygulaması karşısında VBNC fazına girdiği belirlenmiştir (Noor ve diğ., 2013). *Bacillus* türlerinde de 54°C'lik sıcaklık uygulaması sonucunda bakterilerin sıcaklık şok yanıtının bir sonucu olarak VBNC fazına girdiği tespit edilmiştir (Munna ve diğ., 2015).

Legionella'nın su sistemlerinden eliminasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan sıcaklık şoku uygulaması 70°C'de 30 dk'dır (Epalle ve diğ., 2015). Ancak sıcaklığın 60°C'den yüksek sıcaklıklara çıkarılmasında, özellikle büyük binalarda yüksek sıcaklık devamlılığının güvenilir olmaması ve birkaç hafta veya birkaç ay sonunda yeniden kolonizasyonun meydana gelmesi 70°C sıcaklık ile 30 dk uygulamasının güvenilirliğini tartışmalı hale getirmektedir. Bu gibi sistemlerde *Legionella*'nın stres koşullarına direnç göstermesi ve adapte olmasında biyofilm yapısında bulunması, amip içinde bulunması ve VBNC fazına girebilme yeteneği rol oynamaktadır. Çevresel ve klinik *L. pneumophila* üzerine 70°C sıcaklığın 60 dk uygulaması sonucunda bakterinin hala hayatta kaldığı ve hücrelerin VBNC fazına girdikleri tespit edilmiştir (Epalle ve diğ., 2015). Söz konusu bulgular çalışmamız kapsamında elde edilen veriler ile uyumlu olup 65°C sıcaklık ile 1 saatlik muamele sonucunda *L. pneumophila* için planktonik faz bakterilerinde kültürde üremeye rastlanmazken epifloresan mikroskop sonuçlarında canlı bakteri varlığı tespit edilmiştir. Benzer duruma biyofilm yapısında da rastlanmış olup farklı nokta kültürde kontrole göre % 75'lik azalma ile canlı bakteri varlığının gözlenmiş olmasıdır. Bu durumun biyofilmden kaynaklı direncin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Yüksek sıcaklık karşısında mikroorganizmaların hayatta kalabilmeleri sıcak ortama adapte olmalarını sağlayan şaperonlar ve proteazlardan oluşan sıcaklık şoku proteinlerinden kaynaklanmaktadır. Yüksek sıcaklık protein denatürasyonu ve katlanmasına sebep olmaktadır. Şaperonlar denature olmuş proteinlerin doğru katlanmalarını sağlarken, proteazlar geri dönüşümü olmayacak şekilde hasar görmüş proteinlerin yıkımını gerçekleştirmektedir. Yüksek sıcaklık koşulları sıcak şoku

proteinlerinin anlatımında artışa sebep olmaktadır (Grover ve diğ., 2011). *L. pneumophila*'da tespit edilen sıcaklık şoku proteinlerinin yüksek sıcaklıkta protein katlanması ve sekresyon görevlerinin yanı sıra konak hücreye tutunma, invazyon ve fagozomun lizozom ile füzyon adımlarını değiştirmede de görevli olduğu tespit edilmiştir (Hoffman ve Garduno, 1999).

65°C sıcaklığa 24 saat süreyle yıl içinde birkaç kez maruz bırakılan hastane su sistemlerinde yüksek sıcaklığa dayanıklı *L. pneumophila* türlerinin gelişimi gözlenmiştir (Buse ve diğ., 2014). Yüksek sıcaklık koşullarında *L. pneumophila*'nın canlılığını devam ettirmesine katkıda bulunan diğer bir koşul da ölü mikroorganizmaların varlığıdır. Bu konu ile ilgili yapılan benzer bir çalışma, sıcaklık ile ölen mikroorganizmaların sıcak su sistemlerinde *L. pneumophila* için besin kaynağı olması ve bakterinin canlılığını devam ettirmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Temmerman ve diğ., 2006).

L. pneumophila dışında pek çok bakterinin yüksek sıcaklık karşısında canlılığını devam ettirebildiği tespit edilmiştir. Bu durumun sıcaklık uygulaması karşısında sıcaklık şok proteinlerinin sentezlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bakterilerden biri de *S. aureus*'tur. Sıcak şoku karşısında DnaK sıcaklık şoku proteininin bakterinin 42°C'de yaşamasını sağladığı ancak bu proteini üreten gen açısından mutant olan türlerin bu sıcaklıkta yaşayamadığı tespit edilmiştir. Ayrıca mutant hücrelerin yüzeye tutunma ve biyofilm oluşturma yeteneğinde de azalma tespit edilmiş olup biyofilm oluşturma yüksek sıcaklık şoku karşısında korunma yanıtı olabileceği düşünülmektedir (Singh ve diğ., 2012). Sıcaklık şoku proteinlerinin varlığının tespit edildiği diğer bir bakteri *E.coli*'dir. *E.coli*'de bulunan sıcaklık şoku proteinlerinin oranının sıcak şokuna maruz kaldıktan 10-15 dk sonra en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir (Shimizu, 2014).

B. subtilis'te de 4 farklı sınıfa ayrılan sıcaklık şoku proteinleri tespit edilmiştir (Schumann ve diğ., 2002). Sıcaklık şoku proteinlerinin tespit edildiği diğer bir bakteri türü *L. monocytogenes*'tir. Bakterideki sıcaklık şoku proteinleri 42°C'de hücrelerin hayatta kalmaların sağlarken, bu sıcaklıkta sıcaklık şoku proteinlerinin üretiminden sorumlu gen açısından mutant olanların canlılıklarını devam ettiremediği tespit edilmiştir (Nair ve diğ., 2000). *Enterococcus faecalis*'te sentezlenen sıcaklık şoku proteinleri de bakterinin 50°C sıcaklıkta yaşamasını mümkün kılmaktadır (Oliveira ve diğ., 2011). Peridontal patojen olan *Porphyromonas gingivalis* biyofilmi üzerine yapılan sıcaklık etkisinin incelendiği

çalışmada mikroyarray sonuçları *uspA* geninin anlatımının biyofilm oluşumu sırasında arttığı, bu genin optimum biyofilm gelişimi için gerekli olduğu ve bu yolla bakterinin 37°C dışındaki optimal olmayan sıcaklık değerlerinde (25°C, 43°C) yaşanan strese daha dirençli hale geldiği tespit edilmiştir (Chen ve diğ., 2006). Çalışmamız kapsamında 24 saat süreyle 65°C'lik sıcaklık uygulaması sonucunda hem biyofilm hem de planktonik fazda canlı bakteri varlığının tespit edilmiş olması, bakterilerin soğuk şokta olduğu gibi sıcaklık şoku uygulaması karşısında geliştirdiği dirençten kaynaklandığı düşünülmektedir.

CTC-DAPI, LIVE/DEAD kit ve Alamar blue ile tespit edilen canlılıkta ise biyofilm yapısında 1. saatte gözlenen azalmayı 4. ve 24. saatlerde artış izlerken, planktonik fazda 4. saatteki artışın ardından 24. saatte yeniden azalma gözlenmiştir. Çalışma sonucunda epifloresan mikroskopta biyofilm fazında planktoniğe göre daha yüksek sayıda canlı mikroorganizma tespit edilmiştir. Biyofilm yapısında canlı bakteri sayısında gözlenen istikrarlı artış ve planktonik faza göre daha yüksek canlı bakteri varlığının biyofilmin sağladığı korumadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Tüm tekniklerden elde edilen sonuçlar dikkate alındığında istatistiksel analiz sonuçlarına göre de biyofilm yapısında bulunan ve planktonik faz bakterileri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Farklı bakteri türlerinin sıcaklığa karşı gösterdiği dirençte biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik fazda olanlara göre daha dirençli olduğu bilinmektedir. *Mycobacterium bovis* ile yapılan 50°C sıcaklık ile muamele sonucunda biyofilm yapısında daha yüksek sayıda canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir (McAuliffe ve diğ., 2006). Yüksek sıcaklıklarda biyofilmin daha hızlı, daha kalın ve daha geniş bir yayılım gösterdiği yapılan farklı bir çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Söz konusu çalışmada biyofilm yapısında bulunan *L. pneumophila*'nın sıcaklık değişimlerine karşı gösterdiği yanıt incelenmiş ve 25°C'den 42°C'ye çıkan sıcaklık artışının biyofilm kalınlığında iki kat artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık artışının biyofilm yapısında bulunan su kanallarının azaltılmasıyla birlikte hücre yoğunluğunda artışa sebep olduğu ortaya çıkmıştır (Piao ve diğ., 2006).

S. aureus ile yapılan farklı bir çalışmada 50°C, 60°C ve 70°C sıcaklık uygulamaları sonucunda tüm sıcaklıklar için biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktoniklere oranla daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca biyofilm yaşı arttıkça sıcaklık

karşısında sergilediği direncin de arttığı bulunmuştur. (Al-Azemi ve diğ., 2011). Farklı bir çalışmada pilot sıcak su sistemine *Legionella* ile kontamine soğutma kulesi suyu aşılması ile oluşturulan biyofilm üzerine iki kez olmak üzere 70°C’de 30 dk sıcaklık muamelesi yapılmıştır. İlk uygulamanın *Legionella* konsantrasyonunun azaltılması konusunda geçiş etkisi yaptığı ancak ikinci uygulamanın herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Hatta bununla birlikte test örneklerinde kontrol örneklerine oranla 1-2 log daha fazla bakteri elde edilmiştir. Bu sonuçlar sıcaklık uygulamasının biyofilmi tamamen ortadan kaldıramamasının yanında daha hızlı kolonizasyona sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır (Farhat ve diğ., 2010).

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre 65°C sıcaklık şoku ve 4°C soğuk şoku uygulamaları ile kontrol örnekleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bununla birlikte 65°C sıcaklık şoku uygulaması ile 4°C soğuk şoku uygulaması arasında da istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmiş olup yüksek sıcaklığın düşük sıcaklığa oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Çalışmamız kapsamında uygulanan diğer bir stres faktör grubunu farklı pH uygulamaları oluşturmaktadır. Bu amaçla asidik ortamı temsilen pH 3 ve alkali ortamı temsilen pH 11’lik stres koşulları, biyofilm ve planktonik faz bakterilerine 1, 4 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır.

Kültür sonuçlarına göre hem aerobik heterotrofik bakteriler hem de *L. pneumophila* için biyofilm fazında bulunan bakterilerin aside karşı dirençli oldukları ve baz uygulamasının canlılığı azaltma konusunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın planktonik fazda ise bakterilerin alkali uygulamasına dirençli oldukları ve asit uygulamasının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Biyofilm yapsında bulunan mikroorganizmaların asit karşısında dirençli oldukları yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. *E.coli*’de *bhsA* (*ycfR*) geninin asit stresi karşısında biyofilm oluşumunun teşviki için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Bu gene sahip hücrelerin pH 2.5 ile 1 saat inkübasyonun ardından bu geni taşımayan mutantlara oranla 12 kata kadar dirençli olduğu ortaya çıkarılmıştır (Zhang ve diğ., 2007). Ayrıca farklı bir çalışmada da *E. coli*’de *ariR* (*ymgB*) geninin biyofilm oluşumu ve biyofilm yapısında aside direnç genlerinin anlatımı için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Lee ve diğ., 2007).

Çalışma dahilinde LIVE/DEAD kit sonuçları da kültür sonuçlarıyla tutarlı olup biyofilm fazında alkali şok uygulamasının, planktonik fazda ise asit şoku uygulamasının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* biyofilmi ile yapılan farklı bir çalışmada biyofilm hücreleri pH 12 ile muamele edilmiştir. pH 12 muamelesi sonucunda planktonik hücrelerin biyofilm hücrelerine oranla gösterdikleri dirençte artış gözlenmiştir (Weber ve diğ., 2010). Söz konusu veriler çalışmamız ile uyumlu olup pH 11 uygulaması sonucunda planktonik fazda biyofilm fazına oranla daha yüksek sayıda canlı bakteri tespit edilmiştir. Buna karşın asidik şok uygulaması sonucunda ise biyofilm fazında planktonik bakterilerden daha yüksek sayıda canlı mikroorganizma varlığı gözlenmiştir.

Planktonik fazda bulunan *L. monocytogenes* ile yapılan farklı bir çalışmada pH 11 ile 48 saat muamele sonucunda yalnızca 1 log azalma meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra alkali ortamın sıcaklık karşısında da mikroorganizmanın daha dirençli olmasına sebep olduğu tespit edilmiştir (Taormina ve Beuchat, 2001). Söz konusu bu tespitler çalışmamız kapsamında elde edilen verilerle uyumlu olup LIVE/DEAD kit sonuçlarına göre pH 11 ile 24 saat muamelenin sonucunda canlı bakteri sayısında kontrole kıyasla yaklaşık 0.7 log'luk azalma tespit edilmiştir.

Kültür sonuçlarında *L. pneumophila* için planktonik fazın asit ve alkali pH ile muamele edildiği 4. saatte üreme tespit edilmezken, EMA-qPCR sonuçlarına göre ise planktonik faz örneklerinin 4. saatinde tespit edilen canlı *L. pneumophila* sayısı asit uygulaması sonucunda alkali ortam uygulamasına oranla daha yüksek çıkmıştır. Bu sonuçlar *L. pneumophila* için ekstrem pH uygulamalarının hücreleri VBNC fazına girişleri yönünde teşvik etmelerinin yanı sıra *L. pneumophila* eliminasyonu için alkali şok uygulamasının asidik uygulamadan daha etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Yapılan benzer bir çalışmada kültüre edilebilir *L. pneumophila*'nın kaplıcaların kaynak, boru sistemi ve banyo tesisatından toplanan asidik, nötral ve alkali sular olmak üzere geniş aralıktaki pH değerlerinde yaşayabildiği tespit edilmiştir. Çalışmada *L. pneumophila*'nın oda sıcaklığında pH'ı 2-10 arasında ayarlanmış PBS (fosfat tamponu) solüsyonlarında kültüre edilebilirliğini koruduğunu ortaya çıkarılmıştır. Sıcaklığın 42°C olduğu durumlarda 10 dk içinde pH 2'de kültüre edilebilirliğin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. Temas süresinin 10 dk'dan 60 dk'ya çıkarıldığı durumda ise kültüre edilebilirlikte tüm pH değerlerinde tutarlı bir düşüş gözlenmiştir. pH 4-6 arasında ise

kültüre edilebilirliğin, pH 8-10 arasından daha iyi bir şekilde muhafaza edildiği ve buradan yola çıkarak *L. pneumophila* eliminasyonunda alkali pH'ın asidik pH'dan daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Chang ve diğ., 2008).

Yapılan çalışmalar *L. pneumophila*'nın geniş pH aralığında yaşayabildiğini göstermektedir. Soğutma kulesinde gerçekleştirilen farklı bir çalışmada pH'ın 8.2'nin üzerine çıktığı durumlarda üremenin $< 0.65 \log/\text{ml}$ 'lere düştüğü tespit edilmiştir. Bu durumdan hareketle pH'ın 9'ün üstüne çıkarılmasıyla soğutma kulesinde *L. pneumophila*'nın kontrol edilebileceği tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte alkali koşullarda gerçekleştirilen klorlamanın asidik koşullara oranla biyofilm ile mücadele daha etkili olduğu tespit edilmiştir (States ve diğ., 1987). Benzer sonuçlar *E. coli* biyofilmi ile de elde edilmiş olup pH'ı 11.9 olan alkali klor ile gerçekleştirilen temizliğin serbest klorla oranla biyofilm karşısında daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Sharma ve diğ., 2005).

CTC-DAPI, LIVE/DEAD kit ve Alamar blue sonuçları dikkate alındığında aerobik heterotrofik bakterilerin asit uygulaması sonucunda hem biyofilm hem de planktonik fazında 4. saate kadar canlılıkta azalma meydana gelirken 4. saat itibariyle artış gözlenmiştir. Bu durum mikroorganizmaların asidik ortama adaptasyonlarının ardından canlılıklarını arttırdıkları şekilde yorumlanmaktadır. Bu konuda yapılan benzer bir çalışma sonucunda olgun biyofilm hücrelerinin asidik ortam karşısında sergiledikleri direncin genç biyofilm hücrelerine oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca gerek olgun gerekse genç biyofilm hücrelerinin planktonik faza oranla asidik koşullar karşısında daha dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Ortamda meydana gelen pH düşüşü sonucunda gen anlatımında meydana gelen değişiklik neticesinde özellikle laktat dehidrogenaz gibi pH iç dengesinin sağlanmasında önemli rol oynayan glikolitik enzimlerin üretimi ve ATPaz aktivitesinde artış meydana geldiği belirlenmiştir (Neilands, 2007).

S. mutans ile yapılan farklı bir çalışmada biyofilm yapısında bulunan *S. mutans* hücrelerinin planktonik hücrelere oranla pH 3'lük asitle 2 saatlik muamele sonucunda artan tolerans ile hayatta kalma oranının 70000 kat arttırıldığı belirlenmiştir. Başlangıç fazındaki biyofilme uygulanan stresin de protein sentezinde önemli değişikliklere sebep olduğu gösterilmektedir. Protein ifadesindeki bu tür değişiklikler asit toleransına

gösterilen yanıt farkı olarak açıklanmaktadır. Asit karşısında protein profilinde *S. mutans* olgun biyofilminde gözlenen değişiklik % 41.5 iken, yeni oluşan biyofilm hücrelerinin protein profilindeki değişiklik % 5.1 olarak tespit edilmiştir. Hücresel protein profilinde gözlenen bu değişikliklerin biyofilm olgunlaşması sırasında asit şok döngüleri tarafından tetiklenen asit tolerans yanıtı ile gerçekleştiği ifade edilmektedir (Welin-Neilands ve Svensater, 2007).

Ani pH değişikliği ile mücadelede gerçekleştirilen mikroarray çalışması sonucunda planktonik fazda bulunan nötrofilik *B. subtilis*'in üreme ortamının pH'nın 8.9'a yükseltilmesi sonucunda 80 adet genin anlatımında değişiklik meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu değişimden sorumlu yapının alternatif bir sigma faktör (σ^5) olduğu tespit edilmiştir. Bu alternatif sigma faktör pek çok Gram + ve Gram – bakteride bulunan sitoplazma dışı düzenleyici faktörler olarak adlandırılan ailenin bir üyesidir. Hücre dışı ortamda meydana gelen ani pH artışı sonucunda σ^5 regülona ait genlerin 2 adedi dışındaki tüm genlerin anlatımında 2-50 kat artış tespit edilmiştir. Gen anlatımında meydana gelen değişiklik ile bakterinin alkali koşullara adapte olarak canlılıklarını koruduğu ortaya çıkarılmıştır (Wiegert ve diğ., 2001).

S. aureus ve *S. epidermidis* bakterilerinin polistren yüzeyde biyofilm oluşturmaları sırasında uygulanan pH 8.5'lik alkali ortam sonucunda konfokal lazer taramalı mikroskop analizleri ile biyofilm yapısının kontrol örneklerine oranla 2-3 kat daha ince olduğu belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu analizlerine göre ise alkali ortamda meydana gelen biyofilm yapısında hücrelerin zayıf yapılı mikrokoloniler içinde geliştiği ve biyofilm miktarının önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun alkali ortamın hücre duvar hidrofobitesini azalttığı ve buna bağlı olarak da tutunmanın azalmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Nostro ve diğ., 2012).

Yapılan çalışma sonucunda biyofilm yapısındaki bakteriler için alkali pH uygulamasının, planktonik fazdaki bakteriler için ise asidik pH uygulamasının canlılıkta azalmalara sebep olduğu tespit edilmekle birlikte önemli sayıda bakterinin uygulamaların ardından hayatta kaldığı belirlenmiştir. Bu durum biyofilm yapısında olan mikroorganizmaların asidik koşulların yanı sıra alkali ortam söz konusu olduğunda da stres yanıtı oluşturmalarından kaynaklanmaktadır. Aynı durum planktonik fazda bulunan bakteriler için de geçerlidir. Planktonik faz bakterileri de alkali ortama direnç yanıtının dışında asidik koşullar

karşısında da direnç geliştirme yoluna gitmektedir. Tüm pH uygulamaları ve kullanılan teknikler genel olarak dikkate alındığında biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik faz bakterilerinden istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklılaştığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Çalışmamız kapsamında elde edilen bu veriler farklı çalışma sonuçları ile tutarlılık göstermektedir. Örneğin *S. epidermidis* ile yapılan çalışma sonucunda pH 3 uygulamasının yanı sıra pH 12 uygulamasının da biyofilm oluşumuna sebep olarak stresten korunmayı sağladığı belirlenmiştir (Chaieb ve diğ., 2007). Planktonik halde bulunan *L. monocytogenes*'in asidik koşullarla muamele edilmesi sonucunda asit tolerans yanıtında görevli ATP sentaz, şaperonlar, alkol dehidrogenaz, demir alım düzenleyici ve transkripsiyon düzenleyici proteinlerin sentezi ile asidik koşullara direnç geliştirdiği tespit edilmiştir (Phan-Thanh ve diğ., 2000).

Klinik alanda meydana gelen biyofilmlerin de farklı pH koşulları karşısında direnç gösterdikleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Metisiline duyarlı *S. aureus* biyofilmi ile yapılan çalışmada 2 günlük biyofilm hücrelerinin dahi planktonik formalara oranla pH değişikliği karşısında daha dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. pH 10 ile muamele sonucunda planktoniğe oranla 2 günlük biyofilm yapısında 2 log daha fazla canlı hücre elde edilmiştir. 5 günlük biyofilimde ise direncin arttığı tespit edilmiştir. pH 4 muamelesi sonucunda da planktonik ve biyofilm hücreleri arasında 1 log fark gözlenmiştir. 9 günlük biyofilimde de tüm pH değerlerine karşı dirençte, biyofilm hücrelerinde planktonik hücrelere oranla artış gözlenmiştir (Al-Azemi ve diğ., 2011). Uygulamalar karşısında elde edilen farklara bakıldığında biyofilm yapısında bulunmanın gerek asidik gerekse alkali koşullar karşısında planktonik faza göre direnç artışına sebep olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kültür deney sonuçlarında gerek R2A Agar gerekse BCYE Agarda üremenin meydana gelmediği uygulamalar gözlenmiştir. Buna karşın epifloresan mikroskop sonuçlarında tüm uygulamalarda canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. Bu durum uygun olmayan pH koşullarının *L. pneumophila*'nın yanı sıra aerobik heterotrofik bakteriler için de VBNC fazına girme yönünde teşvik oluşturduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Geçmiş yıllarda biyofilm üzerine 24 saat süreyle pH 3 ve pH 11 stres koşullarının uygulanması ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda kültürde gözlenen aerobik heterotrofik bakteri sayısının epifloresan mikroskopla elde edilen

bakteri sayısından ortalama 2 log daha az olduğu belirlenmiştir. Söz konusu pH değerlerinin hücrelerin VBNC fazına girmesine sebep olduğu tespit edilmiştir (Vatansever, 2011). *L. monocytogenes* ile yapılan farklı bir çalışmada da pH 4'lük asit uygulamasının bakterileri VBNC fazına soktuğu ortaya çıkarılmıştır (Cunningham ve diğ., 2009).

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre pH 3 asit şok uygulaması ile pH 11 alkali şok uygulaması arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Tüm teknikler neticesinde elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde asit şok uygulamasının alkali şok uygulamasına oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Çalışma kapsamında uygulanan diğer bir stres koşulu dezenfeksiyondur. Dezenfeksiyon amacıyla biyofilm ve planktonik faz bakterilerine 2 ppm klor, 10 ppm klor, 2 ppm monokloramin ve 10 ppm monokloramin 1, 4 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar mikrobiyolojik kültür tekniğine göre biyofilm bakterilerinin planktoniklere oranla dezenfeksiyona daha dirençli olduğunu göstermektedir. Biyofilm yapısında bulunan bakteriler dezenfektanlara karşı EPS tabakasının jel benzeri yapısının dezenfektanın girişini kısıtlaması, EPS tabakasının adhezyon ve kohezyon ile tutunmuş bakterilere mekanik kararlılık sağlaması, biyofilm içindeki hücrelerin yavaş metabolik aktivite göstermeleri, üreme hızlarını azaltmaları ve geçirdikleri fenotipik değişiklikler ile çok hücreli bir organizma gibi davranarak hayatta kalmalarını optimize etmeleri ile planktonik formlara oranla daha dirençli hale gelmektedirler (Behnke ve diğ., 2011; Simoes ve diğ., 2009; Davies, 2003). Biyofilm yapısında olmanın yanı sıra yoğun bakteri popülasyonu ve çok türden mikroorganizma içeren biyofilmlerin dezenfektan uygulaması karşısında daha dirençli olduğu gösterilmektedir (Otter ve diğ., 2015). Çalışmamız sonucunda tespit edilen dezenfektan direncinin de 14 haftalık biyofilmden kaynaklanan yoğun bakteri ve şebeke suyundan gelen farklı türlerin bulunması dolayısıyla yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu durumun gerçek soğutma kulelerinde de söz konusu olması, üzerinde önemle durulmasını gerektirmektedir.

L. pneumophila biyofilmi üzerine klor etkisinin incelendiği benzer bir çalışma sonucuna göre İngiltere tarafından tavsiye edilen hiperklorinasyon dozu olan 50 mg/l (50 ppm)

klorun 1 saatlik uygulaması sonucunda 2 aylık biyofilmde bulunan hücrelerin 10^6 KOB/cm² gibi yüksek bir oranda üreme gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca 1 aylık ve 2 aylık biyofilm hücrelerine yapılan klor uygulaması sonucunda benzer oranda canlı hücre tespit edilmiştir. Çalışmada 50 mg/l (50 ppm) monokloramin uygulaması sonucunda 3 günlük biyofilm hücrelerinde dahi direnç varlığı tespit edilirken 1 aylık biyofilm yapısında bulunan *L. pneumophila*'nın 3 günlük biyofilmde bulunan *L. pneumophila*'ya oranla 4 kat daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Cooper ve Hanlon, 2010).

S. aureus biyofilmi ile gerçekleştirilen farklı bir çalışmada biyofilm yapısındaki bakterilerin klora karşı planktonik türlere oranla 600 kat daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Luppens ve diğ., 2002). *E. coli* biyofilmi ile yapılan çalışmada ise biyofilm yapısındaki *E. coli*'nin 200 mg/ml (200 ppm) klor uygulaması karşısında dahi tamamen elimine edilemediği ve biyofilm yapısında bulunan bakterilerin klor karşısında planktonik bakterilerden daha dirençli oldukları tespit edilmiştir (Ryu ve Beuchat, 2005). Biyofilmlerin yaşı arttıkça klora karşı gösterdiği direnç de artmaktadır (Sommer ve diğ., 1999).

P. aeruginosa ile yapılan monokloramin uygulaması sonucunda biyofilm yapısındaki bakterilerin planktoniklere oranla daha dirençli olduğu ve biyofilm yaşı arttıkça direncin de arttığı tespit edilmiştir (Cochran ve diğ., 2000). 500 ve 1000 ppm monokloraminin 24 saat süreyle uygulanması sonucunda epifloresan mikroskopta canlı bakteri varlığı tespit edilmesi, biyofilm varlığının sebep olduğu direncin oldukça yüksek dozlarda dahi mümkün olduğunun ortaya çıkmasını sağlamıştır (Vatansever, 2011). Çalışma sonucunda tüm dezenfektan uygulamaları ve tekniklerden elde edilen veriler değerlendirildiğinde biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar ile planktonik fazda bulunan mikroorganizmaların dezenfektan uygulamaları karşısında gösterdikleri direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş olup biyofilm bakterilerinin planktonik bakterilere oranla daha dirençli oldukları tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Biyofilm yapısında bulunan aerobik heterotrofik bakteriler üzerine gerçekleştirilen farklı bir çalışmada 2.5 mg/l (2.5 ppm) monokloraminin 24 saatlik uygulaması sonucunda 2 log azalma elde edilmiştir (Momba ve diğ., 2003). Benzer bir çalışmada 2.5 mg/l (2.5 ppm) monokloraminin 24 saatlik uygulaması sonucunda aerobik hetetrofik bakteri sayısında

2,7 log azalma tespit edilmiştir (Chang ve Craik, 2012). Bulunan sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile uyumlu olup 2 ppm monokloraminin 24 saatlik uygulaması sonucunda biyofilm yapısında bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayısında yaklaşık 2.2 log'luk azalma tespit edilmiştir. Buna karşın planktonik faz örneklerinde ise 24 saatlik uygulama süresi sonunda kültürde üremeye rastlanmamıştır. Bu durumun biyofilm varlığının koruyucu etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma sonuçlarına göre 10 ppm monokloramin ve 10 ppm klor arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte sayısal azalma dikkate alındığında en etkili dezenfektanın 10 ppm monokloramin olduğu tespit edilmiştir. Klor ve monokloramin su sistemlerinin dezenfeksiyonunda yaygın olarak kullanılan dezenfektanların başında gelmektedir. Monokloramin, klorun aksine biyofilm yapısında bulunan hücre dışı polimerler, nükleik asitler gibi organik bileşenler ile reaksiyona girmemekte ve bu sayede sistemde bozulmadan uzun süre kalabilmektedir. Ayrıca biyofilm içine girişi klordan daha iyi olup, dezenfektan yan ürün oluşumu klordan daha azdır (Chandy ve Angels, 2001).

Yapılan farklı bir çalışmada 1 aylık süre boyunca düzenli olarak uygulanan monokloramin muamelesinin, sistemde bulunan toplam *Legionella* türlerinin %69'unun elimine edilmesini sağladığı ortaya çıkarılmıştır. Sonuçlar özellikle amip içinde veya biyofilm yapısında bulunan *Legionella*'ların üzerine klorun etkisinin daha az olduğunu buna karşın monokloraminin amip ve biyofilme daha etkili olduğu ve bakterilere ulaşma konusunda daha başarılı olduğu tespit edilmiştir (Moore ve diğ., 2006).

Laboratuvar çalışmaları rezidual klorun 1-2 ppm olduğu durumlarda biyofouling'in kontrol edilebildiğini göstermektedir. Monokloraminin benzer doz ve sürede kullanılması durumunda ise soğutma kulesi biyofilmi üzerinde daha etkili olduğu bulunmuştur (Rao ve diğ., 1998). Klor ile etkili bir dezenfeksiyonun 2-3 ppm oranında uygulandığında gerçekleştiği ancak bu dozun korozyon etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Melada ve Coniglio, 2015). Bu verilere karşın çalışmamızda elde edilen sonuçlar gerek biyofilm gerekse planktonik fazdaki bakteriler için 2 ppm klor ve monokloraminin bakteri eliminasyonu için yeterli olmadığını ortaya koymuştur.

P. aeruginosa biyofilmi üzerine klor ve monokloramin uygulanmasının gerçekleştirildiği farklı bir çalışmada, biyofilm yapısındaki EPS'nin klora karşı tüketme yoluyla, monokloramine karşı ise hücre membranına ulaşımını kısıtlayarak direnç geliştirdiği ortaya koyulmuştur (Xue ve diğ., 2013). Hastanelerdeki sıcak su sisteminde bulunan *L. pneumophila*'ya karşı monokloramin etkinliğinin incelendiği farklı bir çalışma sonucuna göre 36 ay boyunca monokloramin uygulaması sonucunda ilk 3 ayda toplam sistemin yaklaşık % 10'undan *Legionella* izole edilirken, sürekli uygulama neticesinde ancak 8. aydan itibaren *Legionella*'nın tamamen elimine edilebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada *Legionella*'nın kontrol edilebilmesi için etkili olan dozun 2-3 mg/l (2-3 ppm) olduğu tespit edilmiştir (Marchesi ve diğ., 2013). Ancak çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar 2 ppm monokloraminin *L. pneumophila* ile mücadelede yeterli olmadığını, kültürde üreme gözlenmemesinin yanıltıcı olduğunu ortaya çıkarmıştır.

İçme suyu sistemine serbest klor içeriği 7.5 mg/l (7.5 ppm) olacak şekilde monokloramin uygulamasının gerçekleştirildiği farklı bir çalışma sonucunda heterotrofik bakteri sayısında kültür metodunda 4 log azalma tespit edilirken, propidyum mono azit (PMA)-qPCR tekniği ile sadece 1.5 log azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar monokloraminin aerobik heterotrofik bakterileri VBNC fazına girmeleri yönünde teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca canlı bakteri topluluklarının monokloramin dezenfeksiyonu sırasında önemli değişikliklere uğradığı tespit edilmiştir. *Methylotenera*, *Dechloromonas*, *Azonexus*, *Acidovorax*, *Geothrix* ve *Methylocystis* cinslerinin monokloramine oldukça hassas; *Chlorobium*, *Zoogloea* ve *Ignavibacterium*'un orta derecede hassas; *Legionella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Geobacter*, *Desulfomonile* ve *Desulfuromonas* cinslerinin ise oldukça dirençli oldukları tespit edilmiştir (Chiao ve diğ., 2014). Tespit edilen sonuçlar çalışmamız kapsamda elde edilen bulgular ile tutarlılık göstermektedir. Çalışmamızda kültür deneyinde hem biyofilm hem de planktonik fazda aerobik heterotrofik bakteri kontrol örneklerinde yaklaşık 4.5 log'luk canlı bakteri sayısı tespit edilmiş olup 10 ppm monokloramin uygulaması sonucunda canlı bakteriye rastlanmıştır. Buna karşın epifloresan mikroskop örneklerinde biyofilm için yaklaşık 1 log, planktonik faz için ise yaklaşık 2 log'luk azalma tespit edilmiştir. Planktonik fazda meydana gelen daha yüksek oranda azalma bir kez daha biyofilm varlığının koruyucu etkisini ortaya koymaktadır.

Çalışma sonuçları kültürde üreme olmayan dezenfektan uygulamalarında epifloresan mikroskop ve Alamar blue yöntemi ile canlı mikroorganizma tespit edildiğini, bu sebeple de dezenfeksiyon uygulamasının VBNC faza girmeyi teşvik ettiğini ortaya çıkarmıştır. *L. pneumophila* üzerine uygulanan 0.5 ve 1 ppm klorun 24 saatlik muamelesinin bakterileri VBNC fazına soktuğu tespit edilmiştir (Dusserre ve diğ., 2008). Farklı bir çalışma 20 ppm monokloraminin *Legionella*'nın VBNC fazına girmesini teşvik ettiği ve bu uygulamanın ardından bakterinin virulans faktörlerini üretmeye devam edebildiği belirlenmiştir (Coniglio ve diğ., 2015). *P. aeruginosa* biyofilmi ile yapılan çalışmada 2 mg/l (2 ppm) serbest klorun 24 saatlik uygulamasının bakterileri VBNC fazına soktuğu tespit edilmiştir (Bedard ve diğ., 2014). Farklı bir çalışmada 1 mg/l (1 ppm) serbest klorun *E. coli* ve *S. typhimurium* hücrelerini VBNC fazına soktuğu tespit edilmiştir (Oliver ve diğ., 2005). Çalışmamız tüm dezenfektanlar için 1 saat gibi kısa bir süre sonunda bile kültürde gözlenen canlı mikroorganizma sayısının epifloresan mikroskoptan daha düşük olduğunu ve VBNC fazına girmenin kısa sürede dahi mümkün olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Farklı bir çalışmada *L. pneumophila* üzerine 1 saat süreyle 2 mg/l (2 ppm) klor uygulanmış ve bunun sonucunda canlı bakteri sayısında yalnızca % 26 oranında azalma tespit edilmiş ancak flow sitometri yöntemi ile kültür ile uyumlu olmayan canlı bakteri varlığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar VBNC fazına girmede klorun etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca yine aynı doz ve sürelerde klor uygulaması sonucunda stres yanıt genlerinin anlatımının arttırılması ile birlikte virulans genlerinin anlatımında azalma tespit edilmiştir (Bodet ve diğ., 2012). Çalışmamız kapsamında 2 ppm klorun 1 saatlik uygulaması sonucunda ise gerek biyofilm gerekse planktonik fazda kültürde üremeye rastlanmazken epifloresan mikroskop sonuçları 2 ppm klorun 1 saatlik muamelesinin kontrol örneklerine oranla 1 log'dan az olmak üzere oldukça küçük bir oranda azalmaya sebep olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar klorun 1 saat gibi kısa bir süre ve 2 ppm klor gibi düşük bir oranda dahi VBNC fazına girmede etkili olduğunu göstermektedir.

Dezenfeksiyon çalışması sonucunda elde edilen veriler biyofilm bakterilerinin planktonik bakterilere karşı dezenfektan uygulaması karşısında daha dirençli olduğunu göstermekle birlikte, genel olarak rezidual dezenfeksiyon amacıyla önerilen 2 ppm klor ve 2 ppm monokloraminin etkili bir eliminasyon için yeterli olmadığını ortaya çıkarmıştır. Bu

sebeple en etkili olarak 10 ppm monokloramin daha sonra ise 10 ppm klorun daha başarılı bir dezenfeksiyon sağlanması amacıyla kullanılması gerektiği tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında uygulanan diğer bir stres koşulu ise ozmotik konsantrasyondur. Bu amaçla biyofilm ve planktonik faz bakterilerine 1, 4 ve 24 saat süreyle olmak üzere hipotonik ortamı temsilen % 0.1'lik tuz; hipertonic ortamı temsilen % 3'lük tuz stresi uygulanmıştır.

Kültür analiz sonuçlarına göre hem aerobik heterotrofik bakteriler hem de *L. pneumophila* bakterisinin biyofilm ve planktonik fazında her iki ozmotik konsantrasyon için zamanla azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte hipertonic tuz çözeltisinin hipotonik tuz çözeltisinden daha yüksek bir azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Kültür analizleriyle elde edilen sonuçlar epifloresan teknikler ve Alamar blue ile elde edilen sonuçlar ile tutarlı olup bu analiz sonuçlarına göre de hipertonic tuz uygulamasının hipotonik tuz uygulamasından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları da hipertonic tuz uygulamasının hipotonik tuz uygulamasından anlamlı olarak farklılaştığını ortaya koymaktadır ($p < 0.05$).

Farklı bakterilerden meydana gelen biyofilmlere uygulanan tuz stresinin biyofilmle mücadelede etkili bir teknik olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* biyofilmlerine uygulanan 0.3 M (% 1.76) tuzun biyofilm yapısındaki üremenin % 56.7 oranında azaltılmasına sebep olduğu tespit edilmiştir (Chen ve Stewart, 2000). *P. aeruginosa* biyofilmine uygulanan 0.5 M (% 2.9) tuzun biyofilm kalınlığını % 50 oranında azaltırken, biyofilm oluşumunu % 66.7 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Brazire ve diğ., 2007).

Söz konusu tuz streslerinin biyofilm oluşumunda etkili olmasının sebebi olarak yüksek konsantrasyondaki tuzun bakterilerde besin alımı ve DNA sentezini inhibe etmesi (Csonka ve diğ., 1989), ayrıca tuzun biyofilm yapısındaki elektrostatik etkileşimleri bozarak ve bağlayıcı molekülleri kırarak biyofilm matriksini zayıflatmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Lee ve Elimelech, 2007).

Deniz suyu arıtma tesislerinde oluşan hipertonic bakterileri içeren biyofilm tabakasına % 30 NaCl şok tuz uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre 24. saatten 48. saate kadar biyofilm yapısında artış tespit edilmiştir. 36. saatten itibaren kontrol örneği ile

arasındaki fark oldukça azalmıştır. 48 saatten sonra biyofilm gelişim hızı azalmıştır. 36. saatte ölü mikroorganizma varlığının yüksek olduğu tespit edilmiş olup en yüksek ölü mikroorganizma sayısına ise 48. saatte ulaşılmıştır. Bu sonuçlar düzenli periyotlarda uygulanan ozmotik şokun biyofilmle mücadelede etkili olduğunu göstermektedir (Katebian ve Jiang, 2013). Çalışmamız kapsamında uygulanan hipertonic tuz stresinde LIVE/DEAD kit ve Alamar blue sonuçlarına göre biyofilm örneklerinde 4. saatte meydana gelen artış nedeniyle tuz konsantrasyonunun 24 saat ve daha uzun süreli olarak uygulanmasının daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Planktonik fazda ise zamana bağlı olarak azalma meydana gelmekle birlikte uzun süreli uygulamanın etkili bir eliminasyon için gerekli olduğu ortaya çıkarılmıştır.

LIVE/DEAD canlılık tayin kiti ve Alamar blue ile gerçekleştirilen çalışmalarda her iki tuz uygulaması karşısında biyofilm yapısında bulunan bakterilerde 1. saatin sonunda kontrol örneğine kıyasla düşüş meydana gelirken kültür tekniğinin aksine 4. saatte canlı bakteri sayısında artış gözlenmesine karşın 24. saatin sonunda yine canlılıkta azalma gözlenmiştir. 4. saatte gözlenen artışın mikroorganizmaların tuz stresine direnç geliştirmeleri amacıyla stres genlerinin anlatımlarında meydana gelen artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir.

B. subtilis ile gerçekleştirilen tuz şoku uygulaması sonucunda % 6'lık tuz uygulamasının stres proteinlerinin sentezlenmesini teşvik ettiği ortaya çıkmıştır. Ancak bu değişimin uygulamanın ardından 60 dk içinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu sebeple de tuz uygulamasının ardından ilk 60 dk boyunca canlı mikroorganizma sayısında azalma meydana gelmiş olup ilerleyen saatlerde mikroorganizma sayısı korunmuştur (Völker ve diğ., 1992). Söz konusu deney planktonik faz bakterisi üzerine yapılmış olmasına karşın çalışmamızda 1. saatin sonunda kontrol örneğine oranla meydana gelen azalmanın stres genlerinin anlatımının artışı, ilgili proteinlerin sentezi ve ortama adaptasyon sonucu meydana geldiği; buna karşın adapte olan mikroorganizmaların 4. saatte artış gösterdiği düşünülmektedir. Ancak 24 saatlik uygulamaya bakıldığında söz konusu adaptasyonun uzun vadede etkili olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

S. aureus'ta yüksek tuz konsantrasyonunun biyofilm oluşumunu arttırdığı yapılan farklı bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu amaçla *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunu düzenleyici özelliğe sahip *rbf* geninin, biyofilm gelişiminde ozmolarite sinyal iletimine katılıp

katılmadığı bu geni taşıyan yabani ve mutant tip ile yapılan çalışmalarla test edilmiştir. Çalışma sonucunda her iki türde de % 1.6 NaCl konsantrasyonlarında biyofilm oluşumu gözlenmiş olup, yabani tipte % 4.8 NaCl uygulamasına kadar biyofilm de artış gözlenmiştir. Buna karşın söz konusu gen açısından mutant olan *S. aureus*'ta % 2.4 ve üzerindeki NaCl uygulamasında biyofilm yapısı tespit edilemeyecek düzeylere kadar düşüş göstermiştir (Lim ve diğ., 2004).

Ozmotik şok ile karşılaşan hücrelerin gösterdiği direnç ile ilgili olarak *P. aeruginosa* biyofilmi ile yapılan benzer bir çalışmada, 0.5 M tuz çözeltisi (% 2.9) ile 24 saat inkübasyona bırakılmış örneklerde biyofilm miktarının % 50 oranında azaldığı ortaya çıkmıştır. Hücrelerin ozmotik şoka maruz bırakıldığı koşullarda ortama dışarıdan ilave edilen ve bir ozmo-koruyucu olan glisin betain'in, biyofilmde 2/3'lük bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir (Fare's ve diğ., 1997).

Kültür, epifloresan mikroskop ve Alamar blue sonuçları ile biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmaların değişen ozmotik konsantrasyon uygulamaları karşısında planktonik faz bakterilerine oranla daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bu veriler istatistiksel analizler ile desteklenmekte olup biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik faz bakterilerinden ozmotik konsantrasyon uygulamaları karşısında anlamlı olarak farklı oldukları tespit edilmiştir ($p < 0.05$). *B. subtilis* bakterisi üzerine uygulanan 1 M (% 5.8) tuz stresinin gen anlatımında değişikliklere sebep olarak stresle mücadele etmek için yıkıcı enzim sentezinin arttırılmasına sebep olduğu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte yüzeye tutunan bakterilerde tuz stresi ile meydana gelen gen anlatımındaki artışın planktonik halde bulunan bakterilere oranla 8 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kunst ve Rapoport, 1995).

Halotolerant bakteri olan *Rhodopseudomonas acidophilada* üzerine tuz stresinin incelendiği farklı bir çalışmada total EPS miktarının tuz konsantrasyonundaki artış ile eş zamanlı olarak artması, bakteriyel eksopolisakaritlerin tuz stresi altında bakteriyi koruyucu bir tepki olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Sheng ve Yu, 2006). EPS tabakasının hücrelerin etrafında su tutma özelliğinin biyofilm yapısında bulunan hücreleri planktonik faz hücrelerine oranla hipertonic tuz stresi karşısında koruduğu bilinmektedir (Seufferheld ve diğ., 2008).

S. aureus biyofilmi üzerine tuz stresinin incelendiği başka bir çalışmada hücreler % 4'e varan NaCl ile 20 saat süreyle muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda *S. aureus* hücrelerinin tuz stresi karşısında biyofilm kararlılığını sağlamada görevli olan hücreler arası adezyon polisakkaritlerinde (PIA) artış tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 11 proteinde daha artış tespit edilmiş olup bu proteinler içinde soğuk stres yanıtında görevli CspA soğuk şoku proteinin de olduğu belirlenmiştir (Islam ve diğ., 2015).

Yapılan farklı bir çalışmada biyofilm yapısında bulunan bakterilerin değişen ortam koşullarına karşı stres yanıtı oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. *L. monocytogenes* biyofilmi üzerine uygulanan % 0.5-7.0 gibi tuz konsantrasyonundaki artışa paralel olarak biyofilm yapısında da artış gözlemlendiği tespit edilmiştir. 40 saat süreyle muamele sonucunda kristal viyole metodu ile absorbansta artış tespit edilmiştir. Uygulama sonucunda planktonik halde bulunan bakteri sayısında azalma gözlenirken biyofilm yapısında bulunan bakterilerin sayısında artış meydana gelmiştir. Aynı zamanda açlık, toksik metabolitler ve düşük pH gibi ekstrem koşulların da EPS sentezini arttırdığı tespit edilmiştir (Pan ve diğ., 2010).

Benzer sonuçlar farklı bir *L. monocytogenes* biyofilmi ile yapılan çalışmada da elde edilmiştir. % 3 NaCl ile muamelenin sonucunda tuz stresi ile birlikte soğuk şok proteinleri olan *cspA* geninin anlatımında 2.8 kat ve *cspD* genlerinin anlatımında 4.4 kat artış tespit edilmiştir. *Cspb* geninin anlatımında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Gen anlatımlarındaki artış mikroorganizmanın tuz stresinde hayatta kalmasını sağlarken, *cspD* açısından mutant olan bakterilerin tuz stresi karşısında üremelerinde düşüş meydana gelmiştir. Buna karşın *cspA* veya *cspB*'nin tek başına mutant olmasının üremeyi etkilemediği ancak ikisinde birden meydana gelen mutasyonun üremeyi azalttığı, her üçünde meydana gelen mutasyonun ise üremeyi tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu durumun Csp proteinlerinin şaperon aktivitesinden dolayı tuz stresinin sebep olduğu DNA hasarını onararak ve sodyum iyonlarını dışarı atan taşıyıcı sisteme ait proteinlerin üretimini artırarak sağladığı düşünülmektedir (Schmid ve diğ., 2009).

Farklı bir çalışmada *E. coli* bakterisi 0.1-2 M (% 0.6-% 11.7) tuz ile biyofilm oluşturmak üzere 24 saat inkübe edilmiştir. *E. coli*'nin 1 M (% 5.9) ve daha yüksek tuz konsantrasyonunun olduğu durumda biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir. Buna karşın

1 M sukrozda biyofilm oluşturabildiği 1.5 M sukrozdan itibaren biyofilm oluşturamadığı tespit edilmiştir. Bu veriler tuz kaynaklı ozmotik konsantrasyonun şeker kaynaklı ozmotik konsantrasyondan daha etkili olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (Kawarai ve diğ., 2009).

L. pneumophila için kültür sonuçlarında planktonik fazda biyofilme oranla daha yüksek sayıda canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. EMA-qPCR sonuçları ile elde edilen veriler de kültür sonuçları ile tutarlı olup planktonik faz örneklerinde biyofilme oranla daha yüksek sayıda canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. Bu durum *L. pneumophila* için biyofilm yapısında bulunmanın yanı sıra planktonik fazda bulunan bakterilerin de yüksek oranda değişen tuz konsantrasyonları karşısında hayatta kalabilme yeteneğine sahip olması ile yorumlanmaktadır.

L. pneumophila'nın tuz stresi karşısındaki yanıtının araştırıldığı benzer bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda tuza maruz bırakılması sonucunda *L. pneumophila*'nın % 0.1- % 0.5 gibi NaCl konsantrasyonlarında ve 30-37°C arasında hayatta kalmasını arttırdığı ortaya çıkmıştır. Bu durumun sodyumun metabolik taşımada görevli olması ve enzimler için önemli bir kofaktör olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar klor iyonları ile büyüme arasında ılımlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Çalışmada *L. pneumophila*'nın % 3'n üstündeki NaCl konsantrasyonlarında ve 4-20°C arasında hayatta kalmayı başarabildiği tespit edilmiştir (Heller ve diğ., 1998).

Çalışmamızda ozmotik konsantrasyon ile gerçekleştirilen uygulamalar, istatistiksel açıdan biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik fazda bulunan bakterilere oranla daha dirençli olmalarının yanı sıra hipertonic tuz uygulamasının hipotonik tuz uygulamasından daha etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır ($p < 0.05$).

Çalışmamız kapsamında uygulanan diğer bir stres kuruluktur. Bu amaçla biyofilm fazı örnekleri için biyofilm tabakası oluşmuş olan cam kuponlar steril şalelerin içinde kapakları kapalı olarak; planktonik faz örnekleri ise 0.45 m por çaplı polikarbonat filtreden süzülerek filtre yüzeyinde steril Petri kutularının içinde kapakları kapalı olmak üzere 25°C'ye ayarlanmış etüvde 1, 4 ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Çalışmada elde edilen kültür sonuçlarına göre aerobik heterotrofik bakterilerin hem biyofilm hem de planktonik fazında zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir. *L.*

pneumophila bakterisi için de biyofilm örneklerinde 1 saatin sonunda çok az canlı bakteriye rastlanırken diğer saatler ve planktonik faz örnekleri için hiç bir saatte kültürde üremeye rastlanmamıştır.

Buna karşın epifloresan mikroskop ve Alamar blue sonuçları incelendiğinde biyofilm fazı için 4. saate kadar canlılıkta azalma tespit edilmiş olup 24. saatin sonunda canlılıkta artış meydana gelmiştir. Planktonik faz örnekleri için ise zamanla çok düşük oranlarda azalma meydana gelmiş olup hem biyofilm hem de planktonik bakterilerde canlılık tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar kurulum koşullarının da bakterileri VBNC fazına girmeleri yönünde teşvik ettiklerini göstermektedir.

Kuruluğun şebeke suyundan gelen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm tabakası üzerine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada biyofilm tabakası farklı sürelerde kuruluğa maruz bırakılmıştır. Saat bazında yapılan ölçümlerin sonucunda her ne kadar kültüre edilebilir bakteri sayısı azalsa da epifloresan mikroskop sonuçlarına göre kısa süreli kuruluğun canlı bakteri sayıları üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları biyofilm tabakasının bakterileri kısa süreli kuruluğa karşı koruyabildiğini ve biyofilm tabakasında bulunan karbonhidrat miktarının da kısa süreli kurulumdan etkilenmediğini ortaya çıkarmıştır (Baş ve Türetgen, 2011). *M. bovis* ile yapılan kurulum uygulamasının 24. saatlik etkisi sonucunda planktonik fazda canlı bakteri gözlenmezken biyofilm fazında 32. saatin sonunda dahi canlı bakteri varlığı tespit edilmiştir (McAuliffe ve diğ., 2006).

Banyolarda meydana gelen *Methylobacterium* biyofilmi üzerine kuruluğun etkisinin incelendiği farklı bir çalışmada, banyo zemin ve duvarlarını temsilen plastik yüzey kuponları üzerinde meydana getirilen biyofilm tabakası 30°C’de 10 gün inkübe edilerek kuruluğa maruz bırakılmıştır. 10 günün sonunda bakteri sayısında 1 log’dan daha az bir azalma gözlenmiştir. LIVE/DEAD kit kullanılarak gerçekleştirilen epifloresan mikroskop çalışması sonucunda ise mikro kolonilerin ortasında bulunan hücrelerin kurulum süresinin sonunda hemen hemen hepsinin canlı kaldığı tespit edilmiştir (Yano ve diğ., 2013).

Çalışmamız sonucunda biyofilm fazında gözlenen 4. saatten sonraki artışın kurulum koşulları karşısında gelişen adaptif değişikliklerin sonucunda meydana geldiği ve devam

eden süreçte kuruluk koşullarına adapte olan mikroorganizmaların canlılıklarını arttırdıkları şeklinde yorumlanmaktadır. Ancak çalışma sonuçları planktonik fazda bulunan bakterilerin de kuruluk koşulları karşısında dirençli olduklarını göstermiştir.

Kuruluğun bakteriler üzerindeki etkisinin incelendiği bir diğer çalışma toz bebek mamalarında *Enterobacter sakazakii*'ye rastlanması sonucunda gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada bakteriler 46 gün boyunca 25°C'de hava ile kurutulmuşlardır. Sürenin sonunda bakteri sayısında 1.5 log azalma görülmüştür. Bu sonuçlar glikoza indirgenmeyen bir disakkarit olan trihalozun membran fosfolipidlerini ve proteinleri stabilize ederek kurumaya karşı bakteri korunmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Breeuwer ve diğ., 2003).

L. monocytogenes biyofilmi üzerine yapılan çalışma sonucunda farklı yoğunluktaki biyofilm örnekleri kuruluğa maruz bırakılmış ve bunun sonucunda düşük yoğunlukta en fazla azalmanın olduğu görülmüştür. 20 günlük kuruluğun ardından başlangıç ve son seviye arasında ise kuruluğa karşı dirençte doğru orantı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda bakterilerin biyofilm yapısında olmasıyla ile artan kuruluk direnci arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Hingston ve diğ., 2013).

Gıda patojeni olan *L. monocytogenes*'in, gıda işleme ortamlarında kuruluk koşulları altında 91 güne kadar canlılığını koruyabildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik bakterilere oranla kuruluk karşısında daha dirençli oldukları tespit edilmiştir (Hansen ve Vogel, 2011). *L. monocytogenes* biyofilminin kuruluk karşısında sergilediği direncin EPS yapısında yer alan yüksek oranda hidrofilik olan hücre dışı DNA'lar ve bakterilerin peptidoglikan tabakasında bulunan N-asetil glukozaminden kaynaklandığı, bu yolla biyofilm ve planktonik hücrelerin kuruluğunun azaltılarak direnç geliştirdikleri düşünülmektedir (Harmsen ve diğ., 2010).

Bacillus abortus biyofilmi üzerine yapılan benzer bir çalışma sonucunda da biyofilm yapısında ve planktonik haldeki bakterinin 30°C'de kurutulması sonucunda ekstrasellüler matriksin biyofilm yapısında bulunan hücreleri koruduğu ve biyofilm hücrelerinin planktonik hücrelere oranla kuruluk karşısında daha dirençli olduğu ortaya çıkarılmıştır (Almiron ve diğ., 2013).

Kültür sonuçlarında *L. pneumophila* için canlılık, biyofilm fazında 1. saatten itibaren, planktonik fazda ise hiçbir saatte tespit edilememiştir. Buna karşın EMA-qPCR sonuçlarında tüm uygulamalarda canlı bakteri varlığı gözlenmiştir. Bu durum aerobik heterotrofik bakterilerde olduğu gibi *L. pneumophila*'da da kuruluk koşullarının VBNC fazına girişi teşvik ettiğini göstermektedir. *L. pneumophila* ile yapılan benzer bir çalışma sonucuna göre 15 gün boyunca oda sıcaklığında tutulan bakterinin kültürde üreme göstermemesine karşın LIVE/DEAD kit ile epifloresan mikroskop sonuçlarına göre canlılığını koruduğu tespit edilmiştir (Gobin ve diğ., 2011). *L. pneumophila* ile yapılan farklı bir çalışmada 15 gün boyunca oda sıcaklığında kuruluğa bırakılan bakterinin kültüre edilebilir özelliğini kaybettiği fakat buna karşın canlılığını ve virulansını koruyarak *A. castellanii* ile bir araya getirildiğinde amibi enfekte ederek çoğalabildiği gösterilmiştir (Gobin ve diğ., 2010).

Aerobik heterotrofik bakteriler için epifloresan mikroskop ve Alamar blue ile elde edilen veriler EMA-qPCR sonuçları ile de tutarlılık göstermekte olup, *L. pneumophila* için biyofilm yapısında 4. saate kadar azalma meydana gelmiş ardından ise canlı mikroorganizma sayısında artış tespit edilmiştir. Planktonik örneklerdeki *L. pneumophila* sayısının ise zamanla azaldığı tespit edilmiştir. 24. saatin sonunda aerobik heterotrofik bakterilerin aksine *L. pneumophila* için kontrol örneklerine oranla hem biyofilm hem de planktonik faz bakterileri için anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar aerobik heterotrofik bakterilerin *L. pneumophila*'ya oranla kuruluk karşısında daha dirençli oldukları şeklinde yorumlanmaktadır.

Çalışmamız kapsamında uygulanan diğer bir stres koşulu aşıdır. Bu amaçla biyofilm fazı örnekleri için üzerinde biyofilm tabakası oluşmuş olan cam kuponlar steril şalelerin içinde steril içme suyu ile; planktonik faz örnekleri için ise 0.45 µm por çaplı polikarbonat filtreden süzülmelelerinin ardından filtre yüzeyindeki bakteriler steril içme suyu ile süspanse edilerek 1, 4 ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Çalışmada elde edilen kültür sonuçlarına göre hem aerobik heterotrofik bakteriler hem de *L. pneumophila* için biyofilm ve planktonik faz örneklerinin her ikisinde de zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir. Buna karşın epifloresan mikroskop ve Alamar blue sonuçları incelendiğinde biyofilm fazı için 4. saate kadar canlılıkta azalma tespit edilmiş olup 24. saatin sonunda canlılıkta artış meydana gelmiştir. Planktonik faz örnekleri için

ise zamanla çok düşük oranlarda azalma meydana gelmiş olup hem biyofilm hem de planktonik bakterilerde yüksek oranda canlılığa rastlanmıştır. Bu durum açlık koşullarının bakterileri VBNC fazına giriş konusunda teşvik ettiği şeklinde değerlendirilmiştir.

Mikroorganizmaların bulundukları ortamdaki besin yetersizliği veya tükenmesi açlığa karşı yanıt olarak mikroorganizmaların uzun süreli olarak kültüre edilemeyen formda kalmasına sebep olmaktadır (Oliver, 2005). Farklı bir çalışmada düzenli besin eklenerek meydana getirilen biyofilm tabakası üzerine 9 hafta süre ile besin eklemesi yapılmayarak bakteriler açlığa maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda açlık boyunca hücrelerin canlılığında kültür sonuçlarına göre % 99.9'a varan bir azalma gözlenirken metabolik aktivitenin ölçüldüğü canlılık boyama sonuçlarında ise biyofilm yapısında bulunan hücrelerin yalnızca % 25'inin öldüğü gözlenmiştir (Shen ve diğ., 2010). Yaptığımız çalışma kapsamında kültür sonuçlarına göre 24. saatin sonunda biyofilm yapısında bulunan canlı bakterilerde yaklaşık % 65 oranında azalma tespit edilmesine karşın LIVE/DEAD kit sonuçlarına göre yaklaşık % 5 oranında bir azalma gözlenmiştir.

Farklı bir çalışmada ise açlık ortamına bırakılan bakterilerin kültüre edilebilirliğinde ilk 2 hafta hızlı bir düşüş gözlenirken daha sonraki haftalarda düşüşün daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte total sayının tespit edilmesi için kullanılan akridin oranj boyaması sonucunda kültürde tespit edilenden daha fazla bakteri olduğu gözlenmiştir. Ortam koşulları normale döndüğünde ise üreme yeniden elde edilmiştir (Jiang ve Chai, 1996).

Campylobacter jejuni ile yapılan açlık stresinin incelendiği çalışmada, açlık koşullarının ilk birkaç gün içinde kültüre edilebilirliği azalttığı fakat LIVE/DEAD kit sonuçlarına göre 42 günlük açlığın sonunda bile canlı mikroorganizma varlığının korunduğunu ortaya çıkarılmıştır. Mikroorganizmanın açlık sebebiyle girdiği VBNC fazında virulansını da koruduğu belirlenmiştir (Klancnik ve diğ., 2009).

E. coli'nin açlık stresi karşısındaki tutumunun incelendiği farklı bir çalışmada, besin yetersizliğinin bakterinin durağan faza geçmesi ile sonuçlandığı belirlenmiştir. Durağan faza geçmede görevli olan unsur ise genel stres yanıtın bileşeni olan düzenleyici sigma faktör olan RpoS'dir. RpoS açlık koşullarında durağan faz ile ilgili olan pek çok proteinin

anlatımını düzenlemektedir. Bu sigma faktörü kodlayan gen açısında mutant olan organizmaların açlık koşulları ile karşılaştıklarında durağan faza özgü proteinlerinin anlatımının teşvik edilmediği ve bunun sonucunda açlık koşullarında canlılıklarını devam ettiremedikleri bulunmuştur (Peterson ve diğ., 2005).

Enterococcus faecalis bakterisinin glikoz açlığı karşısındaki tutumunun incelendiği farklı bir çalışmada glikoz içermeyen ortamlarda 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşumu incelenmiştir. Glikoz içermeyen ortamda 48 saatlik biyofilm oluşumunda 24. saate göre daha fazla sayıda canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. Biyokütleye bakıldığı zaman ise 48 saatlik biyofilm oluşumunda 24. saate göre daha az miktarda biyo kütle tespit edilmiştir. Buna karşın glikoz ilavesinin söz konusu olduğu durumlarda değerlerin hepsinde artış görülmüştür. Hidrofobisite açısından ise glikoz olmayan ortamda ilk 24 saatte hidrofobisitede artış gözlenmiştir. Bu artış biyofilm hücrelerinde planktoniklere göre daha fazladır. Bu sonuçlar hiç glikoz olmayan ortamda bile biyofilm oluşumunun gerçekleşebildiği, hidrofobisitenin arttırılarak yüzeye tutunmanın arttırıldığı tespit edilmiştir. Ancak biyofilm yaşı arttıkça açlık koşullarına gösterilen direncin azaldığı tespit edilmiştir (Ran ve diğ., 2015).

Kültür sonuçlarına göre aerobik heterotrofik bakteri sayıları ile kıyaslandığında hem biyofilm hem de planktonik faz örnekleri için *L. pneumophila*'nın açlık koşulları karşısında daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun *L. pneumophila*'nın besin açısından titiz bir mikroorganizma oluşu ve üremek için aerobik heterotrofların aksine aminoasit gibi ek bileşenlere ihtiyaç duymasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

L. pneumophila bakterisinin biyofilm fazı örnekleri ile EMA-qPCR sonuçları birbiriyle uyumlu olup her iki deney sonucuna göre de *L. pneumophila* sayısında zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir. Ancak 24. saatin sonunda epifloresan mikroskopta tüm mikroorganizmalar için canlılık tespit edilemezken kültürde canlı bakteri varlığı tespit edilmiştir. qPCR planktonik faz sonuçlarında ise 4. saatte canlı mikroorganizma varlığı tespit edilemezken 1. ve 24. saatler değerlendirildiğinde ilerleyen zamanın kültür sonuçlarında olduğu gibi azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir.

Cam yüzeyde oluşan *L. pneumophila* biyofilminin incelendiği bir çalışmada elde edilen bulgular, biyofilmin porlu yapısının likit taşıyıcı olarak kapiller etkisi yarattığı

yönündedir. Besinler kapiller etki ile biyofilmin dip kısmından emilmekte ve biyofilm iç kısmında biriken besinler üst tabakalara dağıtılmaktadırlar. Biyofilm içindeki besin birikimi *L. pneumophila*'nın hayatta kalmasını arttırmaktadır. Biyofilmin alt yuvarlak kısmı, besin emilim alanını düz olan üst yüzeyden 3.6 kat arttırmaktadır. Bu durum biyofilmin daha çok besin alımı için bir adaptasyondur. Üst tabakadaki *L. pneumophila* popülasyonu besin buharlaşmasını ve dış kontaminasyonu azaltmaktadır (Konishi ve diğ., 2006).

L. pneumophila'nın hücre içinde bulunan karbon ve enerji kaynağı olan poli-3-hidroksibütirat (PHB) sayesinde filtre ile steril edilmiş düşük besin içerikli musluk suyunda 600 güne kadar kültüre edilebilir özelliğini muhafaza ederek canlı kalmayı başardığı tespit edilmiştir. Kültüre edilebilirliğin ilk hafta hızlı bir şekilde olmak üzere azalması ile birlikte ilerleyen zaman içinde azalma oranında düşüş tespit edilmiştir. Bu azalma PHB azalmasıyla orantılı olarak gerçekleşmiştir. PHB oranındaki düşüşün hücreleri VBNC fazına girmelerini teşvik ettiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca mikroskopik analizler açlık koşullarının hücrelerde morfolojik değişikliklere de sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır. İlk zamanlarda hücre için 1-3 arasında değişen PHB granüllerin varlığı tespit edilirken, ilerleyen zamanlarda granül içeriğine rastlanmamıştır. Ayrıca ilk zamanlarda birçok hücrenin sağlam bir yapıda olmasına karşın ilerleyen zamanda çok miktarda hücre kalıntılarına rastlanmıştır (James ve diğ., 1999).

Açlık stresi üzerine yapılan çalışmalar açlık koşullarına maruz kalan mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini yavaşlatmalarından dolayı diğer stres koşulları karşısında da dirençli olduklarını ortaya çıkarmıştır. *E.coli* biyofilmi üzerine yapılan bir çalışmada aminosit ve karbon açlığına maruz bırakılan hücrelerin meydana gelen stres yanıtı neticesinde florokinolon ofloksasin antibiyotiğine direnç geliştirdiği tespit edilmiştir (Bernier ve diğ., 2013). *S. mutans* ile yapılan farklı bir çalışma, hem biyofilm yapısında hem de planktonik fazda bulunan bakterilerin açlık koşullarında asidik stres koşullarına karşı direncinin arttığını göstermektedir. Bunun yanı sıra açlık ile birlikte gelişen asit stresinin biyofilm mikroorganizmalarında planktonik olanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Zhu ve diğ., 2001).

Çalışmamız kapsamında uygulanan diğer bir stres koşulu UV uygulamasıdır. Bu amaçla biyofilm fazı örnekleri için üzerinde biyofilm tabakası oluşmuş olan cam kuponlar steril

petri kutularının içinde; planktonik faz örnekleri ise 0.45 µm por çaplı polikarbonat filtreden süzölmelerinin ardından steril Petri kutularının içine yerleştirilerek 254 nm dalga boylu ışık altında steril kabin içinde 1 ve 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Kullanılan UV dozu aşağıda belirtilen formül ile belirlenmektedir (Burkut, 2008).

$$\text{UV dozu (Joule/m}^2\text{)}: \text{UV ışık yoğunluğu (Watt/m}^2\text{)} \times \text{Temas süresi (saniye)} \quad (5.1)$$

Çalışmada kullanılan lambanın ışık yoğunluğu 26 µW/cm²'dir. Buradan hareketle 1. saatin sonunda uygulanan UV dozu 936 J/m²; 4. saatin sonundaki UV dozu ise 3744 J/m²'dir.

Çalışma sonucunda hem aerobik heterotrofik bakteri hem de *L. pneumophila* için biyofilm ve planktonik faz örneklerinde kültür deneyi sonuçlarına göre canlı mikroorganizmaya rastlanmamıştır. Buna karşın epifloresan mikroskop ve Alamar blue sonuçları incelendiğinde biyofilm fazı için 1. saatte gözlenen azalmayı 4. saatte artış izlemiştir. Planktonik faz örnekleri için ise epifloresan mikroskop sonuçlarına göre 4. saatte canlı bakteriye rastlanmamıştır. Ancak Alamar blue sonuçlarına göre ise 4. saatin sonunda çok az olmakla birlikte canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler UV uygulamasının bakterileri VBNC fazına girmeleri yönünde teşvik ettiği şeklinde yorumlanmıştır.

UV dezenfeksiyonun incelendiği farklı bir çalışmada içme suyu sisteminde meydana gelen biyofilm tabakası UV ışık ile muamele edilmiştir. Çalışmada 254 nm dalga boyundaki UV lambasından sağlanan 400 J/m² UV dozu kullanılmıştır. UV uygulaması 4 hafta ve 6 aylık periyotlar olmak üzere 2 paralel halinde gerçekleştirilmiştir. 4 haftalık periyodik uygulama sonucunda bile biyofilm yapısında canlı olarak % 70-80 oranında bakteriye ulaşılmıştır. Uzun süreli inkübasyon sonucunda ise biyofilm içindeki bakteri sayısında önemli bir azalma elde edilebilmiştir. Kısa süreli UV uygulaması sonucundaki metabolik aktivitenin yüksek oluşunun DNA onarım mekanizması ile ilgili olduğu ve UV uygulamasının ardından hücrelerin daha etkili bir şekilde yeniden çoğalabilmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte kültürde elde edilen canlı bakteri sayısının CTC-DAPI uygulaması sonucu elde edilen canlı bakteri sayısından daha düşük olduğu belirlenmiştir (Schwartz ve diğ., 2003).

P. aeruginosa biyofilmi üzerine yapılan çalışmada 10 ve 40 mJ/cm² (100 ve 400 j/m²)

arasında uygulanan UV C sonucunda DNA onarım sisteminin indüklenmesine neden olan çok fonksiyonlu bir RecA proteininin hücre içi içeriğinin artarak UV ışınlarına karşı koruyucu bir yapı olarak biyofilm üretiminin uyarıldığı tespit edilmiştir. Çalışmada 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ve 100 mJ/cm² doz uygulamalarının ardından bakteri suşlarının biyofilm üretimi test edilmiştir. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (US-EPA) 2003 tarafından 40 mJ/cm² (400 j/m²) önerilen miktardır ve çalışma sonucunda pek çok *P. aeruginosa* suşunda eşik değere ulaşana kadar arttırılarak uygulanan UV C dozunun biyofilm oluşumunu arttırdığı tespit edilmiş olup her suş için eşik değerin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Ben Said ve diğ., 2011).

Çalışmamızda 4 saatlik uygulama sonucunda epifloresan mikroskop ve Alamar blue sonuçlarına göre biyofilm bakterilerinin canlılığının planktonik bakterilerden yüksek olmasının biyofilm tabakasının UV geçirgenliğini azaltmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

P. aeruginosa biyofilmi üzerine UV etkisinin incelendiği farklı bir çalışmada biyofilmin UV A, UV B ve UV C radyasyonu karşısında bariyer vazifesi üstendiği belirlenmiştir. Aynı seviyede ışın ile muamele edilen planktonik bakterilere göre daha yüksek sayıda canlı bakteri varlığı tespit edilmiştir. Özellikle UV A'nın biyofilm matriksi tarafından içeri girişinin bloke edilerek hücreler üzerinde zararlı etkilere sebep olmasının engellendiği ortaya çıkarılmıştır (Elasri ve Miller, 1999).

Kateterlerde oluşan biyofilmeler enfeksiyonların temel kaynağıdır. Kateter dezenfeksiyonu üzerine yapılan farklı bir çalışmada hastalardan alınan katater örnekleri üzerine farklı dozlarda UV uygulanmış ve yaklaşık % 99'unu öldürmek için gerekli olan dozun 60 dk uygulanması sonucu elde edilen 15 kJ/m² (15000 j/m²) olduğu tespit edilmiş ve bu dozun planktonik hücreleri öldürmek için gerekli olan dozdan 100-1000 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar dikkate alındığında olgun bir biyofilm varlığında uygulama süresinin etkili bir dezenfeksiyon sağlamak için 60 dk'ya kadar çıkarılması gerektiği belirlenmiştir (Bak ve diğ., 2009).

Cryptococcus neoformans sıklıkla bağışıklık kaybına uğramış bireylerde hayatı tehdit eden meningoensefalite neden olan maya benzeri kapsüllü bir mantardır. Bakterinin 48 saatlik biyofilm ve planktonik formuna farklı dozlarda 254 nm dalgaboylu UV lambası

kullanılarak radyasyon uygulanmıştır. Deney sonuçlarına göre kriptokokal biyofilmin planktonik hücrelere kıyasla UV ışınlama ile öldürmeye karşı daha dirençli olduğu sonucu elde edilmiştir. 100 ve 200 j/m² dozlarında planktonik ve biyofilm formları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte 300 j/cm² uygulama sonucunda planktonik formunda % 80 azalma meydana gelirken biyofilm formunda % 40 azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Martinez ve Casadevall, 2007). Elde edilen veriler çalışmamız kapsamında elde edilen veriler ile tutarlı olup UV uygulaması karşısında biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik fazdaki bakterilere oranla daha dirençli oldukları bulunmuştur.

Archaeoglobus fulgidus, anaerobik bir deniz hipertemofilidir ve çevresel strese cevap olarak biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Biyofilm üretimi, pH ve sıcaklık dalgalanmaları, yüksek metal konsantrasyonları, antibiyotik, ksenobiyotik veya oksijen eklenmesi gibi fizyolojik olmayan koşullar tarafından teşvik edilmektedir. Yapılan çalışmada 0.2 J/cm² (2000 j/m²) dozunda 254 nm dalga boylu UV uygulaması sonucunda biyofilm oluşumunun teşvik edildiği gözlenmiştir (Lapaglia ve Hartzell, 1997).

Açlık koşullarının mikroorganizmalarda sebep olduğu farklı dirençlerin gelişimine benzer durum kuruluk ve UV uygulamalarında da görülmektedir. Bu konuda *S. enterica* üzerine UV etkisinin belirlendiği farklı bir çalışmada kuruluğun UV direncini arttırdığı gözlenmiştir. 125 µW/cm² yoğunluğundaki UV radyasyonuna 25 dakika (1875 j/m²) maruz kalma sonucunda kuruluğa maruz bırakılmayan hücrelerin tamamı ölürken kuruluğa maruz kalanlarda 3 log azalma gözlenmiştir (Gruzdev ve diğ., 2011).

L. pneumophila için EMA-qPCR sonuçları ise hem biyofilm hem de planktonik faz örnekleri için zamanla azalma tespit edilmiş olup, planktonik fazın 4. saatinin sonunda canlı bakteriye rastlanmamıştır. Elde edilen veriler UV uygulaması karşısında *L. pneumophila*'nın aerobik heterotrofik bakterilerden daha hassas olduğunu göstermektedir.

Farklı bir çalışmada *E. coli* ve *L. pneumophila*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella micdadei*, *Legionella jordanis*, *Legionella oakridgensis*, *Legionella wadsworthii* olmak üzere 7 farklı farklı *Legionella* türü üzerine 254 nm dalga boylu UV lambası ile 30 sn süre ile 72 j/m² doz uygulaması karşısında bakterilerin gösterdikleri

direnç incelenmiştir. Çalışma sonucunda *E. coli* 'nin incelenen 7 *Legionella* türünden UV uygulaması karşısında daha dirençli olduğu, farklı *Legionella* türleri içinde direnç sıralamasının *L. micdadei* > *L. jordanis* > *L. oakridgensis* > *L. bozemanii* > *L. wadsworthii* > *L. dumoffii* > *L. pneumophila* şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Knudson, 1985).

Kuruluk, açlık ve UV uygulamaları göz önüne alındığında mikroorganizma canlılığı açısından biyofilm ve planktonik faz bakterileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmiş olup biyofilm bakterilerinin söz konusu stres koşulları karşısında planktonik faz bakterilerinden daha dirençli oldukları tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Kuruluk ve UV uygulamaları kontrol örneklerinden anlamlı olarak farklılaşmakta olup açlık uygulaması ile kontrol örnekleri arasında anlamlı fark tespit edilememiştir ($p < 0.05$). Çalışma sonucunda elde edilen sayısal değerler incelendiğinde en etkili parametrenin UV uygulaması olduğu, bu uygulamayı kuruluğun izlediği en son olarak ise açlık uygulamasının geldiği bulunmuştur.

Heterotrofik bakteri popülasyonu yaygın olarak soğutma kulelerinde biyolojik üreme indikatörü olarak kullanılmaktadır. Soğutma Kulesi Ensitüsü (CTI) biyolojik üreme kontrol kriteri olarak biyofilm ve planktonik fazda bulunan bakteriler için sırasıyla 10^5 KOB/cm² ve 10^4 KOB/cm² değerlerini belirlemiştir (CTI, 2008). Bu sebeple de çalışmamızda soğutma kulesinde bulunan biyofilm ve planktonik fazdaki bakteriler üzerine stres koşullarının etkisi araştırılırken aerobik heterotrofik bakteriler incelenmiştir. Çalışma kapsamında aerobik heterotrofik bakterilerin üretilmesi amacıyla R2A Agar kullanılmıştır. R2A Agar düşük besin içeriği, düşük inkübasyon sıcaklığı ve uzun inkübasyon süresi ile içme suyunda bulunan özellikle stres altındaki ve klora dirençli bakterilerin tespitinde kullanılmaktadır (Reasoner ve Geldreich, 1979). Besiyerinin düşük besin içeriği hızlı gelişme gösteren bakterilerin yavaş gelişenleri baskılamasını önlemekte ve bu sayede çok sayıda bakterinin gelişmesine izin vererek yayma ekim uygulamaları için standart metot olarak tavsiye edilmektedir (Means ve diğ., 1981; Eaton ve Greenberg, 1996). Besiyerinin strese maruz kalan bakterilerin üretimine uygun olması ve çok sayıda bakterinin gelişmesine izin vermesi gibi özellikleri, çalışma kapsamında aerobik heterotrofik bakterilerin kültür deneylerinde R2A Agar kullanılmasını sağlamıştır.

Çalışma kapsamında R2A Agara ekimler 3 tekrarlı olarak yapılmış olup 27°C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Reasoner, 1990).

Soğutma kuleleri sunduğu ortam koşulları ile *L. pneumophila*’nın üremesi için uygun bir çevre sağlamasının yanı sıra, üretilen aerosoller nedeniyle bakterinin yayılmasına da katkı sağlamaktadır. Soğutma kulesi kaynaklı Lejyonelloz salgınlarının kayıtlara geçmiş olması soğutma kulelerinde *L. pneumophila* kontrolünü zorunlu hale getirmektedir (Critchley ve Bentham, 2009; Nygard ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2015). *Legionella* kaynaklı salgınlar aerosol üreten cihazlarda bakteri sayısının 10^3 – 10^4 KOB/l’yi aştığı durumlarda meydana gelmektedir (Carducci ve diğ., 2010). Bu sebeplerle çalışmamızda soğutma kulesinde bulunan biyofilm ve planktonik fazdaki *L. pneumophila* üzerine stress koşullarının etkisi incelenmiş olup bakterilerin üretilmesi amacıyla BCYE Agar kullanılmıştır. BCYE Agar *Legionella* türlerinin üremesi için temel besiyeri olarak kabul edilmektedir. Besiyeri bileşiminde demir tuzları, L-sistein ve α -ketoglutarat gibi gelişme faktörleri, pH’ı düzenleyen bir tampon ve toksik radikallerin nötralizasyonu için aktif karbon bulunmaktadır (Çelik ve diğ., 2015). Söz konusu bileşenler üreme koşulları açısından nazlı bir bakteri olan *L. pneumophila*’nın üretilmesi için gerekli ortamı sağlamakta olup çalışmada BCYE agar kullanılmıştır. Çalışma kapsamında BCYE Agara ekimler 3 tekrarlı olarak yapılmış olup 37°C’de 10 gün süreyle inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmıştır (British Standard, 1998).

Stres koşullarının gerek aerobik heterotrofik bakterileri gerekse *L. pneumophila*’yı VBNC fazına soktuğu gerçeği sadece klasik kültür kullanılarak gerçekleştirilen analizlerin gerçeklikten uzak sonuçlar vermesine neden olmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda kültür dışındaki tekniklerin kullanımı ve bununla birlikte kullanılan teknikler içinde en güvenilir olanın belirlenmesi kaçınılmaz hale getirmiştir. Çalışma kapsamında epifloresan mikroskop kullanılarak iki ayrı boyama tekniği ile biyofilm ve planktonik fazda bulunan bakterilerin stres koşulları karşısında canlılıkları incelenmiştir. LIVE/DEAD kit kullanılarak gerçekleştirilen çalışma sonucunda CTC-DAPI boyaları ile tespit edilenden daha yüksek sayıda canlı ve toplam mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir.

Benzer sonuçlar farklı çalışmalarda da elde edilmiştir. Her iki tekniğin kullanıldığı farklı bir çalışmada biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal madde etkinliği test edilmiş ve çalışmamız sonuçlarıyla benzer şekilde LIVE/DEAD kit kullanımı sonucunda CTC-DAPI boya ile gerçekleştirilen uygulamadan daha yüksek sayıda canlı mikroorganizma elde edilmiştir (Kim ve diğ., 2008). Benzer şekilde iki tekniğin de kullanıldığı süspansiyon halinde bakteri analizinde stres koşulları olmadığı durumda LIVE/DEAD kit ve CTC-DAPI boya uygulamaları sonucunda benzer sayıda canlı ve toplam bakteri elde edilmesine karşın bakterilere uygulanan klor, sıcaklık gibi stres koşullarında LIVE/DEAD kit tekniği ile CTC-DAPI boyamasından daha yüksek sayıda canlı ve toplam bakteri tespit edilmiştir (Boulos ve diğ., 1999).

Bu durum CTC indirgenmesi sırasında formazan kristalleri oluşmasının ortamdaki pH ve fosfat konsantrasyonundan etkilenmesi, besin açısından zayıf ortamlarda oluşan kristallerin çok küçük oluşu ve tespitinin zor olması, LIVE/DEAD kitte kullanılan kimyasalların floresan yoğunluğunun yüksek olmasının yanı sıra floresan ışımaların kontrast farkının fazla oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Pyle ve diğ., 1995; Boulos ve diğ., 1999). Buradan hareketle floresan ışımaya yapan boya ile canlılık tayininde LIVE/DEAD kit kullanımının CTC-DAPI boya ile yapılan uygulamaya göre daha güvenli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Su sistemlerinde meydana gelen biyofilm yapısında bulunan *L. pneumophila* üzerine sıcaklık, ozon, UV, klor, monokloramin gibi etkili olmayan uygulamaların ardından hücrelerin VBNC fazına girmelerinden dolayı, sadece kültüre edilebilirliği değerlendiren uygulamalar canlı ve sağlam bakteri varlığını tespit edemediklerinden dolayı gerçek bir gösterge olamamaktadırlar. Bakterinin VBNC fazına girmesinin dışında amip içinde bulunması da geleneksel kültür metodu ile tespit edilmesini engellemektedir (Bedrina ve diğ., 2013; Donohue ve diğ., 2014).

PCR metodu *L. pneumophila*'nın tespitinde sıklıkla kullanılan araçların başında gelmektedir. PCR sunduğu yüksek özgüllük, duyarlılık ve hızın yanı sıra düşük oranda mikroorganizma varlığında dahi tanımlama yapabilmektedir. Real-time PCR kullanımı örnekte bulunan mikroorganizma sayısının tespitini mümkün kılmaktadır (Dusserre ve diğ., 2008). Çalışmamızda tüm bu sebeplerden dolayı *L. pneumophila*'nın stres koşullarının ardından canlılık durumunun tespitinde kültür dışında qPCR tekniği

kullanılmıştır. Bir Real-time PCR olan teknikte bakterinin tespiti için kullanılan kit sayesinde bakteri sayısının belirlenmesi mümkün olmaktadır.

Gözlem amacıyla qPCR kullanılmasının bazı avantajları vardır. Çünkü qPCR belirli bir cins/tür/serogrup için özel olduğu bilinen spesifik bir geni tespit etmekte ve çoğaltılmasını sağlamaktadır. Çeşitli qPCR türleri vardır. Cinse özel olanlar 16s rRNA'yı hedeflerken, türe özgü olanlar makrofaj enfeksiyonunu güçlendirici *mip* genini hedef almaktadır. Serogruba spesifik olanlar ise LPS (lipopolisakkarit) gen kümesini hedef almaktadır. 5s rRNA, 23s rRNA, *rpoB* ve *dotA* genlerini hedef alan PCR'larda geliştirilmiştir. Soğutma kuleleri, sıcak ve soğuk sistemler için belirlenen uyarı seviyesi GU bazında *Legionella* türleri için $< 5 \times 10^3$ GU/l ve *L. pneumophila* için $< 4 \times 10^3$ GU/l'dir (Donohue ve diğ., 2014).

DNA interkalasyon ajanı olan EMA ile kombinlenmiş qPCR çalışmalarında söz konusu kimyasal madde membranı hasar görmüş hücrelerden içeri girerek DNA'ya bağlanmakta ve ölü hücrelerin qPCR ile çoğaltılmalarını engellemektedir. Böylelikle yalnızca membran bütünlüğünü koruyabilen canlı hücrelerin varlığı tespit edilmektedir. EMA-qPCR tekniğinin su örneklerinde *L. pneumophila* tespitinde verimli bir performansa sahip olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Chang ve Chou, 2011; Chen ve Chang, 2010).

Ancak çalışmamız kapsamında *L. pneumophila* için kültür deney sonuçlarında canlı mikroorganizma varlığı tespit edilmesine karşın EMA-qPCR sonuçlarına göre bazı uygulamalarda (sıcaklık-pH kontrol örnekleri gibi) canlı bakteri varlığına rastlanmamıştır. Bu durum EMA ile muamele sonucunda gerçekleştirilen yıkama işleminde EMA'nın tam olarak uzaklaştırılamamış olmasından kaynaklı uzun süreli etkinin, canlı hücrelerin qPCR ile çoğaltılmalarını engellediği şeklinde yorumlanmaktadır. Ayrıca yıkama işlemi sırasında hücrelerin istem dışı uzaklaştırılmış olması ihtimali de canlı bakteri varlığının tespit edilmesini engelleyebilmektedir. Ek olarak canlı bakteri elde edilememiş olmasından dolayı EMA uygulama adımlarında belirlenen değerler (EMA konsantrasyonu, uygulama süresi, ışık şiddeti, süresi ve ışığa uzaklık) için daha ileri optimizasyonun gerekli olduğu düşünülmektedir.

Yüksek konsantrasyondaki EMA canlı hücrelere girerek birikmekte ve qPCR işlemi ile

canlı hücre DNA'sının çoğaltılmasını engelleyebilmektedir. Ayrıca çalışma prensibi kimyasalın membranı zarar görmüş hücrelerden içeri girebilmesine dayanmaktadır. Ancak hücrenin bulunduğu çevrede uygulanan dezenfeksiyon işlemlerinde meydana gelen değişiklikler dolayısıyla da bu işlemlerin hücrede sebep oldukları membran hasarlarının büyüklüğü canlı ve ölü hücre sayısının belirlenmesinde yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca EMA yapısında bulunan azit grubunun aktif bölgesi çevrede bulunan çeşitli maddelerle birleşerek fotoaktivasyonu engellenebilmektedir (Shi ve diğ., 2011). Tüm bu kriterler dikkate alındığında çalışmamız kapsamında kullanılan PBS ve stres koşullarının içerik ve pH'larının EMA-qPCR işlemi sonucunda canlı *L. pneumophila* tespit edilmesini engellemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız sonucunda gerek biyofilm gerekse planktonik bakteriler üzerine etkili olduğu tespit edilen parametrelerden 65°C sıcaklık uygulaması, gerçek soğutma kulesi suyunun sıcaklığının yükseltilmesi ile oldukça kolay uygulanabilecek ve etkili sonuçların alınabileceği bir tekniktir. Bunun yanı sıra kuruluk ve UV uygulamaları da, gerçek soğutma kulesi sisteminde kısa süreli boşaltmaların ardından kolay uygulanabilir olmalarının yanı sıra biyofilm bakterileri üzerine etkinliklerinin de yüksek olduğu teknikler arasında yer almaktadır.

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar kısaca şu şekilde özetlenebilir;

- Su fazında bulunan mikroorganizmalar yüzeylere kolonize olarak biyofilm tabakası meydana getirebilmektedirler.
- Biyofilm tabakası *L. pneumophila* bakterisinin su sistemlerinde üreyip çoğalmasını sağlamaktadır.
- Biyofilm yapısında bulunan bakteriler planktonik fazda bulunan bakterilere oranla stres koşulları karşısında daha dirençlidirler.
- Uygulanan stres koşulları içinde biyofilm ve planktonik fazda bulunan bakteriler üzerine en etkili olanlar 65°C sıcaklık, asidik pH uygulaması, 10 ppm monokloramin, hipertonik tuz, kuruluk ve UV uygulamalarıdır.
- Stres koşulları aerobik heterotrofik bakteriler ve *L. pneumophila*'yı VBNC fazına girmeleri yönünde teşvik etmektedir. Bu sebeple de sadece klasik kültür yapılarak elde edilen sonuçlar canlılık konusunda doğru sayıları yansıtmakta yetersiz kalmaktadır. Bu yanıltıcı sonuçların üstesinden gelmek için mikroskopik ve

moleküler yöntemler gibi ileri analizlerin yapılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

- Epifloresan mikroskop çalışmalarında canlılık tespitinde kullanılan CTC-DAPI ve LIVE/DEAD kit kullanımlarında, LIVE/DEAD kit daha yüksek sayıda canlı ve toplam bakterinin tespit edilmesini sağlamakta olup daha doğru sonuçları daha kısa sürede elde etme konusunda kültür metoduna ek olarak kullanılabilecek uygun bir tekniktir.
- EMA-qPCR, su sistemlerinde *L. pneumophila*'nın tespitinde kullanılan bir tekniktir. Uygun optimizasyon aşamalarının ardından, belirlenen etkili bir prosedür ile örnekteki canlı mikroorganizma varlığının tespit edilebilmesini sağlayabilmesi açısından PCR teknikleri içinde avantajlı bir hale gelebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Model sistemler doğru bir düzende tasarlandığında gerçek sistemleri taklit etme konusunda başarı sağlamaktadırlar. Gerçek sistemlere en yakın tasarımın yapılması biyofilm oluşumunun izlenmesi, biyofilmle mücadelede etkili stratejilerin belirlenebilmesi gibi konularda uygun ortam sunmaktadır.

Soğutma kulelerinde biyofilm gelişimi, biyofilm yapısında bulunabilen başta *L. pneumophila* olmak üzere çeşitli bakterilerin, üretilen aerosollerle dağıtılması sonucunda enfeksiyon meydana getirebilme riskleri açısından ihmal edilmemesi gereken bir konudur. Bakterilerin stres koşulları karşısındaki dirençleri nedeniyle en etkili uygulamaların güvenilir tekniklerle tespit edilmesi halk sağlığı açısından olduğu kadar ekonomik açıdan da oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abdallah M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. and Chihib, N.E., 2014, Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments, *Archives of microbiology*, 196, 453-472.
- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E. and Guyard, C., 2013, Biofilms: The stronghold of *Legionella pneumophila*, *International journal of molecular sciences*, 14, 21660-21675.
- Abranches, J., Lemos, J.A. and Burne, R.A., 2006, Osmotic stress responses of *Streptococcus mutans* UA159, *FEMS microbiology letter*, 255, 240-246.
- Acker, H.V., Dijck, P.V. and Coenye, T., 2014, Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms, *Trends in microbiology*, 22(6), 326-333.
- Ajami, B., Ghazvini, K., Movahhed, T., Ariaee, N., Shakeri M.T. and Makarem, S., 2012, Contamination of a dental unit water line system by *Legionella pneumophila* in the mashhad school of dentistry in 2009, *Iranian red crescent medical journal*, 4(6), 376-378.
- Akan, C. and Kınık, Ö., 2014, Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi, *Journal of food and feed science - technology*, 14, 42-51.
- Akbaş, E., 2013, Hastane su sistemlerinde *Legionella* araştırılmasında temel prensipler, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 43(1), 1-11.
- Al-Azemi, A., Fielder, M.D., Abuknesha, R.A. and Price, R.G., 2011, Effects of chelating agent and environmental stresses on microbial biofilms: relevance to clinical microbiology, *Journal of applied microbiology*, 110, 1307-1313.
- Allegra, S., Girardot, F., Grattard, F., Berthelot, P., Helbig, J.H., Pozzetto, B. and Riffard, S., 2011, Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples, *Journal of applied microbiology*, 110, 952-961.
- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C. and Frere, J., 2008, Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment, *Current microbiology*, 57, 497-502.
- Allison, D.G., 2003, The biofilm matrix, *Biofouling*, 19(2), 139-150.
- Allison, D.G., McBrain A.J. and Gilbert, P., 2000, *Biofilms: problems of control*, Community structure and cooperation in biofilms, In: Allison, D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott H. M. and Wilson M. (eds), Chapter 15, Chambridge University Press, New York, 309-328.

- Almiron, M. A., Roset, M. S. and Sanjuan, N., 2013, The aggregation of *Brucella abortus* occurs under microaerobic conditions and promotes desiccation tolerance and biofilm formation, *The open microbiology journal*, 7, 87-91.
- Anderl, J.N., Zahller, J., Roe, F. and Stewart, P.S., 2003, Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(4), 1251-1256.
- Anderson, K. L., Roberts, C., Disz, T., Vonstegn, V., Hwang, K., Overbeek, R., Olson, P. D., Projan, S. J. and 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.
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.C.M. and Finlay, B.B., 2010, Quorum sensing in bacterial virulence, *Microbiology*, 156, 2271-2282.
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., and Nasu, M., 2002, Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis, *FEMS microbiology ecology*, 43, 111-119.
- Arda, M., 2011, *Bakterilerin üremeleri üzerine etkili faktörler*, Temel mikrobiyoloji, Bölüm 8, Medisan yayınları, Ankara, 61-71.
- Aruliah, R. and Ting, Y.P., 2014, Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from water in a cooling tower, *ISRN Corrosion*, Article ID 803219, 1-11.
- Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S., 2006, Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state, *Environmental microbiology*, 9(4), 869-879.
- ASHRAE Guideline 12-2000, Minimizing the risk of Legionellosis associated with building water systems.
- Atlas, R.M., 1999, *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control, *Environmental microbiology*, 1(4), 283-293.
- Bachmann, R.T. and Edyvean, R.G.J., 2006, Biofouling: an historic and contemporary review of its causes, consequences and control in drinking water distribution systems, *Biofilms*, 1-31.
- Bak, J., Ladefoged, S. D., Tvede, M., Begovic, T. and Gregersen, A., 2009, Dose requirements for UVC disinfection of catheter biofilms, *Biofouling: the journal of bioadhesion and biofilm research*, 25(4), 289-296.
- Bakker, D.P., Postmus, B.R., Busscher, H.J. and Mei, H.C., 2004, Bacterial strains isolated from different niches can exhibit different patterns of adhesion to substrata, *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3758-3760.
- Baron, J.L., Vikram, A., Duda, S., Stout, J.E. and Bibby, K., 2014, Shift in the microbial

- ecology of a hospital hot water system following the introduction of an on-site monochloramine disinfection system, *Plos one*, 9(7), 1-9.
- Barria, C., Malecki, M. and Arraiano, C.M., 2013, Bacterial adaptation to cold, *Microbiology*, 159, 2437-2443.
- Baş, D. and Türetgen, İ., 2011, Kısa süreli kuruluk ve sıcaklık değişiminin şebeke suyuyla beslenen model su borusu sistemindeki mikrobiyal biyofilm oluşumuna etkisi, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 41(4), 155-16.
- Bedard, E., Charron, D., Lalancette, C., Deziel, E. and Prevost, M., 2014, Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress, *FEMS microbiology letters*, 36, 226-234.
- Bedrina, B., Macian, S., Solis, I., Fernandez-Lafuente, R., Baldrich, E. and Rodriguez, G., 2013, Fast immunosensing technique to detect *Legionella pneumophila* in different natural and anthropogenic environments: comparative and 'non-culturable' cells of *Legionella*, *BMC microbiology*, 14(3), 1-10.
- Behnke, S., Parker, A. E., Woodall, D. and Camper, A.K., 2011, Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures, *Applied and environmental microbiology*, 77(20), 7176-7184.
- Ben Said, M., Khefacha, S., Maalej, L., Daly, I. and Hassen, A., 2011, Effect of ultraviolet, electromagnetic radiation subtype C (UV-C) dose on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*, *African journal of microbiology research*, 5(25), 4353-4358.
- Ben Slama, R., Bekir, K., Miladi, H., Noumi, A. and Bakhrouf, A., 2012, Adhesive ability and biofilm metabolic activity of *Listeria monocytogenes* strains before and after cold stress, *African journal of biotechnology*, 11(61), 12475-12482.
- Bernier, S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppee, J.Y., Ghigo, J.M. and Beloin, C., 2013, Starvation, together with the sos response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin, *Plos genetics*, 9(1), 1-14.
- Besinis, A., De Peralta, T. and Handy, R.D., 2014, The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays, *Nanotoxicology*, 8(1), 1-16.
- Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F. and Cappelier, J. M., 2002, Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*, *Veterinary researchs*, 33, 359-370.
- Bixler, G.D. and Bhushan, B., 2012, Biofouling: lessons from nature, *Soft matter*, 7(5), 11271-11284.
- Blanky, M., Rodríguez-Martínez, S., Halpern, M. and Friedler, E., 2015, *Legionella pneumophila*: From potable water to treated greywater; quantification and removal during

treatment, *Science of the total environment*, 533, 557-565.

- Bloomfield, S.F., Arthur, M., Begun, K. and Patel, H., 1993, Comparative testing of disinfectants using proposed European surface test methods, *Letters in applied microbiology*, 10, 287-294.
- Bodet, C., Sahr, T. Dupuy, M., Buchrieser, C. and Hechard, Y., 2012, *Legionella pneumophila* transcriptional response to chlorine treatment, *Water research*, 46, 808-816.
- Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H.J. and Arvin, E., 2003, Experimental systems for studying biofilm growth in drinking water, *Biofilm in medicine, industry and environmental biotechnology*, 215-229.
- Boles, B.R., Thoendel, M. and Singh P.K., 2004, Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities, *Proceedings of the national academy of sciences*, 101, 16630-16635.
- Bonetta, S., Bonetta, S., Ferretti, E., Balocco, F. and Carraro, E., 2009, Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods, *Journal of applied microbiology*, 108, 1576-1583.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. and Messi, P., 2005, Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives, *Biotechnology annual review*, 11, 355-380.
- Bott, T.R., 2009, Biofouling control in cooling water, *International journal of chemical engineering*, Article ID 619873, 1-4.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. and Desjardins, R., 1999, LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *Journal of microbiological methods*, 37, 77-86.
- Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. and Kolter, R., 2005, Biofilms: the matrix revisited, *Trends Microbiology*, 13, 20-26.
- Brazire, A., Diab, F., Jebbar, M. and Haras, D., 2007, Influence of high salinity on biofilm formation and benzoate assimilation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 34, 5-8.
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M. and Joosten, H.M., 2003, Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*, *Journal of applied microbiology*, 95, 967-973.
- Brettar, I. and Höfle, M.G., 2008, Molecular assessment of bacterial pathogens-a contribution to drinking water safety, *Current opinion in biotechnology*, 19, 274-280.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. and Dubois-Brissonnet, F., 2011, Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review, *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
- British Standard, 1998, *Water Quality Part 4: Microbiological Methods*, Detection and Enumeration of *Legionella* BS 6068 - 4.12:1998; ISO 11731:1998.

- Brown, M.R.W. and Barker, J., 1999, Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms, *Trends in microbiology*, 7(1), 46-50.
- Brujls, M.C.M. and Jenner, H.A., 2012, *Cooling water system design in relation to fouling pressure*, Operational and environmental consequences of large industrial cooling water systems, In: Rajagopal, S., Jenner, H.A. and Venugopalan, V.P. (eds), Chapter 4, Springer, London, 45-63.
- Burkut, E., 2008, Ultraviyole ile su dezenfeksiyonu, *Su ve çevre teknolojileri*, 9, 14-17.
- Burmolle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T. and Sorensen, S.J., 2014, Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?, *Trends in microbiology*, 22(2), 84-91.
- Buse, H.Y., Lu, J., Struewing, I.T. and Ashbolt, N.J., 2014, Preferential colonization and release of *Legionella pneumophila* from mature drinking water biofilms grown on copper versus unplasticized polyvinylchloride coupons, *International journal of hygiene environmental health*, 217(2-3), 219-225.
- Buse, H.Y., Schoen, M.E. and Ashbolt, N.J., 2012, *Legionellae* in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure, *Water research*, 46, 921-933.
- Busscher, H.J. and Weerkamp, A.H., 1987, Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata, *FEMS microbiology review*, 46, 165-173.
- Cairrao, F., Cruz, A., Mori, H. and Arraiano, C.M., 2003, Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA, *Molecular microbiology*, 50(4), 1349-1360.
- Canals, O., Serrano-Suarez, A., Salvado, H., Mendez, J., Cervero-Arago, S., & Porras, V.R., Dellunde, J. and Araujo, R., 2015, Effect of chlorine and temperature on free-living protozoa in operational man-made water systems (cooling towers and hot sanitary water systems) in Catalonia, *Environmental science pollution research*, 22, 6610-6618.
- Cappitelli, F, Polo, A. and Villa, F., 2014, Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled, *Food engineering reviews*, 6, 29-42.
- Carducci, A., Verani, M. and Battistini, R., 2010, *Legionella* in industrial cooling towers: monitoring and control strategies, *Letters in applied microbiology*, 50, 24-29.
- Carvalho, F.R.S., Foronda, A.S. and Pellizari, V.H., 2007, Detection of *Legionella pneumophila* in water and biofilm samples by culture and molecular methods from man-made systems in Sao Paulo - Brazil, *Brazilian journal of microbiology*, 38, 743-751.
- Chaieb, K., Chehab, O., Zmantar, T., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A., 2007, *In vitro* effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains, *Annals of microbiology*, 57(3), 431-437.
- Chan, Y.C., Boor, K.J. and Wiedmann, M., 2007, σ^S -dependent and σ^S -independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock

- and cold growth, *Applied and environmental microbiology*, 73(19), 6019-6029.
- Chandy, J.P. and Angles, M.L., 2001, Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay, *Water research*, 35(11), 2677-2682.
- Chang, C.W. and Chou, F.C., 2011, Assessment of bioaerosol sampling techniques for viable *Legionella pneumophila* by ethidium monoazide quantitative PCR, *Aerosol science and technology*, 45, 343-351.
- Chang, C.W., Chang, W.L. and Chang, S.T., 2008, Influence of pH on bioactivity of cinnamon oil against *Legionella pneumophila* and its disinfection efficacy in hot Springs, *Water research*, 42, 5022-5030.
- Chang, L. and Craik, S., 2012, Laboratory simulation of the effect of ozone and monochloramine on biofilms in drinking water mains, *Ozone: science and engineering*, 34, 243-251.
- Chang, T.B. and Lin, T.M., 2014, Water and energy conservation for a counterflow cooling tower using UV light disinfection and variable speed fan, *Journal of process mechanical engineering*, 1-9.
- Characklis, W.G. and Marshall, K.C., 1990, *Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach*, Biofilms, In: Characklis, W.G and Marshall K.C. (eds), John Wiley and sons, New York, 3-15.
- Chauhan, A., Lebeaux, D., Decante, B., Kriegel, I., Escande, M.C., Ghigo, J.M., Beloin, C., 2012, A rat model of central venous catheter to study establishment of long-term bacterial biofilm and related acute and chronic infections, *Plos one*, 7(5), 1-12.
- Chen, N.T. and Chang, C.W., 2010, Rapid quantification of viable *Legionellae* in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR, *Journal applied and environmental microbiology*, 109, 623-634.
- Chen, W., Honma, K., Sharma, A. and Kuramitsu, H.K., 2006, A universal stress protein of *Porphyromonas gingivalis* is involved in stress responses and biofilm formation, *FEMS microbiology letter*, 264, 15-21.
- Chen, X. and Stewart, P., 2000, Biofilm removal caused by chemical treatments, *Water research*, 34, 4229-4233.
- Cheng, G., Zhang, Z., Chen, S., Bryers, J.D. and Jiang, S., 2007., Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces, *Biomaterials*, 28, 4192-4199.
- Chiao, T.H., Clancy, T.M., Pinto, A., Xi, C. and Raskin, L., 2014, Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection, *Environmental science and technology*, 48, 4038-4047.
- Chien, S.H., Chowdhury, I., Hsieh, M.K. Li, H., Dzombak, D.A. and Vidic, R.D., 2012, Control of biological growth in recirculating cooling systems using treated secondary effluent as makeup water with monochloramine, *Water research*, 46, 6508-6518.

- Clarelli, F., Di Russo, C., Natalini, R and Ribot, M., 2013, A fluid dynamics model of the growth of phototrophic biofilms, *Journal of mathematical biology*, 66(7), 1387-1408.
- Cochran, W.L., McFeters, G.A. and Stewart, P.S., 2000, Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine, *Journal of applied microbiology*, 88, 22-30.
- Codony, F., Morato, J. and Mas, J., 2005, Role of discontinuous chlorination on microbial production by drinking water biofilms, *Water research*, 39, 1896-1906.
- Coniglio, M.A., Melada, S. and Ya, M.H., 2015, Monochloramine for controlling *Legionella* in biofilms: how much we know?, *Journal of nature and science*, 1(2), 1-4.
- Connell, G.F., 1996, *Properties of chlorine and ammonia*, The chlorination/chloramination handbook, In: Cornell, G. and Connell, G.F. (eds), American water works association, Denver, United States of America, 23-98.
- Cooling Tower Institute, 2008, Guideline: Best Practices for Control of *Legionella*, Cooling Technology Institute, U.S.A, CTI guidelines WTP-148 (06).
- Cooper, I.R. and Hanlon, G.W., 2010, Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection, *Journal of hospital infection*, 74, 152-159.
- Cortinovis, G.F., Ribeiro, M.T., Paiva, J.L., Song, T.W. and Pinto, J.M., 2009, Integrated analysis of cooling water systems: Modeling and experimental validation, *Applied thermal engineering*, 29, 3124-3131.
- Costa, J., Tiago, I., Costa, M.S. and Verissimo, A., 2005, Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater, *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 663-671.
- Costerton, J.M., 1999, Introduction to biofilm, *International journal of antimicrobial agents*, 11, 217-221.
- Costerton, J.W. and Lappin-Scott, H.M., 1995, *Introduction to microbial biofilms*, Microbial biofilms, In: Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. (eds), Cambridge University Press, Cambridge, 1-11.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J., 1987, Bacterial biofilms in nature and disease, *Annual review of microbiology*, 41, 435-464.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, G.K., 1978, How bacteria stick, *Scientific American*, 238, 86-95.
- Critchley, M. and Bentham, R., 2007, *Legionella* and protozoa in cooling towers: implications for public health and chemical control, *Environmental health*, 7, 36-45.
- Critchley, M. and Bentham, R., 2009, The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae, *Journal of applied microbiology*, 106, 784-789.

- Cronan, J.E., 2002, Phospholipid modifications in bacteria, *Current opinion on microbiology*, 5, 202-205.
- Csonka, L., 1989, Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress, *Microbiology reviews*, 53, 121-147.
- Cunliffe, D.A., 1990, Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine, *Journal of applied bacteriology*, 68, 453-459.
- Cunningham, E., O'Byrne C. and Oliver, J.D., 2009, Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH, *Food control*, 20(12), 1141-1144.
- Çelik, H., Ötgün, S.N. and Topal S., 2015, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye halk sağlığı kurumu, Lejyoner hastalığı kontrol programı rehberi.
- Davey, M.E. and O'toole, G.A., 2000, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847-867.
- Davies, D., 2003, Understanding biofilm resistance to antibacterial agents, *Nature*, 2, 114-122.
- De Jesus, M.C., Urban, A.A., Marasigan, M.E. and Barnett-Foster, D.E., 2005, Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity, *Journal of infectious diseases*, 192, 1430-1440.
- Decho, A.W., 2013, The EPS matrix as an adaptive bastion for biofilms: introduction to special issue, *International journal of molecular sciences*, 14, 23297-23300.
- Declerck, P., 2009, Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*, *Environmental microbiology*, 12(3), 557-566.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., Van Hoef, V., De Keersmaecker, B. and Ollevier, F., 2009, Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes, *Microbiological research*, 164, 593-603.
- Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U. and Wingender, J., 2007, Chemical and physical methods for characterisation of biofilms, *Microchimica acta*, 158, 1-27.
- Desnues, B., Cuny, C., Grégori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H. and Nyströ, T., 2003, Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells, *European molecular biology organization reports*, 4(4), 400-404.
- Diederer, B.M.W., 2008, *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *Journal of infection*, 56(1), 1-12.
- Dikici, A., 2009, Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları, *Electronic journal of food technologies* 4(3), 59-68.

- Donlan, R.M., 2000, Role of biofilms in antimicrobial resistance, *Asaio journal*, 47-52.
- Donlan, R.M., 2002, Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
- Donlan, R.M., Forster, T., Murga, R. Brown, E., Lucas, C., Carpenter, J. and Fields, B., 2005, *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants, *Biofouling*, 21(1), 1-7.
- Donohue, M.J., O'Connell, K., Vesper, S. J., Mistry, J. H., King, D., Kostich, M. and Pfaller, S., 2014, Widespread molecular detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in cold water taps across the United States, *Environmental science and technology*, 48, 3145-3152.
- Douglas, A.E., Bouvaine, S. and Russell, R.R., 2010, How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium, *Proceedings of the royal society b*, Doi:10.1098/rspb.2010.1563.
- Ducret, A., Chabalier, M. and Dukan, S., 2014, Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella*, *BMC microbiology*, 14(3), 1-10.
- Dusserre, E., Ginevra, C., Hallier-soulier, S., Festoc, G., Etienne, J. and Jarraud, S., 2008, A PCR based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *Legionellae* that can recover their cultivability, *Applied and environmental microbiology*, 74, 4817-4824.
- Eaton, A.D. and Greenberg A. E., 1996, Standard methods for the examination of water and wastewater, In: Eaton, A.D., Clesceri, L.S. and Greenberg A.E. (eds), 19th edition, American Public Health Association, Washington D.C., United States of America.
- Edwards, S.J. and Kjellerup, B.V., 2013, Application of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutant, pharmaceuticals/personal care products and heavy metals, *Applied and environmental microbiology*, 79, 9909-9921.
- Eguia, E., Trueba, A., Giron, A., Rio-Calonge, B., Otero, F. and Bielsa, C., 2007, Optimisation of biocide dose as a function of residual biocide in a heat exchanger pilot plant effluent, *Biofouling*, 23(3), 231-247.
- Eiff, C.V., Jansen, B., Kohnen, W. and Becker, K., 2005, Infections associated with medical devices, *Drugs*, 65, 179-214.
- Elasri, M.O. and Miller, R.V., 1999, Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation, *Applied and environmental microbiology*, 65(5), 2025-2031.
- Electric Power Research Institute, 2003, Use of degraded water sources as cooling water in power plants, Consultant report, P500-03-110.
- Elvers, K.T., Leeming, K. and Lappin-Scott, H.M., 2002, Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides, *Journal of industrial*

microbiology and biotechnology, 29, 331-338.

- Epalle, T., Girardot, F., Allegra, S., Maurice-Blanc, C., Garraud, O. and Riffard, S., 2015, Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*, *Microbial ecology*, 69, 215-224.
- Epstein, A.K., Wonga, T.S., Belisle, R.A., Boggs, E.M. and Aizenberg, J., 2012, Liquid-infused structured surfaces with exceptional anti-biofouling performance, *Proceedings of the national academy of sciences*, 109(33), 13182-13187.
- Fare's, A.B., Jebbar, D.B. and Haras, D., 2007, Influence of high salinity on biofilm formation and benzoate assimilation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Industrial microbiology and biotechnology*, 34, 5-8.
- Farhat, M., Trouilhe, M.C., Briand, E., Moletta-Denat, M., Robine, E. and Frere, J., 2010, Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation, *Journal of applied microbiology*, 108, 1073-1082.
- Felipe, K.S., Pampou, S., Jovanovic, O.S., Pericone, C.D., Ye, S.F., Kalachikov, S., and Shuman, H. A., 2005, Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer, *Journal of bacteriology*, 187(22), 7716-7726.
- Fernandez, A., Diaz, E.E., Amils, R. and Sanz, J.L., 2008, Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor, *Microbial ecology*, 56, 121-132.
- Flemming, H.C. and Wingender, J., 2002, Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance, *Encyclopedia of environmental microbiology*, 3, 1223-1231.
- Flemming, H.C. and Wingender, J., 2003, *The crucial role of extracellular polymeric substances in biofilms*, Biofilms in Wastewater Treatment: an interdisciplinary approach. In: Wuertz, S, Bishop P.L, Wilderer, P.A. (eds), Chapter 8, IWA Publishing, London, 178-200.
- Flemming, H.C. and Wingender, J., 2010, The biofilm matrix, *Nature review of microbiology*, 8, 623-633.
- Flemming, H.C., 2002, Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures, *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 629-640.
- Flemming, H.C., Neu, T.R. and Wozniak, D.J., 2007, The EPS matrix: the "house of biofilm cells", *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
- Flemming, K., Klingenberg, C., Cavanagh, J.P., Sletteng, M., Stensen, W., Svendsen, J.S. and Flægstad, T., 2009, High in vitro antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63, 136-145.

- Fonseca, P., Moreno, R. and Rojo, F., 2011, Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses, *Environmental microbiology reports*, 3(3), 329-339.
- Frederick, M.R., Kuttler, C., Hense, B.A. and Eberl, H.J., 2011, A mathematical model of quorum sensing regulated EPS production in biofilm communities, *Theoretical biology and medical modelling*, 8(8), 1-29.
- Gagnon, G.A. and Slawson, R.M., 1999, An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *Journal of microbiology methods*, 34, 203-214.
- Gao, L.Y. and Abu Kwaik, Y., 1999, Activity of caspase-3 during *Legionella pneumophila* induced apoptosis, *Infection and immunity*, 67(9), 4886-4894.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M. and Zhang, Z., 2008, Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, *Progress in natural science*, 18, 1049-1056.
- Gayan, E., Condon, S. and Alvarez, I., 2014, Biological aspects in food preservation by ultraviolet light: a review, *Food and bioprocess technology*, 7, 1-20.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. and Sand, W., 1998, Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching, *Applied and environmental microbiology*, 64, 2743-2747.
- Giao, M.S., Wilks, S.A., Azavedo, N.F., Vieira, M.J. and Keevi, C.W., 2009, Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*, *Microbiology ecology*, 58, 56-62.
- Gleeson, C. and Gray, N.F., 1997, The coliform index and waterborn disease: problem of microbial drinking water assessment, *Taylor and Francis group*, 1-37.
- Gobin, I., Pasic, E., Matesic, M., Rebic, D. and Doric, M., 2010, The pathogenic potential of *Legionella* cells exposed to desiccation, *Central European Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology "Power of Microbes"*, 22.09.2010-25.09.2010, Malinska, Croatia.
- Gobin, I., Pasic, E., Matesic, M., Rebic, D. and Doric, M., 2011, The culturability and virulence of *Legionella* cell, *21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 07.05.2011-10.05.2011, Milan, Italy.
- Goeres, D.M., 2006, *Design of model reactor systems for evaluating disinfectants against biofilm bacteria*, Thesis (PhD), Montana State University, Faculty of Engineering.
- Goeres, D.M., Loetterle, L.R., Hamilton, M.A., Murga, R., Kirby, D.W. and Donlan, R.M., 2005, Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms, *Microbiology*, 151, 757-762.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C. and Buchrieser, C., 2009, *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics, *Infection, genetics and evolution*, 9, 727-739.

- Gonzalez-Escalona, N., Fey, A., Hofle, M.G., Espejo, R.T. and Guzman, C., 2006, Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholera* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock, *Environmental microbiology*, 8, 658-666.
- Gophna, U. and Ron, E.Z., 2003, Virulence and the heat shock response, *International journal of medical microbiology*, 292, 453-461.
- Gopinath, V., Priyadarshini, S., Loke, M.F., Arunkumar, J., Marsili, E., MubarakAli, D., Velusamy, P. and Vadivelu, J., 2015, Biogenic synthesis, characterization of antibacterial silver nanoparticles and its cell cytotoxicity, *Arabian journal of chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.011>.
- Graumann, P., Wendrich, T. M., Weber, M.H.W., Schröder, K. and Marahiel, M. A., 1997, A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures, *Molecular microbiology*, 25, 741-756.
- Grover, M., Ali, S.Z., Sandhya, V., Rasul, A. and Venkateswarlu, B., 2011, Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses, *World journal of microbiology and biotechnology*, 27, 1231-1240.
- Gruzdev, N., Pinto, R. and Sela, S., 2011, Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses, *Applied and environmental microbiology*, 77(5), 1667-1673.
- Habash, M. and Reid, G., 1999, Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections, *Journal of clinical pharmacology*, 39, 887-898.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P., 2009, Evolving concepts in biofilm infections, *Cell microbiology*, 11, 1034-1043.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Hoiby, N., Moser, C., Costerton, J.W., Moter, A. and Bjarnsholt, T., 2012, Towards diagnostic guidelines for biofilm associated infections, *FEMS Immunology and medical microbiology*, 65, 127-45.
- Hansen, L.T. and Vogel, B.F., 2011, Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products, *International journal of food microbiology*, 146, 88-93.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knochel, S. and Molin, S., 2010, Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*, *Applied and environmental microbiology*, 76, 2271-2279.
- Haruta, S. and Kanno, N., 2015, Survivability of microbes in natural environments and their ecological impacts, *Microbes and environments*, 30(2), 123-125.
- Hausner, M. and Wuertz, S., 1999, High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in-situ analysis, *Applied and environmental microbiology*, 65, 3710-3713.
- Helbling D.E. and Vanbriesen J.M., 2007, Free chlorine demand and cell survival of microbial

- suspensions, *Water research*, 41, 4424-4434.
- Heller, R., Holler, C., Submuth, R. and Gundermann, K.O., 1998, Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*, *Letter on Applied microbiology*, 26, 64-68.
- Henrici, A.T., 1933, Studies of freshwater bacteria, I.A direct microscopic technique, *Journal of bacteriology*, 25, 277-87.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M. R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S. and Givskov, M., 2002, Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, *Microbiology*, 148, 87-102.
- Heyde, M. and Portalier, R., 1990, Acid shock proteins of *E. coli*, *FEMS microbiology letters*, 69, 19-26.
- Hilbert, L.R., 2006, Monitoring corrosion rates and localised corrosion in low conductivity water, *Corrosion science*, 48, 3907-3923.
- Hilbi, H., Hoffmann, C. and Harrison, C.F., 2011, *Legionella spp.* outdoors: colonization, communication and persistence, *Environmental microbiology reports*, 3(3), 286-296.
- Hines, S.A., Chappie, D.J., Lordo, R.A., Miller, B.D., Janke, R.J., Lindquist, H.A., Fox, K.R., Ernst, H.S. and Taft, S.C., 2014, Assessment of relative potential for *Legionella* species or surrogates inhalation exposure from common water uses, *Water research*, 56, 203-213.
- Hingston, P.A., Stea, E.C., Knochel, S. and Hansen, T., 2013, Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces, *Food microbiology*, 36, 46-56.
- Hoffman, P.S. and Garduno, R.A., 1999, Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity, *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 7, 58-63.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi G.L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J. and Williams, C., 2015, ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014, *Clinical microbiology and infection*, 21, 1-25.
- Hoiby, N.A., 2014, Personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections, *Pathogens and disease*, 70, 205-211.
- Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A. and Stewart, P.S., 2004, Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment, *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7418-7425.
- Inagaki, S., Matsumoto-Nakano, M, Fujita, K., Nagayama, K., Funao, J., Ooshima, T., 2009, Effects of recombinase A deficiency on biofilm formation by *Streptococcus mutans*, *Oral microbiology and immunology*, 24, 104-108.

- Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K. and Ohta, H., 2015, Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR, *Microbes and environments*, 30(1), 108-112.
- Iordache, C., Oprea, E., Bleotu, C., Dumitrescu, D., Pîrcălăbioru, G., Bucur, M., Larion, C., Lixandru, M., Israil, A.M., Lazăr, V. and Chifiriuc, M.C., 2008, The role of proteins expressed under the stress condition in virulence of some vibrio strains, *Romanian archives of microbiology and immunology*, 67(3-4), 85-91.
- Islam, N., Ross, J.M. and Marten, M.R., 2015, Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* biofilm at elevated levels of NaCl, *Clinical microbiology*, 4(5), 1-15.
- Jakubek, D., Guillaume, C., Binet, M., Leblon, G., Dubow, M. and Brun, M.L., 2013, Susceptibility of *Legionella* strains to the chlorinated biocide, monochloramine, *Microbes and environment*, 28(3), 336-345.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., Keevil, C.W. and Wait, R., 1999, Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments, *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 822-827.
- Jayaraman, A. and Wood, T.K., 2008, Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease, *Annual review of biomedical engineering*, 10, 145-146.
- Jeong, H.H., Jeong, S.G., Park, A., Jang, S.C., Hong, S.G. and Lee, C.S., 2014, Effect of temperature on biofilm formation by Antarctic marine bacteria in a microfluidic device, *Analytical biochemistry*, 446, 90-95.
- Jeyachandran, Y.L., Narayandss, S.K. and Chen, W.C., 2006, A study on bacterial attachment on titanium and hydroxyapatite based films, *Surface and coatings technology*, 201, 3462-3474.
- Ji, W.T., Hsu, B.M., Chang, T.Y.,¹ Hsu, T.K., Koa, P.M., Huang, K.H., Tsai, S.F., Huang, Y.L. and Fan, C.W., 2014, Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and *Legionella* in different aquatic environments, *Science of the total environment*, 499, 212-219.
- Jiang, X. and Chai, T.J., 1996, Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells, *Applied and environmental microbiology*, 62(4), 1300-1305.
- Kanematsu, H., Kougo, H., Kuroda, D., Itho, H., Ogino, Y. and Yamamoto, Y., 2012, Biofilm formation derived from ambient air and the characteristics of apparatus, *Journal of physics*, 433, 1-6.
- Kara, E. C., 2010, *Heat and mass transfer analysis of a counter flow cooling tower under various air and water flow arrangements*, Thesis (MSc), Cukurova University, Department of Mechanical Engineering.
- Karaboz, İ. and Sukatar, A., 2004, Bakterilerde sosyal davranışlar (bakterilerde iletişim

mekanizmaları), *Orlab on-line mikrobiyoloji dergisi*, 2(5) 23-32.

- Karki, K., 2011, Identification of environmental factors involved in *Legionella* development, *Master of public health*, 1-34.
- Katebian, L. and Jiang, S.C., 2013, Marine bacterial biofilm formation and its responses to periodic hyperosmotic stress on a flat sheet membrane for seawater desalination pretreatment, *Journal of membrane science*, 425, 182-189.
- Katsikogianni, M. and Missirlis, Y.F., 2004, Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteri-material interactions, *European cells and materials*, 8, 37-57.
- Kawarai, T., Furukawa, S., Narisawa, N., Hagiwara, C., Ogihara, H. and Yamasaki, M., 2009, Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media, *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(6), 630-635.
- Keevil, C.W., 2003, Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy, *Water science and technology*, 47(5), 105-116.
- Khamisse, E., Firmesse, O., Christieans, S., Chassaing, D. and Carpentier, B., 2012, Impact of cleaning and disinfection on the non-culturable and culturable bacterial loads of food-contact surfaces at a beef processing plant, *International journal of food microbiology*, 158, 163-168.
- Kierek-Pearson, K. and Karatan, E., 2005, Stages of Biofilm Development, Biofilm Development in Bacteria, *Advances in applied microbiology*, 81-98.
- Kim, J., Park, H.D. and Chung, S., 2012, Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation, *Molecules*, 17, 9818-9834.
- Kim, J., Pitts, B., Stewart, P.S., Camper, A. and Yoon, J., 2008, Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm, *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 52(4), 1446-1453.
- Kim, J.K. and Smith, R., 2001, Cooling water system design, *Chemical engineering science*, 56, 3641-3658.
- Kives, J., Orgaz, B. and Sanjos, C., 2006, Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52, *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, 50, 104-108.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B.A. and Marshall, K.C., 1983, Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces, *Applied and environmental microbiology*, 46(5), 978-998.
- Klancnik, A., Guzej, B., Jamnik, P., Vuckovic, D., Abram, M. and Mozina, S.S., 2009, Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation, *Research in microbiology*, 160, 345-352.

- Knudson, G.B., 1985, Photoreactivation of UV-irradiated *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species, *Applied and environmental microbiology*, 49(4), 975-980.
- Kociolek, M.G., 2009, Quorum-sensing inhibitors and biofilm, *Anti-infective agents in medicinal chemistry*, 8, 315-326.
- Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khobade, A.N. and Mahadik, K.R., 2009, Biofilms: 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, Department of Applied Chemistry and Microbiology.
- Konishi, T., Yamashiro, T., Koide, M. and Nishizono, A., 2006, Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator, *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(6), 478-484.
- Kool, J.L., Carpenter, J.J. and Fields, B.S., 1999, Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease, *Lancet*, 353, 272-277.
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.J. and Giaouris, E., 2012, Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions, *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2586-2595.
- Kuczynska-Wisnik, D., Matuszewska, E. and Laskowska, E., 2010, Escherichia coli heat-shock proteins IbpA and IbpB affect biofilm formation by influencing the level of extracellular indole, *Microbiology*, 156, 148-157.
- Kunst, F. and Rapoport, G., 1995, Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*, *Journal of bacteriology*, 177(9), 2403-2407.
- Kusnetsov, J.M., Tulkki, A.I., Ahonen, H.E. and Martikainen, P.J., 1997, Efficiency of three prevention strategies against *Legionella* in cooling water systems, *Journal of applied microbiology*, 82, 763-768.
- Lakretz, A., Ronb, E.Z. and Mamane, H., 2011, Biofilm control in water by a UV-based advanced oxidation process, *Biofouling*, 27(3), 295-307.
- Lapaglia, C. and Hartzell, P.L., 1997, Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*, *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3158-3163.
- Lau, H.Y. and Ashbolt, N.J., 2009, The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water, *Journal of applied microbiology*, 107, 368-378.
- Lawrence, J.R., Swerhome, D.W., Leppard, G.G., Araki, T., Zhang, X., West, M.M. and Hitchcock, A.P., 2003, Scanning transmission X-ray, Laser scanning, and transmission

- electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms, *Applied and environmental microbiology*, 69, 5543-5554.
- Le-Clech, P., Marselina, Y., Ye, Y., Stuetz, R.M. and Chen, V., 2007, Visualisation of polysaccharide fouling on microporous membrane using different characterization techniques, *Journal of membrane science*, 290, 36-45.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O. and Beloin, C., 2013, From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections, *Pathogens*, 2(2), 288-356.
- Lecuyer, S., Rusconi, R., Shen, Y., Forsyth, A., Vlamakis, H., Kolter, R. and Stone, H.A., 2011, Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biophysical journal*, 100, 341-350.
- Lee, J., Page, R., Garcia-Contreras, R., Palermino, J. M., Zhang, X. S., Doshi, O., Wood, T. K. and Peti, W., 2007, Structure and function of the *Escherichia coli* protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance, *Journal of molecular biology*, 373, 11-26.
- Lee, J.L. and Levin, R.E., 2006, Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction, *Journal of microbiological methods*, 67(3), 456-462.
- Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S. and Rice, S.A., 2013, Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm, *International society for microbial ecology*, 1-14.
- Lee, S. and Elimelech, M., 2007, Salt cleaning of organic-fouled reverse osmosis membranes, *Water research*, 41, 1134-1142.
- Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Keinänen, M.M., Kekki, T.K., Laine, O., Hirvonen, A., Vartiainen, T. and Martikainen, P.J., 2004, Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes, *Water research*, 38, 3769-3779.
- Lemos, J.A. and Burna, R.A., 2008, A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*, *Microbiology*, 154, 3247-3255.
- Levesque, S., Plante, P.L., Mendis, N., Cantin, P., Marchand, G., Charest, H., Raymond, F., Huot, C., Goupil-Sormany, I., Desbiens, F., Faucher, S.P., Corbeil, J., and Tremblay, C., 2014, Genomic characterization of a large outbreak of *Legionella pneumophila serogroup 1* strains in Quebec city, 2012, *Plos one*, 9(8), 1-10.
- Lewandowski, Z., 2005, Editorial: advances and challenges in biofilm research, *Water science and technology*, 52(7), 5-13.
- Li, H. and Bashir, R., 2002, Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes, *Sensors and actuators b*, 86, 215-221.

- Li, L., Qin, T., Li, Y., Zhou, H., Song, H., Ren, H., Li, L., Li, Y. and Zhao, D., 2015, Prevalence and molecular characteristics of waterborne pathogen *Legionella* in industrial cooling tower environments, *International journal of environmental research and public health*, 12, 12605-12617.
- Liaqat, I. and Sabri, A.N., 2008, Effect of biocides on biofilm bacteria from dental unit water lines, *Current microbiology*, 56, 619-624.
- Liguori, G., Onofrio, V.D., Gallè, F. Liguori, R., Nastrob, R.A. and Marco Guida, 2014, Occurrence of *Legionella* spp. in thermal environments: Virulence factors and biofilm formation in isolates from a spa, *Microchemical journal*, 112, 109-112.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T. and Lee, C.Y., 2004, Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*, *Journal of bacteriology*, 186(3), 722-729.
- Lindsay, D. and Holy, A.V., 2006, Bacterial biofilm within clinical setting: what healthcare professionals should know, *Journal of hospital infections*, 64, 313-325.
- Liu, Y., Li, J., Qiu, X.F. and Burda, C., 2007, Bactericidal activity of nitrogen-doped metal oxide nanocatalysts and the influence of bacterial extracellular polymeric substances (EPS), *Journal of photochemistry photobiology a chemistry*, 190, 94-100.
- Liu, Y., Zhang, W., Sileika, T., Warta, R., Cianciotto, N.P. and Packman, A.I., 2011, Disinfection of bacterial biofilms in pilotscale cooling tower systems, *Biofouling*, 27, 393-402.
- Liu, Y., Zhang, W., Sileikaa, T., Wartaa, R., Cianciottob, N.P. and Packmana A., 2009, Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems, *Biofouling*, 25(3), 241-253.
- Liu, Y.G., Zhou, M., Zeng, G.M., Wang, X., Li, X., Fan, T. and Xu, W.H., 2008, Bioleaching of heavy metals from mine tailings by indigenous sulfur-oxidizing bacteria: effects of substrate concentration, *Bioresource technology*, 99, 4124-4129.
- Liu, Z., Lin, Y.E., Stout, J.E., Hwang, C.C., Vidic, R.D. and 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.
- Loozen, G., Boon, N., Pauwels, M., Quirynen, M. and Teughels, W., 2011, Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies, *Molecular oral microbiology*, 26, 253-261.
- Lopez, D., Vlamakis, H. and Kolter, R., 2010, Biofilms, *Cold spring harbour Perspect biology*, 2, 1-11.
- Ludensky, M., 2003, Control and monitoring of biofilms in industrial applications, *International biodeterioration and biodegradation*, 51, 255-263.

- Ludensky, M., 2005, *Microbiological control in cooling water systems*, Directory of microbicides for the protection of materials, In: Paulus, W. (ed), Chapter 5, Springer, Netherlands, 121-139.
- Luo, J., Chen, Z. and Sun, Y., 2006, Controlling biofilm formation with an N halamine-based polymeric additive, *Journal of biomedical materials research part A*, Doi: 10.1002/jbm.a, 823-831.
- Luppens, S.B., Reij, M.W., Heijden, R.W., Rombouts, F.M. and Abee, T., 2002, Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants, *Applied and environmental microbiology*, 68, 4194-4200.
- Ma'ayeh, S.Y., Al-Hiyasat, A.S., Hindiye, M.Y. and Khader, Y.S., 2008, *Legionella pneumophila* contamination of a dental unit water line system in a dental teaching centre, *International journal of dental hygiene*, 6, 48-55.
- MacDonald, R., Santa, M. and Brözel, V.S., 2000, The response of a bacterial biofilm community in a simulated industrial cooling water system to treatment with an anionic dispersant, *Journal of applied microbiology*, 89, 225-235.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M., 2010, *Mikrobiyal üreme*, Brock mikroorganizmaların biyolojisi, In: Çökmüş, C. (ed), Chapter 6, Palme, Ankara, 135-165.
- Madsen, J.S., Burmolle, M., Hansen, L.H. and Sørensen, S.J., 2012, The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer, *FEMS immunology and medical microbiology*, 65, 183-195.
- Mah, T.C. and O'toole, G.A., 2001, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
- Mansi, A., Amori, I., Marchesi, I., Proietto, A.R., Marcelloni, A.M., Ferranti, G., Magini, V., Valeriani, F. and Borella, P., 2014, *Legionella spp.* survival after different disinfection procedures: comparison between conventional culture, qPCR and EMA-qPCR, *Microchemical journal*, 112, 65-69.
- Marchesi, I., Ferranti, G., Bargellini, A., Marchegiano, P., Predieri, G., Stout, J. E. and Borella, P., 2013, Monochloramine and chlorine dioxide for controlling *Legionella pneumophila* contamination: biocide levels and disinfection by-products formation in hospital water networks, *Journal of water and health in press*, Doi:10.2166/wh.2013.079.
- Marshall, K.C., 1976, *Interfaces in microbial ecology*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Martinez, L.R. and Casadevall, A., 2007, *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light, *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4592-4601.
- Martiny, A.C., Jorgensen, T.M., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. and Molin, S., 2003, Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system, *Applied and environmental microbiology*, 69(11), 6899-6907.

- McAuliffe, L., Ellis, R.J., Miles, K., Ayling, R.D. and Nicholas, R.A.J., 2006, Biofilm formation by *Mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival, *Microbiology*, 152, 913-922.
- Means, E.G., Hanami, L., Ridgway, H.F. and Olson, B. H. 1981, Evaluating mediums and plating techniques for enumerating bacteria in water distribution systems, *American water works association*, 53, 585-590.
- Megharaj, M., Avudainayagam, S. and Naidu, R., 2002, Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste, *Current microbiology*, 47, 51-54.
- Melada, S. and Coniglio, M.A., 2015, Monochloramine for remediation of *Legionella* only in domestic hot water systems: an iron fist in a velvet glove, *Open journal of preventive medicine*, 5, 143-150.
- Melo, L.F., 2003, *Biofilm formation and its role in fixed film processes*, The handbook of water and wastewater microbiology, In: Mara, D. and Horn, N. J. (eds), Chapter 20, Academic press, London, 337-349.
- Messi, P., Anacarso, I., Bargellini, A., Bondi, M., Marchesi, I., Niederhausern, S. and Borella, P., 2011, Ecological behaviour of three serogroups of *Legionella pneumophila* within a model plumbing system, *Biofouling*, 27(2), 165-172.
- Minami, J., Yoshida, K., Soejima, T., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K., 2010, New approach to use ethidium bromide monoazide as an analytical, *Journal of applied microbiology*, 109, 900-909.
- Mitchell, A.C., Phillips, A.J., Hamilton, M.A., Gerlach, R., Hollis, W.K., Kaszuba, J. P. and Cunningham, A.B., 2008, Resilience of planktonic and biofilm cultures to supercritical CO₂, *The journal of supercritical fluids*, 47, 318-325.
- Molhoek, E.M., Dijk, A.V., Veldhuizen, E.J.A., Haagsmanb, H.P. and Bikker, F.J., 2011, A cathelicidin-2-derived peptide effectively impairs *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *International journal of antimicrobial agents*, 37, 476-479.
- Momba, M.N.B., Ndaliso, S. and Binda, M.A., 2003, Effect of Combined Chlorine-Monochloramine Process on the Inhibition of Biofilm Regrowth in Potable Water Systems, *Water science and technology: water supply*, 3, 215-221.
- Moore, M.R., Pryor, M., Fields, B., Lucas, C., Phelan, M. and Besser, R.E., 2006, Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp., *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 378-383.
- 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.
- Mouchtouri, V.A., Goutziana, G., Kremastinou, J. and Hadjichristodoulou, C., 2010, *Legionella* species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures, *American journal of infection control*, 38(1), 50-55.

- Mukhopadhyay, A., He, Z., Alm, E.J., Arkin, A.P., Baidoo, E.E., Borglin, S.C., Chen, W., Hazen, T.C., He, Q., Holman, H.Y., Huang, K., Huang, R., Joyner, D.C., Katz, N., Keller, M., Oeller, P., Redding, A., Sun, J., Wall, J., Wei, J., Yang, Z., Yen, H.C., Zhou, J. and Keasling, J.D., 2006, Salt stress in *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough: an integrated genomics approach, *Journal of bacteriology*, 118(11), 4068-4078.
- Munna, S., Tahera, J., Afrad, M.H., Nur, I.T. and Noor, R. 2015, Survival of *Bacillus* spp. SUBB01 at high temperatures and a preliminary assessment of its ability to protect heat-stressed *Escherichia coli* cells, *BMC research notes*, 8(637), 1-9.
- Murga, R., Miller, J.M. and 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.
- Murthy, P.S., Venkatesan, R., Nair, K.V.K. and Ravindran, M., 2004, Biofilm control for plate heat exchangers using surface seawater from the open ocean for the OTEC power plant, *International biodeterioration and biodegradation*, 53, 133-140.
- Naam, A., Petersen F.C. and Scheie A.A., 2008, Biofilm formation and autoinducer-2 signaling in *Streptococcus intermedius*: role of thermal and pH factors, *Oral microbiology and immunology*, 23, 492-497.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B. and Foster, K.R., 2009, The sociobiology of biofilms, *FEMS microbiology reviews*, 33, 206-224.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S.A. and Foster, K.R., 2008, The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms, *Plos biology*, 6(1), 171-179.
- Nair, S., Derre, I., Msadek, T., Gaillot, O. and Berche, P., 2000, CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*, *Molecular microbiology*, 35(4), 800-811.
- Neilands, J., 2007, Acid tolerans of *Streptococcus mutans* biofilms, *Journal of Malmo University*, 11-76.
- Netuschil, L., Auschill, T.M., Sculean, A. and Arweiler, N.B., 2014, Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms - which stain is suitable?, *BMC oral health*, 14, 2.
- Nguyen, T. Roddick, F.A. and Fan, J., 2012, Biofouling of water treatment membranes: a review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures, *Membranes*, 2, 804-840.
- Nguyen, T.M.N., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J. and Desenclos, J. C., 2006, A community wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers - how far can contaminated aerosols spread?, *Journal of infectious disease*, 193, 102-111.
- Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Sabzevari, Z. and Zareh, O., 2009, Microbial quality of water in dental unit waterlines, *Journal of researsch medical science*, 14(5), 297-300.

- Noor, R., Islam, Z., Munshi, S.H. and Rahman, F., 2013, Influence of temperature on *Escherichia coli* growth in different culture media, *Journal of pure applied microbiology*, 7, 899-904.
- Nostro, A., Cellini, L., Giulio, M.D., Darrigo, M., Marino, A., Blanco, A.R., Favalaro, A., Cutroneo, G. and Bisignano, G., 2012, Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm Formation, *Acta pathologica, microbiologica and immunologica Scandinavica*, 120, 733-742.
- Nostro, A., Marino, A., Blanco, A.R., Cellini, L., Di Giulio, M., Pizzimenti, F., Roccaro, A.S. and Bisignano, G., 2009, In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact, *Journal of medical microbiology*, 58, 791-797.
- Nygard, K., Werner-Johansen, O., Ronsen, S., Caugant, D.A., Simonsen, O., Kanestrom, A., Ask, E., Ringstad, J., Odegard, R., Jensen, T., Krogh, T., Hoiby, E.A., Ragnhildstveit, E., Aaberge, I.S. and Aavitsland, P., 2008, An outbreak of Legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway, *Clinical infectious disease*, 46, 61-69.
- Nyström, T., 2001, Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and dead, *Archives of microbiology*, 176, 159-164.
- O'toole, G.A., Kaplan, H. and Kolter, R., 2000, Biofilm formation as microbial development, *Annual reviews of microbiology*, 54, 49-79.
- Ochoa, J.C., Coufort, C., Escudie, R., Line, A. and Paul, E., 2007, Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms, *Chemical engineering science*, 62, 3672-3684.
- Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H. and Watanabe, Y., 1999, Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms, *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 5107-5116.
- Oliveira, N.E.M., Abranches, J., Gaca, A.O., Laport, M.S., Damaso, C.R., Bastos, M.C.F., Lemos, J.A. and Giambiagi-deMarval, M., 2011, clpB, a class III heat-shock gene regulated by CtsR, is involved in thermotolerance and virulence of *Enterococcus faecalis*, *Microbiology*, 157, 656-665.
- Oliver, J. D., Dagher, M. and Linden, K., 2005, Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater, *Journal of water and health*, 3(3), 249-257.
- Oliver, J.D., 1999, The viable but nonculturable state and cellular resuscitation, to grow or not to grow: nonculturability revisited, microbial biosystems: new frontiers *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1-8.
- Oliver, J.D., 2005, The viable but nonculturable state in bacteria, *Journal of microbiology*, 43, 93-100.

- Oliver, J.D., 2010, Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria, *FEMS microbiology reviews*, 34, 415-425.
- Olsen, R.A., 2015, Biofilm challenges in the offshore industry, <http://www.umb.no/statisk/konferanser/raolsenumbof251109.pdf>, [Ziyaret tarihi: 15 Aralık 2015].
- Olson, G.J., Brierley, J.A. and Brierley, C. L., 2003, Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries, *Applied and environmental microbiology*, 63, 249-257.
- Ortega, J.M.P., González, M.S. and Gutiérrez A.J., 2010, Optimization model for re-circulating cooling water systems, *Computers and chemical engineering*, 34, 177-195.
- Osaka, I. and Hefty, P.S., 2013, Simple resazurin-based microplate assay for measuring Chlamydia infections, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2838-2840.
- Otter, J.A., Vickery, K., Walker, J.T., Pulcini, E.L., Stoodley, P., Goldenberg, S.D., Salkeld, J.A.G., Chewins, J., Yezli, S. and Edgeworth, J.D., 2015, Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection, *Journal of hospital infection*, 89, 16-27.
- Özçakir, O., 2007, Bakterilerin canlı ama kültürde üretilmeyen formları, *Mikrobiyoloji bülteni*, 41, 477-484.
- Pal, A. and Paul, K., 2008, Microbial extracellular polymeric substance: central elements in heavy metal bioremediation, *Indian journal of microbiology*, 48, 49-64.
- Palmer, J., Flint, S. and Brooks, J., 2007, Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 34, 577-588.
- Pan, Y., Breidt, F. and Gorski, L., 2010, Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains, *Applied and environmental microbiology*, 76(5), 1433-1441.
- Paraje, M.G., 2011, *Antimicrobial resistance in biofilms*, Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, In: Mendez-Vilas, A. (ed), Formatex research center, 736-744.
- Parsek, M.R., Singh, P.K., 2003, Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis, *Annual review of microbiology*, 57, 677-701.
- Pasmore, M., Todd, P., Pfiefer, B., Rhodes, M. and Bowman, C.N., 2002, Effect of polymer surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development, *Biofouling*, 18(1), 65-71.
- Patil, S.A., Harnischa, F., Kapadnisb, B. and Schroder, U., 2010, Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of temperature for biofilm formation and performance, *Biosensors and bioelectronics*, 26, 803-808.

- Pecastaings, S., Berge, M., Dubourg, K.M. and Roques, C., 2010, Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms, *Biofouling*, 26(7), 809-819.
- Peeters, E., Nelis, H.J. and Coenye, T., 2008, Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates, *Journal of microbiological methods*, 72, 157-165.
- Perez, L.M., Alvarez, B.L., Codony, F., Fittipaldi, M., Adrados, B., Penuela, G. and Morato, J., 2010, A new microtitre plate screening method for evaluating the viability of aerobic respiring bacteria in high surface biofilms, *Letters in applied microbiology*, 51, 331-337.
- Peterson, C.N., Mandel, M.J. and Silhavy, T.J., 2005, *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly, *Journal of bacteriology*, 187(22), 7549-7553.
- Pettit, R.K., Weber, C.A. and Pettit G.R., 2009, Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 8(28), 1-7.
- Petzold, M., Thurmer, A., Menzel, S., Mouton, J.W., Heuner, K. and Luck, C., 2013, A structural comparison of lipopolysaccharide biosynthesis loci of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains, *BMC microbiology*, 198(13), 1-11.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F. and Alige, S., 2000, Acid responses of *Listeria monocytogenes*, *International journal of food microbiology*, 55, 121-126.
- Piao, Z., Sze, C.C., Barysheva, O., Lida, K. and Yoshida, S., 2006, Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*, *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1613-1622.
- Pinto, D., Almeida, V., Santos, M.A. and Chambel, L., 2011, Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli, *Journal of applied microbiology*, 110, 1601-1611.
- Potfis, M., 1994, Desiccation tolerance of prokaryotes, *Microbiological reviews*, 58(4), 755-805.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C.A., Nakano, V., Avila-Campos, M.J., Piazza R.M.F. and Wexler, H.M., 2007, Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*, *Microbial pathogenesis*, 43, 78-87.
- Pyle, B.H., Broadway, S.C. and McFeters, G.A., 1995, Factors affecting the determination of respiratory activity on the basis of cyanoditolyl tetrazolium chloride reduction with membrane filtration, *Applied and environmental microbiology*, 61, 4304-4309.
- Qin, T., Tian, Z., Ren, H., Hu, G., Zhou, H., Lu, J., Luo, C., Liu, Z. and Shao, Z., 2012, Application of EMA-qPCR as a complementary tool for the detection and monitoring of *Legionella* in different water systems, *World journal of microbiology and Biotechnology*, 28, 1881-1890.

- Qurashi, A.W., Sabri, A.N., 2012, Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress, *Brazilian journal of microbiology*, 1183-1191.
- Rajagopal, S., Jenner, H.A., Venugopalan, V.P. and Khalanski, M., 2012, *Biofouling Control: Alternatives to Chlorine*, Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems, In: Rajagopal, S., Jenner, H.A. and Venugopalan, V. P. (eds), Chapter 10, Springer, London, 227-271.
- Ramage, G., Robertson, S.N. and Williams, C. 2014, Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms, *International journal of antimicrobial agents*, 43, 114-20.
- Rampersad, S.N., 2012, Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors*, 12, 12347-12360.
- Ran, S.J., Jiang, W., Zhu, C.L. and Liang, J.P., 2015, Exploration of the mechanisms of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in glucose starvation environments, *Australian dental journal*, 60, 143-153.
- Randler, C., Matthes, R., McBain, A.J., Giese, B, Fraunholz, M., Sietmann, R., Kohlmann, T., Hübner, N.O. and Kramer, A., 2010, A three-phase in-vitro system for studying *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses, *BMC microbiology*, 10, 282.
- Rao, T.S., Nancharaiah, Y.V. and Nair, K.V.K., 1998, Biosidal efficacy of monochloramine against biofilm bacteria, *Biofouling*, 12(4), 321-332.
- Reasoner, D.J., 1990, Monitoring heterotrophic bacteria in potable water, *Drinking water microbiology*, 5, 452-477.
- Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E., 1979, A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology 79th Meeting*, 7.
- Reischl, U., Alberdi, M.B., Hoffmann, M. and Bolweinn M., 2006, Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples, assay transfer to the lightcycler 480 real-time PCR system, *Biochemica*, 4, 13-15.
- Rodriguez-Martinez, J.M. and Pascual, A., 2006, Antimicrobial resistance in bacterial biofilms, *Reviews of medical microbiology*, 17, 65-75.
- Rodriguez, G.G., Philps, D., Ishiguro, K. and Ridgway, H.F., 1992, Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria, *Applied and enviromental microbiology*, 58, 1801-1808.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M. and Holck, A.L., 2005, Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples, *Applied and environmental microbiology*, 71, 1018-1024.
- Rueckert, A. and Morgan, H.W., 2007, Removal of contaminating DNA from polymerase chain

- reaction using ethidium monoazide, *Journal of microbiological methods*, 68, 596-600.
- Russell, N.J., Evans, R.I., Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. and Abee, T., 1995, Membranes as a target for stress adaptation, *International journal of food microbiology*, 28, 255-261.
- Rühs, P.A., Böni, L., Fuller, G.G., Inglis, R.F. and Fischer, P., 2013, In-Situ Quantification of the interfacial rheological response of bacterial biofilms to environmental stimuli, *Plos one*, 8(11), 1-9.
- Ryu, J.H. and Beuchat, L.R., 2005, Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine, *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 247-254.
- Saby, S., Sibille, I., Mathieu, L., Paquin, J.L. and Block, J.C., 1997, Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole), *Applied and environmental microbiology*, 63(4), 1564-1569.
- Sanli-Yürüdü, N.Ö. and Kimiran-Erdem, A., 2015, *Evaluation of the antimicrobial activity of colloidal silver-hydrogen peroxide against model cooling tower biofilm*, The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs, In: Méndez-Vilas A. (ed), Chapter 3.6, Formatex Research Center, Badajoz, 526-533.
- Sardessai, Y.N., 2005, Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health, *Current science*, 89(10), 1650.
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M.J., Stephan, R. and Tasara, T., 2009, Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions, *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1621-1627.
- Schoen, M.E. and Ashbolt, N.J., 2011, An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events, *Water research*, 45, 5826-5836.
- Schumann, W., Hecker, M., and Msadek, T., 2002, *Regulation and function of heat-inducible genes in Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R.M. (eds), Chapter 25, American society for microbiology press, Washington D.C., 359-368.
- Schwartz, T., Hoffmann, S. and Obst, U., 2003, Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and U.V. disinfection in a public drinking water distribution system, *Journal of applied microbiology*, 95, 591-601.
- Sekar, R., Deines, P., Machell, J., Osborn, A.M., Biggs, C.A. and Boxall, J.B., 2012, Bacterial water quality and network hydraulic characteristics: a field study of a small, looped water distribution system using culture-independent molecular methods, *Journal of applied microbiology*, 112, 1220-1234.
- Serra, D.O. and Hengge, R., 2014, Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms, *Environmental microbiology*, 16(6), 1455-1471.

- Seufferheld, M.J., Alvarez, H.M. and Farias, M.E., 2008, Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments, *Applied and environmental microbiology*, 74, 5867-5874.
- Shakeri, S., Kermanshahi, R.K., Moghaddam, M.M. and Emtiazi, G., 2007, Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test, *Biofouling*, 23, 79-86.
- Sharma, M., Ryu, J.H. and Beuchat, L.R., 2005, Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage, *Journal of applied microbiology*, 99, 449-459.
- Shen, Y., Monroy, G.L., Derlon, N., Janjaroen, D., Huang, C., Morgenroth, E., Boppart, S.A., Ashbolt, N.J., Liu, W.T. and. Nguyen, T.H., 2015, Role of biofilm roughness and hydrodynamic conditions in *Legionella pneumophila* adhesion to and detachment from simulated drinking water biofilms, *Environmental science and technology*, 49, 4274-4282.
- Shen, Y., Stojicic, S. and Haapasalo, M., 2010, Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture, *Basic research-biology*, 36(11), 1820-1823.
- Sheng, G.P. and Yu, H.Q., 2006, Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy, *Water research*, 40, 1233-1239.
- Shi, H., Xu, W., Luo, Y., Chen, L., Liang, Z., Zhou, X. and Huang, K., 2011, The effect of various environmental factors on the ethidium monazite and quantitative PCR method to detect viable bacteria, *Journal of applied microbiology*, 111, 1194-1204.
- Shimizu, K., 2014, Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses, *Metabolites*, 4, 1-35.
- Simoës, M., Preira, M.O. and De Nys, R., 2007, The role of hydrodynamic stress on the phenotypic characteristics of single and binary biofilms of *Pseudomonas fluorescens*, *Water science and technology*, 55, 437-445.
- Simoës, L.C., Simes, M. and Vieira, M.J., 2010, influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection, *Applied and environmental microbiology*, 76(19), 6673-6679.
- Simoës, M., Simoes, L.C. and Vieira, M.J., 2009, Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments, *Water research*, 43, 229-237.
- Simoës, M., Simoes, L.C. and Vieira, M.J., 2010, A review of current and emergent biofilm control strategies, *Food science and technology*, 43, 573-583.
- Singh, R., Stine, O.C., Smith, D.L., Spitznagel, J.K., Labib, M.E. and Williams, H. N., 2003, Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems, *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3412-3420.

- Singh, V.K., Syring, M., Singh, A., Singhal, K., Dalecki, A. and Johansson, T., 2012, An insight into the significance of the DnaK heat shock system in *Staphylococcus aureus*, *International journal of medical microbiology*, 302, 242-252.
- Sommer, P., Martin-Rouas, C. and Mettler, E., 1999, Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination, *Food microbiology*, 16, 503-515.
- Söderberg, M.A., Rossier, O. and Cianciotto, N.P., 2004, The type ii protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures, *Journal of bacteriology*, 186(12), 3712-3720.
- Spring, T., Tiaden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J.A. and Hilbi, H., 2008, The *Legionella* autoinducer synthase lqsA produces an α -hydroxyketone signaling molecule, *The journal of biological chemistry*, 283(26), 18113-18123.
- Splendiani, A., Livingston, A.G. and Nicolella, C., 2006, Control of membrane-attached biofilms using surfactants, *Wiley periodicals*, 15-23.
- Stahlhut, S.G., Struve, C., Krogfelt, K.A. and Reisner, A., 2012, Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae, *FEMS Immunology and medical microbiology*, 65, 350-359.
- States, S.J., Conley, L.F., Towner, S.G., Wolford, R.S., Stephenson, T.E., Mcnamara, A.M., Wadowsky, R.M. and Yee, R.B., 1987, An alkaline approach to treating cooling towers for control of *Legionella pneumophila*, *Applied and environmental microbiology*, 53(8), 1775-1779.
- Steinert, M., Hentschel, U. and Hacker, J., 2002, *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray, *FEMS Microbiology reviews*, 26 (2), 149-162.
- Stoodley, L.H. and Stoodley, P., 2004, Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens, *Trends in microbiology*, 2-4.
- Stoodley, P. and Dirckx, P., 2003, Biofilm formation in 3 steps, <http://www.biofilm.montana.edu/resources/images/multicellularextracellular/biofilm-formation-3-steps.html>, [Ziyaret Tarihi: 14 Nisan 2016].
- Storey M.V., Ashbolt, N.J. and Stenström, T.A., 2004, Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila* - a quantitative risk assessment for distributed water, *Water science and technology*, 50(1), 77-82.
- 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.
- Sutherland, I.W., 2001, The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment, *Trends microbiology*, 9, 222-227.
- Suzuki, I., 2001, Microbial leaching of metals from sulfide minerals, *Biotechnology advances*,

19, 119-132.

- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W. and Schleifer, K.H., 2000, Microbiological safety of drinking water, *Annual review microbiology*, 54, 81-127.
- Szomolay B., Klapper I., Dockery, J. and Stewart, P.S., 2005, Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms, *Environmental microbiology*, 7(8), 1186-1191.
- Szymanska, J., 2003, Biofilm and dental unit waterlines, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 10, 151-157.
- Şanlı-Yürüdü, N.Ö., 2009, *Soğutma kulesi su sisteminde biyofilm tabakasına karşı biyosit etkinliğinin incelenmesi*, Thesis (PhD), İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tanji, Y., Nishihara, T. and Miyanaga, K., 2007, Monitoring of biofilm in cooling water system by measuring lactic acid consumption rate, *Biochemical engineering journal*, 35, 81-86.
- Taormina, P.J. and Beuchat, L.R., 2001, Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine, *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2555-2563.
- Taylor, M., Ross, K. Bentham, R., 2009, *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems, *Microbial ecology*, 58, 538-547.
- Temmerman, R., Vervaeren, H., Nosedá, B., Boon, N. and Verstraete, W., 2006, Necrotrophic Growth of *Legionella pneumophila*, *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 4323-4328.
- Thieringer, H.A., Jones, P.G. and Inouye, M., 1998, Cold shock and adaptation, *Bioassays*, 20, 49-57.
- Timoner, X., Acun, V., Schiller, D.V. and Sabater, S., 2012, Functional responses of stream biofilms to flow cessation, desiccation and rewetting, *Freshwater biology*, 57, 1565-1578.
- Tribelli, P.M. and Lopez, N.I., 2011, Poly (3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions, *Extremophiles*, 15, 541-547.
- Troussellier, M., Bonnefont, J. L., Courties, C., Derrien, A., Dupray, E., Gauthier, M., Gourmelon, M. and Joux, F., 1998, Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater, *Oceanologica acta*, 21, 965-981.
- Tsuneda, S., Jung, J., Hayashi, H., Aikawa, H., Hgrata, A. and 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.
- Türetgen, I., 2004, Comparison of free residual chlorine and monochloramine for efficacy against biofilms in model and full scale cooling towers, *Biofouling*, 20, 81-85.
- Türetgen, I., 2008, Induction of viable but nonculturable (VBNC) state and the effect of

multiple subculturing on the survival of *Legionella pneumophila* strains in the presence of monochloramine, *Annals of microbiology*, 58, 153-156.

- Urmersbach, S., Aho, T., Alter, T., Hassan, S.S., Autio, R. and Huehn, S., 2015, Changes in global gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* induced by cold- and heat-stress, *BMC microbiology*, 15(229), 1-13.
- Vatansever, C., 2011, Mikrobiyal biyofilm tabakası üzerine farklı fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesi, Thesis (MSc), İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Venugopalan, V.P., Rajagopal, S. and Jenner, H.A., 2012, *Operational and environmental issues relating to industrial cooling water systems: an overview*, Operational and environmental consequences of large industrial cooling water systems, In: Rajagopal, S., Jenner, H.A. and Venugopalan, V.P. (eds), Chapter 1, Springer, London, 1-12.
- Verhagen, P., De Gelder, L., Hoefman, S., De Vos, P. and Boon, N., 2011, Planktonic versus biofilm catabolic communities: importance of the biofilm for species selection and pesticide degradation, *Applied and environmental microbiology*, 77(14), 4728-4735.
- Viscoglios, P.D., Solinac, L. and Delattre, J.M., 2009, Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples, *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3502-3512.
- Völker, U., Mach, H., ShmiD, R. and Hecker, M., 1992, Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*, *Journal of general microbiology*, 138, 2125-2135.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J. and Ivanova, E.P., 2009, Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, *Molecules*, 14, 2535-2554.
- Wahman, D.G., Wulfeck-Kleier, K.A. and Pressman, J.G., 2009, Monochloramine disinfection kinetics of *Nitrosomonas europaea* by propidium monoazide quantitative PCR and Live/Dead BacLight methods, *Applied and environmental microbiology*, 75(17), 5555-5562.
- Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Bennett, A.M., Fulford, M.R., Martin, M.V. and Marsh, P.D., 2000, Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice, *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3363-3367.
- Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Fulford, M.R. and Marsh, P.D., 2003, Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system, *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3327-3332.
- Walser, S.M., Gerstner, D.G., Brenner, B., Höller, C., Liebl, B. and Herr, C.E.W., 2014, Assessing the environmental health relevance of cooling towers - A systematic review of Legionellosis outbreaks, *International journal of hygiene and environmental health*, 217, 145-154.

- Wang, H., Edwards, M., Falkinham, J.O. and Pruden, A., 2012, Molecular survey of the occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water distribution systems, *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6285-6294.
- Wang, J., Liu, M., Xiao, H., Wu, W., Xie, M., Sun, M., Zhu, C. and Li, P., 2013, Bacterial community structure in cooling water and biofilm in an industrial recirculating cooling water system, *Water science and technology*, 68(4), 940-947.
- Wang, L., Li, Y. and Mustapha, A., 2009, Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR, *Journal of applied microbiology*, 107, 1719-1728.
- Weber, M.M., French, C.L., Barnes, M.B., Siegele, D.A. and McLean, R.J.C., 2010, A previously uncharacterized gene, *yjfO* (*bsmA*), influences *Escherichia coli* biofilm formation and stress response, *Microbiology*, 156, 139-147.
- Welch, K., Cai, Y. and Stromme, M., 2012, A method for quantitative determination of biofilm viability, *Journal of functional biomaterials*, 3, 418-431.
- Welin-Neilands, J. and Svensater, G., 2007, Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*, *Applied and environmental microbiology*, 73(17), 5633-5638.
- Wery, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgenes, J.P., Garrelly, L. and Godon, J.J., 2008, Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility, *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3030-3037.
- Whiley, H. and Taylor, M., 2014, *Legionella* detection by culture and qPCR: comparing apples and oranges, *Critical reviews in microbiology*, 42(1), 65-74.
- White-Ziegler, C.A., Um, S., Perez, N.M., Berns, A.L., Malhowski, A.J. and Young, S., 2008, Low temperature (23°C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12, *Microbiology*, 154, 148-166.
- Whitehead K.A., Smith L.A. and Joanna V., 2010, The detection of influence of food soils on microorganisms on stainless steel using scanning electron microscopy and epifluorescence microscopy, *International journal of food microbiology*, 141, 125-133.
- Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S. and Schuman, W., 2001, Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* sW regulon, *Molecular microbiology*, 41(1), 59-71.
- Wingender, J. and Flemming, H.C., 2011, Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens, *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 417-423.
- Wolf, G., Crespo, J.G. and Reis, M.A.M., 2002, Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and activity analysis in water and wastewater treatment, *Review of environmental science and biotechnology*, 1, 227-251.
- Wouters, J.A., Rombouts, F. M., De Vos, W. M., Kuipers, O.P. and Abee, T., 1999, Cold shock

- proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302, *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4436-4442.
- Wouters, J.A., Sanders, J.W., Kok, J., De Vos, W.M., Kuipers, O.P. and Abee, T. 1998, Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five csp genes of *Lactococcus lactis* MG1363, *Microbiology*, 144, 2885-2893.
- www.evapco.com, [Ziyaret Tarihi: 20 Şubat 2016].
- Xu, P., Xu, Z., Wang, J., Zhang, Y. and Zhang, L., 2012, MIC in circulating cooling water system, *Journal of water resource and protection*, 4, 203-206.
- Xue, Z., Hessler, C.M., Panmanee, W., Hassett, D.J. and Seo, Y., 2013, *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine, *FEMS microbiology ecology*, 83, 101-111.
- Xue, Z., Sendamangalam, V.R., Gruden, C.L. and Seo, Y., 2012, Multiple roles of extracellular polymeric substances on resistance of biofilm and detached clusters, *Environmental science and technology*, 46, 13212-13219.
- Yamamoto, H., Hashimoto, Y. and Ezaki, T., 1996, Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation, *FEMS microbiology and ecology*, 20(3), 149-154.
- Yamanaka, K., Fang, L. and Inouye, M., 1998, The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation, *Molecular microbiology*, 27, 247-255.
- Yano, T., Kubota, H., Hanai, J., Hitomi, J., and Tokuda, H., 2013, Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms, *Microbes and environments*, 28(1), 87-95.
- Yousef, A.E., Courtney, P.D., 2003, *Basics of stres adaptation and implications in new-generation foods*, Microbial stres adaptation and food safety, In: Yousef, A E. and Juneja, V.K. (eds), Chapter 1, CRC Pres, New York, 1-25.
- Zandri, G., Pasquaroli, S., Vignaroli, C., Talevi, S., Manso, E., Donelli, G. and Biavasco, F., 2012, Detection of viable but non-culturable Staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays, *Clinical microbiology and infection*, 18(7), 259-261.
- Zeraik, A.E. and Nitschke, M., 2012, Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces, *Brazilian archives of biology and technology*, 55(4), 569-576.
- Zhang, X. and Bishop, P.L., 2003, Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, 50, 63-69.
- Zhang, X. S., Garcia-Contreras, R. and Wood, T. K., 2007, YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity, *Journal of bacteriology*, 189, 3051-3062.

- Zhang, Y., Liu, J.Z., Huang, J.S. and Mao, Z.W., 2010, Genome shuffling of *Propionibacterium shermanii* for improving vitamin B12 production and comparative proteome analysis, *Journal of biotechnology*, 148(2–3), 139-143.
- Zhang, Z.J., Chen, S.H., Wang, S.M. and Luo, H.Y., 2011, Characterization of extracellular polymeric substances from biofilm in the process of starting-up a partial nitrification process under salt stress, *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 1563-1571.
- Zhou, L., Xia, S., Zhang, Z., Ye, B., Xu, X., Gu, Z. and Wang, X., 2014, Effects of pH, temperature and salinity on extracellular polymeric substances of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with N-(3-oxooxetanoyl)-L-homoserine lactone addition, *Journal of water sustainability*, 4(2), 91-100.
- Zhu, M., Takenaka, S., Sato, M. and Hoshino, E., 2001, Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*, *Oral microbiology and immunology*, 16, 24-27.
- Zobell, C.E., 1943, The effect of solid surfaces on bacterial activity, *Journal of bacteriology*, 46, 75-82.
- Zou, Y., Woo, J. and Ahn, J., 2012, Cellular and molecular responses of *Salmonella typhimurium* to antimicrobial-induced stresses during the planktonic-to-biofilm transition, *Letters in applied microbiology*, 55, 274-282.
- Zubair, M., Ashraf, M., Arshad, M., Raza, A., Mustafa, B. and Ahsan, A., 2014, Formation and significance of bacterial biofilms, *International journal of current microbiology and applied sciences*, 3(12), 917-923.

EKLER

EK 1. İstatistiksel Analizler.

PARAMETRELERE GÖRE BİYOFİLM-PLANKTONİK FAZ(GRUPLAR) KARŞILAŞTIRMALI SONUÇLARI

SICAKLIK - KÜLTÜR - R2A AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,220) = 22.723, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,220) = 4.857, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,220) = 18.792, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(4,220) = 8.192, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(2,220) = 2.276, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,220) = 0.486, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(4,220) = 4.485, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 1: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir).

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	4°C	2216.5972*	.030
	37°C	60.0000	.953
	65°C	4895.8472*	.000
4°C	KONTROL	-2216.5972*	.030
	37°C	-2156.5972*	.003
	65°C	2679.2500*	.000
37°C	KONTROL	-60.0000	.953
	4°C	2156.5972*	.003
	65°C	4835.8472*	.000
65°C	KONTROL	-4895.8472*	.000
	4°C	-2679.2500*	.000
	37°C	-4835.8472*	.000

Tablo 2: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	1171.0556	.251
	4. SAAT	3373.0556*	.001
	24. SAAT	2628.3333*	.010
1. SAAT	KONTROL	-1171.0556	.251
	4. SAAT	2202.0000*	.002
	24. SAAT	1457.2778*	.044
4. SAAT	KONTROL	-3373.0556*	.001
	1. SAAT	-2202.0000*	.002
	24. SAAT	-744.7222	.301
24. SAAT	KONTROL	-2628.3333*	.010
	1. SAAT	-1457.2778*	.044
	4. SAAT	744.7222	.301

SICAKLIK - KÜLTÜR - BCYE AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,220) = 4.821$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,220) = 0.221$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,220) = 7.450$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(4,220) = 0.179, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısında; ($F(2,220) = 0.162, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,220) = 0.486, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(4,220) = 0.260, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 3: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	4°C	7230.8681*	.000
	37°C	6380.6944*	.000
	65°C	9124.8472*	.000
4°C	KONTROL	-7230.8681*	.000
	37°C	-850.1736	.348
	65°C	1893.9792*	.037
37°C	KONTROL	-6380.6944*	.000
	4°C	850.1736	.348
	65°C	2744.1528*	.003
65°C	KONTROL	-9124.8472*	.000
	4°C	-1893.9792*	.037
	37°C	-2744.1528*	.003

Tablo 4: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	7440.9583*	.000
	4. SAAT	7923.5069*	.000
	24. SAAT	7371.9444*	.000
1. SAAT	KONTROL	-7440.9583*	.000
	4. SAAT	482.5486	.594
	24. SAAT	-69.0139	.939
4. SAAT	KONTROL	-7923.5069*	.000
	1. SAAT	-482.5486	.594
	24. SAAT	-551.5625	.543
24. SAAT	KONTROL	-7371.9444*	.000
	1. SAAT	69.0139	.939
	4. SAAT	551.5625	.543

SICAKLIK - CTC-DAPI BOYAMA SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,219) = 44.164$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,219) = 13.387$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,219) = 0.041$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(4,219) = 6.059, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(2,219) = 6.102, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,219) = 7.421, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(4,219) = 12.131, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 5: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	4°C	483166.1269*	.009
	37°C	-283827.1009	.122
	65°C	919335.7668*	.000
4°C	KONTROL	-483166.1269*	.009
	37°C	-766993.2278*	.000
	65°C	436169.6399*	.001
37°C	KONTROL	283827.1009	.122
	4°C	766993.2278*	.000
	65°C	1203162.8677*	.000
65°C	KONTROL	-919335.7668*	.000
	4°C	-436169.6399*	.001
	37°C	-1203162.8677*	.000

Tablo 6: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	399470.1364*	.030
	4. SAAT	689369.8124*	.000
	24. SAAT	23449.8963	.898
1. SAAT	KONTROL	-399470.1364*	.030
	4. SAAT	289899.6760*	.026
	24. SAAT	-376020.2402*	.004
4. SAAT	KONTROL	-689369.8124*	.000
	1. SAAT	-289899.6760*	.026
	24. SAAT	-665919.9161*	.000
24. SAAT	KONTROL	-23449.8963	.898
	1. SAAT	376020.2402*	.004
	4. SAAT	665919.9161*	.000

SICAKLIK - LIVE/DEAD KİT SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; $(F(2,212) = 36.485, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; $(F(2,212) = 1.012, p > 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; $(F(1,212) = 1.174, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(4,212) = 2.700, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(2,212) = 7.652, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,212) = 4.613, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(4,212) = 2.935, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 7: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	4°C	-4127302.3641	.363
	37°C	-10105114.3619*	.027
	65°C	16628156.5937*	.000
4°C	KONTROL	4127302.3641	.363
	37°C	-5977811.9978	.068
	65°C	20755458.9579*	.000
37°C	KONTROL	10105114.3619*	.027
	4°C	5977811.9978	.068
	65°C	26733270.9556*	.000
65°C	KONTROL	-16628156.5937*	.000
	4°C	-20755458.9579*	.000
	37°C	-26733270.9556*	.000

Tablo 8: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	-2303989.5544	.611
	4. SAAT	2518800.4637	.577
	24. SAAT	2542994.7709	.578
1. SAAT	KONTROL	2303989.5544	.611
	4. SAAT	4822790.0182	.135
	24. SAAT	4846984.3253	.141
4. SAAT	KONTROL	-2518800.4637	.577
	1. SAAT	-4822790.0182	.135
	24. SAAT	24194.3072	.994
24. SAAT	KONTROL	-2542994.7709	.578
	1. SAAT	-4846984.3253	.141
	4. SAAT	-24194.3072	.994

SICAKLIK - ALAMAR BLUE SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,20) = 10.088$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,20) = 156.737$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,20) = 116.663$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(4,20) = 1.896, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(2,20) = 0.774, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,20) = 158.886, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(4,20) = 0.519, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.



Tablo 9: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	4°C	.1114*	.000
	37°C	.1370*	.000
	65°C	.1685*	.000
4°C	KONTROL	-.1114*	.000
	37°C	.0256	.058
	65°C	.0571*	.000
37°C	KONTROL	-.1370*	.000
	4°C	-.0256	.058
	65°C	.0315*	.022
65°C	KONTROL	-.1685*	.000
	4°C	-.0571*	.000
	37°C	-.0315*	.022

Tablo 10: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	.2691*	.000
	4. SAAT	.0715*	.001
	24. SAAT	.0763*	.000
1. SAAT	KONTROL	-.2691*	.000
	4. SAAT	-.1976*	.000
	24. SAAT	-.1928*	.000
4. SAAT	KONTROL	-.0715*	.001
	1. SAAT	.1976*	.000
	24. SAAT	.0048	.708
24. SAAT	KONTROL	-.0763*	.000
	1. SAAT	.1928*	.000
	4. SAAT	-.0048	.708

PH - KÜLTÜR - R2A AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,142) = 0.002$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,142) = 0.103$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,142) = 34.630$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,142) = 0.001, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,142) = 0.000, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,142) = 0.079, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,142) = 0.000, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 11: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	pH 3 ASİT	61950.1736*	.000
	pH 11 BAZ	62014.0486*	.000
pH 3 ASİT	KONTROL	-61950.1736*	.000
	pH 11 BAZ	63.8750	.965
pH 11 BAZ	KONTROL	-62014.0486*	.000
	pH 3 ASİT	-63.8750	.965

Tablo 12: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	61521.1667*	.000
	4. SAAT	62200.9792*	.000
	24. SAAT	62224.1875*	.000
1. SAAT	KONTROL	-61521.1667*	.000
	4. SAAT	679.8125	.700
	24. SAAT	703.0208	.690
4. SAAT	KONTROL	-62200.9792*	.000
	1. SAAT	-679.8125	.700
	24. SAAT	23.2083	.990
24. SAAT	KONTROL	-62224.1875*	.000
	1. SAAT	-703.0208	.690
	4. SAAT	-23.2083	.990

PH - KÜLTÜR - BCYE AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,154) = 0.000$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,154) = 0.000$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,154) = 30.596$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,154) = 0.000$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,154) = 0.000$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,154) = 0.000$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,154) = 0.000$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 13: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	pH 3 ASİT	5497.2917*	.000
	pH 11 BAZ	5492.5000*	.000
pH 3 ASİT	KONTROL	-5497.2917*	.000
	pH 11 BAZ	-4.7917	.988
pH 11 BAZ	KONTROL	-5492.5000*	.000
	pH 3 ASİT	4.7917	.988

Tablo 14: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	5491.8750*	.000
	4. SAAT	5501.0417*	.000
	24. SAAT	5491.7708*	.000
1. SAAT	KONTROL	-5491.8750*	.000
	4. SAAT	9.1667	.982
	24. SAAT	-.1042	1.000
4. SAAT	KONTROL	-5501.0417*	.000
	1. SAAT	-9.1667	.982
	24. SAAT	-9.2708	.981
24. SAAT	KONTROL	-5491.7708*	.000
	1. SAAT	.1042	1.000
	4. SAAT	9.2708	.981

PH - CTC-DAPI BOYAMA SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,154) = 0.757$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,154) = 2.516$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,154) = 125.129$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,154) = 0,471, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,154) = 1,789, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,154) = 1.408, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,154) = 0.770, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 15: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	pH 3 ASİT	4278264.4676*	.000
	pH 11 BAZ	3853711.9310*	.000
pH 3 ASİT	KONTROL	-4278264.4676*	.000
	pH 11 BAZ	-424552.5367	.386
pH 11 BAZ	KONTROL	-3853711.9310*	.000
	pH 3 ASİT	424552.5367	.386

Tablo 16: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	3292658.3655*	.000
	4. SAAT	4479979.7252*	.000
	24. SAAT	4425326.5072*	.000
1. SAAT	KONTROL	-3292658.3655*	.000
	4. SAAT	1187321.3597*	.049
	24. SAAT	1132668.1417	.060
4. SAAT	KONTROL	-4479979.7252*	.000
	1. SAAT	-1187321.3597*	.049
	24. SAAT	-54653.2180	.927
24. SAAT	KONTROL	-4425326.5072*	.000
	1. SAAT	-1132668.1417	.060
	4. SAAT	54653.2180	.927

PH - LIVE/DEAD KİT SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,153) = 4.789$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,153) = 1.437$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,153) = 71.657$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,153) = 1.586, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısında; ($F(1,153) = 35.836, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,153) = 0.656, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,153) = 4.294, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 17: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	pH 3 ASİT	27259351.5333*	.000
	pH 11 BAZ	24796402.4350*	.000
pH 3 ASİT	KONTROL	-27259351.5333*	.000
	pH 11 BAZ	-2462949.0983*	.032
pH 11 BAZ	KONTROL	-24796402.4350*	.000
	pH 3 ASİT	2462949.0983*	.032

Tablo 18: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	27148320.9963*	.000
	4. SAAT	24827768.6296*	.000
	24. SAAT	26105228.1904*	.000
1. SAAT	KONTROL	-27148320.9963*	.000
	4. SAAT	-2320552.3667	.099
	24. SAAT	-1043092.8059	.456
4. SAAT	KONTROL	-24827768.6296*	.000
	1. SAAT	2320552.3667	.099
	24. SAAT	1277459.5608	.359
24. SAAT	KONTROL	-26105228.1904*	.000
	1. SAAT	1043092.8059	.456
	4. SAAT	-1277459.5608	.359

PH - ALAMAR BLUE SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,14) = 62.548$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,14) = 41.640$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,14) = 4.828$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,14) = 73.158, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,14) = 37.934, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,14) = 56.016, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,14) = 30.660, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 19: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	pH 3 ASİT	.0840*	.000
	pH 11 BAZ	.0094	.492
pH 3 ASİT	KONTROL	-.0840*	.000
	pH 11 BAZ	-.0746*	.000
pH 11 BAZ	KONTROL	-.0094	.492
	pH 3 ASİT	.0746*	.000

Tablo 20: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	.0758*	.000
	4. SAAT	-.0141	.335
	24. SAAT	.0785*	.000
1. SAAT	KONTROL	-.0758*	.000
	4. SAAT	-.0899*	.000
	24. SAAT	.0028	.815
4. SAAT	KONTROL	.0141	.335
	1. SAAT	.0899*	.000
	24. SAAT	.0926*	.000
24. SAAT	KONTROL	-.0785*	.000
	1. SAAT	-.0028	.815
	4. SAAT	-.0926*	.000

DEZENFEKTAN - KÜLTÜR - R2A AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; $(F(3,190) = 269.250, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; $(F(2,190) = 103.429, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; $(F(1,190) = 469.109, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(6,190) = 86.283, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(3,190) = 227.673, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,190) = 95,838, p < .05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(6,190) = 81.426, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 21: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	2 PPM KLOR	33462.5000*	0
	10 PPM KLOR	33462.5000*	0
	2 PPM MONOKLORAMİN	27619.1667*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	33237.4074*	0
2 PPM KLOR	KONTROL	-33462.5000*	0
	10 PPM KLOR	0	1
	2 PPM MONOKLORAMİN	-5843.3333*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	-225.0926	0.607

Tablo 21 (devam): Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-33462.5000*	0
	2 PPM KLOR	0	1
	2 PPM MONOKLORAMİN	-5843.3333*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	-225.0926	0.607
2 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-27619.1667*	0
	2 PPM KLOR	5843.3333*	0
	10 PPM KLOR	5843.3333*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	5618.2407*	0
10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-33237.4074*	0
	2 PPM KLOR	225.0926	0.607
	10 PPM KLOR	225.0926	0.607
	2 PPM MONOKLORAMİN	-5618.2407*	0

Tablo 22: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	31621.1364*	.000
	4. SAAT	31427.0455*	.000
	24. SAAT	33438.8194*	.000
1. SAAT	KONTROL	-31621.1364*	.000
	4. SAAT	-194.0909	.624
	24. SAAT	1817.6831*	.000
4. SAAT	KONTROL	-31427.0455*	.000
	1. SAAT	194.0909	.624
	24. SAAT	2011.7740*	.000
24. SAAT	KONTROL	-33438.8194*	.000
	1. SAAT	-1817.6831*	.000
	4. SAAT	-2011.7740*	.000

DEZENFEKTAN - KÜLTÜR - BCYE AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(3,202) = 0.81$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,202) = 0.81$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,202) = 1.131$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(6,202) = 0.81, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(3,202) = 0.046, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,202) = 0.046, p > .05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(6,202) = 0.046, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 23: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	2 PPM KLOR	26225.0000*	0
	10 PPM KLOR	26225.0000*	0
	2 PPM MONOKLORAMİN	25993.9815*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	26225.0000*	0
2 PPM KLOR	KONTROL	-26225.0000*	0
	10 PPM KLOR	0	1
	2 PPM MONOKLORAMİN	-231.0185	0.687
	10 PPM MONOKLORAMİN	0	1

Tablo 23 (devam): Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

10 PPM KLOR	KONTROL	-26225.0000*	0
	2 PPM KLOR	0	1
	2 PPM MONOKLORAMİN	-231.0185	0.687
	10 PPM MONOKLORAMİN	0	1
2 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-25993.9815*	0
	2 PPM KLOR	231.0185	0.687
	10 PPM KLOR	231.0185	0.687
	10 PPM MONOKLORAMİN	231.0185	0.687
10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-26225.0000*	0
	2 PPM KLOR	0	1
	10 PPM KLOR	0	1
	2 PPM MONOKLORAMİN	-231.0185	0.687

Tablo 24: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	26051.7361*	.000
	4. SAAT	26225.0000*	.000
	24. SAAT	26225.0000*	.000
1. SAAT	KONTROL	-26051.7361*	.000
	4. SAAT	173.2639	.727
	24. SAAT	173.2639	.727
4. SAAT	KONTROL	-26225.0000*	.000
	1. SAAT	-173.2639	.727
	24. SAAT	.0000	1.000
24. SAAT	KONTROL	-26225.0000*	.000
	1. SAAT	-173.2639	.727
	4. SAAT	.0000	1.000

DEZENFEKTAN - CTC-DAPI BOYAMA SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; $(F(3,285) = 3.792, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; $(F(2,285) = 6.668, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; $(F(1,285) = 30.813, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(6,285) = 5.930, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(3,285) = 2.998, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,285) = 2.062, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(6,285) = 5.150, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 25: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	2 PPM KLOR	3231404.5050*	0
	10 PPM KLOR	3512591.3475*	0
	2 PPM MONOKLORAMİN	2961038.1236*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	3634570.9973*	0
2 PPM KLOR	KONTROL	-3231404.5050*	0
	10 PPM KLOR	281186.84	0.189
	2 PPM MONOKLORAMİN	-270366.38	0.207
	10 PPM MONOKLORAMİN	403166.49	0.06

Tablo 25 (devam): Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

10 PPM KLOR	KONTROL	-3512591.3475*	0
	2 PPM KLOR	-281186.84	0.189
	2 PPM MONOKLORAMİN	-551553.2239*	0.01
	10 PPM MONOKLORAMİN	121979.65	0.569
2 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-2961038.1236*	0
	2 PPM KLOR	270366.38	0.207
	10 PPM KLOR	551553.2239*	0.01
	10 PPM MONOKLORAMİN	673532.8737*	0.002
10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-3634570.9973*	0
	2 PPM KLOR	-403166.49	0.06
	10 PPM KLOR	-121979.65	0.569
	2 PPM MONOKLORAMİN	-673532.8737*	0.002

DEZENFEKTAN - LIVE/DEAD KİT SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(3,284) = 204.411$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,284) = 36.518$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,284) = 1529.216, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(6,284) = 58.648, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(3,284) = 237.963, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,284) = 40,819, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(6,284) = 71.250, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 26: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	2 PPM KLOR	88869309.5725*	0
	10 PPM KLOR	92802113.9428*	0
	2 PPM MONOKLORAMİN	62228628.7715*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	93942702.8311*	0
2 PPM KLOR	KONTROL	- 88869309.5725*	0
	10 PPM KLOR	3932804.3703*	0.009
	2 PPM MONOKLORAMİN	- 26640680.8010*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	5073393.2586*	0.001

Tablo 26 (devam): Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

10 PPM KLOR	KONTROL	-92802113.9428*	0
	2 PPM KLOR	-3932804.3703*	0.009
	2 PPM MONOKLORAMİN	-30573485.1712*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	1140588.9	0.442
2 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-62228628.7715*	0
	2 PPM KLOR	26640680.8010*	0
	10 PPM KLOR	30573485.1712*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	31714074.0596*	0
10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-93942702.8311*	0
	2 PPM KLOR	-5073393.2586*	0.001
	10 PPM KLOR	-1140588.9	0.442
	2 PPM MONOKLORAMİN	-31714074.0596*	0

Tablo 27: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	90678242.3839*	.000
	4. SAAT	80022260.3530*	.000
	24. SAAT	82497250.0761*	.000
1. SAAT	KONTROL	-90678242.3839*	.000
	4. SAAT	-10655982.0308*	.000
	24. SAAT	-8180992.3077*	.000
4. SAAT	KONTROL	-80022260.3530*	.000
	1. SAAT	10655982.0308*	.000
	24. SAAT	2474989.7231	.056
24. SAAT	KONTROL	-82497250.0761*	.000
	1. SAAT	8180992.3077*	.000
	4. SAAT	-2474989.7231	.056

DEZENFEKTAN - ALAMAR BLUE SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(3,26) = 15.298$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,26) = 5.885$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,26) = 15.502$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(6,26) = 2.153, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(3,26) = 0.418, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,26) = 2.840, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(6,26) = 2.494, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 28: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	2 PPM KLOR	0.0254	0.065
	10 PPM KLOR	.0602*	0
	2 PPM MONOKLORAMİN	.0618*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	.0883*	0
2 PPM KLOR	KONTROL	-0.0254	0.065
	10 PPM KLOR	.0348*	0.001
	2 PPM MONOKLORAMİN	.0363*	0.001
	10 PPM MONOKLORAMİN	.0629*	0

Tablo 28 (devam): Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

10 PPM KLOR	KONTROL	-.0602*	0
	2 PPM KLOR	-.0348*	0.001
	2 PPM MONOKLORAMİN	0.0016	0.867
	10 PPM MONOKLORAMİN	.0282*	0.006
2 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-.0618*	0
	2 PPM KLOR	-.0363*	0.001
	10 PPM KLOR	-0.0016	0.867
	10 PPM MONOKLORAMİN	.0266*	0.008
10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-.0883*	0
	2 PPM KLOR	-.0629*	0
	10 PPM KLOR	-.0282*	0.006
	2 PPM MONOKLORAMİN	-.0266*	0.008

Tablo 29: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	.0556*	.000
	4. SAAT	.0470*	.001
	24. SAAT	.0741*	.000
1. SAAT	KONTROL	-.0556*	.000
	4. SAAT	-.0086	.296
	24. SAAT	.0185*	.030
4. SAAT	KONTROL	-.0470*	.001
	1. SAAT	.0086	.296
	24. SAAT	.0271*	.002
24. SAAT	KONTROL	-.0741*	.000
	1. SAAT	-.0185*	.030
	4. SAAT	-.0271*	.002

OZMOTİK KONSANTRASYON - KÜLTÜR - R2A AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,133) = 4.294$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,133) = 20.853$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,133) = 0.603$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,133) = 1.519, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,133) = 0.181, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,133) = 3.224, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,133) = 0.527, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 30: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	HİPOTONİK TUZ	45960.3561*	.000
	HİPERTONİK TUZ	47206.7072*	.000
HİPOTONİK TUZ	KONTROL	-45960.3561*	.000
	HİPERTONİK TUZ	1246.3512	.165
HİPERTONİK TUZ	KONTROL	-47206.7072*	.000
	HİPOTONİK TUZ	-1246.3512	.165

Tablo 31: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	42578.8974*	.000
	4. SAAT	47421.0844*	.000
	24. SAAT	48943.5392*	.000
1. SAAT	KONTROL	-42578.8974*	.000
	4. SAAT	4842.1870*	.000
	24. SAAT	6364.6418*	.000
4. SAAT	KONTROL	-47421.0844*	.000
	1. SAAT	-4842.1870*	.000
	24. SAAT	1522.4548	.153
24. SAAT	KONTROL	-48943.5392*	.000
	1. SAAT	-6364.6418*	.000
	4. SAAT	-1522.4548	.153

OZMOTİK KONSANTRASYON - KÜLTÜR - BCYE AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,154) = 24.786$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,154) = 8.052$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,154) = 38.464$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,154) = 2.975, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısında; ($F(1,154) = 10.262, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,154) = 4.168, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,154) = 2.062, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 32: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	HİPOTONİK TUZ	1475.7361*	.000
	HİPERTONİK TUZ	1839.5139*	.000
HİPOTONİK TUZ	KONTROL	-1475.7361*	.000
	HİPERTONİK TUZ	363.7778*	.000
HİPERTONİK TUZ	KONTROL	-1839.5139*	.000
	HİPOTONİK TUZ	-363.7778*	.000

Tablo 33: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	1459.9479*	.000
	4. SAAT	1702.2917*	.000
	24. SAAT	1810.6354*	.000
1. SAAT	KONTROL	-1459.9479*	.000
	4. SAAT	242.3438*	.008
	24. SAAT	350.6875*	.000
4. SAAT	KONTROL	-1702.2917*	.000
	1. SAAT	-242.3438*	.008
	24. SAAT	108.3438	.228
24. SAAT	KONTROL	-1810.6354*	.000
	1. SAAT	-350.6875*	.000
	4. SAAT	-108.3438	.228

OZMOTİK KONSANTRASYON - CTC-DAPI BOYAMA SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,154) = 7.550$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,154) = 4.999$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,154) = 6.171$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,154) = 0.501, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,154) = 0.204, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,154) = 0.026, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,154) = 0.533, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 34: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	HİPOTONİK TUZ	1296891.8147*	.000
	HİPERTONİK TUZ	1562237.1468*	.000
HİPOTONİK TUZ	KONTROL	-1296891.8147*	.000
	HİPERTONİK TUZ	265345.3321*	.007
HİPERTONİK TUZ	KONTROL	-1562237.1468*	.000
	HİPOTONİK TUZ	-265345.3321*	.007

Tablo 35: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	1239994.3826*	.000
	4. SAAT	1434844.9849*	.000
	24. SAAT	1613854.0747*	.000
1. SAAT	KONTROL	-1239994.3826*	.000
	4. SAAT	194850.6023	.102
	24. SAAT	373859.6921*	.002
4. SAAT	KONTROL	-1434844.9849*	.000
	1. SAAT	-194850.6023	.102
	24. SAAT	179009.0898	.132
24. SAAT	KONTROL	-1613854.0747*	.000
	1. SAAT	-373859.6921*	.002
	4. SAAT	-179009.0898	.132

OZMOTİK KONSANTRASYON - LIVE/DEAD KİT SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,154) = 1.192$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,154) = 26.921$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,154) = 44.843$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,154) = 0.850, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,154) = 0.298, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,154) = 51.758, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,154) = 0.166, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 36: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	HİPOTONİK TUZ	16183055.3482*	.000
	HİPERTONİK TUZ	17209585.3469*	.000
HİPOTONİK TUZ	KONTROL	-16183055.3482*	.000
	HİPERTONİK TUZ	1026529.9987	.277
HİPERTONİK TUZ	KONTROL	-17209585.3469*	.000
	HİPOTONİK TUZ	-1026529.9987	.277

Tablo 37: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	11981886.2685*	.000
	4. SAAT	17967126.4721*	.000
	24. SAAT	20139948.3021*	.000
1. SAAT	KONTROL	-11981886.2685*	.000
	4. SAAT	5985240.2035*	.000
	24. SAAT	8158062.0335*	.000
4. SAAT	KONTROL	-17967126.4721*	.000
	1. SAAT	-5985240.2035*	.000
	24. SAAT	2172821.8300	.061
24. SAAT	KONTROL	-20139948.3021*	.000
	1. SAAT	-8158062.0335*	.000
	4. SAAT	-2172821.8300	.061

OZMOTİK KONSANTRASYON - ALAMAR BLUE SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,14) = 94.656$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,14) = 3.064$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,14) = 0.961$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,14) = 32.151, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(1,14) = 23.334, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,14) = 6.799, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(2,14) = 3.380, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 38: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	HİPOTONİK TUZ	.0294*	.004
	HİPERTONİK TUZ	.0890*	.000
HİPOTONİK TUZ	KONTROL	-.0294*	.004
	HİPERTONİK TUZ	.0596*	.000
HİPERTONİK TUZ	KONTROL	-.0890*	.000
	HİPOTONİK TUZ	-.0596*	.000

Tablo 39: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	.0495*	.000
	4. SAAT	.0601*	.000
	24. SAAT	.0680*	.000
1. SAAT	KONTROL	-.0495*	.000
	4. SAAT	.0106	.178
	24. SAAT	.0185*	.027
4. SAAT	KONTROL	-.0601*	.000
	1. SAAT	-.0106	.178
	24. SAAT	.0079	.312
24. SAAT	KONTROL	-.0680*	.000
	1. SAAT	-.0185*	.027
	4. SAAT	-.0079	.312

KURULUK - AÇLIK - UV - KÜLTÜR - R2A AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,183) = 53.435$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,183) = 57.386$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,183) = 95.653$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(3,183) = 48.790, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(2,183) = 26.573, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,183) = 30.572, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(3,183) = 25.723, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.



Tablo 40: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	KURULUK	29555.6319*	.000
	AÇLIK	26949.0397*	.000
	UV	30114.6111*	.000
KURULUK	KONTROL	-29555.6319*	.000
	AÇLIK	-2606.5923*	.001
	UV	558.9792	.509
AÇLIK	KONTROL	-26949.0397*	.000
	KURULUK	2606.5923*	.001
	UV	3165.5714*	.000
UV	KONTROL	-30114.6111*	.000
	KURULUK	-558.9792	.509
	AÇLIK	-3165.5714*	.000

Tablo 41: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	26701.6746*	.000
	4. SAAT	29783.9028*	.000
	24. SAAT	30096.8715*	.000
1. SAAT	KONTROL	-26701.6746*	.000
	4. SAAT	3082.2282*	.000
	24. SAAT	3395.1969*	.000
4. SAAT	KONTROL	-29783.9028*	.000
	1. SAAT	-3082.2282*	.000
	24. SAAT	312.9688	.711
24. SAAT	KONTROL	-30096.8715*	.000
	1. SAAT	-3395.1969*	.000
	4. SAAT	-312.9688	.711

KURULUK - AÇLIK - UV - KÜLTÜR - BCYE AGAR SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; $(F(2,198) = 0.090, p > 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; $(F(2,198) = 0.057, p > 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; $(F(1,198) = 0.665, p > 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(3,198) = 0.055, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısında; ($F(2,198) = 0.000, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,198) = 0.000, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(3,198) = 0.001, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 42: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	KURULUK	2103.9931*	.000
	AÇLIK	2082.0139*	.000
	UV	2104.3750*	.000
KURULUK	KONTROL	-2103.9931*	.000
	AÇLIK	-21.9792	.729
	UV	.3819	.996
AÇLIK	KONTROL	-2082.0139*	.000
	KURULUK	21.9792	.729
	UV	22.3611	.752
UV	KONTROL	-2104.3750*	.000
	KURULUK	-.3819	.996
	AÇLIK	-22.3611	.752

Tablo 43: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	2085.4861*	.000
	4. SAAT	2101.3264*	.000
	24. SAAT	2103.1667*	.000
1. SAAT	KONTROL	-2085.4861*	.000
	4. SAAT	15.8403	.803
	24. SAAT	17.6806	.803
4. SAAT	KONTROL	-2101.3264*	.000
	1. SAAT	-15.8403	.803
	24. SAAT	1.8403	.979
24. SAAT	KONTROL	-2103.1667*	.000
	1. SAAT	-17.6806	.803
	4. SAAT	-1.8403	.979

KURULUK - AÇLIK - UV - CTC-DAPI BOYAMA SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,198) = 3.604$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,198) = 2.161$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,198) = 0.971$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(3,198) = 0.719, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısında; ($F(2,198) = 0.853, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,198) = 6.390, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(3,198) = 0.618, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 44: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	KURULUK	798676.2467*	.000
	AÇLIK	739798.6262*	.000
	UV	1060193.2140*	.000
KURULUK	KONTROL	-798676.2467*	.000
	AÇLIK	-58877.6205	.492
	UV	261516.9673*	.007
AÇLIK	KONTROL	-739798.6262*	.000
	KURULUK	58877.6205	.492
	UV	320394.5878*	.001
UV	KONTROL	-1060193.2140*	.000
	KURULUK	-261516.9673*	.007
	AÇLIK	-320394.5878*	.001

Tablo 45: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	862306.3223*	.000
	4. SAAT	944418.1614*	.000
	24. SAAT	657818.7978*	.000
1. SAAT	KONTROL	-862306.3223*	.000
	4. SAAT	82111.8391	.338
	24. SAAT	-204487.5245*	.034
4. SAAT	KONTROL	-944418.1614*	.000
	1. SAAT	-82111.8391	.338
	24. SAAT	-286599.3637*	.003
24. SAAT	KONTROL	-657818.7978*	.000
	1. SAAT	204487.5245*	.034
	4. SAAT	286599.3637*	.003

KURULUK - AÇLIK - UV - LIVE/DEAD KİT SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,198) = 389.906$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,198) = 64.589$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Grup açısından; ($F(1,198) = 751.123$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(3,198) = 3.885, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(2,198) = 310.079, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,198) = 30.983, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(3,198) = 3.763, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 46: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	KURULUK	16774260.5597*	.000
	AÇLIK	19272150.2139*	.000
	UV	43393704.2323*	.000
KURULUK	KONTROL	-16774260.5597*	.000
	AÇLIK	2497889.6542*	.011
	UV	26619443.6726*	.000
AÇLIK	KONTROL	-19272150.2139*	.000
	KURULUK	-2497889.6542*	.011
	UV	24121554.0184*	.000
UV	KONTROL	-43393704.2323*	.000
	KURULUK	-26619443.6726*	.000
	AÇLIK	-24121554.0184*	.000

Tablo 47: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	21220656.2458*	.000
	4. SAAT	27461578.4326*	.000
	24. SAAT	24439968.3750*	.000
1. SAAT	KONTROL	-21220656.2458*	.000
	4. SAAT	6240922.1868*	.000
	24. SAAT	3219312.1292*	.003
4. SAAT	KONTROL	-27461578.4326*	.000
	1. SAAT	-6240922.1868*	.000
	24. SAAT	-3021610.0576*	.006
24. SAAT	KONTROL	-24439968.3750*	.000
	1. SAAT	-3219312.1292*	.003
	4. SAAT	3021610.0576*	.006

KURULUK - AÇLIK - UV - ALAMAR BLUE SONUÇLARI

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,18) = 14.138$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,18) = 1.048$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Grup açısından; ($F(1,18) = 0.929$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(3,18) = 0.636, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-grup açısından; ($F(2,18) = 3.844, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-grup açısından; ($F(2,18) = 6.980, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-grup açısından; ($F(3,18) = 1.359, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre ve saatlerdeki mikroorganizma sayılarının grup bazında birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 48: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	KURULUK	.0908*	.000
	AÇLIK	.0291	.154
	UV	.1044*	.000
KURULUK	KONTROL	-.0908*	.000
	AÇLIK	-.0618*	.000
	UV	.0135	.392
AÇLIK	KONTROL	-.0291	.154
	KURULUK	.0618*	.000
	UV	.0753*	.000
UV	KONTROL	-.1044*	.000
	KURULUK	-.0135	.392
	AÇLIK	-.0753*	.000

Tablo 49: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	.0669*	.003
	4. SAAT	.0858*	.000
	24. SAAT	.0553*	.016
1. SAAT	KONTROL	-.0669*	.003
	4. SAAT	.0188	.189
	24. SAAT	-.0117	.459
4. SAAT	KONTROL	-.0858*	.000
	1. SAAT	-.0188	.189
	24. SAAT	-.0305	.064
24. SAAT	KONTROL	-.0553*	.016
	1. SAAT	.0117	.459
	4. SAAT	.0305	.064

PARAMETRELERE GÖRE BİYOFİLM FAZI SONUÇLARI**SICAKLIK UYGULAMA SONUÇLARI**

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,136) = 3.934$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,136) = 1.679$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,136) = 83.248, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(4,136) = 2.862, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-teknik açısında; ($F(6,136) = 6.830, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,136) = 4.010, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(12,136) = 6.038, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 50: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	4°C	945182.6062	.709
	37°C	-923597.5792	.716
	65°C	7439315.1200*	.004
4°C	KONTROL	-945182.6062	.709
	37°C	-1868780.1854	.299
	65°C	6494132.5139*	.000
37°C	KONTROL	923597.5792	.716
	4°C	1868780.1854	.299
	65°C	8362912.6993*	.000
65°C	KONTROL	-7439315.1200*	.004
	4°C	-6494132.5139*	.000
	37°C	-8362912.6993*	.000

Tablo 51: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	1239215.6556	.625
	4. SAAT	618973.4227	.807
	24. SAAT	5608536.2327*	.028
1. SAAT	KONTROL	-1239215.6556	.625
	4. SAAT	-620242.2329	.730
	24. SAAT	4369320.5771*	.016
4. SAAT	KONTROL	-618973.4227	.807
	1. SAAT	620242.2329	.730
	24. SAAT	4989562.8100*	.006
24. SAAT	KONTROL	-5608536.2327*	.028
	1. SAAT	-4369320.5771*	.016
	4. SAAT	-4989562.8100*	.006

Tablo 52: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-791362.3942	.650
	LIVE/DEAD	-25393888.3018*	.000
	ALAMAR BLUE	3881.0158	.999
CTC-DAPI	KÜLTÜR	791362.3942	.650
	LIVE/DEAD	-24602525.9076*	.000
	ALAMAR BLUE	795243.4100	.808
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	25393888.3018*	.000
	CTC-DAPI	24602525.9076*	.000
	ALAMAR BLUE	25397769.3176*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-3881.0158	.999
	CTC-DAPI	-795243.4100	.808
	LIVE/DEAD	-25397769.3176*	.000

PH UYGULAMA SONUÇLARI

pH grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,235) = 0.652$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(1,235) = 0.885$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,235) = 77.191$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,235) = 0.592, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-teknik açısında; ($F(3,235) = 5.212, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,235) = 1.185, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(6,235) = 0.353, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 53: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	pH 3 ASİT	3231118.7100*	.000
	pH 11 BAZ	3785417.3281*	.000
pH 3 ASİT	KONTROL	-3231118.7100*	.000
	pH 11 BAZ	554298.6182	.175
pH 11 BAZ	KONTROL	-3785417.3281*	.000
	pH 3 ASİT	-554298.6182	.175

Tablo 54: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	2979310.5979*	.000
	4. SAAT	4093909.7251*	.000
	24. SAAT	3451583.7342*	.000
1. SAAT	KONTROL	-2979310.5979*	.000
	4. SAAT	1114599.1273*	.026
	24. SAAT	472273.1363	.345
4. SAAT	KONTROL	-4093909.7251*	.000
	1. SAAT	-1114599.1273*	.026
	24. SAAT	-642325.9909	.199
24. SAAT	KONTROL	-3451583.7342*	.000
	1. SAAT	-472273.1363	.345
	4. SAAT	642325.9909	.199

Tablo 55: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-4979651.5001*	.000
	LIVE/DEAD	-6721312.5475*	.000
	ALAMAR BLUE	8161.3677	.993
CTC-DAPI	KÜLTÜR	4979651.5001*	.000
	LIVE/DEAD	-1741661.0474*	.000
	ALAMAR BLUE	4987812.8678*	.000
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	6721312.5475*	.000
	CTC-DAPI	1741661.0474*	.000
	ALAMAR BLUE	6729473.9152*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-8161.3677	.993
	CTC-DAPI	-4987812.8678*	.000
	LIVE/DEAD	-6729473.9152*	.000

DEZENFEKTAN UYGULAMA SONUÇLARI

Dezenfektan grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(3,401) = 1.984$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,401) = 0.468$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,401) = 317.466$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(6,401) = 4.714, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-teknik açısından; ($F(9,401) = 4.825, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,401) = 0.558, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(18,401) = 9.371, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 56: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	2 PPM KLOR	3393975.9459*	0
	10 PPM KLOR	4123501.8076*	0
	2 PPM MONOKLORAMİN	4630860.0008*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	4451442.1867*	0
2 PPM KLOR	KONTROL	-3393975.9459*	0
	10 PPM KLOR	729525.8618*	0.031
	2 PPM MONOKLORAMİN	1236884.0549*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	1057466.2409*	0.002

Tablo 56 (devam): Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

10 PPM KLOR	KONTROL	-4123501.8076*	0
	2 PPM KLOR	-729525.8618*	0.031
	2 PPM MONOKLORAMİN	507358.19	0.132
	10 PPM MONOKLORAMİN	327940.38	0.33
2 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-4630860.0008*	0
	2 PPM KLOR	-1236884.0549*	0
	10 PPM KLOR	-507358.19	0.132
	10 PPM MONOKLORAMİN	-179417.81	0.594
10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-4451442.1867*	0
	2 PPM KLOR	-1057466.2409*	0.002
	10 PPM KLOR	-327940.38	0.33
	2 PPM MONOKLORAMİN	179417.81	0.594

Tablo 57: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	4015314.3128*	.000
	4. SAAT	4035408.9480*	.000
	24. SAAT	4408275.0235*	.000
1. SAAT	KONTROL	-4015314.3128*	.000
	4. SAAT	20094.6351	.945
	24. SAAT	392960.7107	.178
4. SAAT	KONTROL	-4035408.9480*	.000
	1. SAAT	-20094.6351	.945
	24. SAAT	372866.0755	.203
24. SAAT	KONTROL	-4408275.0235*	.000
	1. SAAT	-392960.7107	.178
	4. SAAT	-372866.0755	.203

Tablo 58: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-1425636.2295*	.000
	LIVE/DEAD	-7925296.3300*	.000
	ALAMAR BLUE	2536.5912	.996
CTC-DAPI	KÜLTÜR	1425636.2295*	.000
	LIVE/DEAD	-6499660.1005*	.000
	ALAMAR BLUE	1428172.8207*	.006
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	7925296.3300*	.000
	CTC-DAPI	6499660.1005*	.000
	ALAMAR BLUE	7927832.9212*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-2536.5912	.996
	CTC-DAPI	-1428172.8207*	.006
	LIVE/DEAD	-7927832.9212*	.000

OZMOTİK KONSANTRASYON UYGULAMA SONUÇLARI

Ozmotik konsantrasyon grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,232) = 0.240$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,232) = 1.857$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,232) = 412.181$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,232) = 0.554, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-teknik açısından; ($F(3,232) = 0.184, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,232) = 4.596, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(6,232) = 1.066, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 59: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	HİPOTONİK TUZ	1221494.6641*	.003
	HİPERTONİK TUZ	1550629.5760*	.000
HİPOTONİK TUZ	KONTROL	-1221494.6641*	.003
	HİPERTONİK TUZ	329134.9119	.246
HİPERTONİK TUZ	KONTROL	-1550629.5760*	.000
	HİPOTONİK TUZ	-329134.9119	.246

Tablo 60: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	2019058.2203*	.000
	4. SAAT	736824.9184	.092
	24. SAAT	1383171.5209*	.002
1. SAAT	KONTROL	-2019058.2203*	.000
	4. SAAT	-1282233.3019*	.000
	24. SAAT	-635886.6994	.066
4. SAAT	KONTROL	-736824.9184	.092
	1. SAAT	1282233.3019*	.000
	24. SAAT	646346.6025	.064
24. SAAT	KONTROL	-1383171.5209*	.002
	1. SAAT	635886.6994	.066
	4. SAAT	-646346.6025	.064

Tablo 61: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-743610.2943*	.027
	LIVE/DEAD	-10632334.8560*	.000
	ALAMAR BLUE	7729.5171	.990
CTC-DAPI	KÜLTÜR	743610.2943*	.027
	LIVE/DEAD	-9888724.5617*	.000
	ALAMAR BLUE	751339.8114	.221
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	10632334.8560*	.000
	CTC-DAPI	9888724.5617*	.000
	ALAMAR BLUE	10640064.3731*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-7729.5171	.990
	CTC-DAPI	-751339.8114	.221
	LIVE/DEAD	-10640064.3731*	.000

KURULUK - AÇLIK - UV UYGULAMA SONUÇLARI

Diğer parametreler grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(2,306) = 4.019$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,306) = 5.609$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,306) = 922.640$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(3,306) = 2.611, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-teknik açısından; ($F(6,306) = 7.952, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,306) = 11.618, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(9,06) = 4.765, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 62: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	KURULUK	4406261.7566*	.000
	AÇLIK	6029739.6790*	.000
	UV	6140499.7812*	.000
KURULUK	KONTROL	-4406261.7566*	.000
	AÇLIK	1623477.9224*	.000
	UV	1734238.0246*	.000
AÇLIK	KONTROL	-6029739.6790*	.000
	KURULUK	-1623477.9224*	.000
	UV	110760.1022	.803
UV	KONTROL	-6140499.7812*	.000
	KURULUK	-1734238.0246*	.000
	AÇLIK	-110760.1022	.803

Tablo 63: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	4342230.5463*	.000
	4. SAAT	6557347.8139*	.000
	24. SAAT	5445134.3944*	.000
1. SAAT	KONTROL	-4342230.5463*	.000
	4. SAAT	2215117.2676*	.000
	24. SAAT	1102903.8481*	.013
4. SAAT	KONTROL	-6557347.8139*	.000
	1. SAAT	-2215117.2676*	.000
	24. SAAT	-1112213.4194*	.013
24. SAAT	KONTROL	-5445134.3944*	.000
	1. SAAT	-1102903.8481*	.013
	4. SAAT	1112213.4194*	.013

Tablo 64: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-457831.6417	.262
	LIVE/DEAD	-18214406.7199*	.000
	ALAMAR BLUE	3331.9149	.997
CTC-DAPI	KÜLTÜR	457831.6417	.262
	LIVE/DEAD	-17756575.0782*	.000
	ALAMAR BLUE	461163.5566	.545
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	18214406.7199*	.000
	CTC-DAPI	17756575.0782*	.000
	ALAMAR BLUE	18217738.6348*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-3331.9149	.997
	CTC-DAPI	-461163.5566	.545
	LIVE/DEAD	-18217738.6348*	.000

PARAMETRELERE GÖRE PLANKTONİK FAZ SONUÇLARI**SICAKLIK UYGULAMA SONUÇLARI**

Sıcaklık grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; $(F(2,333) = 24.696, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; $(F(2,333) = 4.604, p < 0.05)$ anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Teknik açısından; ($F_{3(2,333)} = 423.135, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F_{4(333)} = 2.153, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-teknik açısından; ($F_{6(333)} = 45.455, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F_{6(333)} = 8.660, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F_{12(333)} = 4.198, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 65: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLI DEĞERİ
KONTROL	4°C	-2963803.3924*	.019
	37°C	-1077990.3866	.390
	65°C	6793192.7688*	.000
4°C	KONTROL	2963803.3924*	.019
	37°C	1885813.0058*	.036
	65°C	9756996.1612*	.000
37°C	KONTROL	1077990.3866	.390
	4°C	-1885813.0058*	.036
	65°C	7871183.1553*	.000
65°C	KONTROL	-6793192.7688*	.000
	4°C	-9756996.1612*	.000
	37°C	-7871183.1553*	.000

Tablo 66: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	-1864422.9321	.138
	4. SAAT	1409369.7417	.260
	24. SAAT	3296034.0191*	.009
1. SAAT	KONTROL	1864422.9321	.138
	4. SAAT	3273792.6738*	.000
	24. SAAT	5160456.9512*	.000
4. SAAT	KONTROL	-1409369.7417	.260
	1. SAAT	-3273792.6738*	.000
	24. SAAT	1886664.2774*	.036
24. SAAT	KONTROL	-3296034.0191*	.009
	1. SAAT	-5160456.9512*	.000
	4. SAAT	-1886664.2774*	.036

Tablo 67: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-715566.2398	.408
	LIVE/DEAD	-28781506.3377*	.000
	ALAMAR BLUE	1854.1980	.999
CTC-DAPI	KÜLTÜR	715566.2398	.408
	LIVE/DEAD	-28065940.0980*	.000
	ALAMAR BLUE	717420.4377	.657
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	28781506.3377*	.000
	CTC-DAPI	28065940.0980*	.000
	ALAMAR BLUE	28783360.5357*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-1854.1980	.999
	CTC-DAPI	-717420.4377	.657
	LIVE/DEAD	-28783360.5357*	.000

PH UYGULAMA SONUÇLARI

pH grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,228) = 10.409$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,228) = 0.570$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,228) = 469.084$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,228) = 1.876, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-teknik açısından; ($F(3,228) = 22.777, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,228) = 1.439, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(6,228) = 3.505, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 68: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	pH 3 ASİT	23751427.3860*	.000
	pH 11 BAZ	20854658.4660*	.000
pH 3 ASİT	KONTROL	-23751427.3860*	.000
	pH 11 BAZ	-2896768.9200*	.000
pH 11 BAZ	KONTROL	-20854658.4660*	.000
	pH 3 ASİT	2896768.9200*	.000

Tablo 69: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	22853445.5133*	.000
	4. SAAT	21667596.4019*	.000
	24. SAAT	22376271.3117*	.000
1. SAAT	KONTROL	-22853445.5133*	.000
	4. SAAT	-1185849.1114	.068
	24. SAAT	-477174.2016	.462
4. SAAT	KONTROL	-21667596.4019*	.000
	1. SAAT	1185849.1114	.068
	24. SAAT	708674.9098	.273
24. SAAT	KONTROL	-22376271.3117*	.000
	1. SAAT	477174.2016	.462
	4. SAAT	-708674.9098	.273

Tablo 70: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-307945.3445	.626
	LIVE/DEAD	-16709770.6201*	.000
	ALAMAR BLUE	1642.5342	.999
CTC-DAPI	KÜLTÜR	307945.3445	.626
	LIVE/DEAD	-16401825.2756*	.000
	ALAMAR BLUE	309587.8788	.788
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	16709770.6201*	.000
	CTC-DAPI	16401825.2756*	.000
	ALAMAR BLUE	16711413.1543*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-1642.5342	.999
	CTC-DAPI	-309587.8788	.788
	LIVE/DEAD	-16711413.1543*	.000

DEZENFEKTAN UYGULAMA SONUÇLARI

Dezenfektan grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(3,391) = 79.561$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(2,391) = 12.685$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,391) = 1331.345$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(6,391) = 21.872, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-teknik açısında; ($F(9,391) = 136.736, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,391) = 24.945, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(18,391) = 39.266, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 71: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	2 PPM KLOR	73095493.0964*	0
	10 PPM KLOR	75129434.3708*	0
	2 PPM MONOKLORAMİN	51849913.3854*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	75667140.5639*	0
2 PPM KLOR	KONTROL	-73095493.0964*	0
	10 PPM KLOR	2033941.2744*	0.043
	2 PPM MONOKLORAMİN	-21245579.7110*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	2571647.4675*	0.011

Tablo 71 (devam): Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

10 PPM KLOR	KONTROL	-75129434.3708*	0
	2 PPM KLOR	-2033941.2744*	0.043
	2 PPM MONOKLORAMİN	-23279520.9854*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	537706.19	0.591
2 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-51849913.3854*	0
	2 PPM KLOR	21245579.7110*	0
	10 PPM KLOR	23279520.9854*	0
	10 PPM MONOKLORAMİN	23817227.1785*	0
10 PPM MONOKLORAMİN	KONTROL	-75667140.5639*	0
	2 PPM KLOR	-2571647.4675*	0.011
	10 PPM KLOR	-537706.19	0.591
	2 PPM MONOKLORAMİN	-23817227.1785*	0

Tablo 72: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	73512631.8888*	.000
	4. SAAT	66047268.8742*	.000
	24. SAAT	68039873.6946*	.000
1. SAAT	KONTROL	-73512631.8888*	.000
	4. SAAT	-7465363.0146*	.000
	24. SAAT	-5472758.1941*	.000
4. SAAT	KONTROL	-66047268.8742*	.000
	1. SAAT	7465363.0146*	.000
	24. SAAT	1992604.8204*	.022
24. SAAT	KONTROL	-68039873.6946*	.000
	1. SAAT	5472758.1941*	.000
	4. SAAT	-1992604.8204*	.022

Tablo 73: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-655468.1621	.482
	LIVE/DEAD	-34727789.3160*	.000
	ALAMAR BLUE	-286183.6143	.843
CTC-DAPI	KÜLTÜR	655468.1621	.482
	LIVE/DEAD	-34072321.1539*	.000
	ALAMAR BLUE	369284.5478	.788
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	34727789.3160*	.000
	CTC-DAPI	34072321.1539*	.000
	ALAMAR BLUE	34441605.7018*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	286183.6143	.843
	CTC-DAPI	-369284.5478	.788
	LIVE/DEAD	-34441605.7018*	.000

OZMOTİK KONSATRASYON UYGULAMA SONUÇLARI

Ozmotik konsantrasyon grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(1,222) = 0.433$, $p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat açısından; ($F(2,222) = 14.836$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,222) = 247.643$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(2,222) = 0.076, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-teknik açısından; ($F(3,222) = 0.314, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,222) = 26.671, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(4,222) = 0.188, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 74: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	HİPOTONİK TUZ	14090646.9836*	.000
	HİPERTONİK TUZ	14782992.7851*	.000
HİPOTONİK TUZ	KONTROL	-14090646.9836*	.000
	HİPERTONİK TUZ	692345.8014	.224
HİPERTONİK TUZ	KONTROL	-14782992.7851*	.000
	HİPOTONİK TUZ	-692345.8014	.224

Tablo 75: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLI DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	9986942.3421*	.000
	4. SAAT	15903298.4541*	.000
	24. SAAT	16906924.3940*	.000
1. SAAT	KONTROL	-9986942.3421*	.000
	4. SAAT	5916356.1120*	.000
	24. SAAT	6919982.0519*	.000
4. SAAT	KONTROL	-15903298.4541*	.000
	1. SAAT	-5916356.1120*	.000
	24. SAAT	1003625.9399	.142
24. SAAT	KONTROL	-16906924.3940*	.000
	1. SAAT	-6919982.0519*	.000
	4. SAAT	-1003625.9399	.142

Tablo 76: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-413164.5016	.589
	LIVE/DEAD	-13528708.9048*	.000
	ALAMAR BLUE	6821.8892	.996
CTC-DAPI	KÜLTÜR	413164.5016	.589
	LIVE/DEAD	-13115544.4032*	.000
	ALAMAR BLUE	419986.3907	.725
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	13528708.9048*	.000
	CTC-DAPI	13115544.4032*	.000
	ALAMAR BLUE	13535530.7939*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-6821.8892	.996
	CTC-DAPI	-419986.3907	.725
	LIVE/DEAD	-13535530.7939*	.000

KURULUK-AÇLIK-UV UYGULAMA SONUÇLARI

Diğer parametreler grubunda parametreler, saatler ve teknikler açısından mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar iki yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre mikroorganizma sayıları;

Parametre açısından; ($F(3,290) = 124.321$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat açısından; ($F(3,290) = 14.449$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Teknik açısından; ($F(3,290) = 2673.171$, $p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat açısından; ($F(3,290) = 0.512, p > 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmamaktadır.

Parametre-teknik açısından; ($F(6,290) = 373.858, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Saat-teknik açısından; ($F(6,290) = 43.254, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Parametre-saat-teknik açısından; ($F(9,290) = 1.068, p < 0.05$) anlamlı olarak farklılaşmaktadır.

Ayrıca Post-Hoc analizi ile hangi parametre, saat ve tekniklerdeki mikroorganizma sayılarının birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Tablo 77: Parametrelere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen parametrelerdir.)

PARAMETRE	PARAMETRE	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	KURULUK	11998362.3613*	.000
	AÇLIK	10385794.7785*	.000
	UV	27101844.8091*	.000
KURULUK	KONTROL	-11998362.3613*	.000
	AÇLIK	-1612567.5828*	.001
	UV	15103482.4478*	.000
AÇLIK	KONTROL	-10385794.7785*	.000
	KURULUK	1612567.5828*	.001
	UV	16716050.0306*	.000
UV	KONTROL	-27101844.8091*	.000
	KURULUK	-15103482.4478*	.000
	AÇLIK	-16716050.0306*	.000

Tablo 78: Saatlere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen saatlerdir.)

SAAT	SAAT	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KONTROL	1. SAAT	12763934.0469*	.000
	4. SAAT	15675282.7896*	.000
	24.SAAT	14698298.4464*	.000
1. SAAT	KONTROL	-12763934.0469*	.000
	4. SAAT	2911348.7427*	.000
	24.SAAT	1934364.3994*	.001
4. SAAT	KONTROL	-15675282.7896*	.000
	1. SAAT	-2911348.7427*	.000
	24.SAAT	-976984.3433	.077
24.SAAT	KONTROL	-14698298.4464*	.000
	1. SAAT	-1934364.3994*	.001
	4. SAAT	976984.3433	.077

Tablo 79: Tekniklere göre ölçülen mikroorganizma sayı dağılımları.

(* ile gösterilenler anlamlı fark tespit edilen tekniklerdir.)

TEKNİK	TEKNİK	ORTALAMA FARKLARI	ANLAMLILIK DEĞERİ
KÜLTÜR	CTC-DAPI	-353482.2364	.502
	LIVE/DEAD	-42368341.2814*	.000
	ALAMAR BLUE	4535.4607	.996
CTC-DAPI	KÜLTÜR	353482.2364	.502
	LIVE/DEAD	-42014859.0450*	.000
	ALAMAR BLUE	358017.6971	.705
LIVE/DEAD	KÜLTÜR	42368341.2814*	.000
	CTC-DAPI	42014859.0450*	.000
	ALAMAR BLUE	42372876.7421*	.000
ALAMAR BLUE	KÜLTÜR	-4535.4607	.996
	CTC-DAPI	-358017.6971	.705
	LIVE/DEAD	-42372876.7421*	.000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Cansu VATANSEVER
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	15.12.1986
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0532 451 75 14
E-Posta Adresi	drcansuvatansever@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	2008

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı
Mezuniyet Tarihi	2011

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı
Mezuniyet Tarihi	2017

Makale ve Bildiriler	
Vatansever, C., Türetgen, I., 2015, Survival of Biofilm-Associated <i>Legionella pneumophila</i> Exposed to Various Stressors, <i>Water Environment Research</i> , 87(3), 227-232.	
Türetgen, I., Vatansever, C., Isıklı, G. Bay, B.N., The Effects of Nano Silver Sulfadiazine and Nano Benzalkonium Chloride on Various Planktonic and Biofilm Bacteria, <i>International Science and Technology Conference (ISTEC)</i> , Vienna, Austria, 13-15 July 2016.	
Türetgen, I., Vatansever, C., Reduction of Biofilm Formation in Cooling Tower Water Systems Using Nano-Hydrophobic Coating, <i>6th Congress of European</i>	

Microbiologists (FEMS), 1398, Maastricht, Netherlands, 7-11 June 2015.

Vatansever, C., Türetgen, İ., Farklı Bakterilerin Meydana Getirdiği Biyofilm Tabakaları Üzerine Çeşitli Alkollerin Etkilerinin İncelenmesi, 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, 1390, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.

Vatansever, C., Türetgen, İ., *Legionella pneumophila* Biyofilmi Üzerine Nano ve Klasik Dezenfektanların Etkilerinin İncelenmesi, 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, 1509, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.

Vatansever, C., Türetgen, I., The Effects of Alcohols and Disinfectants Against Surface-Associated Bacteria, 5th *Congress of European Microbiologists (FEMS)*, 101, Leipzig, Germany, 21-25 July 2013.

Vatansever, C., Türetgen, İ., Farklı Stres Etkenlerine Maruz Bırakılan *Pseudomonas aeruginosa* ve Ölü Bakterilerin Yapışma Durumlarının İncelenmesi, 21. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

Vatansever, C., Türetgen, İ., Biyofilm Tabakasına Üzerine Çeşitli Fiziksel ve Kimyasal Etkenlerin İncelenmesi, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, 906-907, Denizli, 21-25 Haziran 2010.