İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SU SİSTEMLERİNDE MİKROBİYAL BİYOFİLM OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ

İrfan TÜRETGEN
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı

Danışman
Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK

Haziran, 2005

İSTANBUL

Bu çalışma 27/06/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji programında "Doktora Tezi" olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Meral BİRBİR
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet ASAN
Trakya Üniversitesi

Prof. Dr. Gülşen TİMUR
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Gülruh ULAKOĞLU
İstanbul Üniversitesi

ÖNSÖZ

Doktora tezimin tamamlanması için tüm aşamalarında akademik tecrübesi, bilgisi ve yeni fikirlere açık oluşu ile her satırında emeği olan danışmanım *Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK'a*,

Doktora Tez İzleme Komitesi'nde yer alan ve yapıcı eleştirileriyle tezime katkıda bulunan *Prof. Dr. Meral BİRBİR* ile *Doç. Dr. Gülruh ULAKOĞLU'na,*

desteğini ve güler yüzünü eksik etmeden yanımda olan ve olumlu eleştirileri ile tezime katkıda bulunan eşim *Araş. Gör. İlknur ÖZALP TÜRETGEN'e,*

bir bardak kahve ile başlayan bu tez serüveninde desteği ve yararlı tartışmaları ile yanımda olan oda arkadaşım *Araş. Gör. Esra İLHAN SUNGUR'a,*

RAPD-PCR metodunun optimizasyonunda beraber çalıştığımız ve olumlu eleştirileri ile tezime katkıda bulunan, *Yard. Doç. Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM, Yard. Doç. Dr. Zuhal ZEYBEK'e,*

ağır metal analizlerini yaparak emek vermiş *Araş. Gör. Murat Belivermiş'e,*

istatistiksel analizlerin yapılmasında emeği geçen *Doç. Dr. Ömer ALTUN* ve *Yard. Doç. Dr. Sevim CESUR'a,*

model sistemin tasarlanması, üretilmesi, polimerlerin temini, teknik bilgi açısından maddi ve manevi olarak bu projeye destek veren *DİZAYN GRUP A.Ş. Araştırma ve Teknoloji Geliştirme Müdürlüğü'ne,*

SEM fotoğraflarının çekilmesinde emeği geçen, Yıldız Teknik Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nden *Doç Dr. Nurhan CANSEVER'e*

teşekkür ederim.

İstanbul, 2005 ***İrfan TÜRETGEN***

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **iii**
TABLO LİSTESİ ..... **v**
ÖZET ..... **vi**
SUMMARY ..... **vii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. Biyofilm Tabakasının Tanımı 3
2.2. EPS Tabakası 6
2.3. Mikrobiyal Yapışma 7
2.4. Model Sistemler 12
2.5. Su Sistemlerinde Biyofilm Tabakasının Önemi 12
3. MALZEME VE YÖNTEM **16**
3.1. Su Sirkülasyon Tankı ve İşletim Koşulları 16
3.2. Bakteriyolojik Analiz 17
3.3. Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)Analizi 19
3.4. Termofilik Bakteri İzolasyonu 19
3.5. Alg İzolasyonu 19
3.6. Toplam Karbonhidrat Analizi 19
3.7 Ağır Metal Analizi 20
3.8. Çözünmüş Oksijen Ölçümü 21
3.9. Toplam Çözünmüş Madde (TÇM) Analizi 21
3.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Hazırlık İşlemi 21
3.11. Serbest Klor Ölçümü 21
3.12. Lateks Aglütinasyon 22
3.13. İstatistiksel Analiz 22
3.14. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler 22
3.14.1. R2A Agar Besiyeri 22
3.14.2. Gentamisin-Sülfat Katkılı R2A Agar Besiyeri 23
3.14.3. Tripton Soya Agar (TSA) Besiyeri 23
3.14.4. Charcoal Yeast Extract (CYE) Agar 23
3.14.5. BCYE Besiyeri Katkısı 24
3.14.6. GVPC Selektif Besiyeri Katkısı 24
3.14.7. Fosfat Tamponu (PBS) 24
3.14.8. Asit Hazırlanışı 24
4. BULGULAR **26**
4.1. Birinci Deney Süresi 28
4.2. İkinci Deney Süresi 41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **52**
KAYNAKLAR **63**
ÖZGEÇMİŞ **79**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Yüzeylerde biyofilm oluşumunu gösteren şematik diyagram 9
Şekil 2.2 : Biyofilm tabakasının gelişimi ve biyolojisine etki eden bazı faktörler 11
Şekil 2.3 : Soğutma kulesi çalışma şeması 13
Şekil 3.1 : Model su sirkülasyon sisteminin şematik diyagramı 17
Şekil 3.2 : Fenol-sülfürik asit yönteminde karbonhidrat miktarı ölçümü için hazırlanan standart eğri 20
Şekil 4.1 : 180 gün sonunda fayans üzerinde oluşmuş biyofilm tabakasının fotoğrafı 28
Şekil 4.2 : SEM fotoğrafında galvanizli çelik sac üzerinde oluşmuş korozyon oyukları 32
Şekil 4.3 : Işık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafta paslanmaz çelik sac üzerinde oluşmuş korozyon alanları 32
Şekil 4.4 : Birinci deney süresinde 30. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 33
Şekil 4.5 : Birinci deney süresinde 60. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 33
Şekil 4.6 : Birinci deney süresinde 90. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 34
Şekil 4.7 : Birinci deney süresinde 120. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 34
Şekil 4.8 : Birinci deney süresinde 150. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 35
Şekil 4.9 : Birinci deney süresinde 180. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 35
Şekil 4.10 : Birinci deney süresince suyun pH ve çözünmüş oksijen değerleri 36
Şekil 4.11 : Birinci deney süresince ölçülmüş aylık planktonik heterotrofik canlı bakteri sayıları 36
Şekil 4.12 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca PVC üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 37
Şekil 4.13 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca PP üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 37
Şekil 4.14 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca PE üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 38
Şekil 4.15 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca cam üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 38
Şekil 4.16 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca paslanmaz çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 39
Şekil 4.17 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca bakır üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 39
Şekil 4.18 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca fayans üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 40
Şekil 4.19 : Birinci deney süresinde 180 gün boyunca galvanizli çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları 40
Şekil 4.20 : İkinci deney süresinde 30. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 43
Şekil 4.21 : İkinci deney süresinde 60. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 43

Şekil 4.22 : İkinci deney süresinde 90. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 44
Şekil 4.23 : İkinci deney süresinde 120. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları eğişimi 44
Şekil 4.24 : İkinci deney süresinde 150. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 45
Şekil 4.25 : İkinci deney süresinde 180. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 45
Şekil 4.26 : İkinci deney süresince suyun pH ve çözünmüş oksijen değerleri 46
Şekil 4.27 : İkinci deney süresince ölçülmüş aylık planktonik heterotrofik canlı bakteri ve *L. pneumophila* sayıları 46
Şekil 4.28 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca PVC üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 47
Şekil 4.29 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca PP üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 47
Şekil 4.30 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca PE üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 48
Şekil 4.31 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca cam üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 48
Şekil 4.32 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca paslanmaz çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 49
Şekil 4.33 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca bakır üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 49
Şekil 4.34 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca fayans üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 50
Şekil 4.35 : İkinci deney süresinde 180 gün boyunca galvanizli çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları 50
Şekil 4.36 : İkinci deney süresinde farklı aylarda rasgele seçilmiş 9 *L. pneumophila* izolatı DNA bantlarının UV ışığı altında agaroz jeldeki görüntüsü 51

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 **:** İSKİ'den sağlanan su kalite raporu.. ……27
Tablo 4.2 **:** Birinci deney periyodu boyunca malzemeler üzerinde ve serbest formda tespit edilmiş olan heterotrofik canlı bakteri sayıları. ……30
Tablo 4.3 **:** Birinci deney süresince aylara göre ölçülen pH, çözünmüş oksijen, TÇM miktarları ve konsantrasyon oranları..... 31
Tablo 4.4 **:** Birinci deney süresince aylara göre ölçülen ağır metal miktarları ve standart hataları 31
Tablo 4.5 **:** İkinci deney periyodu boyunca malzemeler üzerinde ve serbest formda tespit edilmiş olan *L. pneumophila* sayıları 42
Tablo 4.6 **:** İkinci deney süresince ölçülen pH, çözünmüş oksijen, TÇM miktarları ve konsantrasyon oranları..... 42

ÖZET

Su Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi

Su sirkülasyon sistemlerinde biyofilm tabakası oluşursa mikrobiyal korozyon ile sistem hasara uğrar, tıkanmaya yol açarak ısı transfer verimi düşer ve enerji tüketimi artar. Soğutma kuleleri su sirkülasyon sistemleridir ve herhangi bir yerde açığa çıkan sıcaklığın su yardımıyla düşürülmesinde iş görürler. Soğutma kuleleri ve su dağıtım şebekeleri, mikrobiyolojik ve kimyasal süreçlerin gerçekleştiği büyük reaktörler olarak görülmektedir. Biyofilm tabakasının oluşumu ve varlığı su sistemlerinde sıklıkla bildirilmektedir.

Bu çalışmanın amacı soğutma kulesi model sisteminde farklı yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşumunu araştırmak ve *Legionella pneumophila* bakterisinin bu yüzeylerdeki dağılımını değerlendirmektir.

Bu çalışma için soğutma kulesi su haznesinin benzeri laboratuvar ölçekli su sirkülasyon sistemi imal edilmiştir. Model sistemin amacı, gerçek soğutma kulesi su haznesinin simülasyonudur. Boru ve depo üretiminde sektörde sıklıkla kullanılan çeşitli malzemeler, yüzeylerinde barınan heterotrofik bakteri sayısı, *Legionella pneumophila* sayısı ve hücre dışı polimerik maddeler (EPS) bakımından değerlendirilmiştir. Belirli aralıklarla örnek alımı için sisteme malzemeler yerleştirilmiştir. Çalışma, birbirinden bağımsız iki ayrı 180 günlük deney süresini kapsamaktadır. İlk deney süresinde yüzeyler üzerinde doğal, karışık biyofilm oluşması sağlanmıştır. İkinci deney süresinde ise ilkinden farklı olarak sisteme standart *L. pneumophila* suşu deneysel olarak eklenmiştir. Bakteriyel analizlerde heterotrofik bakteriler için R2A Agar besiyeri, *L. pneumophila* için Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar besiyeri kullanılmıştır. Karbonhidrat miktarları fenol-sülfürik asit metoduyla ölçülmüştür.

Kontrol malzemesi olarak sisteme konan cama kıyasla, galvanizli çelik ve bakır yüzeyde yüksek oranda biyofilm oluştuğu gözlenirken plastik malzemelerde özellikle polivinil klorür (PVC) ve polietilen (PE) anlamlı derecede daha az bakteri ve EPS barındırdığı tespit edilmiştir. PVC ve polipropilen (PP) yüzeylerin diğerlerine oranla daha az sayıda *L. pneumophila* bakterisi taşıdığı tespit edilmiştir.

SUMMARY

Investigation of Microbial Biofilm Formation in Water Systems

Biofouling, which occurs in recirculating water systems, damages equipment through biocorrosion and causes clogging, decreased heat transfer efficiency and increased energy consumption. Cooling towers are recirculating water systems and are used to dissipate heat, created elsewhere in the system. The cooling tower and the drinking water distribution network may be viewed as large reactors where a number of chemical and microbiological processes are taking place. The formation and presence of biofilms in water systems have been reported frequently.

The aim of this work is to quantify the biofilm formation on different substrata in a model cooling tower water system and to evaluate the distribution of *Legionella pneumophila* on surfaces.

For this study, a laboratory-scale recirculating water system was built to simulate the cooling tower water basin. The purpose of model systems was to closely mimic the conditions of a real operating cooling tower basin. In this study, different materials, which are widely used as pipe or cooling tower material, were tested regarding heterotrophic bacterial counts, *Legionella pneumophila* accumulation and biofilm quantity on surfaces to evaluate their material dependencies. Surfaces were inserted into water basin to sample biofilms at regular intervals. Thesis covers two independent 180-day periods. In the first period, natural mixed biofilm had been allowed to grow on surfaces; whereas in the second period, the system was seeded experimentally by standard strain of *L. pneumophila*. Bacterial analyses were performed by plate count method, using R2A Agar for heterotrophic bacteria and Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar for *L. pneumophila* enumeration. Phenol-sulfuric acid method was used for carbohydrate analyses.

When compared to an inert surface like glass (control), galvanized steel and copper surfaces have been shown to enhance the biofilm formation. Plastic polymers, especially polyvinyl chloride (PVC) and polyethylene (PE), possess significantly low heterotrophic bacteria and extracellular polymeric substances (EPS). Low numbers of *L. pneumophila* were present on PVC and polypropylene (PP).

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların yüzeylere tutunarak üreyebildikleri fikri, 150 yıldan uzun bir süre önce mikrobiyologların doğal popülasyonları gerçek ekosistemleri içinde incelemeye başladıkları anda akla gelmiştir. Zobell [1] 1937'de, deniz mikroorganizmalarını ilk kez doğal habitatlarında incelemiş, bakterilerin yüzeye tutunarak sessil (yüzeye yapışık) popülasyonlar oluşturduğu ve yüzeye tutunmuş olan bakterilerin planktonik (serbest yüzen) formlardan sayıca daha fazla olduğu sonucuna varmıştır. Çeşitli çalışmalarda doğal, tıbbi ve endüstriyel akuatik ekosistemler mikroskobik yöntemlerle incelendiğinde, çok kısa bir sürede bakterilerin yüzeyler üzerinde ürediği görülmüştür [2, 3, 4]. Fosil kayıtlar yardımıyla 3.5 milyar yıl öncesinde de biyofilm tabakasının olduğu anlaşılmıştır [5], ancak mikrobiyoloji tarihinde 1970'li yıllara kadar çok az sayıda mikrobiyolog çalışmalarında mikroorganizmaları doğal yaşam alanlarında incelemiş ve bakterilerin yüzeylere tutunduktan sonra daha farklı çoğalarak biyofilm oluşturduklarını gözlemlemiştir. Bu alanda yapılan detaylı çalışmaların günümüze olan yakınlığı, biyofilm konusunun oldukça genç bir disiplin olduğunu göstermektedir. [6]. Biyofilm oluşumu, prokaryotik yaşam çevriminde farklı ortamlarda canlılığın sürdürülebilmesi için anahtar rol olmuştur. Sessil ve planktonik fenotip, bir anlamda birbiriyle bütünleşmiş bir yaşam biçimi olarak düşünülebilir [7]. Yüksek çözünürlüğe sahip görüntüleme cihazları ve modern metotların gelişimiyle biyofilm tabakasının pasif hücre yığınları değil, yapısal ve dinamik açıdan karmaşık biyolojik sistemler olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar, biyofilm oluşturma yeteneğinin prokaryotların çok eski ve ortak karakteristiği olduğunu desteklemektedir [5, 7, 8].

Günümüzde, endüstriyel ve evsel su sistemlerindeki mikrobiyolojik kirlilik, yıllardır giderek büyümüş bir sorun olarak karşımızdadır. Kaynağından musluklara ya da endüstriyel su sistemlerine kadar gelen şebeke suyu, kilometrelerce uzunlukta borulardan geçmekte, çoğu zaman depolarda bir süre beklemektedir. Bu yolculuğun herhangi bir noktasında suya karışan mikroorganizmalar, su akışıyla beraber taşınır ve boruların yüzeylerine yapışarak çoğalırlar. Şebeke suyunda ya da yüzeyler üzerinde

bulunan inorganik ve organik bileşikler, bakteriler için enerji kaynağıdır. Mikroorganizmalar bu bileşikleri metabolize edip çoğalırlar. Sudaki mikroorganizma sayısının artışı, suyun hijyenik ve estetik kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır [9, 10, 11, 12, 13, 14]. Boru ve depolarda yapılan yanlış temizlik, biyofilmin suya karışmasına ve böylece mikroorganizmaların hızlı bir şekilde üreyerek su kalitesinin bozulmasına yol açmaktadır [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Ayrıca biyofilmde uçucu organik bileşiklerin varlığı da (geosmin, beta-iyonon, menton vb.) suda kötü koku oluşmasına sebep olmaktadır [22]. Bu nedenlerden dolayı, endüstriyel ve evsel su sistemlerinin sağlıklı işletilmesinde biyofilm tabakasının kontrolü çok büyük bir paya sahiptir [23, 24]. Tüm bunların yanı sıra biyofilmin zararları yanında faydaları da vardır. Örneğin, atık arıtımında kullanılan biyoreaktörlerde, toprakta var olan çevreye zararlı maddelerin parçalanmasında, minerallerden kömür partiküllerinin ayrılması işleminde, sudaki ağır metallerin temizlenmesi vb. süreçlerde biyofilm tabakalarından faydalanılmaktadır [25].

Bu araştırma kapsamında, laboratuvar ölçekli soğutma kulesi model sisteminde, farklı soğutma kulesi, depo ve su borusu malzemelerinin su sistemindeki mikroorganizmalar ile etkileşimi, biyotik ve abiyotik faktörlerin biyofilm tabakasının oluşumuna etkilerinin incelenmesi planlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOFİLM TABAKASININ TANIMI

Biyofilm tabakası "canlı veya cansız bir yüzeye yapışık olarak kendi ürettikleri polimerik matriks içinde yaşayan bakteri hücrelerinin oluşturduğu topluluk", "yoğun bir ekzopolimer matriks içinde, mikroorganizmalar tarafından organize olmuş fonksiyonel ortaklık" ya da "bir yüzeye tutunmuş, organik polimer matrikse gömülü mikrobiyal birlik" olarak değişik tarzlarda tanımlanmıştır [26]. Tanımlardan anlaşıldığı üzere biyofilm tabakası mikroorganizma, yüzey ve matriks olarak üç temel bileşenden oluşmaktadır. Eğer bu temel bileşenlerden biri olmazsa biyofilm tabakasından söz edilemez. Elbette bu yapı çok basite indirgenmiştir ve çevresel faktörleri içine almamaktadır. Sözü edilen matriks, yani EPS, terminolojide "hücre dışı polimerik maddeler", "ekzopolisakkaritler" ya da "ekzopolimerler" terimlerinin karşılığı olarak kullanılmaktadır. EPS, biyofilm tabakasında bakterilerin hücre dışına saldıkları maddelerdir ve bakterileri bir arada tutan çimento gibi düşünülmektedir [27]. Aynı zamanda biyofilm tabakasının bütünlüğünü ve mimari yapısını da korumaktadır. Biyofilm tabakasının morfolojisi ise büyük bir oranda çevre şartları tarafından belirlenmektedir [28]. EPS'nin üstünlüğü, aracısız olarak tüm katı yüzeylere tutunmayı sağlamasıdır. Kirpik ya da pilus ise daha çok canlı doku yüzeylerine özgün birleşme için gerekli hücre zarı yapılarıdır [6, 29, 30].

Bakteriler, suda serbest yüzmek yerine bir yüzeye tutunmayı tercih eder [29]. Bunun sebebi, tutunduğu yüzeyin besin kaynağı olması, suyun akışıyla tutunduğu yere besin maddesi taşınması ya da su akışı sayesinde bol oksijen bulunması olabilir [31]. Çünkü mikroorganizmalar ekolojik stratejilerinde en çok besin maddesi bulunan ortamı seçmektedir [3]. Biyofilm tabakasının oluşumunda yüzeye ilk tutunan ve çoğalan bakterinin türü de önemlidir. Yerleşik bir biyofilm tabakasının varlığı yeni bakteri türlerinin girişini engellemektedir. Çünkü yerleşik mikroorganizmalar elektrik yükü farklılığı, besin rekabeti ya da saldığı kimyasal maddeler ile diğer mikroorganizmaları

uzaklaştırabilir [32]. Mikroorganizmaların bazıları yüzeylere tutunurken, bazıları da su içinde serbest halde dağılmış olarak bulunurlar. Planktonik bakterilerin akuatik bir ekosistemde total bakterilerin % 0.1'ini temsil ettiği düşünülmektedir [33]. Serbest formdaki mikroorganizmalar hareketlerini yavaşlatarak yüzeye yaklaşırlar, yüzeyle veya yüzeye daha önceden tutunmuş olan organik maddelerle ya da diğer mikroorganizmalarla geçici bir ilişki kurarlar. Bu geçici ilişki, bakterilere yüzeyde kendilerine uygun bir yer bulma olanağı sağlar. Yüzeye tutunan bakteriler, hücre dışına saldığı polimerlerle diğer mikroorganizmaların da o bölgeye yapışmasını sağlayarak biyofilm tabakasını oluşturmaya başlar. EPS matriks, moleküler bir filtre olarak davranıp bakterileri bir örtü gibi sarar [26]. Onları antimikrobiyal ajanlardan, besinsizlikten, geçici kuraklıktan, pH dalgalanmalarından, oksijen radikallerinden, toksinlerden, bakteriyofajlardan ve avcı protozoonlardan korur, hücreleri bir arada tutar, iz miktardaki organik molekülleri, iyonları ve besin maddelerini biriktirir [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43]. Ayrıca tabaka, zengin gen havuzu sayesinde kolay gen transferi, mekanik destek sağlama, kanallar yardımıyla hızlı madde transferi, hücre dışı enzimlerin alıkonması gibi avantajlar sağlar [44]. Bu jelsi tabaka (ekzopolisakkaritler) negatif yüklüdür ve bir iyon değişim reçinesi gibi davranarak büyük miktarlarda besin moleküllerini kendilerine bağlar [45]. Aşırı besinsizlik durumunda, bakterilerin kendilerinin ya da diğer türlerin ürettiği EPS tabakasını yıkarak beslenme amacıyla tükettikleri de bilinmektedir [46]. EPS tamamen geçirimsiz bir tabaka değildir, ancak kimyasal ajanların difüzyonunu yavaşlatır ve konsantrasyonlarını düşürür [47]. EPS birikmesi, su ile temasta bulunan yüzeylerde kirliliğin en önemli basamağıdır.

Olgun biyofilm tabakasında mikrobiyal çoğalma hiçbir zaman durmaz. Özellikle suyun akış gücü ile kopan hücre ya da hücre kümelerinin yeri hemen doldurulur. Tek bir hücre kopabildiği gibi 500 μm çapında bir hücre kümesi de yüzeyden ayrılabilmektedir. Biyofilmden kopma süreci, enfeksiyonların yayılması ve su sistemlerinin uzak uçlarının kontaminasyonunda klinik ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Hücrelerin tabakadan tek tek kopması "erozyon", kütleler halinde kopması ise "dökülme" olarak adlandırılır. Erozyon ya da dökülme suyun akış hızıyla doğrudan ilişkilidir [48, 49, 50]. Biyofilmden ayrılma çoğunlukla erozyon ile gerçekleşirken, dökülmede gözlenen hücre sayısının türe bağlı olarak 10 ila 300 hücre arasında değiştiği bildirilmiştir [51].

Özellikle besinin bol bulunduğu (ötrofik) sularda biyofilm tabakası çok hızlı gelişirken, düşük düzeyde besin bulunan (oligotrofik) sularda bu süreç yavaştır, çünkü düşük düzeyde besin maddesinin bulunduğu ortamda bakteri üremekten çok hücre canlılığının devamı için mücadele eder. Bu strateji, bakteri için önemli bir hayatta kalma çabasıdır [41]. Yetersiz besin ve enerji nedeniyle bakterilerin üremesi uzun bir süre engellenebilir. Oligotrofik ortamda bakterilerin açlık stresine karşı farklı bir fenotipe büründüğü, küçülerek yuvarlak bir şekil aldığı ve besin miktarı arttığında tekrar eski şekline döndüğü bildirilmiştir [52]. Dezenfeksiyon gibi stres faktörlerinin biyofilm oluşumunu teşvik ettiği [14], laboratuar ortamında pasajları yapılan suşların yapışma yeteneklerinin ve saldıkları EPS miktarlarının zamanla azaldığı bildirilmiştir [53]. Biyofilm tabakası, su sistemlerine uygulanan dezenfeksiyon etkinliğini azaltmaktadır. Sisteme katılan dezenfektanların etkinliği biyofilm tabakasının kalınlığına bağlı olarak derinlere girdikçe azalmakta [54], biyofilmin içinde veya su fazında bulunan organik moleküllere bağlanmasıyla sudaki etkin konsantrasyonu düşmektedir. Özellikle serbest klorun çok hızlı bir şekilde EPS ile reaksiyona girerek sudaki etkinliğinin azaldığı belirtilmektedir [55]. Besin ya da oksijen gibi yaşamsal moleküller için var olan rekabet, biyofilmin içinde farklı ekolojik katmanların oluşmasına yol açar [46]. Hibiya ve diğ. [56], yaptıkları çalışmada biyofilm tabakasında derine indikçe çözünmüş oksijen miktarının hızla azaldığını göstermişlerdir. Bu koşullar anaerop bakteriler için biyofilm tabakasının derinlerinde bir yaşam alanı oluşturmaktadır.

Yapılmış olan bir araştırmada [57], besin açısından fakir ortamlarda yaşayan bakterilerin, antimikrobiyal ajanlara agar plağında üreyenlerden daha dirençli oldukları gösterilmiştir. Stepanović ve diğ. [58] tarafından yapılan bir çalışmada, seyreltilmiş besin maddesi içeren ortamda (1/20 Tripton soya broth) *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* bakterilerinin normal oranda hazırlanmış besiyerine (Tripton soya broth) göre daha hızlı biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir. Prokaryotlar değişik ortam şartlarına genetik düzenleme ile çok kolay uyum sağlarlar ve yüzeye yaklaşırken düzenleyici genlerin çalışmasıyla dakikalar içinde sessil yaşam fenotipine dönerler. Bu adaptasyon sonucunda planktonik ve sessil hücrelerin birbirinden farklı protein sentezlediklerini ortaya koyan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [7, 59, 60]. Değişim esnasında bazı genlerin anlatımı teşvik edilirken bazıları da baskılanır [60]. Biyofilm tabakası oluşturmak üzere anlatım yapmaya

başlayan genler, polisakkarit, peptidoglikan, hücre içi adezin, otolizin, haberleşme sinyalleri, yüzey ve kontrol proteinleri gibi maddelerin sentezini başlatır. Planktonik faza göre önemli farkların olması, "biyofilm yaşam modu" tanımını kuvvetle desteklemektedir [35]. Bu esnek ve hızlı değişimleri çok hücreli ökaryotların yapması imkansızdır [5].

Biyofilm tabakası ısı değiştiricilerde, su ve yakıt ileten borularda, gemi karinalarında, diş ünitelerinde, bina duvarlarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde biyofauling olarak da adlandırılan istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara yol açarak önemli derecede ekonomik kayıplara sebep olmaktadır [61, 62, 63, 64, 65, 66, 67]. Biyofilm tabakası katı-sıvı, gaz-katı, gaz-sıvı, sıvı-sıvı, katı-katı gibi farklı ara yüzlerde oluşabilir [68]. Yapılan çalışmalara dayanarak, yüzeylerde biyofilm tabakasının oluşumunun engellenmesinin neredeyse imkansız olduğu söylenebilir. Ancak doğru malzeme seçimi, düzenli temizlik ve dezenfeksiyon ile biyofilm oluşumu azaltılabilir [69]. Yüksek biyofauling potansiyeline sahip endüstriyel sistemlerde ek olarak sürfaktan madde kullanımı ile yüzeye tutunmuş bakterilerin sökülmesi kolaylaşır. Özellikle iyonik olmayan yapıdaki sürfaktanların biyofilm tabakasını anlamlı düzeyde depolimerize ettiği bildirilmiştir [70].

2.2 EPS TABAKASI

EPS, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından bulunduğu ortama bağlı olarak farklılık gösterse de, karbonhidrat yapıda elastik bir polimerdir (çoğunlukla 1,3- ya da 1,4-β- bağlı heksoz ile pentoz) ve biyofilm tabakası içindeki total organik karbon miktarının % 50-90'ını temsil eder. EPS'nin molekül ağırlığı birkaç binden milyona kadar değişmektedir ve yapısında karboksil, amino ve fosfat gibi fonksiyonel grupları bulundurmaktadır [53]. Bileşimi substrat miktarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilen, bünyesinde oldukça fazla su tutabilen, yarı katı jelsi bir matrikstir. Biyofilm matriksinin % 90-97'si sudan oluşmaktadır [71, 72]. Bu sayede biyofilm tabakası mikroorganizmaları kuruluğa karşı da koruyabilmektedir [73, 74]. Türden türe değişmekle beraber, nötr pH'da EPS üretiminin en yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir [75]. Bulundukları ortam şartlarına bağlı olarak biyofilm tabakasında % 10-25 oranında bakteri, % 75-90 EPS bulunur. Polisakkaritlerin haricinde protein,

nükleik asit, hücre kalıntıları ve bazı mikroorganizmaların spesifik ürünleri de biyofilm matriksinde gömülü olarak bulunur ve jel matrikse yapısal destek verir. Bu spesifik ürünlere en çarpıcı örnek olarak alginat verilebilir. Mukoid *Pseudomonas aeruginosa* suşları, bir polisakkarit polimeri olan alginatı bol miktarda üretir [60].

EPS tabakasının en önemli ekolojik üstünlüğü, barındırdığı farklı mikroorganizmaları uzun bir süre boyunca bir arada tutabilmesidir. Çoğu mikroorganizma biyofilm oluşturabilir ve yeryüzündeki mikroorganizmaların % 99'u biyofilm tabakası içinde yaşayabilir [76, 77].

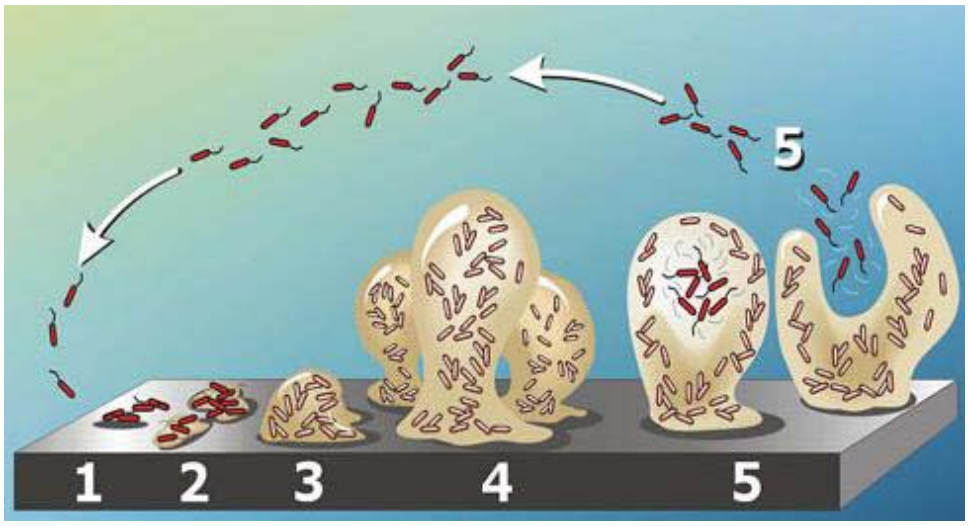
2.3. MİKROBİYAL YAPIŞMA

Biyofilm tabakasının oluşumundaki ilk basamak mikroorganizmanın yüzeye yaklaşmasıdır [78]. Ancak bunun öncesinde yüzeyin yapışmaya uygun hale gelmesi gerekmektedir. Bu aşamada sudaki cansız partiküller, elementler, organik ve/veya inorganik moleküller yüzeye yapışır ve ince bir film tabakası oluşturarak mikrobiyal biyofilm oluşumu için yüzeyi hazır hale getirir (surface-conditioning) [79, 80]. Bu film tabakası malzemenin yüzey özelliklerini değiştirerek mikrobiyal tutunmayı kolaylaştırır [81]. Planktonik hücrelerin suda hareket ederken proton ve sinyal moleküller saldığı bilinmektedir. Bu proton ve sinyal moleküller bakteri herhangi bir yüzeye uzak iken radyal olarak yayılırlar. Mikroorganizmalar difüzyon, Brown Hareketi, aktif hareket ya da su akışı ile tutunacağı yüzeye yaklaşır. Bakteri yüzeye yakınsa proton ve sinyal moleküller yüzeye çarpıp geri döner ve bakteri ile yüzey arasında bu moleküllerin konsantrasyonları artar [6, 82]. Yüzeye kritik uzaklıkta olduğu anda (yaklaşık 1 nm), bakteri itici ve çekici güçlerin etkisiyle ya yüzeye yapışır ya da itilir. Bu itici ve çekici güçler, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen ve Van der Waals bağlarının kuvveti, asit-baz etkileşimi, sterik etkileşimler (mikrotopoloji), hidrodinamik güçler olarak tanımlanmaktadır ve bunlar non-spesifik bağlanmada işlev görürler. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir. Çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür. Bakterilerin negatif yükü genellikle sahip oldukları mikrobiyal polisakkaritlerden ileri gelmektedir [80]. Bakterilerin, kendileri gibi negatif yüklü çoğu doğal veya yapay yüzeylere yaklaşabilmesi için hidrofobik etkileşim ya da Van der Waals güçlerinin elektrostatik etkileşimden daha kuvvetli olması gerekir [80, 83]. Bu

nedenle ortamın pH ve iyonik güç parametreleri yapışmada önemlidir. Ortamın pH değeri bakterinin izoelektrik noktasından düşük ise bakteri pozitif yüklüdür. Bu durum genellikle 1.5-4.5 arasındaki pH değerlerinde görülür ki, şebeke ve soğutma kuleleri suyunun pH değeri genellikle 6.5'in üzerindedir.

Hücrelerin yüzeye yapışmasıyla ilgili iki temel teori vardır. Bunlardan biri araştırıcıların ismine atfen DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) Teorisi, diğeri ise Termodinamik Teori'dir ve her ikisi de fizikokimyasal güçler ile ilgilidir. DLVO Teorisi, hücre çeşidi ya da yüzey farklılığı gözetmeden tamamen hücre yüzey özellikleri ile ilişkilidir. Cam ya da polimer bazlı yüzeylerde mikrobiyal yapışma süreci, itici ve çekici güçlerin eşit olduğu durumda dengededir, buna DLVO Yaklaşımı da denir [4, 25, 84]. Ancak elektrostatik itme kuvveti göz önüne alındığında negatif yüklü partiküllerin negatif yüklü yüzeylere yapışması DLVO Teorisi'ne ters düşmektedir. Termodinamik Teori ise hücre ve malzeme yüzeyinden açığa çıkan serbest yapışma enerjisi temeline dayanmaktadır. Fakat bakterilerin hücre yükü ve hidrofobisite değiştirebilme özellikleri nedeniyle uygun bir yapışma teorisi ortaya atılamamıştır [85].

Primer yapışmanın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür [26]. Bunun yanı sıra yüzeyin çeşidi, kirpik varlığı, pH, besin miktarı, su akış hızı, sıcaklık da yüzeye yapışmada etkili role sahiptir [32, 50, 86, 87]. Bakteri, sahip olduğu kirpik ya da saldığı polimerler ile yüzeye tutunur. Bu bağlanma kirpik ile gerçekleşirse bakteri tutunduğu yüzeyden kendini ayırabilir, ancak EPS ile yüzeye tutunursa bu bağlanma geri dönüşümsüz olur [6, 69, 86]. Yüzeye tutunan bakterinin EPS üretimini artırdığı bilinmektedir [72]. Yüzeye yaklaştığını algılayan planktonik bakteri, primer yapışma ve biyofilm adaptasyonu bakımından aktif bir süreç içine girer. Mikroorganizmaların yapışma yeteneklerinin logaritmik üreme fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiş, bunun nedeninin de hücre duvarının üreme fazında artan hidrofobik özelliğinden ileri geldiği açıklanmıştır [78]. Biyofilm oluşum sürecinde dört önemli aşama bulunur: geri dönüşümlü yapışma, geri dönüşümsüz yapışma, olgunlaşma, kopma. Bu aşamaların son halkası biyofilm gelişim döngüsünde planktonik faza geçişi sağlar. Bu süreç, bütünsel bir yaklaşımla ele alındığında, sessil ve planktonik fenotiplerin prokaryotik yaşamla bütünleşmiş bileşenler olduğu görülmektedir [7].



Şekil 2.1: Yüzeylerde biyofilm oluşumunu gösteren şematik diyagram (*Peg Dirckx*'in yazılı izniyle kullanılmıştır – Center for Biofilm Engineering, Bozeman USA)

Yüzeye tutunan bakteri çoğalarak önce mikrokolonileri, bunlar da büyüyüp yatay planda genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturmaktadır (Şekil 2.1). Tutunma gerçekleşince bakteri bir takım adaptasyon evreleri geçirir. Bunlar içinde EPS üretimi ve antimikrobiyal ajanlara direnç gelişimi en önemli olanlarıdır [88]. Biyofilm ile ilgili yapılmış çalışmalarda en iyi incelenmiş tür olan *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri, hücre-hücre haberleşmesiyle (quorum-sensing) üremelerini durdurma özelliğine sahiptir [89]. Hücre dışına saldıkları sinyal moleküller yardımıyla hücreler popülasyon yoğunluğunu algılayabilmektedir. Ancak her türün kendine özgü sinyal molekülleri olduğu için farklı türlerin bulunduğu heterojen biyofilm tabakalarında farklı haberleşmeler gerçekleşmektedir. Bakteriler hücre-hücre haberleşmesiyle çevre şartlarına göre davranışlarını düzenler. Ayrıca, besin varlığı, diğer mikroorganizmalara karşı savunma, toksik maddelere direnç gibi değişkenlere cevap vererek canlılıklarını sürdürür [90, 91]. Biyofilm tabakasının en küçük birimleri mikrokolonilerdir. Mikrokoloni içinde bulunan bakteriler Brown Hareketi yeteneğini kaybetmişlerdir. Mikrokoloniler çoğunlukla şapkalı mantar görünümündedir (Şekil 2.1). Bakterilerin büyük çoğunluğu bu yapının şapka kısmında, çok azı ise sap kısmında yer alır. Mikrokoloninin ince yapısında çok fazla miktarda su kanalları olduğu ve bu geçirgen kanallar yardımıyla oksijen, besin ve artık maddelerin taşındığı belirtilmiştir. Bu kanallarının birbiriyle birleşen yapısı, ökaryotik hücrelerdeki endoplazmik retikuluma benzetilebilir. Bu şekliyle olgun bir mikrokoloni olarak kabul edilen yapının oluşumu

10 günde tamamlanabilmektedir [7, 92]. Mikrokoloniler ince biyofilm tabakalarında yatay, kalın biyofilm tabakalarında ise dikey planda düzenlenir. Bu düzenlenmede en önemli etkenler su akış hızı ve yüzey gibi çevre koşullarıdır [6, 50, 78]. Suyun akış hızının artması EPS üretimi [87] ile mikroorganizma sayısını artırmakta ve daha ince biyofilm tabakası oluşmasına yol açmaktadır [50, 62].

Bazı mikroorganizmalar yüzey üzerinde hareketlidir ve 10 Hz'den büyük titreşimler yaparak ya da göç ederek (~1 μm/saat) yer değiştirirler [93]. Hareket, bakterinin hücre dışı yapılarıyla olabileceği gibi su akışı tarafından da teşvik edilebilir [49]. *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterileri sahip oldukları kirpik ile yüzeye yaklaşıp tutunarak mikrokoloni oluşturur. Bu bakterilerin kirpik taşımayan mutantlarının sadece tek sıralı biyofilm tabakası oluşturdukları ve bu süreci daha uzun zamanda tamamladıkları tespit edilmiştir. *Vibrio cholerae* bakterisi flagella hareketiyle yüzeyde hızla yayılırken, kirpiksiz mutantlar aynı yüzeyde birbirinden çok uzak, adacıklar halinde gelişen zayıf mikrokoloniler oluşturmaktadır [60]. Biyofilm tabakasının dinamiğine etki eden bazı biyotik ve abiyotik faktörler Şekil 2.2'de genel olarak gösterilmiştir [68].



Şekil 2.2: Biyofilm tabakasının gelişimi ve biyolojisine etki eden bazı faktörler

Biyofilmin üst tabakalarındaki hücreler besin maddeleri ve oksijene daha kolay ulaşırken, metabolik atıkların deşarjı da kolay olur. Besin ve oksijenin daha zor girdiği derin kısımlardaki bakteriler bu sıkıntı nedeniyle metabolik olarak daha az aktiftir ya da uyku fazındadır [45, 59]. Çoğunlukla bakterilerin baskın olduğu biyofilm tabakalarında protozoon ve mantara da rastlanır [41]. Protozoonlar genellikle beslenme amacıyla EPS matriksin içine girerler [94].

2.4. MODEL SİSTEMLER

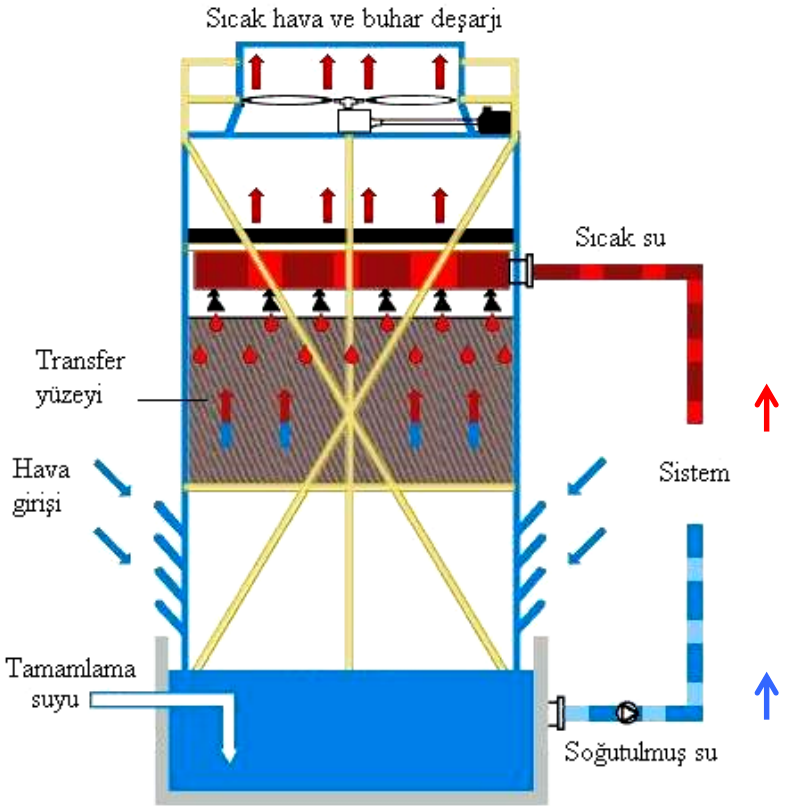
Su sisteminde az kullanılan musluklara giden borularda ve ölü uçlarda biyofilm tabakası hızla oluşur ve bina yapılırken döşenen tesisatın bu noktalarına mekanik olarak ulaşmak mümkün olmadığı için biyofilm tabakası ile mücadele etmek zordur. Rutin dezenfeksiyon işlemi ile planktonik mikroorganizmalar ölmekte, ancak biyofilm içinde bulunanlar canlı kalmaktadır. Canlı kalanlar suyun akış hızı ya da popülasyondaki artış ile biyofilmden koparak suyun estetik ve hijyenik kalitesini hızla düşürmektedir [93]. Bu zorluklar nedeniyle araştırıcılar biyofilm oluşumunu engellemek ya da azaltmak üzere, su sirkülasyon sistemlerini küçük, model ya da pilot sistemlerde araştırmaya yönelmişlerdir [95, 96]. Model sistemler kontrol altında tutulabilen tasarımlar olmalı ve olabildiğince gerçekçi dizayn edilmelidir. Üzerinde çalışılan model sistemler statik ya da dinamik olabilir. Statik sistemler, dinamik olanlara göre daha temel yaklaşımları izlemek için tercih edilir. Statik sistemler bir Petri kutusu, lam, beher ya da doku kültüründe kurulabilir. Basit, hızlı ve fazla tekrar imkanı açısından avantajlı olsa da bu sistemler dinamik parametrelerin incelenmesinde yetersiz kalmaktadır [97]. Dinamik sistemlerde sürekli ya da belirli aralıklarla su ya da besin maddesi akışı vardır. Bu amaçla dairesel reaktörler, Erlenmayer, silindirik tamburlar ya da dikey akışlı tüpler içine yerleştirilmiş kupon veya yüzeyler kullanıldığı gibi [10, 38, 98, 99, 100, 101], doğrudan boru içerisinde biyofilm oluşturulup borudan kesitler alınmasıyla da yapılan çalışmalar vardır [95, 102, 103, 104, 105]. Ayrıca çok sayıda boru ve reaktörün kombinasyonundan oluşan sistemlerden de yararlanılmıştır [94, 106, 107].

2.5. SU SİSTEMLERİNDE BİYOFİLM TABAKASININ ÖNEMİ

Soğutma kuleleri, endüstride cihaz ya da sistemlerin sıcaklığının düşürülmesinde kullanılır ve fiziksel, kimyasal, organik maddeler açısından bakterilerin üremesi için ideal bir ortam sağlar (Şekil 2.3) [67, 108, 109, 110, 111, 112, 113]. Bu özelliğinden ötürü soğutma kuleleri ideal inkübatörler olarak düşünülebilir. Soğutma kulelerinde suyun soğutulduğu metal levhalarda biyofilm tabakasının birikimi, levhalar arasındaki alanı doldurmakta ve soğutma yüzeyini azaltmaktadır. Biyofilm, tek tabakalı bakteri katmanı olarak birikmeye başlar ve çok tabakalı, kalın algal katmanlara kadar ulaşabilir

[80]. Suyun saf olarak buharlaşması sonucu biriken karbonat, fosfat, sülfat, magnezyum ve kalsiyum tuzları tabakalaşmaya yol açarak korozyonu hızlandırır [42]. Korozyona uğramış yüzeylerin artan pürüzlülüğü nedeniyle daha fazla sayıda bakteri barındırdığı bilinmektedir [18].

Biyofauling, yüzeyler üzerinde istenmeyen organizmaların birikimi olarak bilinir ve biyofauling oluşumunun en önemli etkenlerinden biri, soğutma kulelerinde artan organik karbon miktarıdır. Özümlenebilir organik karbon (AOC) mikrobiyal üremeyi teşvik eden en önemli substrattır [113]. Tüm bu kirlilik, ısı transfer veriminin düşmesine, aşırı enerji tüketimine, tıkanmaya ve sonuç olarak da sistemin durmasına yol açmaktadır. Biyofilm tabakası nedeniyle ısı transferinin % 50'ye varan oranlarda azaldığı tespit edilmiştir [14, 61]. Enerji santralleri ya da endüstriyel üretim yapan tesislerde kullanılan soğutma kulelerinin temizlik nedeniyle kapatılması büyük maddi kayıplara yol açmaktadır [114]. Biyofilm tabakası ile ilgili sorunlar hijyenin son derece önemli olduğu besin sektörü ve tıp alanında da mevcuttur [60, 73, 115, 116, 117].



Şekil 2.3: Soğutma kulesi çalışma şeması

Biyofilm tabakası patojen, indikatör ve maddi zarara yol açabilecek mikroorganizmalar için uygun bir niştir [73]. Örneğin, su tesisatında korozyona neden olan anaerobik sülfat indirgeyen bakterilerle birlikte aynı koşullarda yaşayabilen ve Lejyoner Hastalığı'nın etkeni olduğu bilinen *Legionella pneumophila* bakterileri biyofilm tabakasında bulunabilmektedir [113, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124]. Anaerobik sülfat indirgeyen bakteriler metal depo ve borularda mikrobiyal korozyona yol açarken, *L. pneumophila* cinsi bakteriler de su sisteminde çoğalarak çevreye yayılabilir [125, 126]. *Legionellaceae* familyasının üyeleri su sistemlerinde özellikle biyofilm içinde yaşayan amipleri enfekte eder ve amiplerin içinde çoğalıp konak hücreyi parçalayarak sisteme dağılır. Bu bakteriler amibin içindeyken uygulanan dezenfeksiyondan etkilenmezler [127, 128]. Soğutma kuleleri, fan aktivitesi yardımıyla çevreye su buharı ve aerosol deşarj eder. Lejyoner Hastalığı, kontamine olmuş aerosolların solunmasıyla bulaşır. Bilinen en büyük iki Lejyoner Hastalığı salgınında kaynak, soğutma kulesidir [129, 130]. İsmi ilk kez 1976 yılında konan bu hastalık sebebiyle dünya üzerinde çok sayıda insan hayatını kaybetmiştir. Bu nedenle bu bakterinin su sistemlerinde kontrolü önem taşımaktadır [131, 132]. Şebeke suyunda üreme imkanı bulan patojen bakteriler bir anda binlerce kişiye bulaşabilir. Fırsatçı patojen *E. coli* ya da gastrik ülser etkeni *Helicobacter pylori* cinsi bakteriler de biyofilm tabakası içinde çoğalarak şebeke suyu taşıyan tesisatlarda sağlık riski oluşturabilir [41, 128]. Bakterilerin yanı sıra enterik virionlar ve bakteriyofajlar da biyofilmde çoğalabilmektedir [133].

Su sistemlerinde heterotrofik bakteri sayısı tayini su kalitesini belirleyen kriterlerden biridir ve bunların bir kısmı fırsatçı patojen oldukları için sağlık riski oluşturabilmektedir [119, 134]. R2A agar besiyerinde üreyen heterotrofik bakterilerin, total canlı popülasyonun % 1 ila 2'sini temsil ettiği bilinmektedir. Ancak agar plağında üreyen bakterilerin biyofilm içinde metabolik açıdan aktif bakteriler olduğu tespit edilmiştir [41, 135]. Risk değerlendirme çalışmaları ve yetersiz epidemiyolojik veriler nedeniyle heterotrofik bakterilerin insan sağlığına olan olumsuz etkileri konusunda yorum yapılamamaktadır [136]. Heterotrofik bakteri sayısı tayini ile depo ve sirkülasyon sularındaki mikrobiyal değişimler kolayca izlenerek, su sistemlerinin yapımında kullanılan malzemeler üzerindeki mikrobiyal birikim düzeyi saptanabilir [21, 137].

Bu araştırmada hedef, soğutma kulelerindeki biyofauling problemini model bir su sirkülasyon sisteminde inceleyip biyofilm tabakasının kontrolüne çözüm sağlamaktır. Şimdiye kadar yapılmış çalışmalarda antifauling araştırmaları, model ya da pilot sistemlerde içme (şebeke) suyu üzerinde yapılmıştır. [10, 38, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105, 107, 132, 138, 139, 140, 141, 142, 143]. Model sistem, küçük ölçekli bir su şebekesi olduğu gibi [95, 102], araştırıcılar tarafından geliştirilmiş ve ticari olarak bulunabilen "Robbins", "Pedersen", "Propella®", "Couette" ya da "Roto-Torque" isimleri ile anılan biyofilm reaktörleri de olabilmektedir [18, 42, 94, 103, 104, 132, 142, 144, 145]. Bu tip cihazlarda su, sistemden geçerek atılır ve sistem her zaman taze şebeke suyu ile beslenir. Ancak soğutma kulesi gibi suyun tekrarlı olarak kullanıldığı sirkülasyon modellerinde suyun kimyasal, fiziksel ve biyolojik parametreleri farklılık gösterir [113]. Bu farklılıklar nedeniyle şebeke suyu sistemlerindeki sonuçlar, sirkülasyon sistemlerindekilerle pratikte karşılaştırılamaz. Yapılan detaylı literatür taramalarında, soğutma kulelerinde farklı malzemeler üzerinde biyofilm oluşumu ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

Araştırma projesi 180 günlük birbirinden bağımsız iki ayrı deney süresini kapsamaktadır. İlk deney süresinde su tankı normal soğutma kulesi işletim koşullarına bağlı olarak çalıştırılmış ve aylık örnekler alınmıştır. Sadece uygun deşarjlar yapılarak belirli parametrelerin limitler içerisinde tutulması sağlanmıştır. İkinci 180 günlük deney süresinde ise sisteme başlangıçta *L. pneumophila* bakterisi eklenerek birinci deney süresindeki parametrelere ek olarak planktonik ve sessil *L. pneumophila* sayıları tespit edilmiştir.

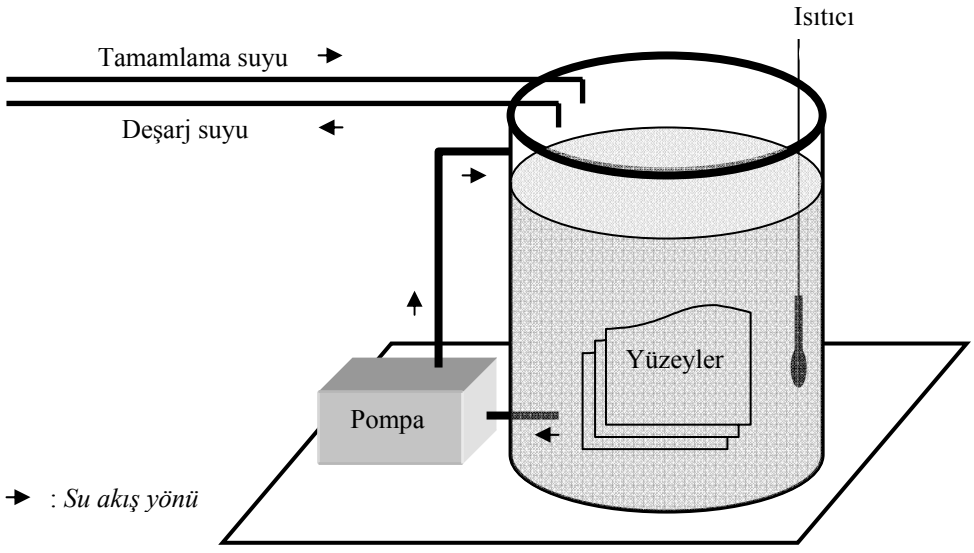
3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. SU SİRKÜLASYON TANKI VE İŞLETİM KOŞULLARI

Deneyde 100 cm yükseklikte, 45 cm çapında 100 litre hacimli PE100'den (yüksek yoğunluklu polietilen) imal edilmiş kapalı devre su sirkülasyon sistemi kullanılmıştır. Deney tankına su sirkülasyonu sağlayacak pompa eklenmiş (550 W, 40 l/d) ve su sıcaklığını 27°C'de sabit tutacak bir ısıtıcı (Atman, AT-100, 100 W) yerleştirilerek (Şekil 3.1) sistem, her biri 180 günden oluşan iki deney süresince kesintisiz çalıştırılmıştır. PE100 malzeme asidik, bazik ve tuzlu her türlü ortamda kullanılabilir. Su tankı içine yerleştirilmiş bakır (Cu-DHP, ASTM B 280), paslanmaz çelik (SS, AISI 316-2B), galvanizli çelik sac (GSS, EN 10142-Z 200), cam (Düz cam, 2mm), fayans (Seramik, düz), polivinil klorür (PVC), polietilen 100 (PE), polipropilen random co-polimer (PP) gibi farklı su deposu ve boru malzemeleri üzerinde biyofilm oluşumu incelenmiştir. Deneylerde kullanılmış olan tüm malzemeler kalite sertifikalı ürünlerdir. Bu malzemelerin üzerinde oluşacak olan biyofilmin aylık incelenmesi için örneğin alınacağı 10 cm^2'lik alanlar önceden işaretlenmiştir. Malzemeler su tankına konmadan önce deterjanla çeşme suyunda yıkanmış, distile su ile durulandıktan sonra etanolde (% 70) beş dakika bekletilmiş ve kurutulmuştur [146]. Pil etkisi oluşmaması için metal malzemeler tank içinde birbirine dokunmayacak şekilde ve su akışına paralel olarak yerleştirilmiştir. Su sisteminde buharlaşma ve deşarj (blowdown) ile azalan su miktarı şebeke suyu ile tamamlanmıştır (make-up) (3.5 litre/gün). Çünkü buharlaşma esnasında su, saf olarak buharlaşırken geride bıraktığı bileşikler sudaki toplam çözünmüş madde (TÇM) miktarını artırmaktadır. Bu artış suyun pH değerinin, konsantrasyonunun ve elektrolitik özelliğinin yükselmesine yol açar ki, bu istenmeyen bir durumdur [147]. Deşarj miktarı, sudaki toplam çözünmüş madde miktarının ölçümü yardımıyla hesaplanmıştır. Bu sayede su sisteminde bulunan partikül, erimiş mineral ve bakterilerin kontrolsüz artışı önlenmiştir. İkinci 180 günlük deney süresi için tüm malzemeler yenilenmiştir. Deney tankına farklı yüksekliklere cam kuponlar

yerleştirilerek tank içinde biyofilm oluşumu bakımından bölgesel farklılıklar olup olmadığı da incelenmiştir.

Su sirkülasyon sistemi çalıştırıldıktan sonra ilk 180 günlük deney süresinde birer aylık aralıklarla serbest yüzen ve yüzeylere tutunmuş heterotrofik bakteri sayıları (HPC), yüzeylerdeki karbonhidrat miktarları, pH, serbest klor, çözünmüş oksijen, toplam çözünmüş madde, ağır metal miktarları ve sıcaklık değerleri kaydedilmiştir. 180 günlük ikinci deney süresinde sisteme *L. pneumophila* suşu (Serogrup 1, ATCC 33152, The Biodeterioration Centre, University of Hertfordshire, UK) deneysel olarak eklenerek birer aylık aralıklarla serbest yüzen ve yüzeylere tutunmuş *L. pneumophila* ile heterotrofik canlı bakteri sayıları, yüzeylerdeki karbonhidrat miktarları, serbest klor, pH, çözünmüş oksijen, toplam çözünmüş madde ve sıcaklık değerleri kaydedilmiştir. Ayrıca her iki deney döneminde planktonik alg ve termofilik bakteri varlığı test edilmiştir. Su sıcaklığı ölçümleri sabit sıcaklığın kontrolü amacıyla yapılmıştır.



Şekil 3.1: Model su sirkülasyon sisteminin şematik diyagramı

3.2. BAKTERİYOLOJİK ANALİZ

Biyofilm örneklerinin bakteriyolojik açıdan incelenmesi için steril eküvyon ile 10 cm^2'lik alandan alınan kazıntı, içinde 5 ml fosfat tamponu (PBS) bulunan santrifüj tüpünde 60 sn vorteks cihazı ile karıştırılarak homojenize edilmiştir [148]. Her analiz

için 3 farklı alandan alınan kazıntıdan iki tekrarlı ekimler yapılmıştır. Serbest formdaki heterotrofik bakteri sayısının tespiti için, selektif olmayan R2A agar besiyerine su örneğinden 100 µl ekim yapılmış ve 27°C'de 10 gün bekletme sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. Yüksek orandaki bakteri sayısı nedeniyle planktonik ve sessil mikroorganizma örnekleri 200 kat PBS ile seyreltildikten sonra ekimleri yapılmıştır.

180 günlük 2. deney süresi için su sistemi, mekanik ve kimyasal olarak temizlenip malzemeler yenilenerek çalıştırılmış ve mililitresinde yaklaşık 10^5 *L. pneumophila* bakterisi içeren stok süspansiyondan 1 ml alınarak su sirkülasyon sistemine katılmıştır. *L. pneumophila* sayısının tespiti için, biyofilm örneği hem doğrudan hem de asit ve sıcaklık ile muamele edildikten sonra 100 µl su örneği BCYE agar besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de 14 gün bekletme sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. Su fazındaki *L. pneumophila* sayısının tespiti için 3 litre model sistem suyu, 142 mm çaplı naylon filtreden süzülmüştür. Su örneklerinin filtrasyonu öncesinde filtre cihazından kaynar distile su geçirilerek sterilizasyonu yapılmıştır. Cihazın soğumasını takiben, su örneği naylon filtreden peristaltik bir pompa yardımıyla geçirilmiştir. Naylon filtre, içinde 20 ml steril distile su bulunan steril poşet içinde iyice ovalanarak üzerindeki bakterilerin su fazına geçmesi sağlanmıştır. Poşet içindeki süspansiyonun 10 ml'si 6000 devirde 15 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldıktan sonra, üstteki 5 ml sıvı pipetle uzaklaştırılarak, üzerine 5 ml asit (HCl-KCl) ilave edilip, karıştırılmıştır. Asitle 20 dk muamele edildikten sonra alınan 0.1 ml örnek BCYE agar besiyerine ekilmiştir. Poşette kalan süspansiyondan alınan 2 ml örnek ise, steril cam şişe içine konup Benmari aletinde 50°C'de 30 dk bekletilmiş ve bu süre sonunda alınan 0.1 ml örnek BCYE agar besiyerine ekilmiştir. Koloni morfolojisi ve Gram boyanma özelliği *L. pneumophila* bakterilerine benzeyen kolonilerden Tripton Soya Agar (TSA) besiyerine pasaj yapılmıştır [149]. TSA besiyerinde üreme olmaması halinde lateks aglütinasyon yöntemiyle bakterinin cinsi ve serogrubu tayin edilmiştir. Sisteme 2. deney süresi başında eklenmiş *L. pneumophila* suşunun, yüzeylerden izole edilen suş olduğunu kanıtlamak için farklı aylarda rasgele seçilerek pasajları alınan 9 *L. pneumophila* izolatı RAPD-PCR yöntemiyle birbirleriyle karşılaştırılmıştır [150, 151].

3.3 RASGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK DNA (RAPD) ANALİZİ

Deneysel olarak su sirkülasyon sistemine eklenmiş *L. pneumophila* suşu ile biyofilmden izole edilen *L. pneumophila* suşlarının aynı olduğunu teyit etmek için DNA'ları izole edilen suşlar, uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülüp, görüntüleme sistemlerinde incelenip karşılaştırılmıştır. Deney için tüplere primer (5'-CGGCGGCGGCGG-3'), dNTP karışımı, $MgCl_2$, *Taq* polimeraz enzimi, deiyonize saf su ve tampon konmuştur. Bu karışım, 25 µl'lik reaksiyon hacminde PCR tüplerine paylaştırılarak son adımda bakteri DNA'sı eklenmiştir. PCR için kullanılan cihaz (Techne-Genius, UK), 95°C'de 1 dk denatürasyondan sonra 30 döngü (94°C'de 30 sn, 36°C'de 60 sn, 72°C'de 90 sn) yapacak şekilde ayarlanmıştır. Son döngüden sonra 72°C'de 8 dk bekletilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde, 100 V elektrik akımı ile en az 10 cm ilerleyecek kadar yürütülmüştür. Agaroz jel, UV görüntüleme sistemine aktarılarak bantların görüntüsü incelenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir [150, 151].

3.4 TERMOFİLİK BAKTERİ İZOLASYONU

Termofilik bakterilerin varlığını araştırmak için biyofilm homojenatından R2A agar besiyerine ekim yapılmış ve 55°C'de nemli ortamda 7 gün bekletilmiştir [152].

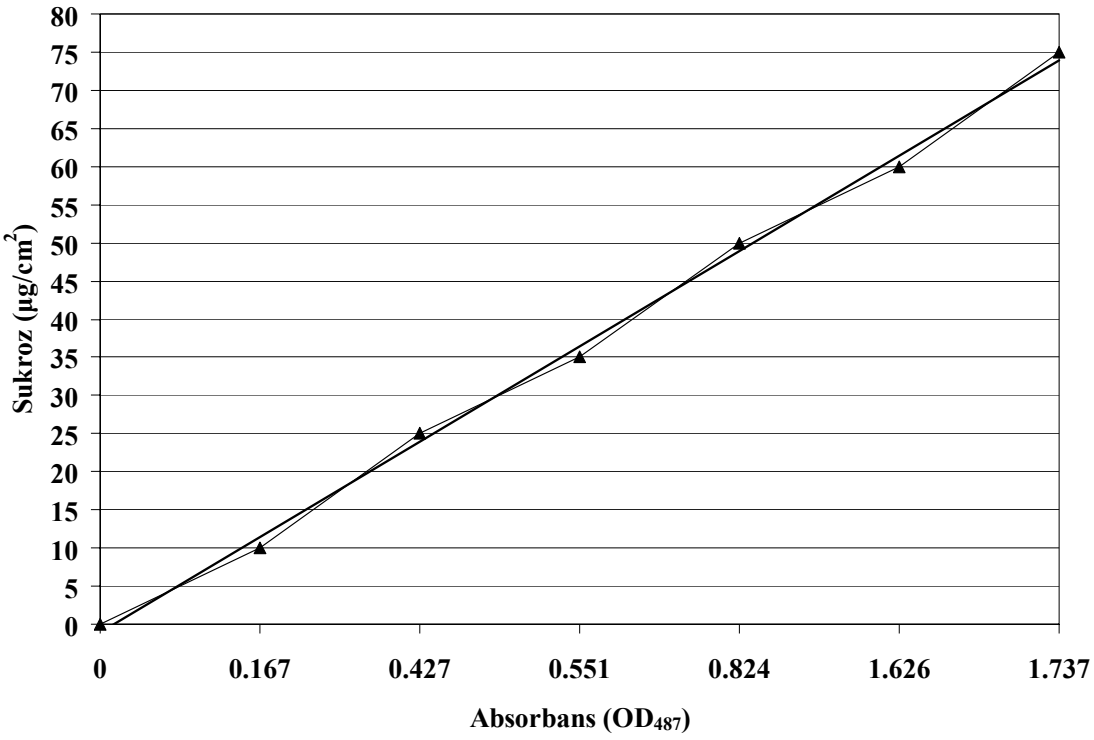
3.5 ALG İZOLASYONU

Su sisteminde algleri araştırmak amacıyla da her ay gentamisin-sülfat içeren R2A agar besiyerine ekim yapılarak, ışık varlığında 22°C'de 30 gün boyunca takip edilmiştir [153].

3.6 TOPLAM KARBONHİDRAT ANALİZİ

Biyofilm oluşumu ve miktarının tayini fenol-sülfürik asit metoduyla gerçekleştirilmiştir [154, 155]. Bu metot Storey ve diğ. [132] tarafından mikrobiyal biyofilm tabakasının EPS miktarını tayin etmek için modifiye edilmiştir. Deneylerde, yüzeylerden kazınmış biyofilm tabakası 4 ml PBS içinde homojenize edilmiş, üzerine 3 ml % 5'lik fenol

eklenerek vorteks cihazı ile karıştırılmış ve hidroliz için 60 dk oda sıcaklığında bekletilerek polisakkaritlerin alt birimlerine ayrılması sağlanmıştır. Süre sonunda tüplere 10 ml derişik sülfürik asit eklenmiş ve oda sıcaklığında 60 dk bekletilerek soğutulmuştur. Meydana gelen renk değişimi, spektrofotometre cihazında (Shimadzu, UV-160) 487 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart eğri yardımıyla spektrofotometrede okunan absorbans değerine karşılık gelen karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır. Standart eğri elde etmek için 10, 25, 35, 50, 60, 75, 85, 100 μg/ml'lik sukroz çözeltileri hazırlanarak metot uygulanmış ve grafik çizilmiştir (Şekil 3.2). Deneylerde 10, 50 ve 100 μg/ml'lik standart sukroz çözeltileri de kontrol olarak ölçülmüştür.



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

3.7 AĞIR METAL ANALİZİ

Su sirkülasyon sistemindeki suyun demir, çinko, kadmiyum ve kurşun değerleri aylık olarak ölçülmüştür. Analizlerde alevli atomik absorbsiyon spektrofotometresi (AA 680 Shimadzu) kullanılmıştır. Parametrelerin değişmesini önlemek amacıyla, ölçümleri

yapılacak su örnekleri PET (Polietilen tereftalat) şişelere alınarak 1 N HNO_3 ile pH değeri 2.5'e indirilmiştir.

3.8 ÇÖZÜNMÜŞ OKSİJEN ÖLÇÜMÜ

Su sirkülasyon sisteminin çözünmüş oksijen miktarı oksimetre cihazı (WTW - Oxi 330) ile ölçülmüştür. Her kullanımdan önce cihaz kalibre edilmiştir.

3.9 TOPLAM ÇÖZÜNMÜŞ MADDE (TÇM) ANALİZİ

Sirkülasyon sistemlerinde su saf olarak buharlaşırken, mineraller su haznesinde çözünmüş olarak artar. Suyun iletkenliğinin artışıyla ideal bir elektrolit haline gelerek sonuç olarak istenmeyen korozyon ürünleri oluşmasını teşvik eder. Kondüktivitemetre cihazının (WTW LF 95 Conductivity Meter) ölçtüğü spesifik iletkenlik ile su içerisindeki toplam çözünmüş madde analizi yapılmıştır. Alınan sonuçlar µS (mikroSiemens) biriminden ppm (part per million) birimine çevrilmiştir. Ölçüm yapılmadan önce cihaz deiyonize su ve % 2 NaOH çözeltisi ile 25°C'de kalibre edilmiştir. Soğutma kuleleri için yapılması gereken deşarj rejimi, konsantrasyon oranı hesabı ile belirlenir. Deşarj suyunun TÇM değerinin şebeke suyu TÇM değerine oranı tank suyunun konsantrasyon oranını vermektedir [147].

3.10 TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) HAZIRLIK İŞLEMİ

Yüzeyleri biyofilm tabakasından arındırılan galvanizli çelik, amonyum hidroksit solüsyonuyla, paslanmaz çelik ise nitrik asitle sonikasyon yardımıyla temizlendikten sonra bu metallerin yüzeyi SEM ile incelenerek resimleri çekilmiştir [156].

3.11 SERBEST KLOR ÖLÇÜMÜ

Buharlaşma ve deşarj ile eksilen suyu, şebekeden tamamlanırken şebeke suyunun ve aylık olarak su sirkülasyon sisteminin serbest klor ölçümü yapılmıştır. 10 ml su örneği üzerine 3 damla orto-toluidin ayıracı damlatılıp çalkalandıktan sonra 5 dakika beklenmiştir. Süre sonunda oluşan renk, standart renk göstergesi ile karşılaştırılmıştır. Ölçüm kiti 0.2-5 ppm arasındaki miktarları tespit edebilmektedir.

3.12 LATEKS AGLÜTİNASYON

Seçici besiyerinde üremiş olan *L. pneumophila* türü bakterilerin serogruplarının belirlenmesinde lateks aglütinasyon kiti (OXOID) kullanılmıştır. Legionella lateks aglütinasyon kiti ile serolojik tanımlama yapılmadan önce, kuşkulu koloni bir damla fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edilerek otoaglütinasyon kontrolü yapılmıştır. Otoaglütinasyon gerçekleşmediğinden emin olduktan sonra süspansiyonun üzerine serogrup 1 antikoru damlatılmış, 30 saniye içinde aglütinasyon görüldüğünde sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir. 30 saniyeden sonra meydana gelecek aglütinasyon dikkate alınmamıştır. Aynı işlem serogrup 2-14 antikoru için de yapılmış ve sonuç kaydedilmiştir. Her iki antikorla da reaksiyon oluşturduğu durumlarda, aglütinasyonun antijene özgün olmadığı düşünülerek sonuç negatif olarak kaydedilmiştir [157].

3.13 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Yüzeylerdeki bakteri sayıları ve karbonhidrat miktarları açısından malzemeler arasında farklılığın olup olmadığını belirlemek için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Malzemelerin birbirleri arasındaki fark istatistiksel olarak Student Newman Keul'ün çoklu karşılaştırma testiyle gösterilmiştir [158]. İki deney süresince ölçülen parametreler arasındaki farklılık t-testi ile karşılaştırılmıştır. Her bir yüzeydeki bakteri sayısı ve EPS miktarı arasındaki ilişki korelasyon analizi ile gösterilmiştir. Bulgular bölümünde tüm bakteri sayıları 10 tabanındaki logaritması ($\log_{10}$) alınarak verilmiştir.

3.14 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.14.1 R2A Agar Besiyeri

Heterotrofik ve termofilik canlı bakteri sayısı tespitinde kullanılan R2A agar besiyeri bileşimi,

Maya özütü	0.5 g
Pepton	0.5 g
Kazein hidrolizatı	0.5 g

Glikoz	0.5 g
Nişasta	0.5 g
Sodyum pirüvat	0.3 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	0.3 g
Magnezyum sülfat	0.05 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml

121°C'de 15 dakika steril edilir.

3.14.2 Gentamisin-Sülfat Katkılı R2A Agar Besiyeri

Alg izolasyonu için kullanılan besiyeridir. Steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutulmuş R2A agar besiyerine 80 mg/l gentamisin-sülfat katılmasıyla hazırlanmıştır [153].

3.14.3 Tripton Soya Agar (TSA) Besiyeri

L. pneumophila'nın tanısında kullanılan TSA besiyeri bileşimi,

Tripton	15 g
Soya peptonu	5 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

121°C'de 15 dakika steril edilir.

3.14.4 Charcoal Yeast Extract (CYE) Agar

Legionellaceae familyasına dahil bakterilerin izolasyonunda kullanılan besiyeri bileşimi,

Aktif kömür	2 g
Maya özütü	10 g
Agar	13 g
Distile su	1000 ml

121°C'de 15 dakika steril edilir. 45-50°C'ye soğutulduktan sonra BCYE ve GVPC besiyeri katkı maddeleri üzerine eklenir.

3.14.5 BCYE Besiyeri Katkısı

Legionellaceae familyasına dahil bakterilerin üremesini sağlayan bu katkı maddesi 500 ml besiyeri için kullanılmıştır.

ACES tampon / Potasyum hidroksit	1 g
Ferrik pirofosfat	0.025 g
L-sistein	0.04 g
∝- ketoglutarat	0.1 g
Distile su	10 ml

3.14.6 GVPC Selektif Besiyeri Katkısı

Legionellaceae familyasına dahil bakterilerin, çevresel örneklerden izolasyonunda kullanılan GVPC selektif besiyeri katkı maddesi 500 ml besi ortamı için kullanılmıştır.

Glisin (amonyaksız)	1.5 g
Vankomisin hidroklorür	0.5 mg
Polimiksin B sülfat	39600 IU
Siklohekzimid	40 mg
Distile su	50 ml

3.14.7 Fosfat Tamponu (PBS)

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	7.3

121°C'de 15 dakika steril edilir.

3.14.8 Asit Hazırlanışı

Bir litre distile su üzerine 105 ml konsantre hidroklorik asit (HCl) eklenerek 1.2 mol/l HCl solüsyonu hazırlanmıştır. Bir litre distile su içinde 14.9 g potasyum klorür (KCl) eritilerek 0.2 mol/l KCl solüsyonu hazırlanıp 1.2 mol/l HCl solüsyonundan 3.9 ml ve 0.2 mol/l KCl solüsyonundan 25 ml alınıp karıştırılmıştır. Son olarak asit solüsyonunun

pH'sı, 1 mol/l potasyum hidroksit (KOH) yardımıyla pH 2.2'ye (±0.2) ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilerek karanlıkta cam şişede saklanmıştır.

4. BULGULAR

Bu bölümde, tespit edilen sessil-planktonik heterotrofik canlı bakteri ve *L. pneumophila* sayıları, karbonhidrat miktarları, pH, çözünmüş oksijen değerleri her iki deney süresi için ayrı alt başlıklarda verilmiştir.

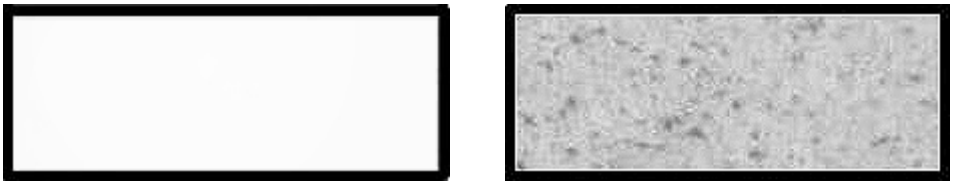
Deneyler esnasında su sirkülasyon sistemine verilen şebeke suyuna ait veriler İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi'nden (İSKİ) sağlanmıştır (Tablo 4.1). Buharlaşma ve deşarjlarla (blowdown) eksilen model sistem suyu yine şebeke suyu ile tamamlanmıştır (make-up). Ömerli tasfiye tesisinden çıkan suyun serbest klor miktarı 1.3 ± 0.1 ppm iken, tamamlama suyunun temin edildiği muslukta serbest klor değeri 0.3 ppm olarak ölçülmüştür. Deney tankında aylık olarak yapılmış ölçümlerde serbest klora rastlanmamıştır. Model sistem suyu TÇM değerinin şebeke suyu sisteminin 3 katından fazlasına ulaşmaması için düzenli deşarj (~ 3.5 l/gün) yapılmıştır [147].

Tablo 4.1: İSKİ'den sağlanan su kalite raporu

Parametre	**Miktar**
Mikrobiyolojik, bakteri/100 ml	
Koliform bakteri	0
Dezenfeksiyon yan ürünleri, mg/l	
Toplam trihalometanlar	21
Bromat	0
İnorganik kimyasallar, mg/l	
Alüminyum	0.165
Arsenik	0
Baryum	0.022
Kadmiyum	0
Krom (Toplam)	0
Çinko	0.016
Sülfat	39
Mangan	0.008
Bakır	0.003
Demir	0.035
Flor	0.07
Kurşun	0
Cıva	0
Nitrat	7.45
Selenyum	0
Gümüş	0
Antimon	0
Berilyum	0
Estetik, mg/l	
Klorür	3.3
Renk (birim)	2.5
Deterjanlar	0
Koku yapan geosmin maddeler MIB	0
Bulanıklık (NTU)	0.76
pH	7.0
Toplam Çözünmüş Madde (TÇM)	135
Ek parametreler, mg/l	
Kalsiyum	28
Sertlik ($CaCO_3$)	88
Magnezyum	5
Potasyum	2.78
Sodyum	17.7
Serbest klor	1.1
Amonyum	0.05

Tablodaki değerler Türk Standartları Enstitüsü, Dünya Sağlık Örgütü ve Avrupa Birliği'nin belirlediği standartların altındadır. Bulanıklık, pH, klorür, toplam sertlik ve bakiye klor değerleri tesis işletme laboratuvarlarının aylık ortalama değerleridir. Diğer parametreler atık su ve su kalite laboratuvarlarında yapılmış analizlerin aylık ortalamasıdır.

Her iki deney süresince yüzeylerde oluşan biyofilmin, çıplak gözle kolayca fark edilebilen, kahverengi, yüzeyden kolay kazınabilen, heterojen bir tabaka oluşturduğu gözlenmiştir. Besiyerine ekim sonucunda agar plakları üzerinde görülen kolonilerin küme halinde değil, birbirinden uzak olması biyofilmin iyi homojenize edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.1: 180 gün sonunda fayans üzerinde oluşmuş biyofilm tabakasının fotoğrafı (solda temiz yüzey, alan 10 cm^2)

Biyofilm tabakasının doğrudan mikroskobik incelenmesini kolaylaştırmak amacıyla su sistemine mikroskop lamları daldırılmıştır. Bu sayede biyofilm yapısı bozulmadan, kimyasal fiksasyonu takiben Gram yöntemiyle boyama yapılarak biyofilm kompozisyonu incelenebilmiştir. Mikroskobik preparatlarda mikrokolonilerin varlığı ve Gram negatif çomak bakterilerin yoğunluğu göze çarparken kok, spiral şekilli bakteriler, amipler, mantar sporları ve 180 gün sonunda Rotifera sınıfına ait ökaryotik canlılar da gözlenmiştir. Heterotrofik bakterilerinden ayrı olarak termofilik bakterilerin varlığını araştırmak için her ay R2A agar besiyerine biyofilm homojenatından ekim yapılmıştır, 55°C'de bekletilen agar plaklarında üreme olmamıştır [152]. Su sisteminde alglerin varlığını araştırmak amacıyla da her ay gentamisin-sülfat katkılı R2A besiyerine su fazından ekim yapılarak, ışık varlığında 22°C'de 30 gün boyunca takip edilmiş ve herhangi bir üremeye rastlanmamıştır [153].

Her iki deney süresince yüzeyler üzerinde ölçülen heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları arasındaki korelasyonun beklendiği üzere pozitif yönde ve anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < .05$). İki değişken arasındaki ilişkinin malzemeye bağlı olarak .91 ila .99 arasında olduğu gözlenmiştir.

4.1. BİRİNCİ DENEY SÜRESİ

Birinci deney süresinde, yüzeylerdeki heterotrofik canlı bakteri sayısı (HPC) açısından en kirli malzemenin galvanizli çelik, en temiz malzemenin polietilen iken, karbonhidrat açısından ise en kirli malzemenin galvanizli çelik, en temiz malzemenin de PVC olduğu

gözlenmiştir. Galvanizli çelik yüzeyinden 180 gün boyunca aylık olarak alınan örneklerde heterotrofik canlı bakteri sayısı ve karbonhidrat miktarının diğer malzemelere göre anlamlı derecede ($p < .05$) yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.2). Polietilenin 180 gün sonunda en az sayıda heterotrofik canlı bakteri barındırdığı, PVC'nin 180 gün sonunda en az miktarda karbonhidrat taşıdığı saptanmıştır (Şekil 4.9). Birinci deney süresinde 30 gün sonunda fayans ve GSS sessil heterotrofik bakteri sayısı, planktonik heterotrofik bakteri sayısından oldukça yüksek iken diğer malzemelerdeki sessil heterotrofik bakteri sayısı planktonik heterotrofik bakteri sayısına yakındır. Otuz gün sonunda plastik polimerlerin yüzeyinde birbirlerine yakın sayıda heterotrofik canlı bakteri olduğu ve bunların planktonik bakteri sayısından daha az sayıda oldukları gözlenmiştir (Tablo 4.2). Altmış gün sonunda plastik malzemelerin sessil heterotrofik bakteri sayısı, planktonik heterotrofik bakteri sayısından düşük bulunmuştur. Doksan gün sonunda, bir önceki analizlere oranla sessil heterotrofik bakteri sayısında anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6). Birinci deney süresi sonunda bakır ve GSS yüzeylerdeki sessil heterotrofik bakteri sayısı, planktonik heterotrofik bakteri sayısından yüksek bulunmuştur (Tablo 4.2). Model sistemde planktonik heterotrofik canlı bakteri sayılarının yaklaşık 100 gün sonra plato fazına girerek daha fazla artmadıkları gözlenmiştir (Şekil 4.11). Yapılan istatistiksel çoklu karşılaştırma analizi ile 180 gün sonunda, yüzeylerdeki bakteri sayısı itibariyle PE malzemenin diğer tüm malzemelerden anlamlı derecede düşük sayıda bakteri taşıdığı, galvanizli çelik sacın ise en yüksek sayıya sahip olduğu gözlenmiştir. PVC, cam ile paslanmaz çelik arasında bakteriyel kirlilik açısından anlamlı fark olmadığı da kaydedilmiştir (Şekil 4.9). Düzenli deşarjlara rağmen kadmiyum, çinko, kurşun ve demir miktarlarında artış saptanmıştır (Tablo 4.4).

Yüzeylerde biriken EPS miktarının tayininde kullanılan fenol-sülfürik asit metoduyla ölçülen karbonhidrat miktarları itibariyle PVC yüzeyin, diğer tüm malzemelerden anlamlı derecede düşük düzeyde, galvanizli çelik sacın ise en yüksek düzeyde karbonhidrat taşıdığı gözlenmiştir. PE yüzey, en düşük sayıda bakteri taşıyan malzeme olmasına karşın karbonhidrat yükü bakımından sekiz malzeme arasında beşinci sırada yer almıştır (Şekil 4.9). Malzemeler 180 gün boyunca üzerlerinde oluşan bakteriyel ve polimerik birikim açısından tek tek ele alındığında PVC üzerinde 60 ila 90. günler arasında hızlı bir artış görülürken karbonhidrat miktarında bir artış görülmemiştir

(4.12). PP, PE, cam, paslanmaz çelik ve galvanizli çelik sac malzemelerde 90 gün sonrasında bakteri üremesi ve karbonhidrat üretiminin çok artmadığı görülmektedir (Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.19). Bakır ve fayans yüzeylerde 120 ve 150. günler arasında bakteri sayılarında büyük bir artış kaydedilmiştir (Şekil 4.17 ve 4.18). Deney tankı içinde farklı yüksekliklere sabitlenmiş cam üzerinde oluşan biyofilm tabakasında her iki yüzeyde bakteri sayısı ya da karbonhidrat miktarı açısından anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir.

Sistemden düzenli olarak deşarjla su atılmasıyla TÇM konsantrasyonun artışı önlemiş olsa da, deney süresince pH ve çözünmüş oksijen değerleri zaman içinde artmıştır (Tablo 4.3 ve Şekil 4.10). Başlangıçta 6.58 olan pH değeri ve 7.40 mg/l olan çözünmüş oksijen miktarı artarak, 180 gün sonunda pH 8.42, çözünmüş oksijen miktarı ise 8.49 mg/l değerine ulaşmıştır.

Tablo 4.2: Birinci deney süresince malzemeler üzerinde ve serbest formda tespit edilmiş olan heterotrofik canlı bakteri sayıları. Veriler, üç tekrarlı analizlerin ortalamalarıdır ve $\log_{10}$ tabanında verilmiştir

	HPC											
	30. gün		60. gün		90. gün		120. gün		150. gün		180. gün	
Malzeme	**P***	**S****	**P**	**S**	**P**	**S**	**P**	**S**	**P**	**S**	**P**	**S**
PCV	3.22	2.93	3.99	3.04	5.53	5.26	5.53	5.28	5.53	5.27	5.53	5.26
PP	3.22	2.99	3.99	3.44	5.53	5.46	5.53	5.47	5.53	5.46	5.53	5.45
PE	3.22	3.09	3.99	3.58	5.53	4.93	5.53	4.95	5.53	4.96	5.53	4.97
Cam	3.22	3.25	3.99	3.75	5.53	5.25	5.53	5.28	5.53	5.27	5.53	5.28
SS	3.22	3.30	3.99	3.78	5.53	5.28	5.53	5.30	5.53	5.29	5.53	5.31
Bakır	3.22	3.32	3.99	3.79	5.53	4.60	5.53	4.68	5.53	5.61	5.53	5.66
Fayans	3.22	3.57	3.99	3.8	5.53	4.47	5.53	4.53	5.53	5.50	5.53	5.51
GSS	3.22	4.43	3.99	5.26	5.53	5.69	5.53	5.73	5.53	5.69	5.53	5.70

P* : planktonik

S** : sessil

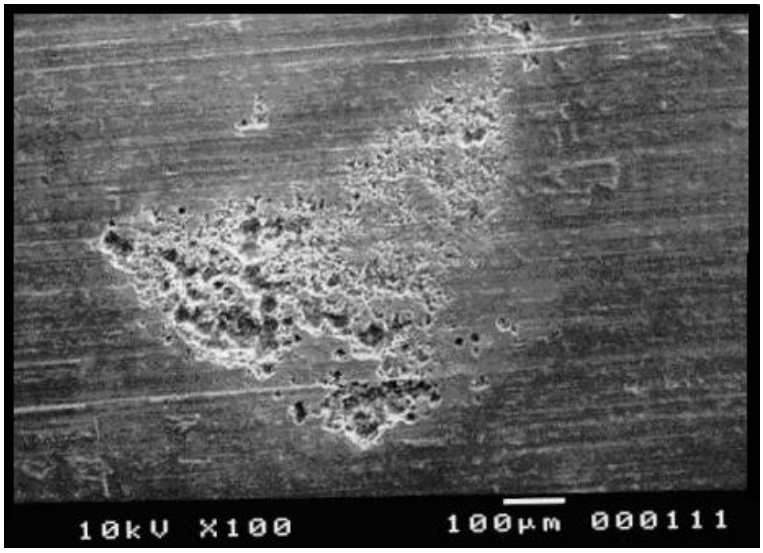
Tablo 4.3: Birinci deney süresince aylara göre ölçülen pH, çözünmüş oksijen, TÇM miktarları ve konsantrasyon oranları

Aylar	pH	Çözünmüş oksijen (mg/l)	Deşarj suyu TÇM (ppm)	Şebeke suyu TÇM (ppm)	Konsantrasyon oranı
1	6.58	7.40	281	110	281 / 110 = 2.55
2	7.64	7.90	320	113	320 / 113 = 2.83
3	7.60	7.30	304	109	304 / 109 = 2.78
4	8.30	7.30	311	108	311 / 108 = 2.87
5	8.53	8.53	299	107	299 / 107 = 2.79
6	8.42	8.49	303	110	303 / 110 = 2.75

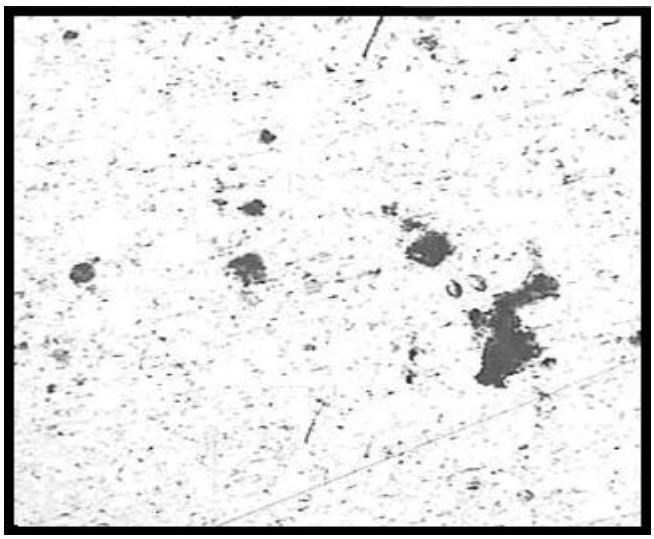
Tablo 4.4: Birinci deney süresince aylara göre ölçülen ağır metal miktarları (± standart sapma). Ağır metal verileri yapılan 3 ölçümün ortalamasıdır

Aylar	Kadmiyum (mg/l)	Çinko (mg/l)	Kurşun (mg/l)	Demir (mg/l)
0	0	0.016 ± 0.002	0	0.035 ± 0.009
1	0.0035 ± 0.0002	3.0538 ± 0.22	0.1426 ± 0.034	0.0456 ± 0.0023
2	0.0074 ± 0.0005	3.2710 ± 0.48	0.2426 ± 0.060	0.0789 ± 0.0029
3	0.0303 ± 0.0009	3.0555 ± 0.52	0.7256 ± 0.075	0.0885 ± 0.0052
4	0.0310 ± 0.0011	3.1225 ± 0.18	1.0068 ± 0.110	0.0952 ± 0.0099
5	0.0319 ± 0.0011	3.1240 ± 0.20	1.0102 ± 0.095	0.0980 ± 0.0075
6	0.0325 ± 0.0009	3.1300 ± 0.16	1.0110 ± 0.088	0.0990 ± 0.0083

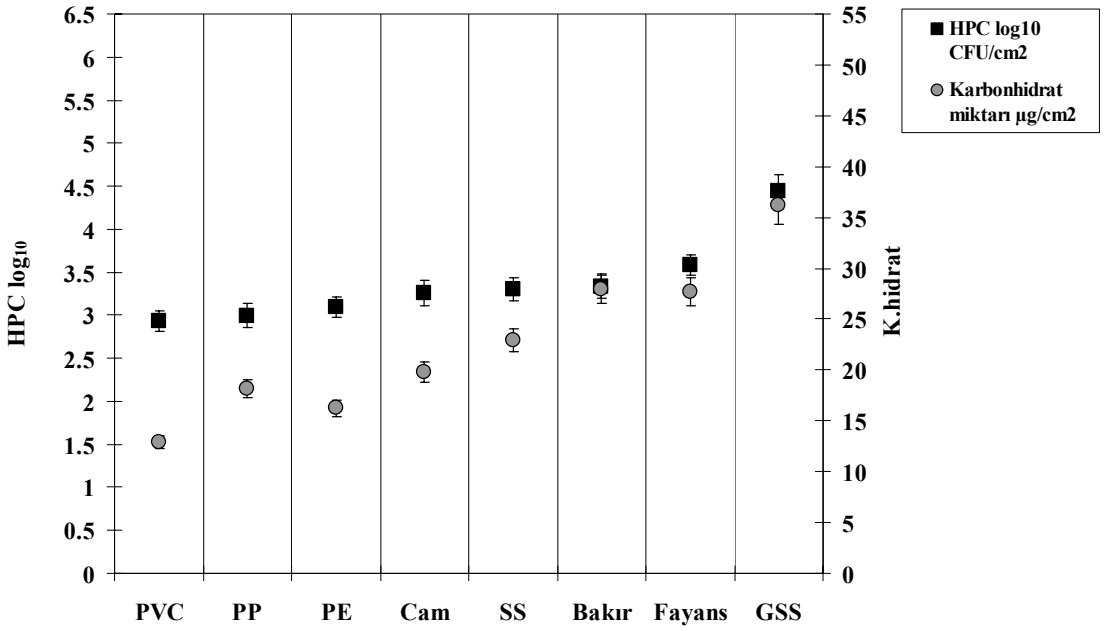
Birinci deney süresi sonunda galvanizli çelik ve paslanmaz çelik üzerinde bölgesel korozyon alanları gözlenmiştir. 180 gün sonunda SEM fotoğrafında galvanizli çelik sac ve ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafta paslanmaz çelik sac üzerinde oluşmuş korozyon alanları Şekil 4.2 ve 4.3'te görülmektedir.



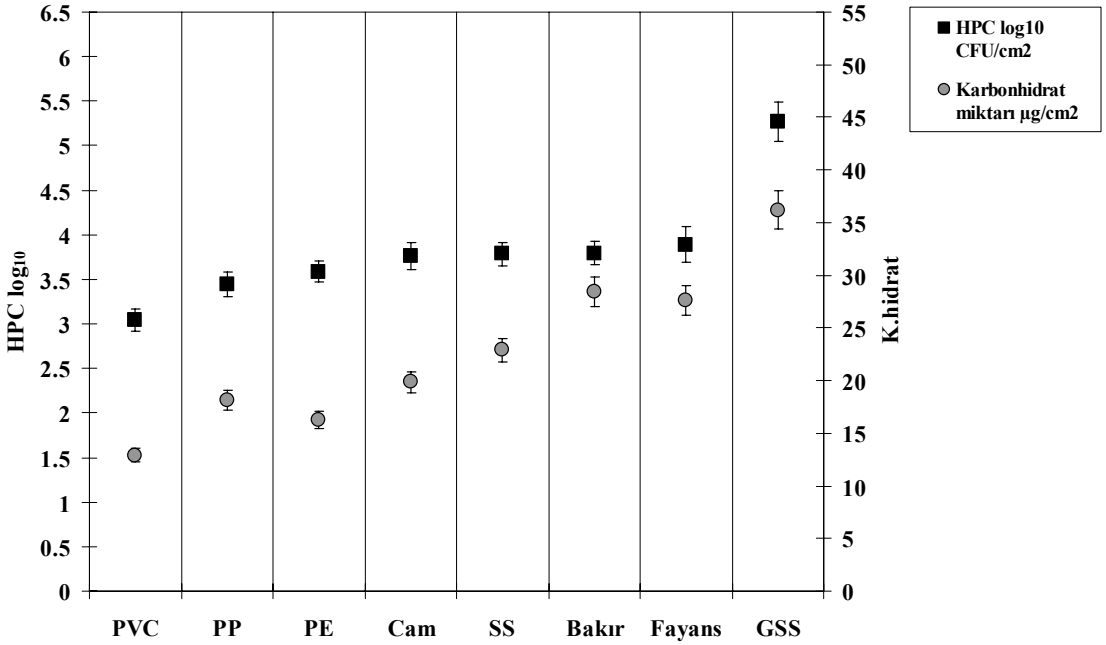
Şekil 4.2: SEM fotoğrafında galvanizli çelik sac üzerinde oluşmuş korozyon oyukları (Bar: 100 µm)



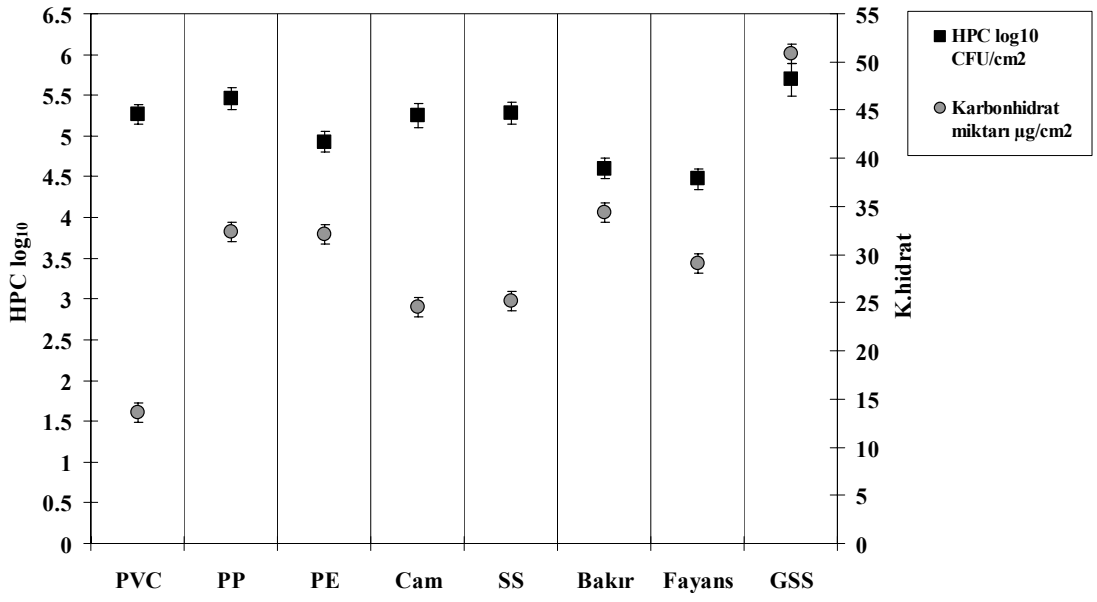
Şekil 4.3: Işık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafta paslanmaz çelik sac üzerinde oluşmuş korozyon alanları



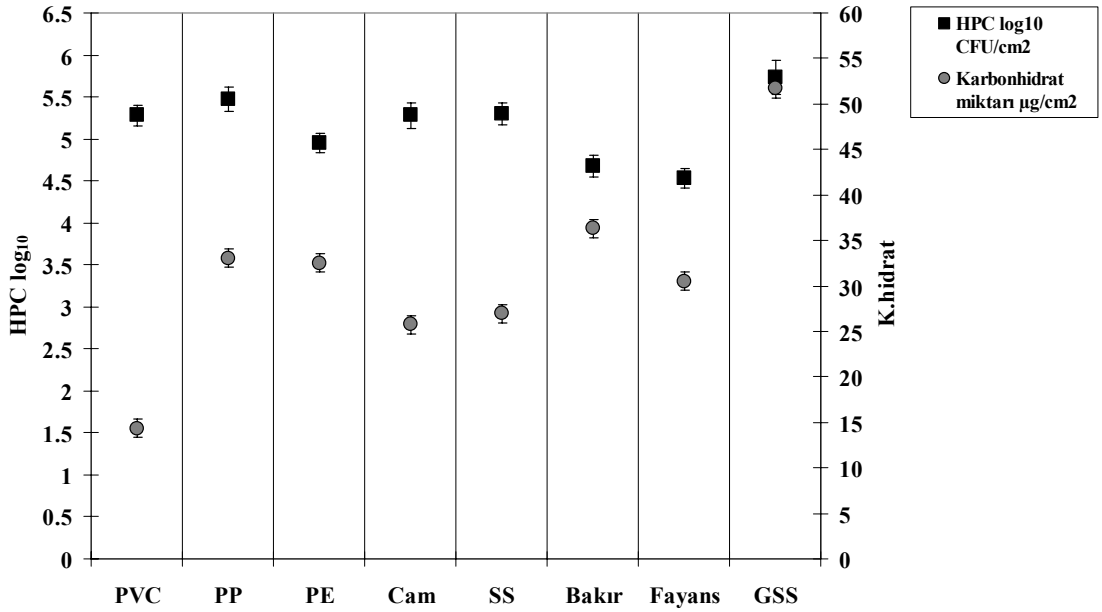
Şekil 4.4: Birinci deney süresinde 30. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri sayıları ve karbonhidrat miktarları. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir. **CFU**: Koloni oluşturan birim (Colony Forming Unit), **HPC**: Heterotrofik bakteri sayısı (Heterotrophic Plate Count)



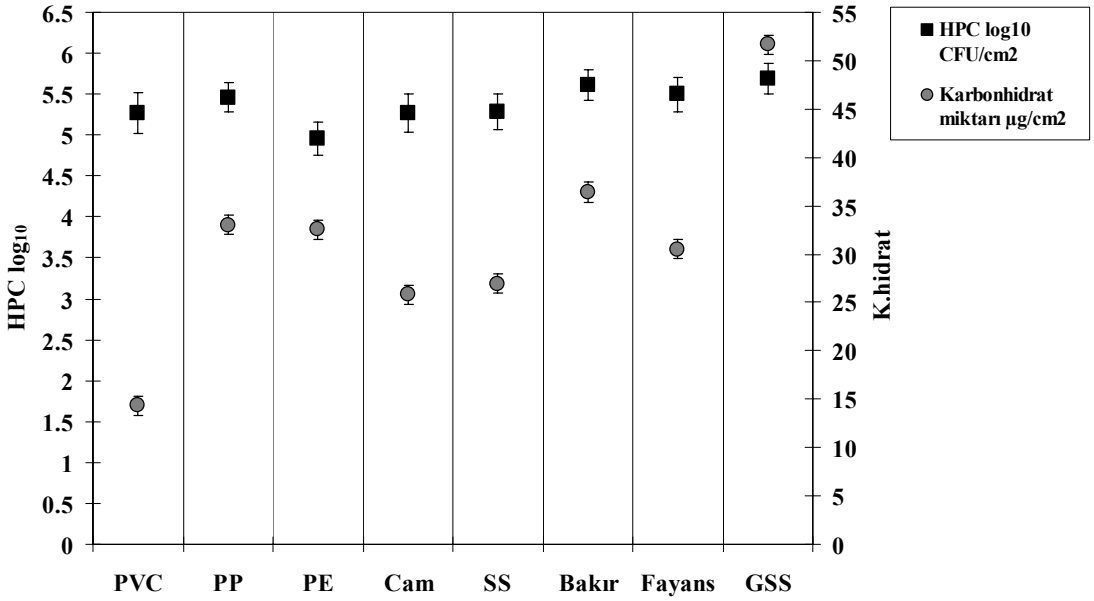
Şekil 4.5: Birinci deney süresinde 60. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



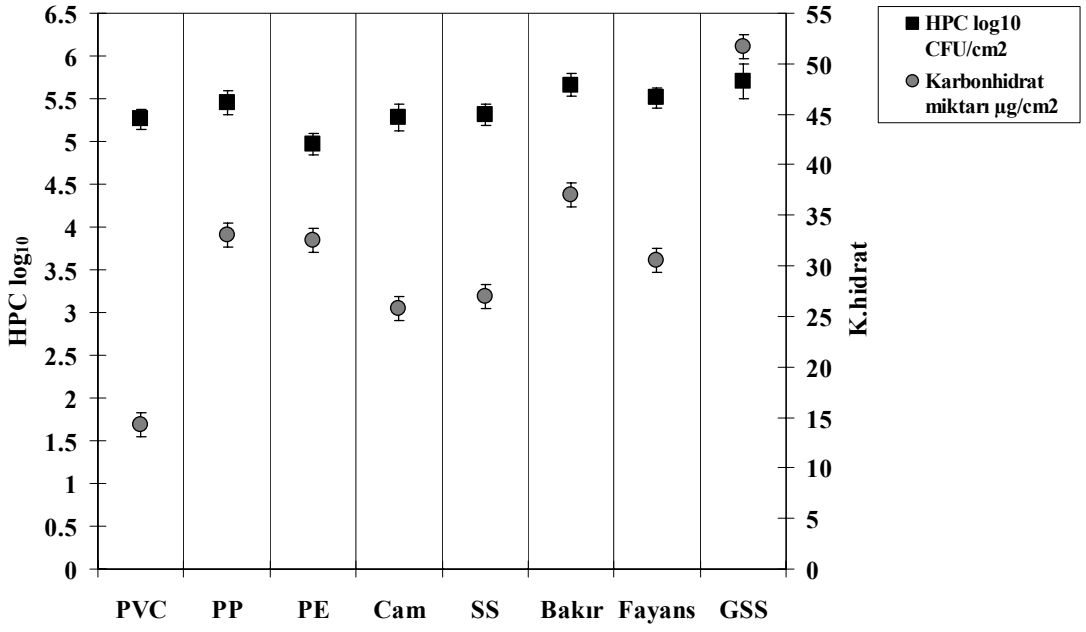
Şekil 4.6: Birinci deney süresinde 90. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



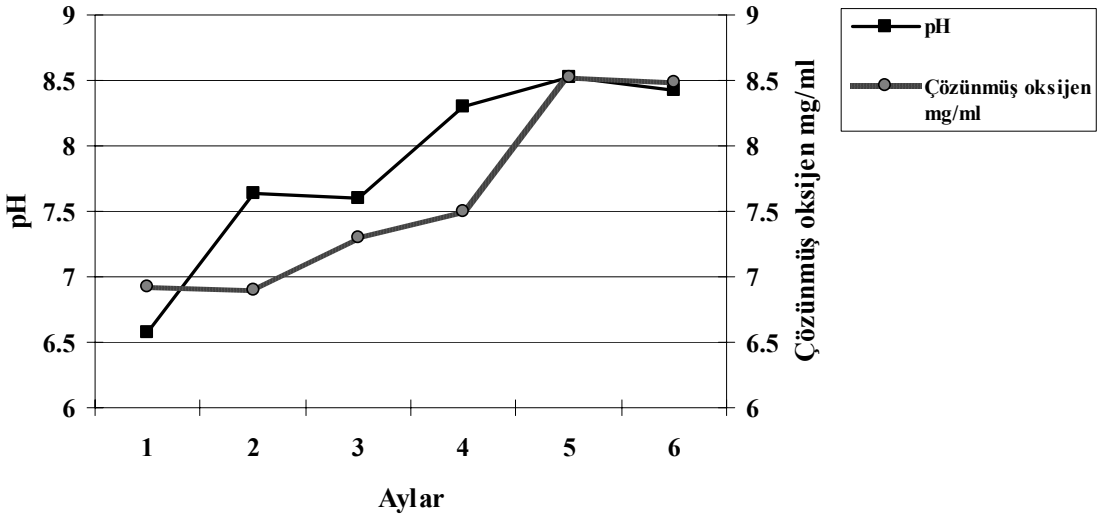
Şekil 4.7: Birinci deney süresinde 120. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



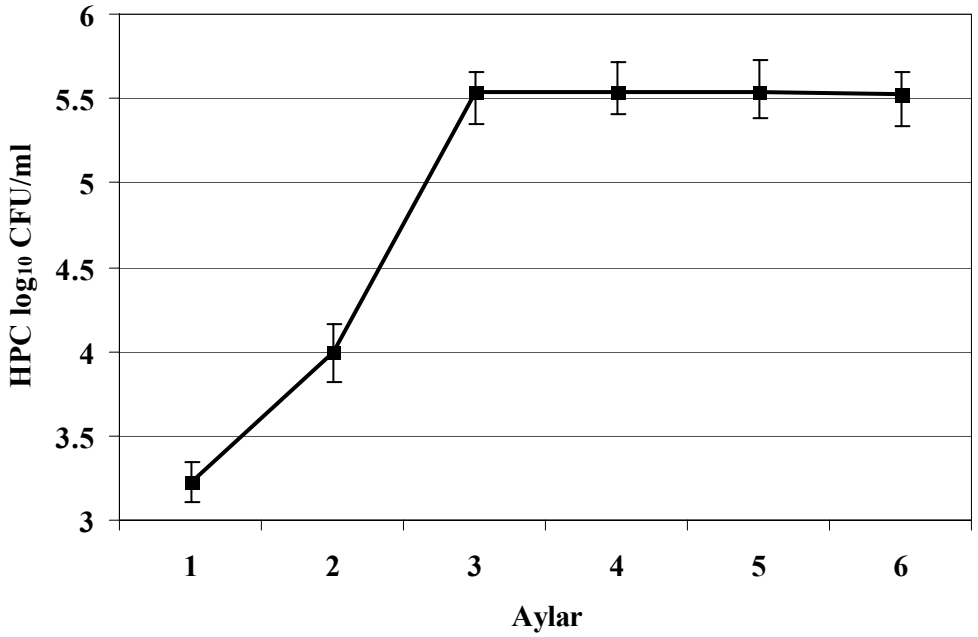
Şekil 4.8: Birinci deney süresinde 150. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



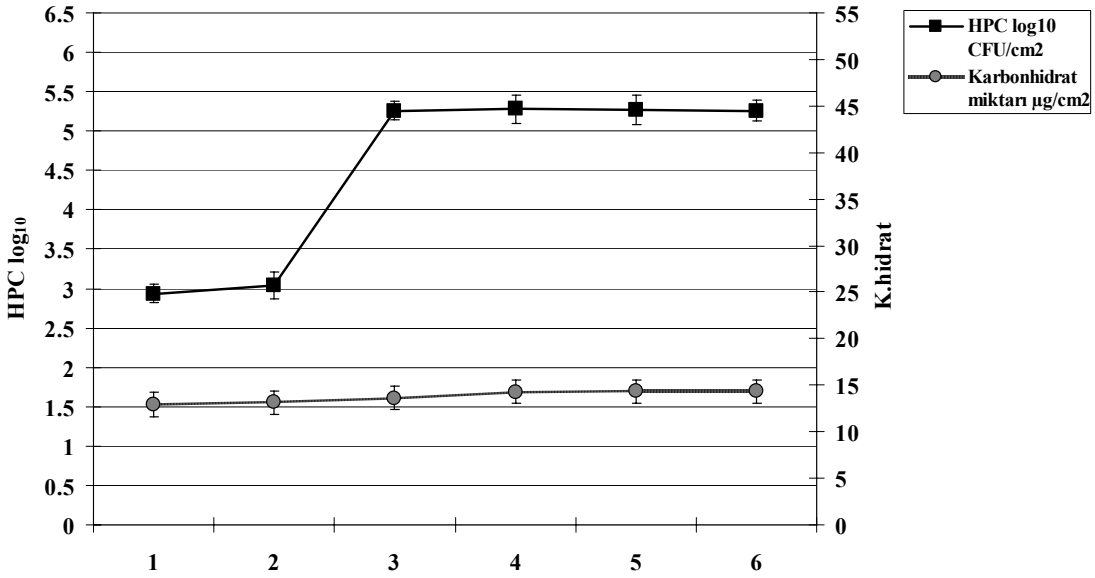
Şekil 4.9: Birinci deney süresinde 180. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



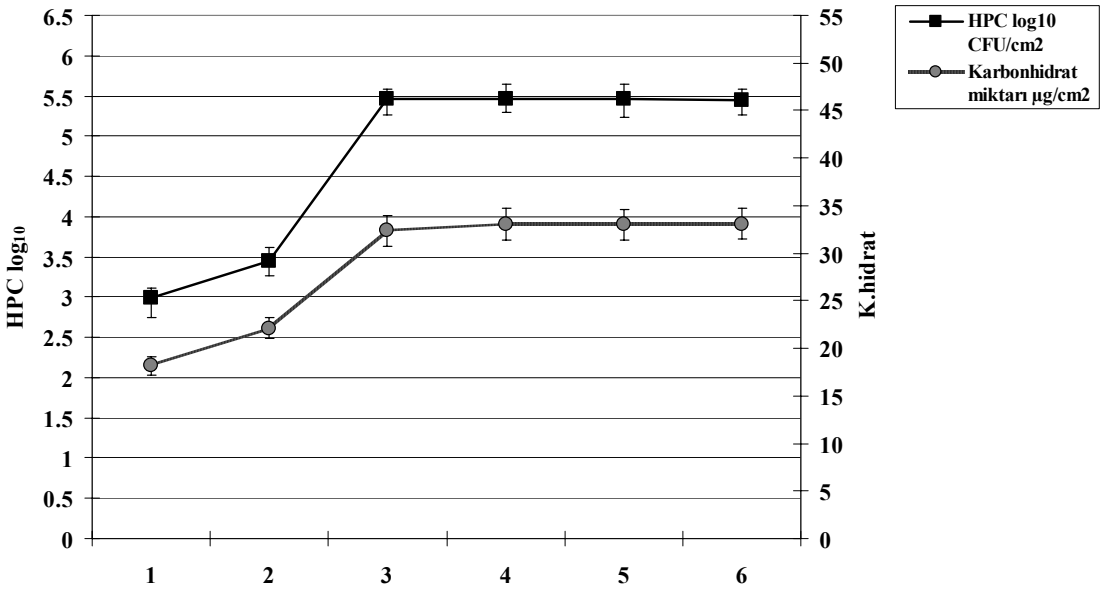
Şekil 4.10: Birinci deney süresince suyun pH ve çözünmüş oksijen değerleri



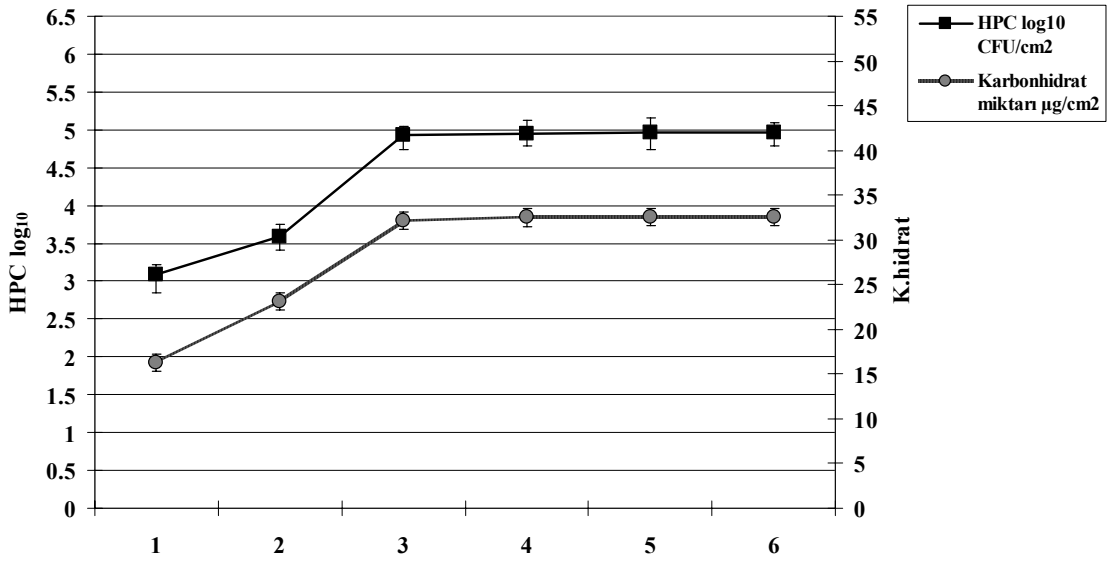
Şekil 4.11: Birinci deney süresince ölçülmüş aylık planktonik heterotrofik canlı bakteri sayıları. HPC başlangıç (0. saat) değeri 1.36 $\log_{10}$ CFU/ml'dir



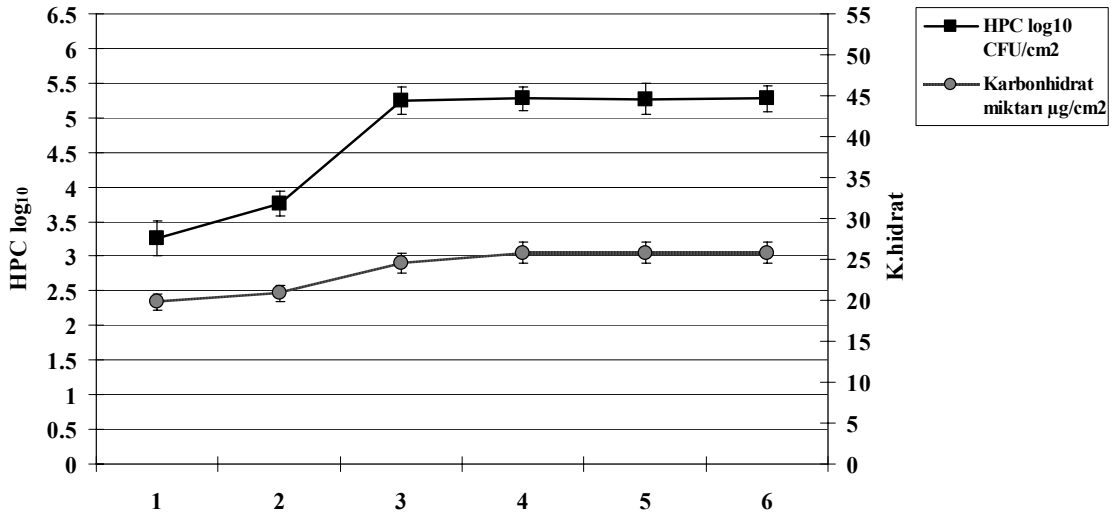
Şekil 4.12: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca PVC üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



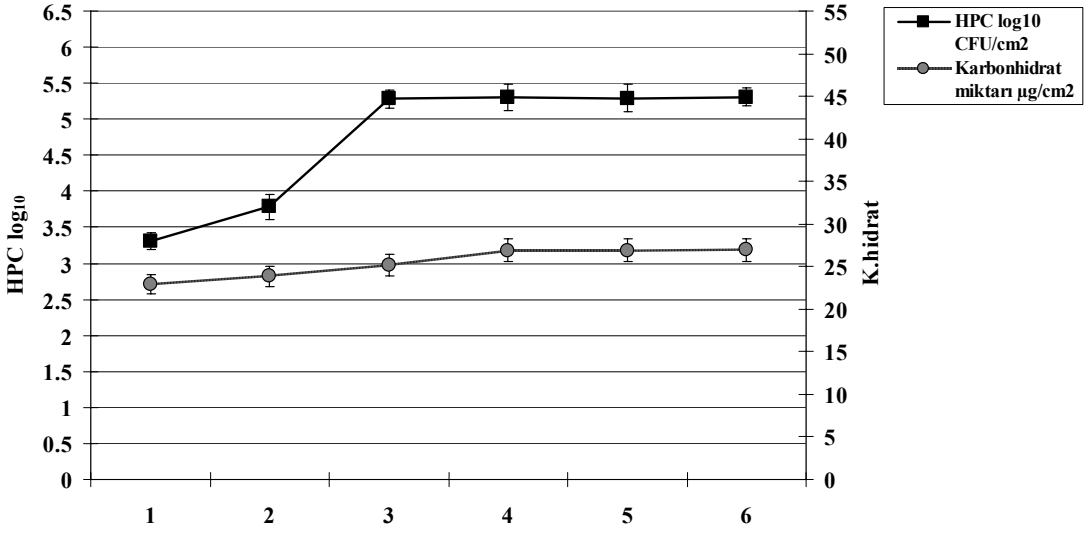
Şekil 4.13: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca PP üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



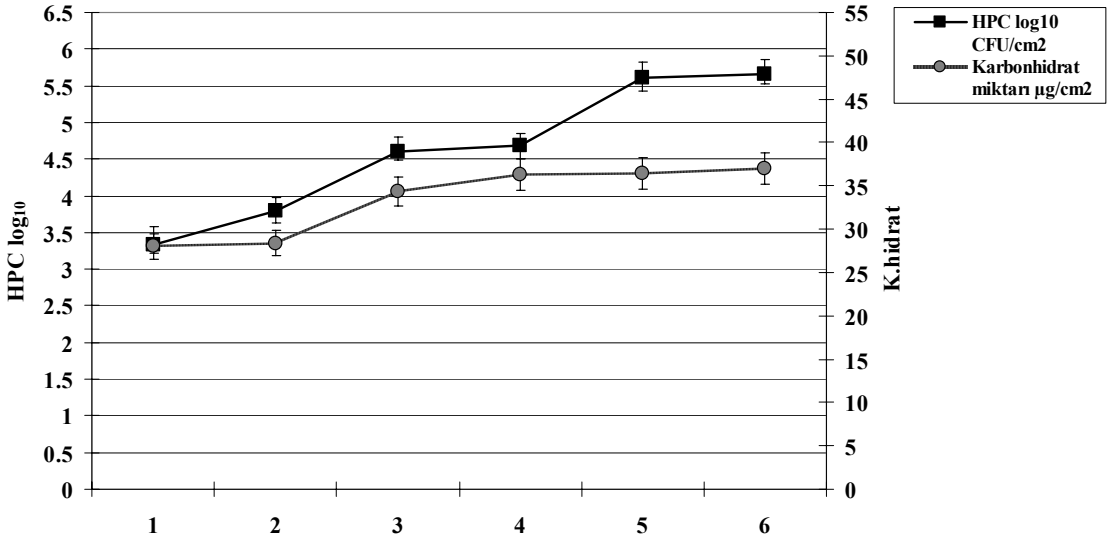
Şekil 4.14: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca PE üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



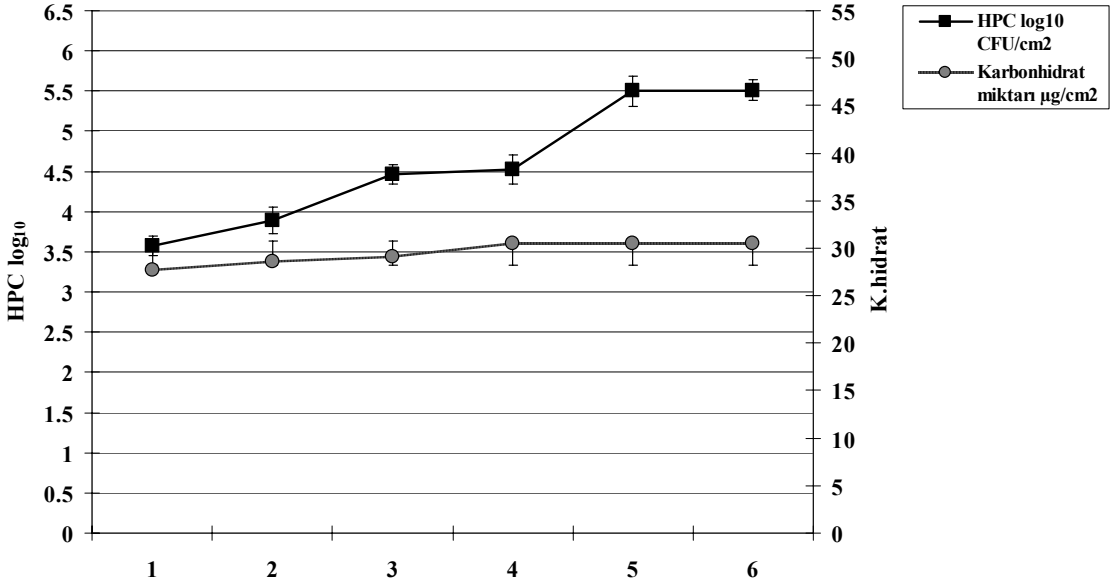
Şekil 4.15: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca cam üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



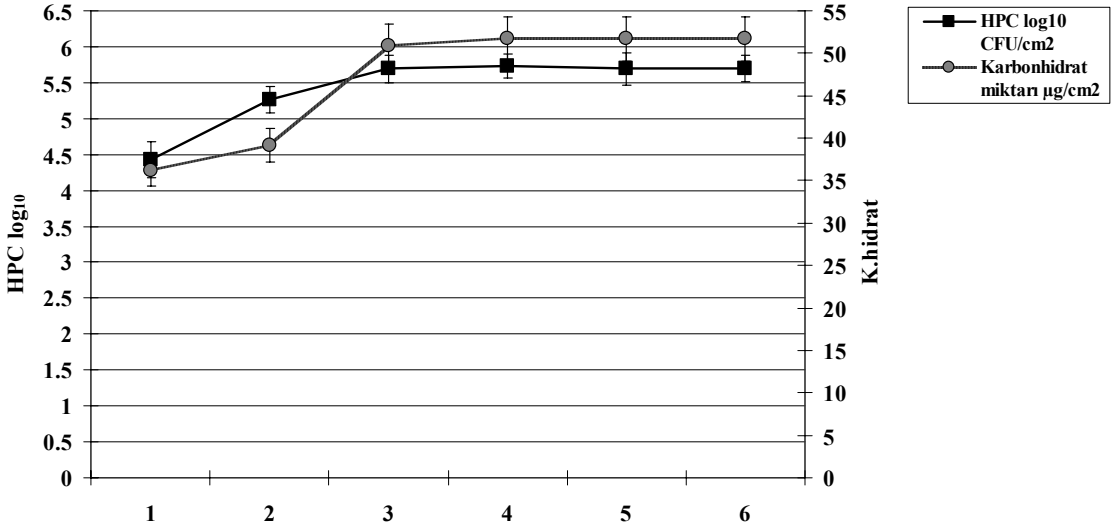
Şekil 4.16: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca paslanmaz çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.17: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca bakır üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.18: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca fayans üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.19: Birinci deney süresinde 180 gün boyunca galvanizli çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri ve karbonhidrat miktarları

4.2. İKİNCİ DENEY SÜRESİ

İkinci deney süresince yüzeylerden kazınan biyofilm tabakasında ölçülen heterotrofik canlı bakteri sayıları, karbonhidrat miktarları, suda ölçülen pH ve çözünmüş oksijen değerleri birinci deney süresinde ölçülenler ile benzer bulunmuşlardır. Yapılan istatistiksel karşılaştırma sonucunda iki deney süresi arasında yukarıda adı geçen parametreler arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. İkinci deney süresi sonunda *L. pneumophila* bakterisi en az sayıda PVC üzerinde bulunurken, en yüksek sayıya galvanizli sac üzerinde ulaşmıştır (Tablo 4.5). *L. pneumophila* bakterisi, kendisine toksik etkisi bilinen bakır yüzeyde dahi paslanmaz çelik yüzeyde ürediği kadar üremiştir.

L. pneumophila bakterisi açısından ilk 30 gün sonunda planktonik sayı, yüzeydekilerken yüksek değerde bulunmuştur (Tablo 4.5 ve Şekil 4.20). Bu bakterinin 60 gün içinde yüzeylerde hızla, neredeyse heterotrofik bakterilere yakın sayıda ürerken, sonraki aylarda üremesi yavaşlamış ama durmamıştır (Şekil 4.21). Model sistem suyunda planktonik *L. pneumophila* sayılarının yaklaşık 100 gün sonra plato fazına girerek daha fazla artmadıkları kaydedilmiştir (Şekil 4.27). İlk 30 gün sonunda yüzeydeki en yüksek *L. pneumophila* sayısı PP üzerinde, en düşük sayı ise paslanmaz çelik üzerinde gözlenmiştir (4.20). *L. pneumophila* sayısı, 60. günden sonra galvanizli çelik sac üzerindeki heterotrofik bakteri sayıları ile beraber artmış olmasına rağmen tüm malzemeler üzerinde aynı durum gözlemlenmemiştir (Şekil 4.21, 4.22, 4.23 ve 4.24). Plastik polimerler, paslanmaz çelik ve bakır üzerindeki *L. pneumophila* sayıları diğer malzemelere oranla düşük düzeyde kalmış ve kendi aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Özellikle fayans ve galvanizli çelik üzerinde diğer malzemelere göre anlamlı derecede yüksek sayıda *L. pneumophila* birikimi gerçekleşmiştir (4.25). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda da *L. pneumophila* sayısı ile heterotrofik bakteri sayıları arasında bir korelasyon saptanamamıştır. *L. pneumophila* fayans ve galvanizli çelik sac dışındaki yüzeylerde bakterileri 180 gün boyunca hafif bir artış eğilimi içindeyken, fayans ve galvanizli çelik sac üzerinde ise 60 ile 90. günler arasındaki dönemde anlamlı bir artış ile çoğalmışlardır (Şekil 4.34 ve 4.35).

Sistemden düzenli olarak deşarjla su atılmasıyla TÇM konsantrasyonun artışı önlemiş olsa da, deney süresince pH ve çözünmüş oksijen değerleri zaman içinde artmıştır (Tablo 4.6 ve Şekil 4.26). Başlangıçta 6.61 olan pH değeri ve 7.23 mg/l olan çözünmüş oksijen miktarı artarak, 180 gün sonunda pH 8.60, çözünmüş oksijen miktarı ise 8.49 mg/l değerine ulaşmıştır.

Tablo 4.5: İkinci deney süresince malzemeler üzerinde ve serbest formda tespit edilmiş olan *L. pneumophila* sayıları. Veriler, üç tekrarlı analizlerin ortalamalarıdır ve $\log_{10}$ tabanında verilmiştir

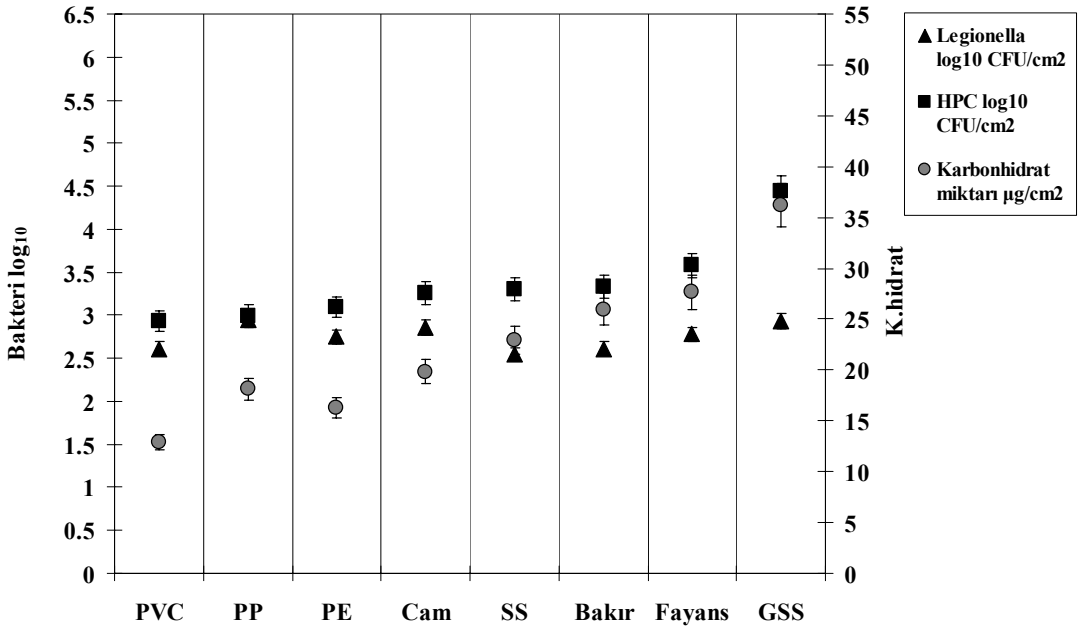
	L. pneumophila											
	30. gün		60. gün		90. gün		120. gün		150. gün		180. gün	
Malzeme	**P***	**S****	**P**	**S**	**P**	**S**	**P**	**S**	**P**	**S**	**P**	**S**
PCV	3.17	2.61	3.23	2.96	3.30	2.99	3.31	3.00	3.32	3.00	3.32	3.00
PP	3.17	2.95	3.23	2.95	3.30	3.00	3.31	3.10	3.32	3.10	3.32	3.10
PE	3.17	2.75	3.23	3.05	3.30	3.18	3.31	3.20	3.32	3.20	3.32	3.20
Cam	3.17	2.86	3.23	3.15	3.30	3.50	3.31	3.55	3.32	3.55	3.32	3.55
SS	3.17	2.55	3.23	2.86	3.30	3.11	3.31	3.18	3.32	3.18	3.32	3.18
Bakır	3.17	2.61	3.23	2.91	3.30	3.13	3.31	3.20	3.32	3.20	3.32	3.20
Fayans	3.17	2.78	3.23	3.10	3.30	3.90	3.31	4.10	3.32	4.10	3.32	4.10
GSS	3.17	2.93	3.23	3.21	3.30	4.09	3.31	4.20	3.32	4.20	3.32	4.20

P* : planktonik

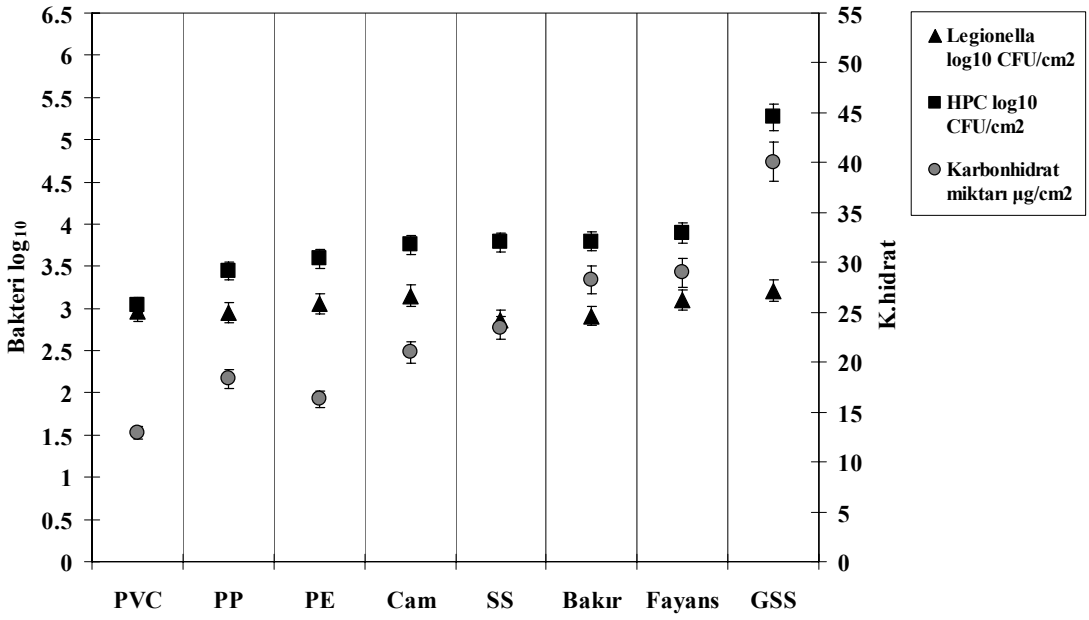
S** : sessil

Tablo 4.6: İkinci deney süresince ölçülen pH, çözünmüş oksijen, TÇM miktarları ve konsantrasyon oranları

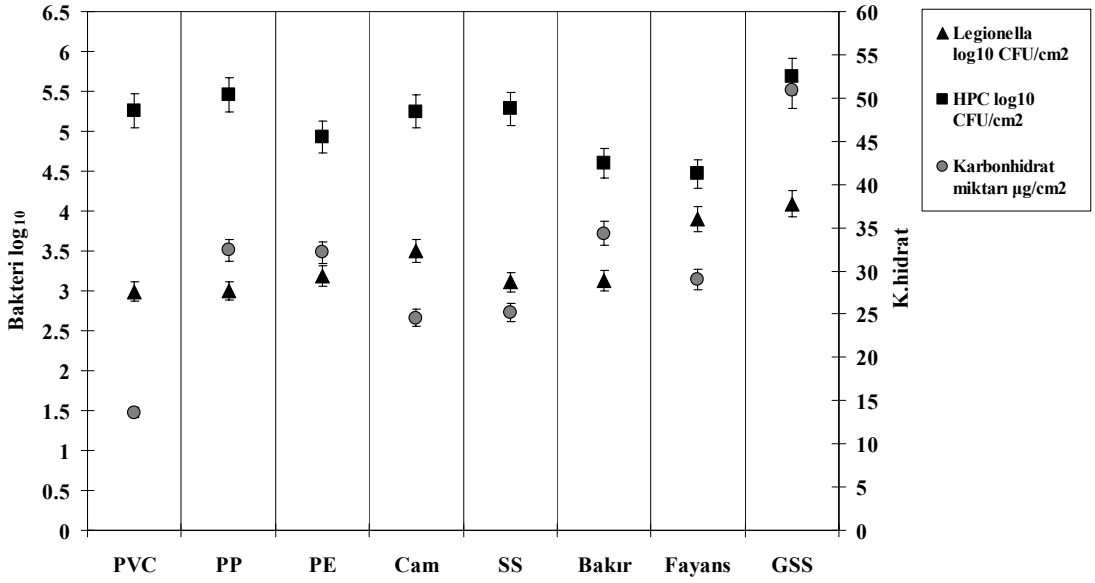
Aylar	**pH**	**Çözünmüş oksijen (mg/l)**	**Deşarj suyu TÇM (ppm)**	**Şebeke suyu TÇM (ppm)**	**Konsantrasyon oranı**
1	6.61	7.23	291	111	291 / 111 = 2.62
2	7.66	7.40	299	111	299 / 111 = 2.69
3	7.69	7.30	307	105	307 / 105 = 2.92
4	8.28	7.30	304	109	304 / 109 = 2.78
5	8.53	8.53	295	107	295 / 107 = 2.75
6	8.60	8.49	300	108	300 / 108 = 2.77



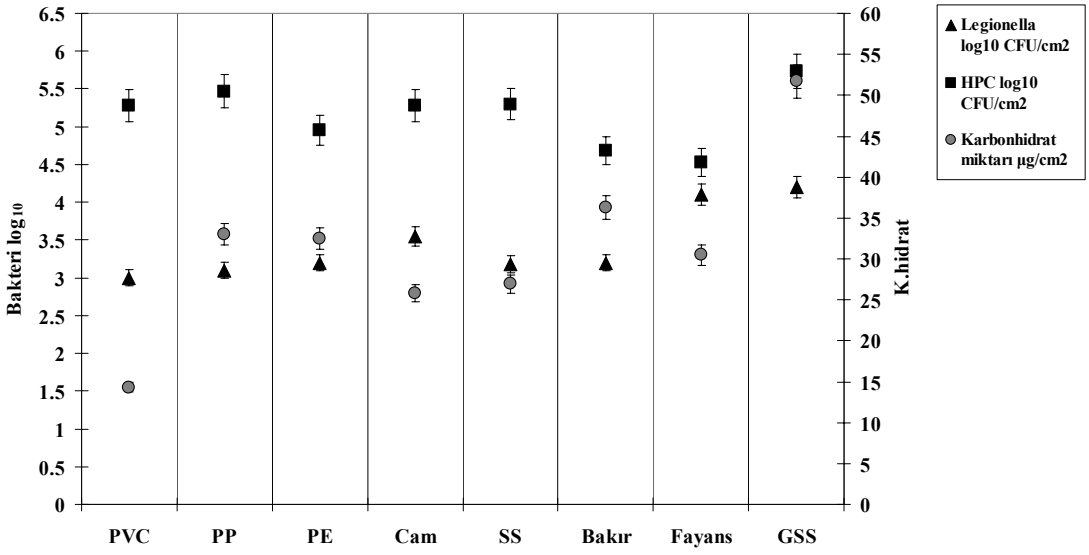
Şekil 4.20: İkinci deney süresinde 30. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



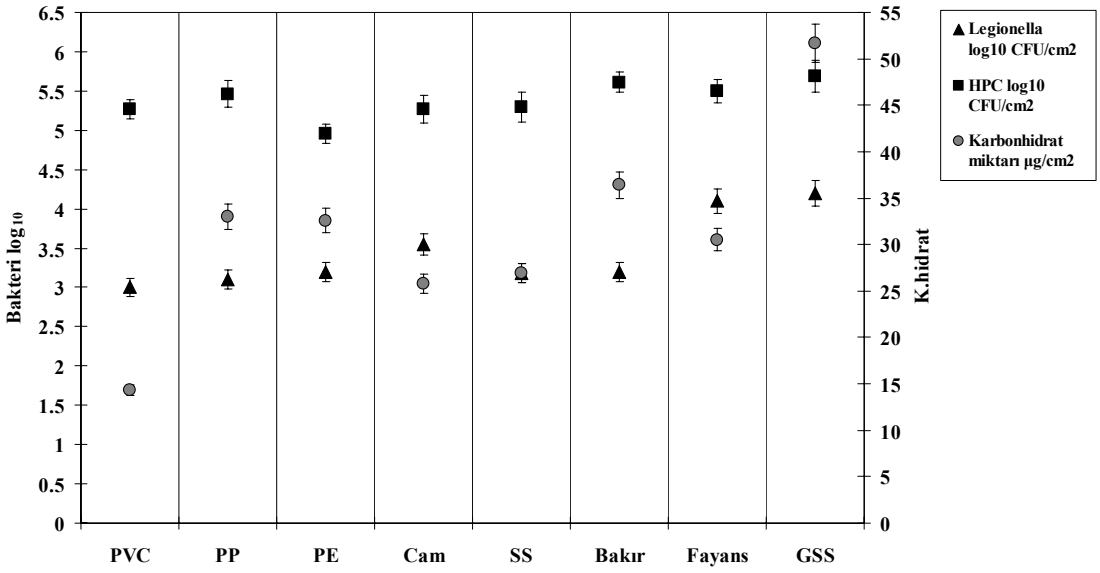
Şekil 4.21: İkinci deney süresinde 60. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



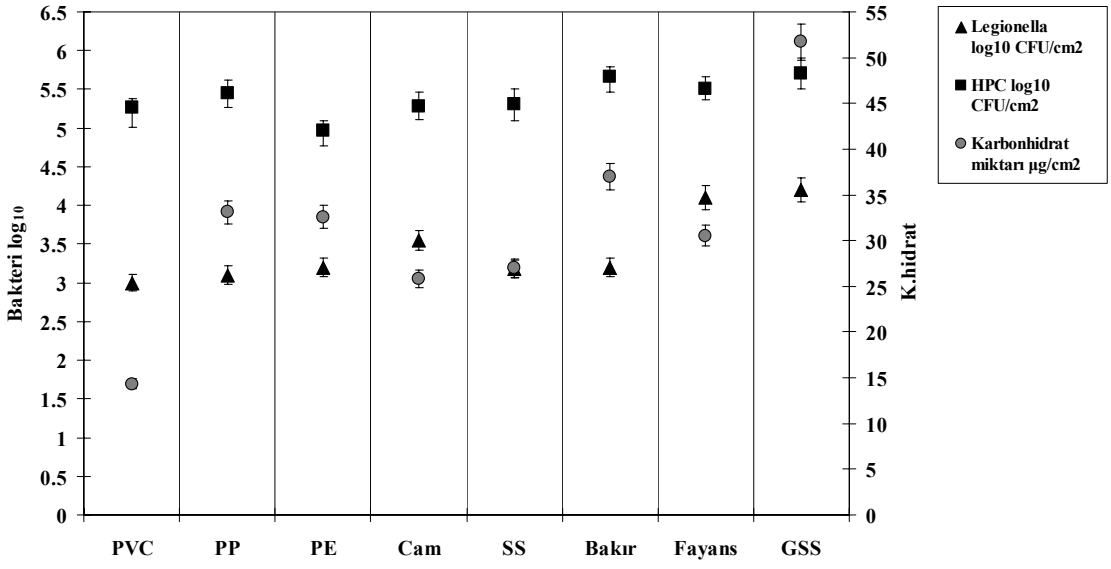
Şekil 4.22: İkinci deney süresinde 90. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



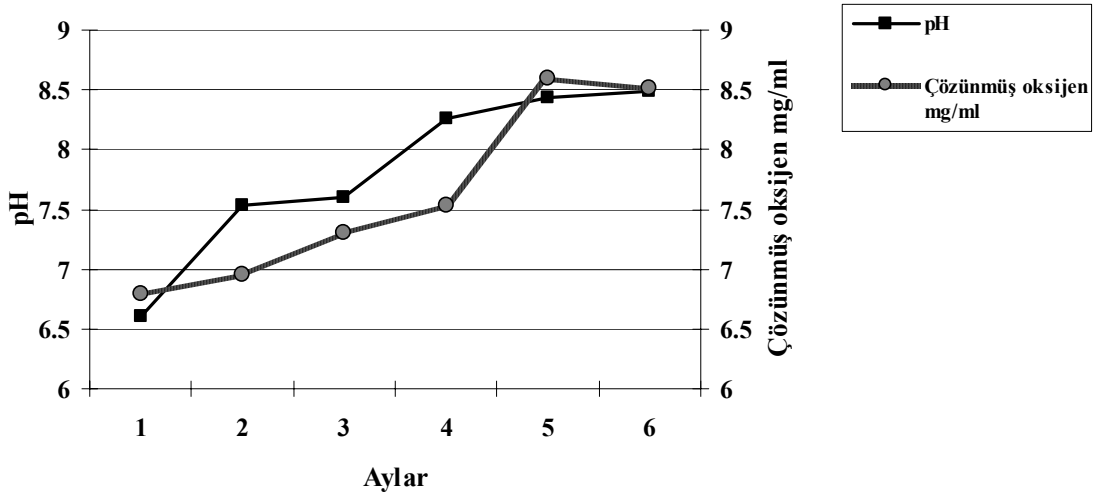
Şekil 4.23: İkinci deney süresinde 120. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



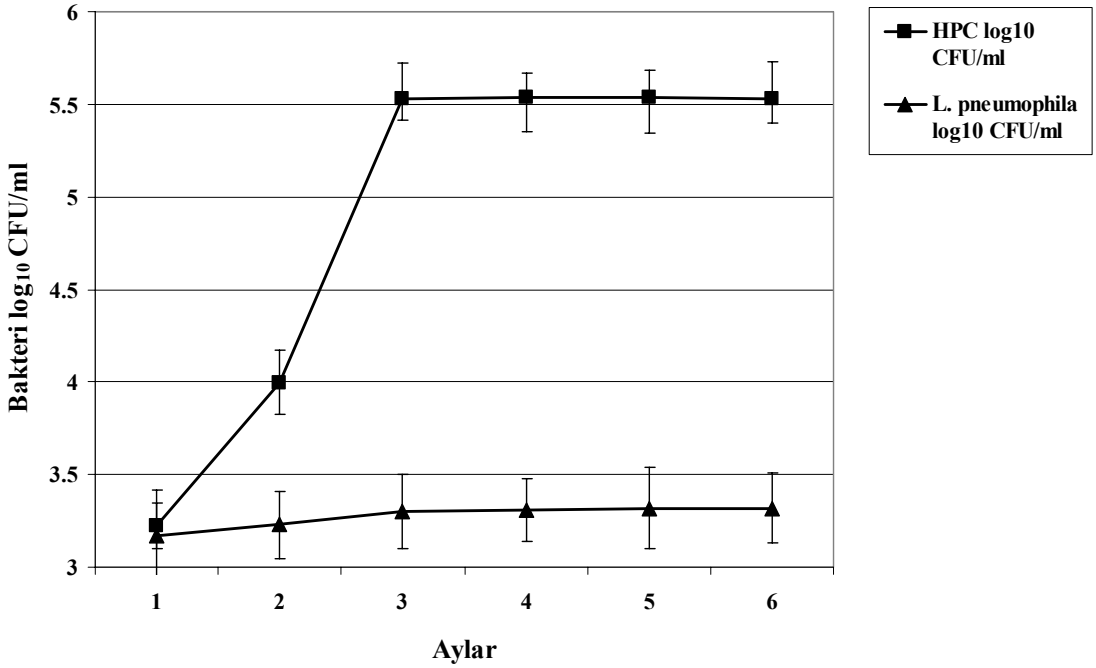
Şekil 4.24: İkinci deney süresinde 150. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



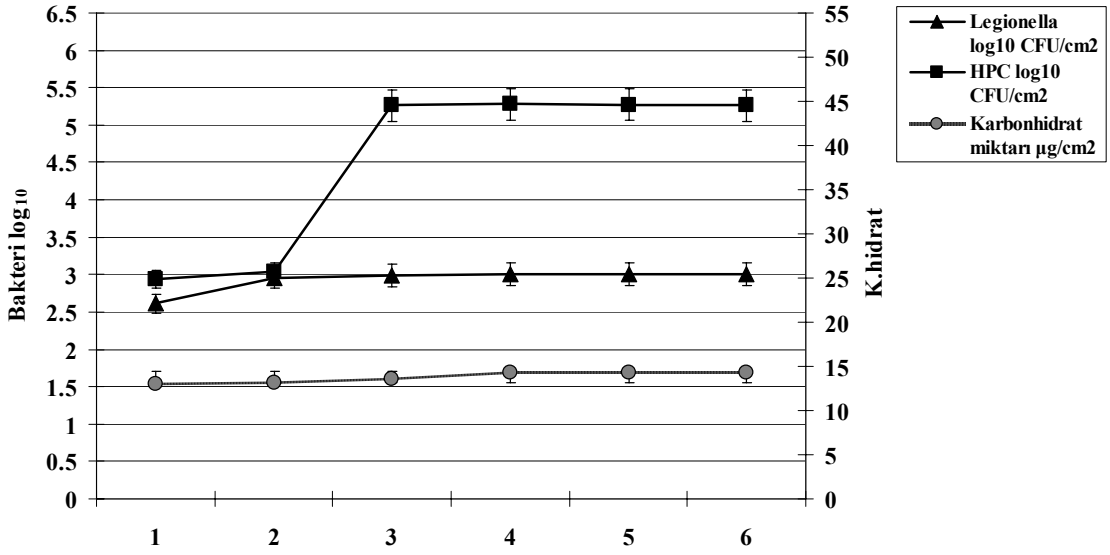
Şekil 4.25: İkinci deney süresinde 180. günde yüzeyler üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



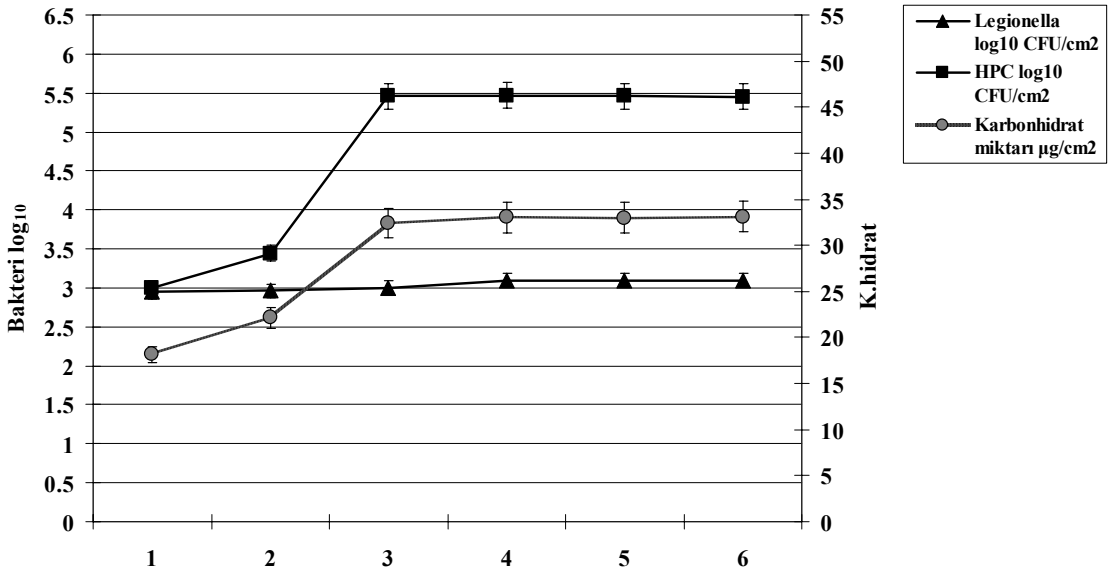
Şekil 4.26: İkinci deney süresince suyun pH ve çözünmüş oksijen değerleri



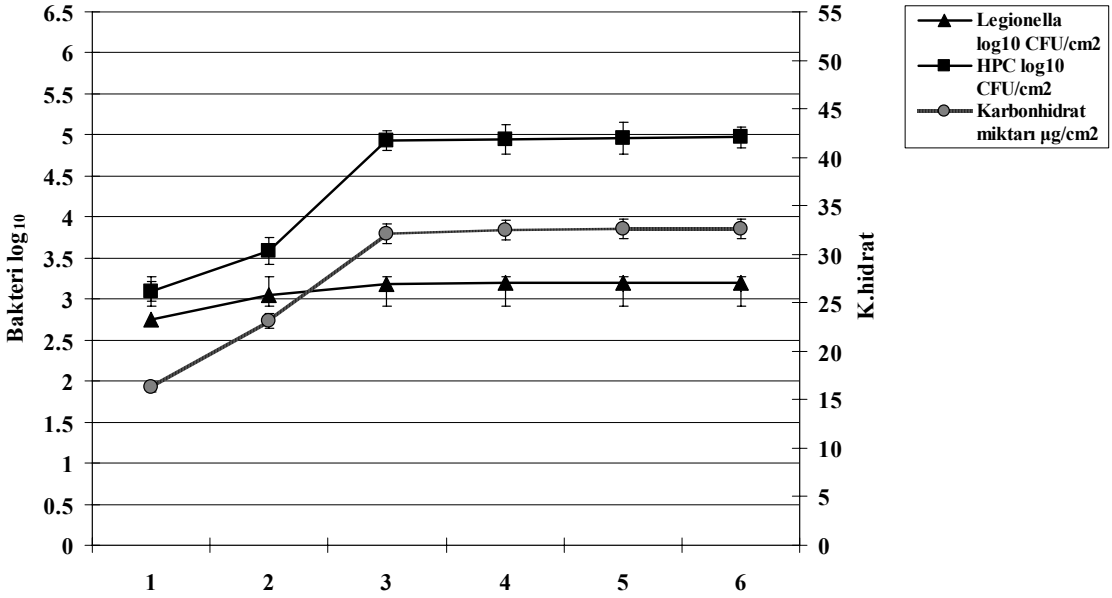
Şekil 4.27: İkinci deney süresince ölçülmüş aylık planktonik heterotrofik canlı bakteri ve *L. pneumophila* sayıları. HPC başlangıç (0. saat) değeri 1.37 $\log_{10}$ CFU/ml iken *L. pneumophila* başlangıç (inokülasyon miktarı) değeri 1 CFU/ml'dir



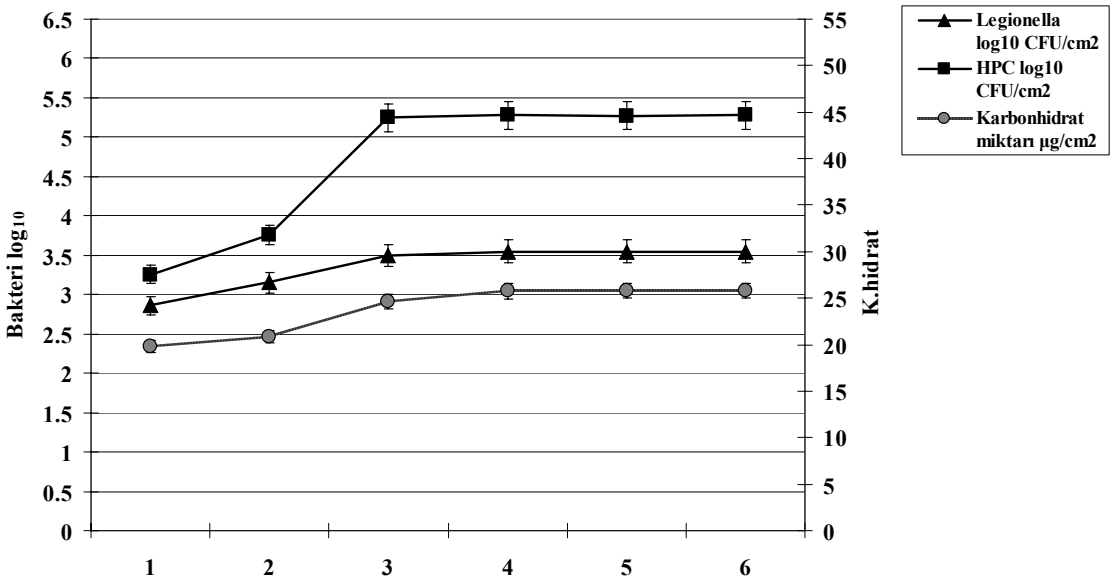
Şekil 4.28: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca PVC üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



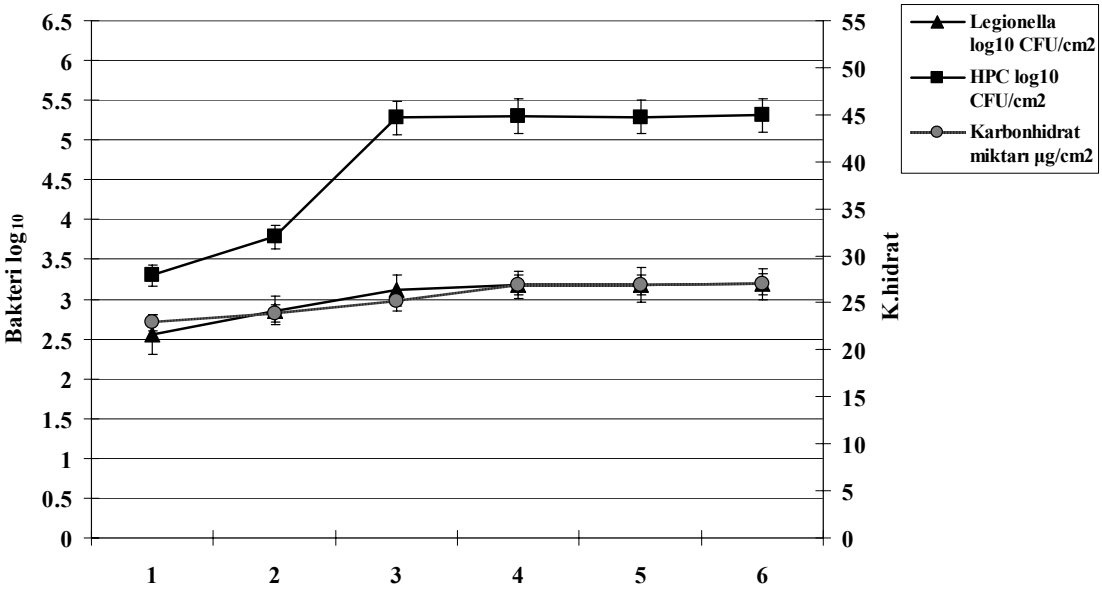
Şekil 4.29: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca PP üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



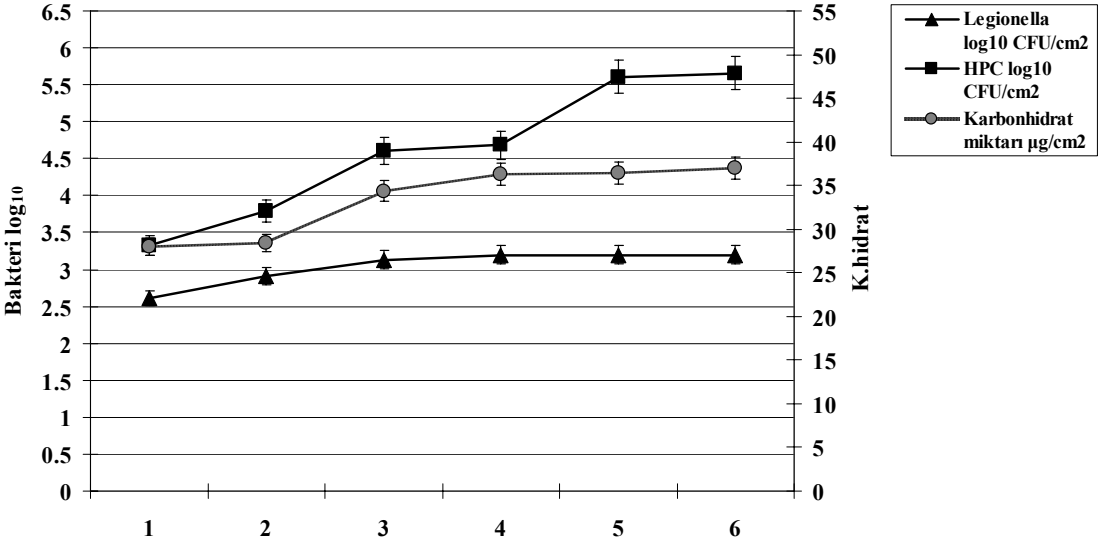
Şekil 4.30: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca PE üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



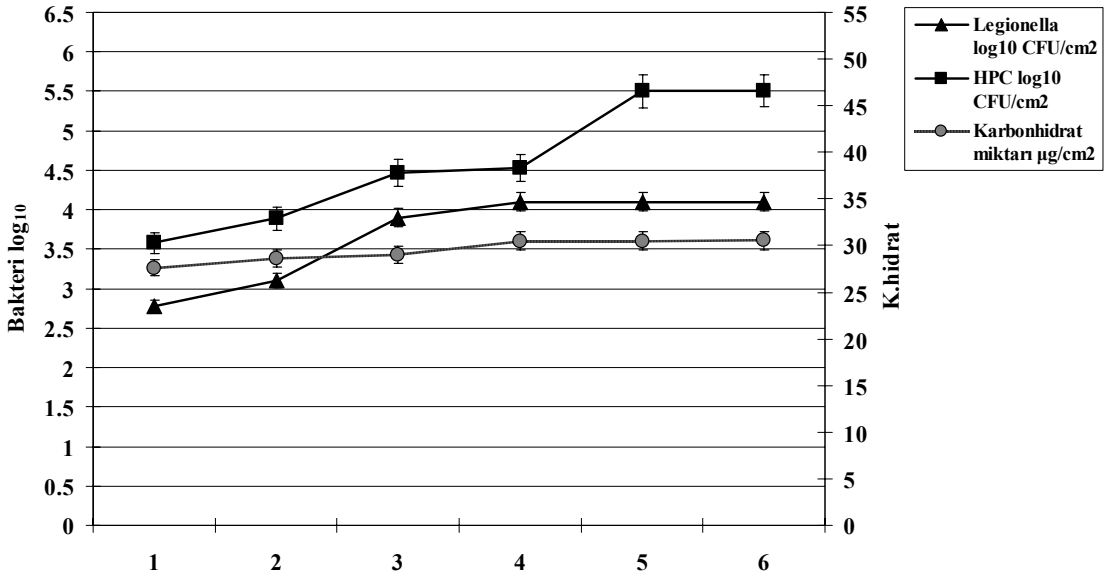
Şekil 4.31: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca cam üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



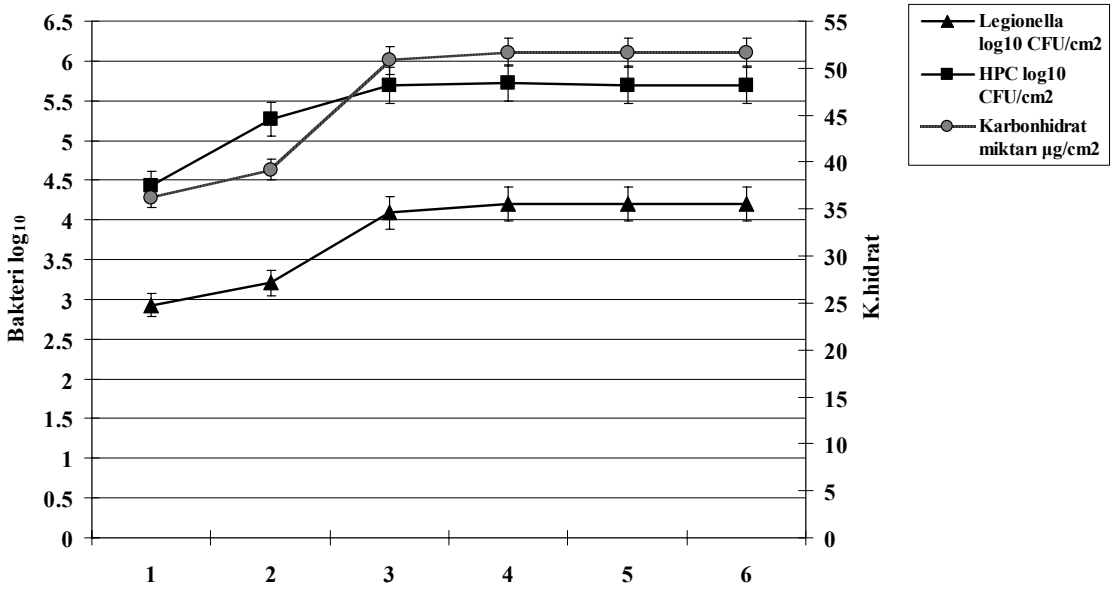
Şekil 4.32: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca paslanmaz çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.33: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca bakır üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları

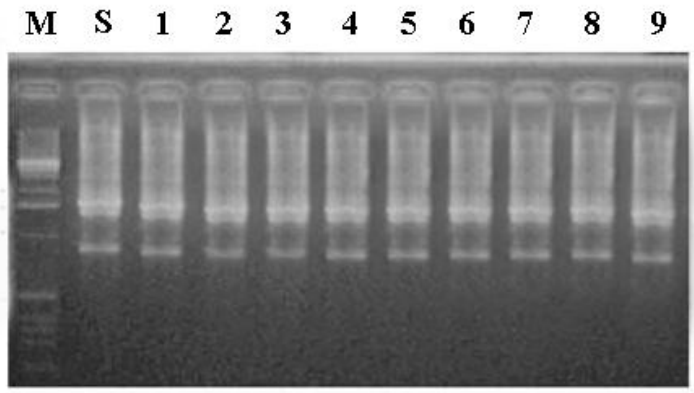


Şekil 4.34: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca fayans üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları



Şekil 4.35: İkinci deney süresinde 180 gün boyunca galvanizli çelik üzerinde heterotrofik canlı bakteri, *L. pneumophila* sayıları ve karbonhidrat miktarları

Her ay üreyen *L. pneumophila* bakterisinin, deneysel olarak eklenen suş olduğunu tespit etmek için pasajları alınan izolatları RAPD PCR yöntemiyle karşılaştırılmış ve şebekeden yeni bir suşun sisteme girmediği belirlenmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36: İkinci deney süresinde farklı aylarda rasgele seçilmiş 9 *L. pneumophila* izolatı DNA bantlarının UV ışığı altında agaroz jeldeki görüntüsü. M: Markır, S: Standart suş, 1-9: İzolatlar

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya üzerinde en başarılı yaşam formu olarak kabul görmüş olan biyofilm tabakası ile mücadele, modern çağın en önemli savaşlarından biridir. İstenmediği ortamlarda oluşmasını önlemek mümkün olmadığı için biyofilm tabakası ile mücadelede strateji belirlemek hayli zor olmuştur. Değişen ortam şartlarına son derece hızlı bir şekilde adapte olabilen biyofilmle ilişkili mikroorganizmalar, birçok alanda maddi zarara yol açmaktadır. Etkin bir antifauling stratejisi için, biyofauling durumunun analizini, uygun metotların kullanımını ve etkili kontrol yöntemlerini kapsayan bütünsel bir yaklaşıma gerek vardır [44].

Geçmişteki çalışmalar, biyofilm tabakasının model sistemlerde 100-150 gün sonra yarı-durağan faza ulaştığını bildirmektedir [94, 102, 142]. Yarı-durağan olarak nitelendirilmesinin nedeni ise biyofilm tabakasının sürekli bir dinamiğe sahip oluşudur. Biyofilmdeki bakteri sayısı bu fazda artmıyor gibi görünse de, su fazına erozyon ya da dökülme ile sürekli bakteri geçişi olurken aynı zamanda üreme devam edeceğinden, bu denge sayıca korunacaktır [16]. Araştırmamızın her iki deney süresinde de 120 gün sonrasında yarı-durağan faza geçiş gözlenmiştir. Bu geçiş, bakteri sayısının plato fazına girmesi ve karbonhidrat miktarındaki artışın durması ile tespit edilmiştir. Sudaki çözünmüş oksijen miktarının zaman içinde düzenli artışının da, azalan mikrobiyal aktiviteyi işaret ettiği söylenebilir. Biyofilm konusunda yapılmış çalışmaların çoğu 2 haftadan kısa bir süre içinde gelişmiş popülasyonlar üzerinde yapılmıştır ki, bu evrede üreme logaritmik fazdadır, dökülme veya erozyon henüz görülmez. Genç biyofilmler temel alınarak yapılmış çalışmaların sonuçlarını, haftalar ya da aylarca olgunlaşmış tabakalarla yorumlamak yanlış sonuçlar doğurabilir [48]. Biyofilm asenkron bir popülasyon olduğu için her tür yaşam evresinde bulunan bakteri mevcut olacaktır. Üreme/ayrılma oranı dengede kalacağından biyofilm kalınlığı da sabit bir değerde duracaktır. Olgun biyofilm tabakalarındaki mikroorganizmaların aktivitelerinin azalması nedeniyle jenerasyon süresinin çok uzadığı bilinmektedir [47]. Biyofilmdeki dengenin korunmasında avcı protozoonların da önemi büyüktür. Mikroorganizmalarla

beslenmek için biyofilm tabakasının içine giren protozoonlara, özellikle avcı amip, heterotrofik flagellat ve siliatlara çoğu akuatik çevrede rastlanır. Cereceda ve diğ. [138], yaptıkları bir çalışmada karmaşık akuatik biyofilmlerde protozoonların % 90'ını siliatların oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Avcı protozoonların olgun biyofilm tabakalarında bakterileri besin olarak tüketmesiyle total bakteri sayılarında azalmaya yol açtığı bilinmektedir [94, 159].

Biyofilm tabakasının yüzeyden kazınması, süspansiyon haline getirilmesi ve kültür metotları, biyofilm bakterilerinin sayılmasında çok kritik bir öneme sahiptir. Eküvyon, cam boncuklar, bisturi vb. araçlar yardımıyla biyofilm yüzeyden sökülürken uygulanan fiziksel ya da kimyasal işlemler için uygun süre ve konsantrasyonlar belirlenmelidir. Güçlü çalkalama ya da karıştırma işlemleri mikroorganizmaların parçalanarak ölmesine yol açarken, kısa süreli ya da zayıf işlemler bakteri kümelerinin dağılmayarak kültür ya da sayım aşamasında yanlış okunmasına neden olabilirler [160]. Katı-sıvı ara yüzünde bulunan biyofilm tabakası içindeki bakterileri yüzeyden alıp su fazına geçirirken kullanılacak yöntemin tayin edilmesi için altı farklı metot denenmiştir. Steril eküvyon ile 10 cm^2'lik alandan alınan kazıntı, 5 ml fosfat tamponu (PBS) içindeki deney tüpünde; I) 30 sn vorteks, II) 60 sn vorteks, III) 30 sn vorteks - 30 sn sonikasyon, IV) 30 sn vorteks - 60 sn sonikasyon V) 60 sn sonikasyona maruz bırakılmıştır. Deneme sonunda, Wirtanen ve diğerlerinin de [160] buldukları gibi en iyi metodun 60 sn vorteks cihazı ile karıştırma olduğu tespit edilmiştir.

Suyun akış hızı, fiziko-kimyasal özellikleri, kaynağı, temas ettiği yüzeyin şekli [32, 69] ve malzeme tipi [3, 11, 28, 94, 145, 162, 163, 164] yüzeye yapışmış olan biyomasın karakteristiğini büyük ölçüde etkilemektedir. Özellikle kimyasal açıdan inert olmayan malzemeler üzerinde bakteri kolonizasyonu seçicilik göstermektedir [3]. Mikroorganizmalar laboratuvar şartlarında hidrofobik, apolar özellikte olan Teflon® ve diğer plastik malzemelere tutunmaya cam veya metal benzeri hidrofilik malzemelere göre daha büyük bir ilgi duymaktadırlar [73, 95]. Yapı itibariyle PP yüksek derecede hidrofobikken PE ve PVC orta düzeyde hidrofobiktir. Araujo ve diğ. [165], yüzey hidrofobisitesinin primer yapışmayı değiştirmediğini, hidrofobik PP ve hidrofilik cam yüzeylerin Robbins cihazında aynı mikrobiyal kompozisyon ve sayıya sahip olduklarını göstermişlerdir. Çalışmamızda PP yüzeyin, hem bakteri sayısı hem de karbonhidrat

miktarı açısından PVC ve PE yüzeylerden daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür. Bu noktadan yola çıkarak, plastik polimerlerde yüksek yüzey hidrofobisitesinin model sistemdeki PP yüzeylerde bakteri kolonizasyonunu teşvik ettiği söylenebilir.

Ökaryotlara oranla daha basit yapılı bakteriler, fenotipik adaptasyon ile ortam şartlarına çok hızlı bir şekilde uyum sağlarlar. Negatif yüklü bir bakteri, yüzey yükünü değiştirerek negatif yüklü plastik bir yüzeye kolayca yapışabilir. Bu tip bir etkileşim güçlüdür ve geri dönüşümsüzdür [80]. Ayrıca negatif zeta potansiyeline (*zeta potansiyeli* - yüzey ya da hücrelerin taşıdığı etkin elektrostatik yük) sahip bakterinin yapışması elektrostatik etkileşimler ile gerçekleşmez. Yüzey yükünü etkileyen pH değerinin primer yapışmadaki rolü çok önemlidir. Farklı değerlerde pH hem yüzeyin hem bakterinin yüzey yükünü değiştirir. Nötr pH civarında tüm yüzeyler elektriksel anlamda yük taşır [29], ancak yüzey yükünün yokluğunda hidrofobik etkileşimler elektrostatik etkileşimlerin önüne geçer [166]. Bu nedenle hidrofobik etkileşimlerin mikrobiyal yapışma sürecindeki önemi çok büyüktür [78]. Metaller ile bakteriler arasındaki diğer etkileşimlerde Ca^{+2}, Fe^{+2}, Mg^{+2} gibi katyonlar rol oynar. Bu katyonlar negatif yüklü yüzeylerde hidrofobisiteyi artırır. Norton ve LeChevallier [167], pilot su şebeke sisteminde demir boruların PVC borulardan mikrobiyal açıdan daha çabuk kirlendiklerini göstermişlerdir. Bakteriler metabolik faaliyetlerinde kullanmak metal yüzeylerden iyon koparabilmektedirler. Bu durum, metal yüzeylerin biyofilm oluşumu için neden en çok tercih edilen yüzey olduğunu açıklamakta ve çalışmamızın sonuçları da bunu işaret etmektedir.

Yüksek pH değerlerinde polimerik malzemelerin zeta potansiyelinin negatif olduğu bilinmektedir [168]. Yüksek pH değerlerine sahip model sistem suyunda plastik malzemeler üzerinde daha az biyofilm tutunması, ayrıca bakır iyonlarının EPS üretimini artırdığı bilindiğinden [169], galvanizli çelikten sonra en çok EPS'nin neden bakır yüzey üzerinde biriktiği bu şekilde açıklanabilir. Bir başka çalışmada, en az biyofilm taşıyan malzeme olarak PVC'nin gözlenmesi, bu malzemenin serbest yüzey enerji değerine bağlanmıştır [75]. Her iki deney periyodunun sonunda galvanizli çelik üzerinde tespit edilen karbonhidrat miktarının diğer malzemelere oranla son derece yüksek olduğu görülmektedir. Galvanizli çelik üzerinde kolonize olmuş bakterilerin

diğer yüzeylerdeki bakterilere oranla daha fazla miktarda EPS saldıkları sonucuna varabiliriz.

Niquette ve diğ. [139] tarafından yapılmış çalışmada PVC, PE, çelik, beton, dökme demir, gri demir boru malzemeleri üzerinde şebeke suyunun biyofilm oluşturma potansiyeli incelenmiş, farklı sıcaklık ve organik madde miktarı olan değişik deney koşullarında PVC ile PE malzemenin en az düzeyde biyomas taşıdıkları tespit edilmiştir. Şebeke suyu ile yapılmış olan bu çalışmanın sonuçları, araştırmamızda alınan sonuçlar ile benzerdir. Ancak şebeke suyu ile yapılan çalışmalarda su sıcaklığında anlamlı farklılıklar olabilmekte ve biyofilm oluşumunu etkileyebilmektedir. Zacheus ve diğ. [170], ozonlama ile dezenfekte edilmiş şebeke suyunun kullanıldığı sistemde PVC, PE ve paslanmaz çelik kuponlardan en çok PVC üzerinde heterotrofik bakterinin ürediğini ve ozonlama ile dezenfeksiyonun sudaki organik madde miktarının arttığını bildirmişlerdir. Ollos ve diğ. [163], model su şebekesi sisteminde yaptıkları deneyde, polikarbonat yüzeyler ile dökme demir kuponlar üzerinde oluşan biyofilm arasında anlamlı bir fark olmadığı ve oluşan biyofilmin sıcaklık, yüzey tipi ve akış hızından çok suda bulunan organik madde ve dezenfektan miktarına bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. Camper ve diğ. [164], biyolojik olarak arıtılmış içme suyunun biyofilm oluşturma potansiyelini biyofilm reaktöründe PVC, epoksi, beton demir kuponlar üzerinde incelemişler ve en az biyofilmin PVC üzerinde oluştuğunu kaydetmişlerdir. Yedi farklı arıtma tesisinden gelen şebeke suyunun 18 farklı pilot su şebekesi sisteminde analizi ile yapılan bir diğer çalışmada PVC en az biyofilm oluşturan malzeme olarak göze çarparken, dökme demir ve galvanizli çelik en çok biyofilm barındıran malzemeler olmuştur [137]. Hyde ve diğ. [171], endüstriyel alanlarda kullanılan paslanmaz çelik, PP, cam, silikon, polivinil diflorür ve Teflon® kuponları, içinde besiyeri olan bir biyofilm reaktöründe test etmiş ve paslanmaz çeliğin en fazla, Teflon®'un ise en az düzeyde biyofilm ile kaplandığını tespit etmişlerdir. Yapılmış bir başka çalışmada bakır ve PE borular biyofilm oluşumu açısından şebeke suyu pilot sisteminde karşılaştırılmış, sonuçta iki boru tipi arasında 300 gün boyunca anlamlı bir fark olmadığı görüşmüştür [162]. Laboratuvar model sistemi üzerinde şebeke suyu ile yapılan çalışmada PE, PVC, dökme demir boru malzemelerinin üzerinde biyofilm oluşumu incelenmiş ve gerek 21 gün, gerekse 7 aylık süre sonunda PVC en temiz yüzey olarak tespit edilmiştir [145]. King ve diğ. [172],

tatlı su balık yetiştiriciliğinde kullanılan yapay havuz malzemeleri ile onların yüzeylerindeki bakteri sayısı arasında ilişkiyi incelemek amacıyla fiberglas, plastik, PVC, alüminyum, kauçuk çimento, paslanmaz çelik ve styropor (beyaz köpük) malzemeleri dinamik koşullar altında test etmiş ve paslanmaz çelik ile PVC yüzeylerin en az düzeyde biyofilm taşıdıklarını bildirmişlerdir. Geçmiş çalışmalarda da görüldüğü üzere PVC, birçok farklı ortamda mikrobiyal kolonizasyonun en az oluştuğu malzeme olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da diğer malzemelere göre en az mikrobiyal birikimin PVC'de bulunması, soğutma kulesi gövdesi ve su ile temasta dahili parçalarının yapımında bu malzemenin kullanımının teşvik edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Oligotrofik ortamlardaki heterotrofik bakterilerin kültürü için kullanılan R2A Agar, Kings Agar B, Plate Count Agar ve koyun kanlı agar besiyerleri arasında en iyi sonuç R2A agar besiyerinden alınmıştır [21, 41, 136, 173]. Mikroorganizmalar, şebeke suyu gibi az besin içeren bir ortamdan zengin besiyerine alındığında besin şokuna uğramaktadır [9]. Zengin besiyerleri üzerinde hızlı üreyen mikroorganizmalar, yavaş üreyen diğer bakterilerin çoğalmasına imkan vermezler. R2A agar besiyeri, düşük konsantrasyonlarda içerdiği maya özütü, kazein hidrolizatı, pepton ve glikoz nedeniyle yavaş üreyen mikroorganizmaların çoğaltılmasında rakipsizdir. Ayrıca, içerdiği nişasta ve pirüvat, hasarlı bakterilerin de hızla çoğalmasını sağlamaktadır. İnkübasyon için ideal sıcaklık aralığı 22-29°C'dir. Optimum değerler 28°C'de 7 gün olarak bildirilmiştir [136]. Deneylerimizin sonuçlarını takip ederken üç gün içinde üremiş olan bakterilerin yanında 4. günde beliren yeni kolonilerin varlığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda biyofilm tabakasından alınıp R2A agar besiyerinde üremiş heterotrofik bakterilerin saflaştırılması amacıyla yapılan alt pasajların çoğunda başarısız olunmuştur. Bunun olası nedeni biyofilm içindeki mikrofloranın sinerjik üremesi olarak açıklanabilir. Buna benzer bir şekilde 2. deney süresinde *L. pneumophila* bakterileri doğrudan ekim yapıldığında diğer mikroorganizmaların varlığında BCYE agar plaklarında ürerken, ısı veya asit uygulaması sonucu refakatçi mikrofloranın büyük oranda azalmasıyla BCYE agar plaklarında üremediği gözlenmiştir. *Legionella* familyasının izolasyonunda standart olarak uygulanan bu seleksiyon işleminden bu nedenle vazgeçilmiş, sadece doğrudan ekim yapılmıştır. Bu sürecin, biyofilm tabakasında yaşayan ve çoğalan bakterilerle sinerjik etkileşimin bir sonucu olduğu düşünülmüştür. Costerton ve diğ.

[174], biyofilm içinde üreyen bakterilerin farklı bir metabolizmaya sahip olduklarını ve topluluk içindeki diğer bakterilere ihtiyaçları olduğunu belirtmişlerdir. Bu bilgi, *L. pneumophila* bakterileri ve refakatçi mikrofloranın bir arada üremelerini desteklemektedir.

Armon ve diğ. [175], yaptığı çalışmada *L. pneumophila* bakterisinin steril suda kısa bir süre içinde sayısının azalarak yok olduğunu, ancak diğer mikroorganizmalarla beraber bulunduğu ortamda daha uzun süre canlı kaldığını bildirmiştir. Steril çeşme suyunda da serogrup 1 suşlarının 4-7 pH aralıklarında 30 gün sonunda % 99 oranında canlılık kaybı olduğu bildirilmiştir [176]. Çalışmamızda model sistemde 180 gün boyunca hem su fazından hem de biyofilm tabakasından, zamanla giderek artan sayıda *L. pneumophila* bakterisi izole edilmiştir. Murga ve diğ. [101] ise *L. pneumophila* bakterisinin biyofilmde amip varlığında sayısını artırdığını, ancak amip yokluğunda biyofilmdeki sayısının sabit kaldığını bildirmiştir. Yine aynı çalışmada *L. pneumophila* bakterisinin amip yokluğunda biyofilmde çok uzun süre canlı kalabildiği gösterilmiştir. Surman ve diğ. [9], biyofilm tabakasından izole edilen heterotrofik bakterilerin *L. pneumophila* bakterisinin R2A agar besiyeri üzerindeki canlılık süresini artırdığını göstermişlerdir. Kullandığımız model sistemde *L. pneumophila* sayısının artışı, bu bakterinin yüzeylerdeki diğer bakteri ya da amiplerin yardımıyla çoğaldığını işaret etmektedir. Nitekim, Kuiper ve diğ. [177] yaptıkları çalışmada heterotrofik biyofilm tabakasının kontrolünün *L. pneumophila* üremesini anlamlı düzeyde azaltacağını bildirmişlerdir. Borella ve diğ. [178], *L. pneumophila* bakterisi izole ettikleri binaların % 90'ının demir boru (% 10 plastik) su tesisatına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu bakterinin üremesi için demir bileşiklerine ihtiyaç duyması, metalik yüzeylerdeki hızlı kolonizasyonunun nedeni olarak da açıklanabilir. Çalışmamız boyunca çoğu yüzeyde gözlenen yüksek heterotrofik canlı bakteri sayıları nedeniyle hızlı bir üreme ortamı edinen sessil *L. pneumophila* bakterisi sayılarında zamanla azalma tespit edilmemiştir. *L. pneumophila* bakterisinin biyofilm içinde amiplerle bir arada bulunması ve bu bakterinin biyofilmden ayrılarak su fazına geçmesi, Lejyoner Hastalığı riskinin artmasına yol açabilecek iki önemli ekolojik faktör olarak görülmektedir [177, 179].

Mauchline ve diğ. [180], *L. pneumophila* bakterisinin kemostat cihazında 30°C'nin altındaki sıcaklıklarda flagella taşıdığını, daha yüksek sıcaklıktaki ortamlarda

flagellasını kaybettiğini gözlemlemişlerdir. Kirpik varlığı ve kirpikle hareket, biyofilm tabakası oluşumunda son derece etkindir. Bu sonuç çevre şartlarının hücre morfolojisini değiştirmesi ile açıklanabilir. İkinci deney döneminin başında sisteme deneysel olarak eklenen *L. pneumophila* süspansiyonun model sistemdeki final konsantrasyonu litre başına bir bakteri olacak şekilde hesaplanmıştır. Bunun nedeni, şebeke sistemlerindeki düşük sayıdaki *L. pneumophila* varlığına olabildiğince yakın bir konsantrasyonda bu bakteriyi sisteme eklemeyi sağlamaktır. Planktonik *L. pneumophila* sayısının artması bu bakterinin biyofilmde konak içinde çoğalarak su fazına geçtiğini de desteklemektedir. *L. pneumophila* bakterisinin çok kısa bir sürede çoğalıp yüzeyden ayrılması soğutma kulelerinde ne denli büyük tehlike oluşturduğunun göstergesidir. Nitekim en büyük Lejyoner Hastalığı salgınları, kaynağını soğutma kulelerinden almıştır [129, 130].

L. pneumophila bakterisinin varlığı, çalışmamızda deneye alınan tüm yüzeyler üzerinde tespit edilmiştir. Önceden yapılmış çalışmalar, bakır iyonlarının bu bakteri ve diğer heterotrofik mikroorganizmalar üzerinde toksik etkisi olduğunu bildirmektedir [8, 110, 166, 181, 182, 183]. Ancak deney sonuçları bakır üzerinde üreyen *L. pneumophila* bakteri sayısının paslanmaz çelikten bile yüksek olduğunu göstermektedir. Lin ve diğ. [181] tarafından yapılmış çalışmada bakır iyonlarının yüksek pH değerlerinde *L. pneumophila* bakterisi üzerine etkisinin olmadığı şeklinde açıklanmıştır. Walker ve diğ. [182] kemostat cihazında heterotrof bakteriler varlığında bakır ve PE, PVC yüzeyler üzerinde *L. pneumophila* bakterilerini incelemiş, bakır ve PVC üzerinde sayıca daha az *L. pneumophila* bakterisi olduğunu gözlemlemişlerdir.

Birbirinden bağımsız her iki deney süresinde aynı günlerde ölçülen yüzeylerdeki heterotrofik canlı bakteri sayıları, karbonhidrat miktarları ile suda ölçülen pH ve çözünmüş oksijen değerleri arasında anlamlı bir fark olmaması model sistemde biyofilm oluşumunun tekrarlanabilirliği göstermiştir. İkinci deney süresinde *L. pneumophila* bakterisinin yüksek sayılara ulaştığı yüzeylerde bile heterotrofik canlı bakteri sayılarını etkilemediği görülmüştür. Planktonik heterotrofik bakteriler ile planktonik *L. pneumophila* arasında bir ilişki olmadığı geçmiş çalışmalarda belirtilmişti [125, 183]. Aynı yorumu bu deneyde alınan sonuçlar ışığında biyofilm ilişkili heterotrofik bakteriler ile *L. pneumophila* için de yapmak mümkündür.

Fenol-sülfürik asit metodu biyofilm tabakasının karbonhidrat bileşiminin tayin edilmesinde kullanılan son derece hassas bir metottur [132, 154]. EPS, yapısında karbonhidratlar dışında protein, nükleik asit ve hücre kalıntılarına da sahiptir. Karbonhidratlar dışındaki bileşenlerin düşük miktarda olması bu ölçümün güvenilirliğini etkilememektedir [35, 123, 185, 186]. Biyofilm tabakasındaki karbonhidratlar, proteinlerden en az dört kat daha fazladır [87]. Brown ve Lester [127] yaptığı çalışmada biyofilm homojenatında bulunan DNA ve protein miktarları ile karbonhidrat miktarları arasında bir korelasyon olmadığını, biyofilmin homojenizasyonu esnasında hücrelerin parçalanması sonucu artan DNA ve proteinin sapmalara yol açtığına bağlamıştır. Biyofilm miktarının kantitatif analizinde üronik asit tayini de kullanılmaktadır ancak biyofilmde karbonhidratlara oranla daha az bulunması nedeniyle analiz hassasiyeti daha düşüktür [53]. Tsuneda ve diğ. [187], EPS'de bulunan heksoz ve pentoz miktarlarının bakterinin yüzeye yapışabilme yeteneği ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir.

Presti ve diğ. [150] tarafından uygulanmış RAPD polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer ve deney koşulları, *L. pneumophila* bakterisinin tür düzeyinin de altında ayırım yapmasına olanak vermektedir. Kendi türü içinde 15 serogrubu ve serogrup 1'inde kendi içinde birbirinden serolojik özellikleri itibariyle farklı 6 alt grubu da (Knoxville, Olda-Heysham, Benidorm, Bellingham, France, Philadelphia) [188] ayırma gücüne sahip bu metot ile, sisteme en başta eklenen ve deney boyunca farklı zamanlarda izole edilen *L. pneumophila* suşları karşılaştırılmış ve farklı bir suşun model sisteme girmediği gözlenmiştir. Deneysel olarak *L. pneumophila* bakterisinin eklenmediği ilk deney süresinde de İstanbul şehir şebeke suyundan model sisteme bu bakterinin girişi saptanmamıştır.

Çeşitli eser element ve ağır metallerin tayininde atomik absorbsiyon spektrofotometresinden yararlanılmaktadır. Atomik absorbsiyon spektrofotometresinde ölçüm, örneğin yakılması sonucu atomların yaydığı enerji spektrumlarının optik okuyucu tarafından algılanarak gerçekleşmektedir. Sirkülasyon sisteminde ölçümü yapılan ağır metallerin su fazındaki miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Biyofilm tabakasının bir iyon değişim reçinesi olarak çalıştığı bilindiğinden bu artış beklenen bir sonuç olmuştur [45].

Suyun akış hızı ve sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerinde son derece önemli etkiye sahip olduğu geçmiş araştırmalardan bilinmektedir [41, 58, 189, 190, 138]. Stepanović ve diğ. [58] 22°, 30° ve 37°C'de 30 farklı *Salmonella* suşu kullanarak plastik yüzeylerde biyofilm oluşturmuş ve en yoğun biyofilmin 30°C'de oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu durum bakteri genomunda polimer sentezi yapan belirli genlerin spesifik sıcaklıkta anlatım yapmasıyla açıklanmıştır. Model soğutma kulesi sisteminde suyun akış hızı ve sıcaklık sabit tutularak bu parametrelerin biyofilm oluşumunda sapmalara yol açması önlenmiştir.

Sıcaklık, çözünmüş oksijen miktarı, pH, TÇM değerleri dikkate alındığında su sirkülasyon sisteminde dolaşan su, şebeke suyundan çok farklıdır ve son derece aşındırıcı özelliktedir. Bu koşullar metal malzemelerde korozyonu hızlandırmaktadır [191]. Örneğin, şebeke suyu ile soğutma kulelerine sülfat indirgeyen bakteriler gelmekte [124] ve bu grup bakterilerin biyolojik korozyondan sorumlu oldukları bilinmektedir [40, 152, 192, 193]. Polimer bazlı malzemeler su ile reaksiyona girmezken, metal malzemeler zaman içinde su ile reaksiyona girer [194]. Metaller üzerinde çok yoğun ve boşluk bırakmadan tüm yüzeyi kaplamış biyofilm tabakasının, aerobik sistemlerde oksijen rekabeti nedeniyle korozyonu önlediği bilinmektedir. Bu nedenle bölgesel (heterojen) oluşmuş biyofilm tabakaları korozyonu hızlandırmaktadır [169]. Araştırma kapsamında kullanılmış galvanizli çelik kuponların SEM fotoğrafları ve paslanmaz çelik kuponların ışık mikroskobu fotoğrafları bu görüşü desteklemektedir (Sayfa 32, Şekil 4.2 ve 4.3). Sacı koruyan galvaniz kaplamanın 180 gün sonunda yüzeyde kalmadığı tespit edilmiştir. Sudaki çinko miktarının artışı da bu sonucu doğrulamaktadır. Soğutma kulelerinin üretiminde metal malzeme, özellikle galvanizli çelik sac çok büyük oranda kullanılmaktadır. Yapılmış bir çalışmada, soğutma kulesi su sirkülasyon hattına yerleştirilmiş pirinç (% 70 bakır, % 30 çinko) kuponlar üzerinde korozyon oluşumu incelenmiş ve 90 günlük deney süresi sonunda korozyonun olmadığı gözlenmiştir [152]. Ancak deney süresinin nispeten kısa olması nedeniyle ileriye dönük tahmin yapmak zor olmaktadır. Çünkü işletimine başlanan bir soğutma kulesinin çalışma ömrü yıllarla telaffuz edilmektedir. Sonuç olarak en az biyofilm oluşturan ve en az korozyona uğrayan malzemenin tespit edilmesi soğutma kulesi, boru ve su deposu malzemeleri sektöründe hizmet veren öncü firmalara doğru tesisat malzemesinin

seçiminde fikir verebilecektir. Fayans, soğutma kulesi ya da boru üretimiyle ilişkili bir malzeme değildir, ancak ülkemizde su depolarının içini izole etmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşturma potansiyelini diğer malzemelerle karşılaştırabilmek amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir. Sonuçlar ışığında fayansın yüzeyinde bakteriyel kolonizasyonun yoğun olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda kullanılan model sistemde oluşan biyofilm tabakalarının heterotrofik canlı bakteri sayısı ve karbonhidrat miktarı bakımından benzerliği ve tekrarlanabilirliği, gerçek soğutma kulesinde oluşan biyofilm tabakalarıyla bir başka çalışmada karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < .05$) olmadığı tespit edilmiştir [67]. Model sistemin bir diğer avantajı da, istenen özelliklere sahip yüzeylerin kolayca deneye adapte edilebilmesidir. Ancak farklı hidrodinamik rejimler, kimyasal ve mikrobiyolojik parametrelere sahip su ile yapılacak çalışmaların değişik sonuçlar verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu çalışmada varılan sonuçlar kısaca şu şekilde özetlenebilir;

- Model sistemde plastik polimerler, metallere oranla yüzeylerinde daha az mikrobiyal biyofilm barındırmıştır.
- Tasarlanmış olan model su sirkülasyon sistemi, hem suyun fiziko-kimyasal parametreleri hem de biyofilm oluşturma potansiyeli bakımından gerçek soğutma kulesi değerlerine çok yakın sonuçlar vermiştir.
- Bakteriler, malzeme türüne bakılmaksızın su ile temas eden yüzeylerde oldukça hızlı biyofilm oluşturmuştur.
- Model sistemdeki biyotik ve abiyotik faktörlerin metaller üzerinde aşındırıcı etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.
- Soğutma kulesi yapımında sıklıkla kullanılan galvanizli çelik malzemenin, bu çalışmadan alınan sonuçlar doğrultusunda üzerinde anlamlı derecede daha fazla miktarda biyofilm taşıdığı ve biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisinden kendisini koruyamadığı söylenebilir. Özellikle soğutma kulelerinde varlığı bilinen *L. pneumophila* bakterisi galvanizli çelik üzerinde oluşan kalın biyofilm tabakası içinde hızla sayısını artırmaktadır.
- Ülkemizde temizliği oldukça ihmal edilen soğutma kulelerinde, halk sağlığını olumsuz etkileyebilecek *L. pneumophila* bakterisinin, çok düşük sayıda sisteme

girmesi durumunda bile sistemde hızla kolonize olup çoğalarak tehlikeli sayılan miktarlara ulaşabildiği bu çalışma sonunda ortaya çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

1. ZOBELL, C.E., 1943, The effect of solid surfaces upon bacterial activity, *J Bacteriol*, 46, 539-557.

2. COSTERTON, J.W., 1993, Structure of biofilms, 1-13, Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems, GEESEY, G.G., LEWANDOWSKI, Z., FLEMMING, H.C., ISBN: 0-87371-928-X / 087371928X Chapter 1, Lewis Publishers, USA.

3. COSTERTON, J.W., 1999, The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 22, 551-563.

4. FRANCOLINI, I., DONELLI, G., STOODLEY, P., 2003, Polymer designs to control biofilm growth on medical devices, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2, 307-319.

5. HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J.W., STOODLEY, P., 2004, Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases, *Nature Rev Microbiol*, 2, 95-108.

6. COSTERTON, J.W., 1999, Introduction to biofilm, *Int J Antimic Agents*, 11, 217-221.

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

8. SCHULTE, S, 2003, *Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid gegenüber Biofilmen*, Thesis (PhD), Duisburg-Essen University.

9. SURMAN, S.B., MORTON, L.H.G., KEEVIL, C.W., 1994, The dependence of *Legionella pneumophila* on other aquatic bacteria for survival on R2A medium, *Int Biodet Biodeg*, 13, 223-236.

10. BATTÉ, M., KOUDJONOU, B., LAURENT, P., MATHIEU, L., COALLIER, J., PRÉVOST, M., 2003, Biofilm responses to ageing and to a high phosphate load in a bench-scale drinking water system, *Wat Res*, 37, 1351-1361.

11. PERCIVAL, S.L., KNAPP, J.S., EDYVEAN, R.G.J, WALES, D.S., 1998, Biofilms, mains water and stainless steel, *Wat Res*, 32, 2187-2201.

12. VIDELA, H.A., 2002, Prevention and control of biocorrosion, *Int Biodet Biodegr,* 49, 259-270.

13. MOMBA, M.N.B., KFIR, R., VENTER, N., CLOETE, T.E., 2000, An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality, *Water SA*, 26, 59-66.

14. WIRTANEN, G., 1997, *Biofilm formation and its elimination from food processing equipment*, Thesis (PhD), Helsinki Technology University.

15. KOOIJ, D., 1999, Potential for biofilm development in drinking water distribution systems, *J Appl Microbiol*, 85, 39-44

16. ALLISON, D.G., 2003, The biofilm matrix, *Biofouling*, 19, 139-150.

17. BOE-HANSEN, R., ALBRECHTSEN, H.J., ARVIN, E., JORGENSEN, C., 2002, Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions, *Wat Res*, 36, 4477-4486.

18. BATTÉ, M., APPENZELLER, B.R.M., GRANDJEAN, D., FASS, S., GAUTHIER, V., JORAND, F., MATHIEU, L., BOUALAM, M., SABY, S., BLOCK, J.C., 2003, Biofilms in drinking water distribution systems, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2, 147-168.

19. HALLAM, N.B., WEST, J.R., FORSTER, C.F., SIMMS, J., 2001, The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Wat Res*, 35, 4063-4071.

20. SURMAN, S.B., MORTON, L.H.G., KEEVIL, C.W., 1993, The use of a biofilms generator in the evaluation of a biocide for use in water treatment, Proceeding of the 9th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Leeds, UK, 5-10 Sept 1993.

21. CARTER, J.T., RICE, E.W., BUCHBERGER, G., LEE, Y., 2000, Relationship between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system, *Wat Res*, 34, 1495-1502.

22. SKJEVRAK, I., LUND, V., DUE, A., HERIKSTAD, H, 2004, Biofilm in water pipelines; a potential source for off-flavours in the drinking water, *Wat Sci Tech*, 49, 211-217.

23. CHAURET, C., VOLK, C., CREASON, R., JAROSH, J., ROBINSON, J., WARNES, C., 2001, Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking system: a field and pilot study, *Can J Microbiol*, 47, 782-786.

24. CUNLIFFE, D., SMART, C.A., ALEXANDER, C., VULFSON, E.N., 1999, Bacterial adhesion at synthetic surfaces, *Appl Environ Microbiol*, 65, 4995-5002.

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

26. DUNNE, M.W., 2002, Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?, *Cli Microbiol Rev*, 15, 155-166.

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

28. ELSE, T.A., PANTLE, C.R., AMY, P.S., 2003, Boundaries for biofilm formation: Humidity and temperature, *Appl Environ Microbiol,* 69, 5006-5010.

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

30. STICKLER, D., 1999, Biofilms, *Curr Op Microbiol*, 2, 270-275.

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

32. POMPERMAYER, D.M.C, GAYLARDE, C.C., 2000, The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene, *Food Microbiol*, 17, 361-365.

33. SARAVIA, S.G.G., MELE, M.F.L., 2003, Non-invasive methods for monitoring biofilm growth in industrial water systems, *LAAR*, 33, 353-359.

34. FLEMMING, H.C., 2003, Role and levels of real-time monitoring for successful anti-fouling strategies - an overview, *Wat Sci Tech*, 47, 1-8.

35. JEFFERSON, K.K., 2004, What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett*, 236, 163-173.

36. CODONY, F., MORATO, J., RIBAS, F., MAS, J., 2002, Effect of chlorine, biodegradable dissolved organic carbon and suspended bacteria on biofilm development in drinking water systems, *J Basic Microbiol*, 42, 311-319.

37. CHAPMAN, J.S, 2003, Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance, *Int Biodet Biodeg,* 51, 271-276.

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

39. SCHWARTZ, T., HOFFMANN, S., OBST, U., 1998, Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems, *Wat Res*, 32, 2787-2797.

40. FANG, H.H.P., XU, L., CHAN, K., 2002, Effect of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion, *Wat Res*, 36, 4709-4716.

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

42. CLOETE, T.E., BRÖZEL, V.S., 1992, Practical aspects of biofouling control in industrial water systems, *Int Biodet Biodegrad*, 29, 299-341.

43. LEWIS, K., 2001, Riddle of biofilm resistance, *Antimic Agents Chem*, 45, 999-1007.

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

45. ANWAR, H., STRAP, J.L., COSTERTON, J.W., 1992, Establisment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy, *Antimic Agent Chem*, 36, 1347-1351.

46. ZHANG, T.C., FU, Y.C., BISHOP, P.L., 1994, Competition in biofilms, *Wat Sci Tech*, 29, 263-270.

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

48. TELGMANN, U., HORN, H., MORGENROTH, E., 2004, Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilm, *Wat Res*, 38, 3671-3684.

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

50. PERCIVAL, S.L., KNAPP, J.S., WALES, D.S., EDYVEAN, R.G.J, 1999, The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 22, 152-159.

51. WILSON, S., HAMILTON, M.A., HAMILTON, G.C., SCHUMANN, M.R., STOODLEY, P., 2004, Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Appl Environ Microbiol,* 70, 5847-5852.

52. CORPE, W.A., JENSEN, T.E., 1996, The diversity of bacteria, eukaryotic cells and viruses in an oligotrophic lake, *Appl Microbiol Biotechnol*, 46, 622-630.

53. TSUNEDA, S., JUNG, J., HAYASHI, H., AIKAWA, H., HİRATA, A., SASAKI, H., 2003, Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory, *Colloids Surfaces,* 29, 181-188.

54. LU, W., KIENE, L., LEVI, Y., 1999, Chlorine demand of biofilms in water distribution systems, *Wat Res*, 33, 827-835.

55. MOMBA, M.N.B., CLOETE, T.E., VENTER, N., KFIR, R., 1999, Examination of the behavior of *Escherichia coli* in biofilms established in laboratory-scale units receiving chlorinated and chloraminated water, *Wat Res*, 33, 2937-2940.

56. HIBIYA, K., NAGAI, J., TSUNEDA, S., HIRATA, A., 2004, Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment, *Biochem Eng J*, 19, 61-68.

57. LECHEVALLIER, M., CAWTHON, C.D., LEE, R.G., 1988, Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies, *Appl Environ Microbiol*, 54, 649-654.

58. STEPANOVIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I., RANIN, L., ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M., 2004, Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces, *Lett Appl Microbiol*, 38, 428-432.

59. GILBERT, P., COLLIER, P.J., BROWN, M.R.W., 1990, Influence of the growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: Biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response, *Antimic Agents Chem*, 34, 1865-1868.

60. HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P., 2002, Developmental regulation of microbial biofilms, *Environ Biotechnol*, 13, 228-233.

61. FLEMMING, H.C., WINGENDER, J., 2001, Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part II: Technical aspects, *Wat Sci Tech*, 43, 9-16.

62. CLOETE, T.E., 2003, Biofouling control in industrial water systems: What we know and what we need to know, *Materials Corrosion*, 54, 520-526.

63. KEMMLING, A., KAMPER, M., FLIES, C., SCHIEWECK, O., HOPPERT, M., 2004, Biofilms and extracellular matrices on surfaces, *Int J Geosci*, 10, 1-13.

64. BEECH, I.B., 2004, Corrosion of technical materials in the presence of biofilms-current understandings and state-of-the art methods for study, *Int Biodet Biodeg*, 53, 177-183.

65. LUDENSKY, M., 2003, Control and monitoring of biofilms in industrial applications, *Int Biodet Biodegr*, 51, 255-263.

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

67. TÜRETGEN, İ., 2004, Comparison of free residual chlorine and monochloramine for efficacy against biofilms in model and full scale cooling towers, *Biofouling*, 20, 81-85.

68. WIMPENNY, J., 2000, An overview of biofilms as functional communities, 1-23, Community structure and co-operation in biofilms, 1. Baskı, Cambridge University Press, UK.

69. PASMORE, M., TODD, P., PFEIFER, B., RHODES, M., 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, 65-71.

70. CLOETE, T.E., JACOBS, L., 2001, Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass, *Water SA*, 27, 21-26.

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

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

73. DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W., 2002, Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Cli Microbiol Rev*, 15, 167-193.

74. OPHIR, T., GUTNICK, D.L., 1994, A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation, *Appl Environ Microbiol*, 60, 740-745.

75. OLIVEIRA, R., MELO, L., OLIVEIRA, A., SALGUEIRO, R., 1994, Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material, *Coll Surfaces B*, 2, 41-46.

76. FLEMMING, H.C., WINGENDER, J., 2001, Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects, *Wat Sci Tech*, 43, 1-8.

77. COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M., 1995, Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-745.

78. LOOSDRECHT, M.C.M, LYKLEMA, J., NORDE, W., ZEHNDER, A.J.B., 1990, Influence on interfaces on microbial activity, *Microbiol Rev*, 54, 75-87.

79. MORTON, L.H.G., GAYLARDE, C.C., 2001, The role of microbial slimes in biodeterioration, *Culture*, 22, 1-4.

80. CHRISTENSEN, B.E., 1989, The role of extracellular polysaccharides in biofilms, *J Biotechnol*, 10, 181-202.

81. MURGA, R., MILLER, J.M., DONLAN, R.M., 2001, Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model, *J Cli Microbiol*, 39, 2294-2297.

82. MORISAKI, H., NAGAI, S., OHSHIMA, H., IKEMOTO, E., KOGURE, K., 1999, The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment, *Microbiol*, 145, 2797-2802.

83. JUCKER, B.A., HARMS, H., ZEHNDER, A.J.B, 1996, Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and teflon, *J Bacteriol*, 178, 5472-5479.

84. HERMANSSON, M., 1999, The DLVO theory in microbial adhesion, *Colloids Surfaces*, 14, 105-119.

85. SCHEUERMANN, T.R., CAMPER, A.K., HAMILTON, M.A., 1998, Effects of substratum topography on bacterial adhesion, *J Colloid Interface Sci*, 208, 23-33.

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

87. LIU, Y., TAY, J.H., 2001, Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behavior of biofilms, *World J Microbiol Biotechnol*, 17, 111-117.

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

89. KJELLEBERG, S., MOLIN, S., 2002, Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?, *Curr Opinion Microbiol*, 5, 254-258.

90. KAISER, D., 1996, Bacteria also vote, *Science*, 272, 1598-1599.

91. UNIVERSITY OF NOTTINGHAM QUORUM SENSING RESEARCH GROUP, The quorum-sensing site, http://www.nottingham.ac.uk/quorum/ [Ziyaret tarihi: 01/06/2004].

92. COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORBER, D., JAMES, G., 1994, Biofilms, the customized microniche, *J Bacteriol*, 176, 2137-2142.

93. STOODLEY, P., WILSON, S., CARGO, R., PISCITELLI, C., RUPP, C.J., 2001, Detachment forces and other dynamic processes in bacterial biofilms, in Surfaces in Biomaterials 2001 Symposium Proceedings, 189-192, Surfaces in Biomaterials Foundation, Minneapolis.

94. PEDERSEN, K., 1990, Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water, *Wat Res*, 24, 239-243.

95. VEENENDAAL, H.R., KOOIJ, D., 1999, Biofilm formation potential of pipe material in plumbing systems, Kiwa N.V., Hollanda.

96. HERMANOWICZ, S., 2001, A simple 2D biofilm model yields a variety of microbiological features, *Math Biosci*, 169, 1-14.

97. LAWRENCE, J.R., NEU, T.R., MARSHALL, K.C., 2002, Colonization, adhesion, aggregation, and biofilms, 466-477, Manual of Environmental Microbiology, HURST, C.J., 2. Baskı, ISBN: 1-55581-199-X, ASM Press, Washington, D.C., USA.

98. WILLIAMS, M.M., BRAUN-HOWLAND, E.B., 2003, Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine, *Appl Environ Microbiol,* 69, 5463-5271.

99. BANNING, N., TOZE, S., MEE, B.J., 2003, Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system, *Microbiol*, 149, 47-55.

100. DONLAN, R., R. MURGA, J. CARPENTER, E. BROWN, R. BESSER, AND B. FIELDS, 2002, Monochloramine disinfection of biofilm-associated *Legionella pneumophila* in a potable water model system, p. 406-410. Legionella, R. MARRE, Y. ABU KWAIK, C. BARTLETT, N.P. CIANCIOTTO, B.S. FIELDS, M. FROSCH, J. HACKER, AND P.C. LUCK. ISBN: 1-55581-230-9, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

101. MURGA, R., FORSTER, T., BROWN, E., PRUCKLER, J.M., FIELDS, B., DONLAN, R.M., 2001, Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable water system, *Microbiol*, 147, 3121-3126.

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

103. MCCOY, W.F. COSTERTON, J.W., 1982, Fouling biofilm development in tubular flow systems, *Develop Ind Microbiol*, 23, 551-558.

104. MCCOY, W.F., BRYERS, J.D., ROBBINS, J., AND COSTERTON, J.W., 1981, Observations of fouling biofilm formation, *Can J Microbiol*, 27, 910-917.

105. FRIAS, J., RIBAS, F., LUCENA, F., 2001, Effects of different nutrients on bacterial growth in a pilot distribution system, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 129-138.

106. FEREY, K.M., PASMORE, M., STOODLEY, P., WILSON, G., HUSSON, G.P., COSTERTON, J.W., 2003, Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model, *J Hosp Infect*, 53, 64-71.

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

108. TÜRETGEN, İ., 1998, Soğutma kuleleri suyunda legionella cinsi bakterilerin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

109. MACDONALD, R., BRÖZEL, V.S., 2000, Community analysis of bacterial biofilms ın a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Wat Res*, 34, 2439-2446.

110. LANDEEN, L.K., YAHYA, M.T., GERBA, C.P., 1989, Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of *Legionella pneumophila*, *Appl Environ Microbiol*, 55, 3045-3050.

111. BOTT, T.R., 1998, Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems, *Appl Therm Eng*, 18, 1059-1066.

112. ISHIMATSU, S., MIYAMOTO, H., HORI, H., TANAKA, I., YOSHIDA, S., 2001, Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower, *Annu Occup Hyg*, 6, 421-427.

113. MEESTERS, K.P.H, GROENESTJIN, J.W., GERRITSE, J., 2003, Biofouling reduction in recirculating cooling systems through biofiltration of process water, *Wat Res*, 37, 525-532.

114. HARRIS, A., 2000, Problems associated with biofilms in cooling tower systems, 139-144, Biofilms in the aquatic environment, KEEVIL, C.V., GODFREE, A., HOLT, D., DOW, C., ISBN 0-85404-758-1, Springer-Verlag, New York, USA.

115. MEYER, B., 2003, Approaches to prevention, removal and killing of biofilms, *Int Biodeter Biodegr*, 51, 249-253.

116. STEPANOVIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I., MIJAĆ, V., ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M., 2003, Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp., *Food Microbiol*, 20, 339-343.

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

118. GREEN, P.N., 1993, Efficacy of biocides on laboratory-generated Legionella biofilms, *Lett Appl Microbiol*, 17, 158-161.

119. RUSIN, P.A., ROSE, J.B., GERBA, C.B., 1997, Health significance of pigmented bacteria in drinking water, *Wat Sci Tech*, 35, 21-27.

120. RUSIN, P.A., ROSE, J.B., HAAS, C.N., GERBA, C.B., 1997, Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water, *Rev Environ Toxicol*, 152, 57-83.

121. ROGERS, J., DOWSETT, A.B., DENNIS P.J., LEE, J.V., KEEVIL. C.W., 1994, Influence plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water system, *Appl Environ Microbiol*, 60, 1842-1851.

122. ROGERS, J., DOWSETT, A.B., DENNIS P.J., LEE, J.V., KEEVIL. C.W., 1994, Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora, *Appl Environ Microbiol*, 60, 1585-1592.

123. BROWN, M.R.W., BARKER, J., 1999, Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms, *Trends Microbiol*, 7, 46-50.

124. SUNGUR, E.İ., 2001, Soğutma kuleleri suyunda sülfat indirgeyen bakterilerin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

125. YAMAMOTO, H., SUGIURA, M., KUSUNOKI, E., EZAKI, T., IKEDO, M. YABUUCHI, E., 1992, Factors stimulating propagation of legionellae in cooling tower water, *Appl Environ Microbiol,* 58, 1394-1397.

126. BAGH, K.L., ALBRECHTSEN, H.J., ARVIN, E., OVESEN, K., 2004, Distribution of bacteria in a domestic hot water system in a Danish apartment building, *Wat Res*, 38, 225-235.

127. BROWN, M.J., LESTER, J.N., 1980, Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods, *Appl Environ Microbiol*, 40, 179-185.

128. SRIKANTH, S., BERK, S., 1993, Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae, *Appl Environ Microbiol*, 59, 3245-3249.

129. GARCIA-FULGUEIRAS, A., NAVARRO, C., FENOLL, D., GARCIA, J., GONZÁLEZ-DIEGO, P., JIMÉNEZ-BUÑUALES, T., 2003, Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain, *Emerging Infect Dis,* 9, 915-921.

130. PASTORIS, M.C., CICERONI, L., MONACO, R.L., GOLDONI, P., MENTORE, B., FLEGO, G., CATTANI, L., CIARROCCHI, S., PINTO, A., VISCA, P., 1997, Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 16, 883-92.

131. STOREY, M.V., LÅNGMARK, J., ASHBOLT, N.J., STENSTRÖM, T.A., 2004, The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment, *Wat Sci Tech*, 49, 11-12.

132. STOREY, M.V., ASHBOLT, N.J., 2002, A comparison of methods and models for the analysis of water distribution pipe biofilms, *Wat Sci Tech*, 2, 73–80.

133. STOREY, M.V., ASHBOLT, N.J., 2001, Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms, *Wat Sci Tech*, 43, 133-138.

134. HUCK, P.M., GAGNON, G., 2004, Understanding the distribution system as a bioreactor: a framework for managing heterotrophic plate count levels, *Int J Food Microbiol*, 92, 347-353.

135. SHER, B., SHER, E., DEL GIORGIO, P., 2001, Enumeration of total and highly active bacteria, *Methods Microbiol*, 30, 129-158.

136. LILLIS, T.O., BISSONNETTE, G.K., 2000, Detection and characterization of filterable heterotrophic bacteria from rural groundwater supplies, *Lett Appl Microbiol*, 32, 268-272.

137. CHANG, Y.C., PUIL, M.L., BIGGERSTAFF, J., RANDALL A.A., SCHULTE, A., TAYLOR, J.S., 2003, Direct estimation of biofilms density on different pipe material coupons using a specific DNA-probe, *Mol Cell Probes*, 17, 237-243.

138. CERECEDA., M.M., SERRANO, S., GUINEA, A., 2001, Biofilm communities and operational monitoring of a rotating biological contactor system, *Wat Air Soil Poll*, 126, 193-206.

139. NIQUETTE, P., SERVAIS, P., SAVOIR, R., 2000, Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system, *Wat Res*, 34, 1952-1956.

140. BOE-HANSEN, R., ALBRECHTSEN, H.J., ARVIN, E., JORGENSEN, C., 2002, Substrate turnover at low carbon concentrations in a model drinking water distribution system, *Wat Sci Tech*, 2, 89-112.

141. BOE-HANSEN, R., MARTINY, A.C., ARVIN, E. ALBRECHTSEN, H.J., 2003, Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution Networks under oligotrophic conditions, *Wat Sci Tech*, 47, 91-97.

142. BOE-HANSEN, R., ALBRECHTSEN, H.J., ARVIN, E., 2003, Experimental systems for studying biofilm growth in drinking water, 215-229, Biofilm in medicine, industry and environmental biotechnology, IWA publishing, USA.

143. LAOPAIBOON, L., HALL, .J, SMITH, R.N., 2002, The effect of quaternary ammonium biocide on the performance and characteristics of laboratory-scale rotating biological contactors, *J Appl Microbiol*, 93, 1051-1058.

144. PEREIRA, M.O., MORIN, P., VIEIRA, M.J., MELO, L.F., 2002, A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions, *Lett Appl Microbiol*, 34, 22-26.

145. KERR, C.J., OSBORN, K.S., ROBSON, G.D., HANDLEY, P.S., 1999, The relationship between pipe material and biofilm formation in a laboratory model system, *J Appl Microbiol Symposium Supp*, 85, 29-38.

146. LINDSAY, D., HOLY, A., 1997, Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms, *Food Microbiol*, 14, 383-390.

147. WATER EFFICIENCY, Water management options, North Carolina department of environment and natural resources, division of pollution prevention and environmental assistance.
http://www.psu.edu/search/pdfframe.asp?pdfurl=/ref/04/03101.pdf [Ziyaret tarihi 03/06/2004]

148. GAGNON, G.A., SLAWSON, R.M., 1999, An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *J Microbiol Methods*, 34, 203-214.

149. NEWSOME, L.A., SCOTT, T.M., BENSON, R.F., FIELDS, B.S., 1998, Isolation of amoeba naturally harbouring a distinctive *Legionella* species, *Appl Environ Microbiol*, 64, 1688-1693.

150. PRESTI, F.L., RIFFARD, S., VANDENESCH, F., ETIENNE, J., 1998, Identification of *Legionella* species by random amplified polymorphic DNA profiles, J *Cli Microbiol*, 36, 3193-3197.

151. BANSAL, N.S., MCDONELL, F., 1997, Identification and DNA fingerprinting of Legionella strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis, *J Cli Microbiol*, 35, 2310-2314.

152. ALMEIDA, M.A.N., FRANÇA, F.P., 1999, Thermophilic and mesophilic bacteria in biofilms associated with corrosion in a heat exchanger, *World J Microbiol Biotechnol*, 15, 439-442.

153. CODONY, F., MIRANDA, A.M., MAS, J., 2003, Persistence and proliferation of some unicellular algae in drinking water systems as result of their heterotrophic metabolism, *Water SA*, 29, 113-116.

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

155. ZHANG, X., BISHOP, P.L., KUPFERLE, M., 1998, Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers, *Wat Sci Tech*, 37, 354-348.

156. ASTM, Annual Book of ASTM standards, 1975, Standard recommended practice for preparing, cleaning, and evaluating corrosion test specimens, G-1-72, 626-637, Philadelphia, USA.

157. SEDGWICK, A. K., TILTON, R. C., 1983, Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination, *J Clin Microbiol*. 17, 365-369.

158. ZAR, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis* 4th Edition, ISBN 0471163864, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ, USA.

159. HUWS, S.A., MCBAIN, A.J., GILBERT, P., 2004, Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities, *J Appl Microbiol*, 98, 238-244.

160. WIRTANEN, G., ALANKO, T., MATTILA-SANDHOLM, T., 1996, Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces, *Colloids Surfaces*, 5, 319-326.

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

162. LEHTOLA, M.J., MIETTINEN, I.T., KEINÄNEN, M.M., KEKKI, T.K., LAINE, O., HIRVONEN, A., 2004, Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes, *Wat Res*, 38, 3769-3779.

163. OLLOS, P.J., HUCK, P.M., SLAWSON, R.M., 2003, Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems, *AWWA*, 95, 87-97.

164. CAMPER, A.K., BRASTRUP, K., SANDVIG, A., CLEMENT, J., SPENCER, C., CAPUZZI, A.J., 2003, Effect of distribution system materials on bacterial regrowth, *AWWA*, 95, 107-121.

165. ARAUJO, J.C., MORTARA, R., CAMPOS, J.R., VAZOLLER, R.F., 2004, Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces, *Environ Tech*, 25, 809-817.

166. CHEN, C.I., GRIEBE, T., SRINIVASAN, R., STEWART, P.S., 1993, Effects of various metal substrata on accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and the efficacy of monochloramine as a biocide, *Biofouling*, 7, 241-251.

167. NORTON, C.D., LECHEVALLIER, M.W., 2000, A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution, *Appl Environ Microbiol*, 66, 268-276.

168. TEIXEIRA, P., OLIVEIRA, R., 1999, Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substances, *J Adhesion Sci Technol*, 13, 1287-1294.

169. WAGNER, D., CHAMBERLAIN, A.H.L., 1997, Microbiologically influenced copper corrosion in potable water with emphasis on practical relevance, *Biodegradation*, 8, 177-187.

170. ZACHEUS, O.M., IIVANAINEN, E.K., NISSINEN, T.K., LEHTOLA, M.J., MARTIKAINEN, P.J., 2000, Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water, *Wat Res*, 34, 63-70.

171. HYDE, F.W., ALBERG, M., SMITH, K., 1997, Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 19, 142-149.

172. KING, R., FLICK, G.J., PIERSON, M.D., SMITH, S.A., BOARDMAN G.D., COALE, C.W., 2004, Identification of bacterial pathogens in biofilms of recirculating aquaculture systems, *J Aquatic Food Prod Technol*, 13, 125-133.

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

174. COSTERTON, J.W., NICKEL, J.C, LADD, T.I, 1986, Suitable methods for the comparative study of free-living and surface associated bacterial populations, 49-84, Bacteria in Nature, 2. Baskı, Plenum Publishing Corporation, USA.

175. ARMON, R., STAROSVETZKY, J., ARBEL, T., GREEN, M., 1997, Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems, *Wat Sci Tech*, 35, 293-300.

176. KATZ, M., HAMMEL, J.M., 1987, The effect of drying, heat and pH on the survival of *Legionella pneumophila*, *Ann Cli Lab Sci*, 17, 150-156.

177. KUIPER, M.W., WULLINGS, B.A., AKKERMANS, A.D.L., BEUMER, R.R., KOOIJ, D., 2004, Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride, *Appl Environ Microbiol*, 70, 6826-6833.

178. BORELLA, P, MONTAGNA, M.T., ROMANO-SPICA, V., STAMPI, S., STANCANELLI, G., TRIASSI, M., NEGLIA, R., MARCHESI, I., FANTUZZI, G., TATO, D., NAPOLI, C., QUARANTA, G., LAURENTI, P., LEONI, E., DE LUCA, G., OSSI, C., MORO, M., RIBERA D.G., 2004, Legionella infection risk from domestic hot water, *Emerg Infect Dis*, 10, 457-64.

179. STOREY, M.V., ASHBOLT, N.J., STENSTRÖM, T.A., 2004, Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila* – a quantitative risk assessment for distributed water, *Wat Sci Tech*, 50, 77-82.

180. MAUCHLINE, W.S., ARAUJO, R., WAIT, R., DOWSETT, A.B., DENNIS, P.J., 1992, Physiology and morphology of *Legionella pneumophila* in continuous culture at low oxygen concentration, *J Gen Microbiol*, 138, 2371-2380.

181. LIN, Y.E., VIDIC, R.D., STOUT, J.E., YU, V.L., 2002, Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*, *Appl Environ Microbiol*, 68, 2711-2715.

182. WALKER, J.T., SONESSON, A., KEEVIL, C.W, WHITE, D.C., 1993, Detection of *Legionella pneumophila* in biofilms containing a complex microbial consortium biofilm gas cromathography-mass spectrometry analysis of genus specific hydroxy fatty acids, *FEMS Microbiol Lett*, 113, 139-144.

183. BORELLA, P., MONTAGNA, M.T., ROMANO-SPICA, V., STAMPI, S., 2003, Relationship between mineral content of domestic hot water and microbial contamination, *J Trace Elem Med Biol,* 17, 37-43.

184. TÜRETGEN, İ., SUNGUR, E.İ., ÇOTUK, A., 2005, Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems, *Environ Monitor Assess*, 100 (1-3) 53-58.

185. FORD, T., SACCO, E., BLACK, J., KELLEY, T., GOODACRE, R., BERKELEY, R.C.W., MITCHELL, R., 1991, Characterization of exopolymers of aquatic bacteria by pyrolysis-mass spectrometry, *Appl Environ Microbiol*, 1595-1601.

186. LAZAROVA, V., MANEM, J., 1995, Biofilm characterization and activity in water and wastewater treatment, *Wat Res*, 29, 2227-2245.

187. TSUNEDA, S., AIKAWA, H., HAYASHI, H., YUASA, A., HIRATA, A., 2003, Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface, *FEMS Microbiol Lett*, 223, 287-292.

188. LÜCK, P.C., HELBIG, J.H., EHRET, W., MARRE, R., WITZLEB, W., 1992, Subtyping of Legionella pneumophila serogroup 1 strains isolated in Germany using monoclonal antibodies, *Zentralbl Bakteriol*, 277, 179-87.

189. NORWOOD, D.E., GILMOUR, A, 2001, The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature, *Lett Appl Microbiol*, 33, 320-328.

190. STOODLEY, P., DEBEER, D., LEWANDOWSKI, Z., 1994, Liquid flow in biofilm systems, *Appl Environ Microbiol*, 60, 2711-2716.

191. CHOUDARY, S.G., 1998, Emerging microbial control issues in cooling water systems, *Hydrocarbon Process*, 77, 91-103.

192. MCLEOD, E.S., MACDONALD, R., BRÖZEL, V.S., 2002, Distribution of *Shewanella putrefaciens* and *Desulfovibrio vulgaris* in sulphidogenic biofilms of industrial cooling tower systems determined by fluorescent *in situ* hybridization, *Water SA*, 28, 123-128.

193. WHITE, D.C., KIRKEGAARD, R.D., PALMER, R.J., FLEMMING, C.A., CHEN, G., LEUNG, K.T., 2000, The biofilm ecology of microbial biofouling, biocide resistance and corrosion, 120-129, Biofilms in the Aquatic Environment, KEEVIL, C.V., GODFREE, A., HOLT, D., DOW, C., Springer-Verlag, New York, USA.

194. HALLAM, N.B., WEST, J.R., FORSTER, C.F., POWELL, J.C., SPENCER, I., 2002, The decay of chlorine associated with the pipe wall in water distribution systems, *Wat Res*, 36, 3479-3488.

ÖZGEÇMİŞ

26 Haziran 1973 tarihinde, Berlin'de doğmuştur. 1990 yılında Haydarpaşa Lisesi'nden, 1995 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olmuştur. 1995 yılının Aralık ayında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalında, Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamıştır. Bu tarihten itibaren, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Genel Mikrobiyoloji Laboratuarı, İmmünoloji Laboratuarı ve Özel Mikrobiyolojik Yöntemler Laboratuarı pratiklerinde görev almıştır. 1998 yılında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsünde "Soğutma Kuleleri Suyunda Legionella Cinsi Bakterilerin Araştırılması" isimli Yüksek Lisans tezini tamamlayarak mikrobiyoloji bilim dalında uzman unvanını almıştır. 1998–1999 eğitim-öğretim yılında Avusturya hükümetinden kazandığı (Austrian Academic Exchange Service) araştırma bursu kapsamında Prof. Dr. Werner LUBITZ danışmanlığında *Viyana Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Genetik Enstitüsü (Vienna Biocenter) Sistematik Bakteriyoloji Kürsüsü* ve Prof. Dr. Günther WEWALKA danışmanlığında *Avusturya Ulusal Legionella Referans Laboratuvarı*'nda misafir araştırıcı olarak çalışmıştır.

(E-posta: turetgen@istanbul.edu.tr)