



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARA MARUZ BIRAKILAN
LEGIONELLA PNEUMOPHILA BAKTERİLERİNİN
TESPİTİNDE UYGUN YÖNTEMLERİN BELİRLENMESİ

İpek ADA

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayten ERDEM

Mayıs, 2014

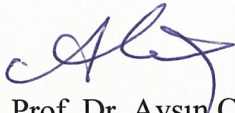
İSTANBUL

Bu çalışma 09/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Doç. Dr. Ayten ERDEM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



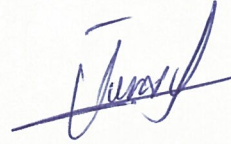
Prof. Dr. Aysin ÇOTUK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Esra İLHAN SUNGUR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 23947 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca değerli fikirleri ile bana yol gösteren, desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, tezimde büyük emeği olan, her daim yanımda olan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayten ERDEM'e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca akademik tecrübesi ve bilgisi ile her zaman desteğini hissettiğim saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Aysin ÇOTUK'a,

Tez çalışmam boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Zuhâl ZEYBEK, Doç. Dr. Esra İLHAN SUNGUR ve Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN'e,

Tez deneylerim sırasında teknik destekleri ile yanımda olan Sayın Doç. Dr. Fusun ÖZTAY'a,

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU ve tüm asistan hocalarıma,

Tez çalışmam boyunca ihtiyacım olan her konuda bilgilerini paylaşan ve her daim güler yüzlü olan sevgili hocam Araş. Gör. Miray ÜSTÜNTÜRK'e ve iyi ve kötü her an yanımda olan, dostluklarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım, Araş. Gör. Cansu VATANSEVER, Zaven AĞAY, Nilay DÖKÜMCÜ, Tuba ÜNSAL, Büşra DEMİR, Merve GÜLENER, Ayşenur TÜRKMEN ÖZDEMİR, Ayça SEZEN, Hüseyin US, Ekin GENÇ, Simge ARKAN, Gökçe İŞIKLI, Özgecan KAYALAR, Hale ÖVET ve Öznur YILMAZ'a,

Tez çalışmam boyunca manevi desteğiyle yanımda olan Tolga ALVER'e,

Yaşamım boyunca her konuda yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan, iyi ve kötü her anımda bana destek olan, canımdan çok sevdiğim annem İsmete ADA, değerli anneannem Fikriye ÇOBAN ve sevgili dayım Muzaffer ÖZALP ve ailesine,

Fikirleri, sevgisi, ilgisi ve şefkatiyle beni yetiştiren, akademik ve özel hayatımda iyi yerlere gelmemi sağlayan, her an yanımda hissettiğim, kişiliğiyle her daim idolüm olan, hayatım boyunca unutamayacağım güzel anılar bırakan, bugünlerimi görmeyi çok isteyen, sonsuzluğa uğurladığım, canımdan çok sevdiğim, gururum, biricik babam Muhittin ADA'ya,

tüm kalbimle teşekkür ederim.

Mayıs, 2014

İPEK ADA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiv
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	6
2.1. <i>LEGIONELLA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	6
2.1.1. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Fenotipik Özellikleri.....	6
2.1.2. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Keşfi ve Yaşam Alanları	6
2.2. <i>LEGIONELLA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN PATOGENEZİ	8
2.2.1. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Neden Olduğu Hastalıklar	8
2.2.2. <i>Legionella</i> Cinsi Bakteriler ile Konak Hücre Arasındaki İlişki.....	10
2.2.3. Lejyoner Hastalığı Tedavisi	11
2.3. <i>LEGIONELLA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN İZOLASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	12
2.3.1. Geleneksel Kültür Yöntemi	12
2.3.2. Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	13
2.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	16
2.4. SU ÖRNEKLERİNDEN <i>L. PNEUMOPHILA</i> 'NİN GERİ KAZANIMINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	20
2.4.1. Konsantrasyon.....	20
2.4.3. pH.....	22
2.4.4. Biyosit	22
3. MALZEME VE YÖNTEM	25
3.1. DENEYDE KULLANILAN ŞİŞELERİN HAZIRLANMASI	25
3.2. DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER.....	25

3.3. FARKLI KONSANTRASYONLARDA <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİ İLE KONTAMİNE SU ÖRNEKLERİNDEN <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ.....	26
3.3.1. Farklı Konsantrasyonlarda <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Hazırlanması	26
3.3.2. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti.....	27
3.3.3. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti.....	28
3.3.4. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanımlarının Semi-Nested PZR Yöntemi ile Tespiti.....	30
3.3.4.1. DNA izolasyonu.....	30
3.3.4.2. DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi	31
3.3.4.3. Semi-Nested PZR Yöntemi.....	32
3.4. FARKLI ÇEVRESEL FAKTÖRLERE MARUZ BIRAKILAN ÖRNEKLERDEN <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ.....	33
3.4.1. Deneyde Kullanılan Bakterilerin Hazırlanması	33
3.4.2.1. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti	34
3.4.2.2. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti	35
3.4.2.3. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanımlarının Semi-nested PZR Yöntemi ile Tespiti	35
3.4.3.1. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti	37
3.4.3.2. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti	38
3.4.3.3. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Semi-nested PZR Yöntemi ile Tespiti.....	38
3.4.4. Farklı Konsantrasyonlarda ve Sürelerde Biyosite Maruz Bırakılan Su Örneklerinden <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti	39
3.4.4.1. Deneyde Kullanılan Biyosit.....	39
3.4.4.2. Biyosit Uygulaması	39
3.4.4.3. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti	40
3.4.4.4. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti	41

3.4.4.5. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanımlarının Semi-nested PZR Yöntemi ile Tespiti	41
3.6. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER	42
3.6.1. Charcoal Yeast Ekstract (CYE)	42
3.6.2. BCYE Besiyeri Katkısı	42
3.6.3. Triptik Soya Agar (TSA) Besiyeri	43
3.6.4. HCl-KCl Asit Solüsyonu	43
3.6.5. 3x Fosfat Tamponu (3x PBS).....	44
3.6.6. 1x PBS	44
3.6.7. 5 M NaCl.....	44
3.6.8. 1 M NaOH.....	44
3.6.9. 10 M NaOH.....	45
3.6.10. 1 M HCl	45
3.6.11. %10 Sodyumdodesilsülfat (SDS)	45
3.6.12. 1 M Tris-HCl.....	45
3.6.13. 0.5 M EDTA	46
3.6.14. Tris-EDTA	46
3.6.15. Paraformaldehit (PFA).....	46
3.6.16. DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol)	47
3.6.17. Hibridizasyon Tamponu.....	47
3.6.18. Yıkama Tamponu.....	47
3.6.19. 0.1 N HCl (Hidroklorik Asit) Çözeltisi.....	47
3.6.20. 0.01 M KCl (Potasyum Klorür)	47
3.6.21. 10 M KOH (Potasyum Hidroksit).....	48
3.6.22. LEG705 Prob Konsantrasyonu	48
3.6.23. 10x TAE.....	48
3.6.24. 1x TAE.....	48
3.6.25. %1'lik Agaroz Jel	49
3.6.26. LEG225 Primer Konsantrasyonu	49
3.6.27. LEG448 Primer Konsantrasyonu	49
3.6.28. LEG858 Primer Konsantrasyonu	49
3.6.29. %50'lik Alkol.....	49
3.6.30. %80'lik Alkol.....	49
3.6.31. %96'lık Alkol.....	50

3.6.32. %98'lik Alkol.....	50
3.6.33. SYBR Nötralize Edici Solüsyon.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. FARKLI KONSANTRASYONLARDA <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİ İLE KONTAMİNE SU ÖRNEKLERİNDEN <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ.....	51
4.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları.....	51
4.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları.....	55
4.1.4. Semi-Nested PZR Sonuçları	61
4.2. FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARA MARUZ BIRAKILAN <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİ İLE KONTAMİNE SU ÖRNEKLERİNDEN <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ.....	65
4.2.1. Farklı Sıcaklık Uygulamalarına Maruz Bırakılan <i>L. pneumophila</i> Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti	65
4.2.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları.....	65
4.2.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları.....	67
4.2.1.3. Farklı Sıcaklık Uygulamalarına Maruz Bırakılan <i>L. pneumophila</i> ile Kontamine Su Örneklerinden <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Kültür ve FISH Yöntemine Göre Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırılması	72
4.2.1.4. Semi-Nested PZR Sonuçları	72
4.3.1. Farklı pH Uygulamalarına Maruz Bırakılan <i>L. pneumophila</i> Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti.....	76
4.3.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları.....	77
4.3.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları.....	79
4.3.1.3. Farklı pH Uygulamalarına Maruz Bırakılan <i>L. pneumophila</i> Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Kültür ve FISH Yöntemine Göre Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırılması	91
4.3.1.4. Semi-Nested PZR Sonuçları	91
4.4.1. Farklı Konsantrasyon ve Sürelerde Biyosite Maruz Bırakılan <i>L. pneumophila</i> Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti.....	95
4.4.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları.....	96
4.4.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları.....	97

4.4.1.3. Farklı Konsantrasyon ve Sürelerde Biyosite Maruz Bırakılan <i>L. pneumophila</i> Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin Kültür ve FISH Yöntemine Göre Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırılması	104
4.4.1.4. Semi-Nested PZR Yöntemi Sonuçları	104
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	109
KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ.....	132

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 3.1:** *L. pneumophila* bakterisinin Gram yöntemi ile boyanmış ışık mikroskobu görüntüsü (100x büyütme).....26
- Şekil 4.1:** Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila*'nın kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları54
- Şekil 4.2:** Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden kültür yöntemi ile geri kazanılan *L. pneumophila*'nın BCYE Agar besiyeri üzerindeki koloni görüntüleri. A) 10^{10} h/L, B) 10^9 h/L, C) 10^8 h/L, D) 10^7 h/L, E) 10^6 h/L, F) 10^5 h/L, G) 10^4 h/L, H) 10^3 h/L55
- Şekil 4.3:** Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....57
- Şekil 4.4:** Farklı konsantrasyonlarda standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü A) 10^{10} h/L, B) 10^5 h/L, C) Pozitif kontrol, 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....58
- Şekil 4.5:** Farklı konsantrasyonlarda çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 10^{10} h/L, B) 10^5 h/L, C) Pozitif kontrol, 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....59
- Şekil 4.6:** Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.60
- Şekil 4.7:** Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüsü. A) Kontrol. Standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi; B) 10^{10} h/L, C) 10^9 h/L, D) 10^8 h/L, E) 10^7 h/L, F) 10^6 h/L, Çevresel *L. pneumophila* izolatu; G) 10^{10} h/L, H) 10^9 h/L, I) 10^8 h/L, J) 10^7 h/L, K) 10^6 h/L.....61
- Şekil 4.8:** Farklı konsantrasyonlardaki standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol, 3) 10^{10} h/L, 4) 10^9 h/L, 5) 10^8 h/L, 6) 10^7 h/L, 7) 10^6 h/L, 8) Negatif kontrol, 9) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.63
- Şekil 4.9:** Farklı konsantrasyonlardaki çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol, 3) 10^{10} h/L, 4) 10^9 h/L, 5) 10^8 h/L,

6) 10 ⁷ h/L, 7) 10 ⁶ h/L, 8) Negatif kontrol, 9) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.....	64
Şekil 4.10: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterilerini içeren su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	67
Şekil 4.11: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	69
Şekil 4.12: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan standart <i>L. pneumophila</i> ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 5 °C'de 24 saat, B) 60 °C'de 3 dakika, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....	70
Şekil 4.13: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan çevresel <i>L. pneumophila</i> izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 5 °C'de 24 saat, B) 60 °C'de 3 dakika, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....	71
Şekil 4.14: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	72
Şekil 4.15: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüsü. A) Pozitif kontrol. <i>L. pneumophila</i> ATCC 33152 bakterisi; B) 5 °C'de 24 saat, C) 50 °C'de 30 dakika, D) 55 °C'de 15 dakika, E) 60 °C'de 3 dakika. Çevresel <i>L. pneumophila</i> izolatu; F) 5 °C' de 24 saat, G) 50 °C' de 30 dakika, H) 55 °C'de 15 dakika, I) 60 °C'de 3 dakika, J) Negatif kontrol.....	73
Şekil 4.16: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan standart <i>L. pneumophila</i> ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) 5 °C'de 24 saat, 3) 50 °C'de 30 dakika, 4) 55 °C'de 15 dakika, 5) 60 °C'de 3 dakika, 6) Pozitif kontrol, 7) Negatif kontrol, 8) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.	75
Şekil 4.17: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan çevresel <i>L. pneumophila</i> izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) 5 °C'de 24 saat, 3) 50 °C'de 30 dakika, 4) 55 °C'de 15 dakika, 5) 60 °C'de 3 dakika, 6) Pozitif kontrol, 7) Negatif kontrol, 8) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.	76
Şekil 4.18: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları. A) pH 2.2, B) pH 5.8, C) pH 7.0, D) pH 8.2.....	79
Şekil 4.19: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları. A) pH 2.2, B) pH 5.8, C) pH 7.0, D) pH 8.2.....	82

- Şekil 4.20:** Farklı sürelerde pH 2.2'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.83
- Şekil 4.21:** Farklı sürelerde pH 5.8'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.84
- Şekil 4.22:** Farklı sürelerde pH 7.0'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.85
- Şekil 4.23:** Farklı sürelerde pH 8.2'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.86
- Şekil 4.24:** Farklı sürelerde pH 2.2'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....87
- Şekil 4.25:** Farklı sürelerde pH 5.8'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....88
- Şekil 4.26:** Farklı sürelerde pH 7.0'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....89
- Şekil 4.27:** Farklı sürelerde pH 8.2'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.....90
- Şekil 4.28:** Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları. 1) pH 2.2, 2) pH 5.8, 3) pH 7.0, 4) pH 8.291
- Şekil 4.29:** Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüsü. pH 2.2; 1) 0. dakika, 2) 15 dakika, 3) 30 dakika, 4) 1 saat, 5) 24 saat, pH 5.8; 6) 0. dakika, 7) 15 dakika, 8) 30 dakika, 9) 1 saat, 10) 24 saat, pH 7.0; 11) 0. dakika, 12) 15 dakika, 13) 30 dakika, 14) 1 saat, 15) 24 saat, pH 8.2; 16) 0. dakika, 17) 15 dakika, 18) 30 dakika, 19) 1 saat, 20) 24 saat, 21) Pozitif kontrol, 22) Negatif kontrol. A: ATCC 33152 bakterisi, B: Çevresel izolat.92

- Şekil 4.30:** Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol. pH 2.2; 3) 0. dakika, 4) 15 dakika, 5) 30 dakika, 6) 1 saat, 7) 24 saat, pH 5.8; 8) 0. dakika, 9) 15 dakika, 10) 30 dakika, 11) 1 saat, 12) 24 saat, pH 7.0; 13) 0. dakika, 14) 15 dakika, 15) 30 dakika, 16) 1 saat, 17) 24 saat, pH 8.2; 18) 0. dakika, 19) 15 dakika, 20) 30 dakika, 21) 1 saat, 22) 24 saat, 23) Pozitif kontrol, 24) Negatif kontrol, 25) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.94
- Şekil 4.31:** Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol. pH 2.2; 3) 0. dakika, 4) 15 dakika, 5) 30 dakika, 6) 1 saat, 7) 24 saat, pH 5.8; 8) 0. dakika, 9) 15 dakika, 10) 30 dakika, 11) 1 saat, 12) 24 saat, pH 7.0; 13) 0. dakika, 14) 15 dakika, 15) 30 dakika, 16) 1 saat, 17) 24 saat, pH 8.2; 18) 0. dakika, 19) 15 dakika, 20) 30 dakika, 21) 1 saat, 22) 24 saat, 23) Pozitif kontrol, 24) Negatif kontrol, 25) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.95
- Şekil 4.32:** Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.97
- Şekil 4.33:** Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.99
- Şekil 4.34:** 100 ppm konsantrasyonda biyosite maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 saat, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy2 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü..... 100
- Şekil 4.35:** 200 ppm konsantrasyonda biyosite maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 saat, B) 6 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy2 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü..... 101
- Şekil 4.36:** 100 ppm konsantrasyonda biyosite maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 saat, B) 6 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy2 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü 102
- Şekil 4.37:** 200 ppm konsantrasyonda biyosite maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0 saat, B) 6 saat, C) Pozitif kontrol 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy2 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü 103
- Şekil 4.38:** Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları. 104
- Şekil 4.39:** Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA bant görüntüsü. 100 ppm; 1) 0. saat, 2) 1 saat, 3) 3 saat, 4) 6 saat, 5) 24 saat,

6) Pozitif kontrol. 200 ppm; 7) 0. saat, 8) 1 saat, 9) 3 saat, 10) 6 saat, 11) 24 saat, 12) Negatif kontrol. A: ATCC 33152 bakterisi, B: Çevresel izolat.....105

Şekil 4.40: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol, 100 ppm; 3) 0. saat, 4) 1 saat, 5) 3 saat, 6) 6 saat, 7) 24 saat, 200 ppm; 8) 0. saat, 9) 1 saat, 10) 3 saat, 11) 6 saat, 12) 24 saat, 13) Negatif kontrol, 14) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.....107

Şekil 4.41: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol, 100 ppm; 3) 0. saat, 4) 1 saat, 5) 3 saat, 6) 6 saat, 7) 24 saat, 200 ppm; 8) 0. saat, 9) 1 saat, 10) 3 saat, 11) 6 saat, 12) 24 saat, 13) Negatif kontrol, 14) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.108

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan sıcaklık ve süreleri.	34
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan pH değerleri/süre.....	37
Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan biyosit konsantrasyon ve süreleri.....	40
Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	53
Tablo 4.2: Farklı konsantrasyonlarda <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	56
Tablo 4.3: Farklı konsantrasyonlarda <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumu.	62
Tablo 4.4: Farklı sıcaklık değerlerinin <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	66
Tablo 4.5: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.	68
Tablo 4.6: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumu.	74
Tablo 4.7: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.	78
Tablo 4.8: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.	81
Tablo 4.9: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürünü oluşumu.	93
Tablo 4.10: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	96

Tablo 4.11: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.....	98
Tablo 4.12: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan <i>L. pneumophila</i> bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumu.....	106

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µl	: mikrolitre
µM	: mikromolar
°C	: santigrat derece
g	: gram
L	: litre
ml	: mililitre
pH	: hidrojen gücü
ppm	: milyonda bir
rpm	: round per minute

Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonları
BCYE	: Buffered Charcoal Yeast Extract
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CTI	: Cooling Technology Institute
DAPI	: 4',6- diamino-2-phenylindole, dihydrochloride
DNA	: deoksiribonükleik asit
EDTA	: etilendiamintetraasetik asit
FISH	: Floresan <i>in situ</i> Hybridisation
kob	: koloni oluşturan birim
OSHA	: Occupational Safety and Health Administration
PBS	: phosphate buffered saline
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
rRNA	: ribozomal ribonükleik asit

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARA MARUZ BIRAKILAN *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN TESPİTİNDE UYGUN YÖNTEMLERİN BELİRLENMESİ

İPEK ADA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ayten ERDEM

Legionella cinsi bakteriler 59 tür ve 70 farklı serotipi ile doğal su kaynakları ve insan yapımı su sistemlerinde yaygın olarak bulunan, insanda Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşine neden olan patojen bir bakteridir. *Legionella* cinsi bakteriler soğutma kulesi, duş başlığı, klimalar, spa ve havuzlar gibi insan yapımı su sistemlerine geçtiklerinde uygun koşullar nedeniyle çoğalırlar. Besin yetersizliği, sıcaklık, pH, dezenfektan gibi çevresel şartlar ve ortamdaki diğer mikroorganizmalar, *Legionella* bakterilerini strese sokarak VBNC (viable but non-culturable) fazına girmesine neden olabilmektedir. Çevresel faktörlere maruz bırakılmış *Legionella* cinsi bakterileri içeren su örnekleri laboratuvar ortamında incelendiğinde, bakterilerin *Legionella* bakterilerine özgü besiyerlerinde koloni oluşturamadığı bilindiğinden besiyerinde üreme olmaması bakterinin o ortamda var olmadığı anlamına gelmemektedir.

Çalışmamızın ilk aşamasında, farklı konsantrasyonlarda (10^2 - 10^{10} h/L) standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ve çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı için kullanılan kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemlerindeki en düşük tespit etme değerleri belirlenmiştir. Çalışmamızın ikinci aşamasında da farklı sıcaklık (5 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C), pH (2.2, 5.8, 7.0, 8.2) ve Huwa-San TR⁵⁰ biyositin farklı dozlarına (100 ppm ve 200 ppm) farklı sürelerde maruz bırakılan 10^8 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilen içme suyu örneklerinde geleneksel kültür, floresan *in situ*

hibridizasyon (FISH) ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının saptanmasında en uygun yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

L. pneumophila bakterilerinin geri kazanım sonuçları konsantrasyona bağlı olarak değerlendirildiğinde, düşük konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterilerini içeren örnekler için geri kazanımda en iyi yöntemin kültür yöntemi (10^3 h/L) olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan yöntemlerle konsantrasyona bağlı olarak geri kazanımın olabilmesi için su örneğinde, kültür yöntemi için en az 10^3 h/L, FISH yönteminde 10^5 h/L, semi-nested PZR yönteminde 10^6 h/L *L. pneumophila* bakterisinin olması gerektiği saptanmıştır.

Farklı çevresel koşullara maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden *L. pneumophila*'nın geri kazanımı incelendiğinde, en yüksek geri kazanım oranının 5 °C'de 24 saat (%94), pH 2.2'de 0. dakika (%97) ve 200 ppm (0. saat) konsantrasyondaki biyosit uygulamasında (%95.75) FISH yöntemi ile sağlandığı tespit edilmiştir. Farklı çevresel koşullara (sıcaklık, pH, biyosit) maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklerin tümünden semi-nested PZR yöntemi ile geri kazanımın yapıldığı belirlenmiştir.

FISH ve semi-nested PZR yönteminin, farklı çevresel koşullara maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden geri kazanımında uygun yöntemler olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma, ülkemizde farklı çevresel koşullara maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak geri kazanım oranlarının incelendiği ilk çalışma olması açısından önem göstermektedir.

Mayıs 2014, 150.

Anahtar kelimeler: *L. pneumophila*, kültür yöntemi, FISH, semi-nested PZR.

SUMMARY

M. Sc. THESIS

IDENTIFICATION OF PROPER METHODS TO DETERMINE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* BACTERIA EXPOSED TO DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS

İpek ADA

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ayten ERDEM

Legionella species bacteria are pathogenic bacteria that are present commonly in natural water and human-made water systems with 59 species and 70 different serotypes and that causes Legionnaires' disease and Pontiac fever. *Legionella* species bacteria reproduce due to suitable conditions as they pass through the human-made water systems such as cooling tower, shower head, air conditioners, spa and pools. *Legionella* bacteria pass to the VBNC (viable but non-culturable) phase due to the presence of other microorganisms in the environment and the environmental conditions such as starvation, temperature, pH and disinfectants. After examining under laboratory conditions the water samples containing *Legionella* type bacteria that have been exposed to environmental factors, it was shown that those bacteria couldn't form a medium that are particularly optimum for the *Legionella* bacteria, but this result will not mean that the bacteria is not present in such sample or environment.

At the first stage of our study, it was determined lowest detection limit of *L. pneumophila* by using traditional culture, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and semi-nested polymerase chain reaction (PCR) methods in *L. pneumophila* ATCC 33152 bacteria and environmental *L. pneumophila* isolate at different concentrations (10^2 - 10^{10} cell per liter). At the second stage of our study, it was aimed to determined the most suitable method for determination of recovery usage water samples that are contaminated by *L. pneumophila* bacteria at 10^8 cell per liter concentration at different

times at different temperatures (5 °C, 50 °C, 55 °C and 60 °C), pH (2.2, 5.8, 7.0, 8.2) and Huwa-san TR⁵⁰ biocide dosage (100 ppm and 200 ppm).

When the recovery results of *L. pneumophila* bacteria are evaluated depending on the concentration; the most suitable method for the recovery of the samples including *L. pneumophila* bacteria at lower concentrations were determined as the culture method (10³ cell per liter). In order to have recovery depending on concentration via the methods applied; it was found that at least 10³ cell per liter for the culture method, 10⁵ cell per liter for the FISH method and 10⁶ cell per liter *L. pneumophila* bacteria for the semi-nested PCR method should be present in the water sample.

When the recovery of *L. pneumophila* bacteria were assessed among the water samples including *L. pneumophila* bacteria that were exposed to different environmental conditions; it was found that the maximum recovery ratio was provided via the FISH method in biocide application at 24 hours at 5 °C (% 94), 0th minute at pH 2.2 (%97) and 200 ppm (0th hour) concentration. It was specified that recovery from all the samples including *L. pneumophila* bacteria that were exposed to different environmental conditions (temperature, pH and biocide) were examined by the semi-nested PCR.

Among the water samples including *L. pneumophila* bacteria were exposed to different temperature applications (24 hours at 5 °C, 30 minutes at 50 °C, 15 minutes at 55 °C and 3 minutes at 60 °C); it was determined that recovery ratio was the lowest in the FISH method at 3 minutes at 60 °C and the highest was 24 hours at 5 °C.

It was determined that FISH and semi-nested PCR methods are suitable methods for the recovery of *L. pneumophila* bacteria that are subject to different environmental conditions from the water samples.

This study places importance to be the first study that examines the recovery ratios of water samples including *L. pneumophila* bacteria that are exposed to different environmental conditions in our country via culture, FISH and semi-nested PCR methods.

May 2014, 150.

Keywords: *L. pneumophila*, culture method, FISH, semi-nested PCR.

1. GİRİŞ

Legionella cinsi bakteriler, temel enerji kaynağı olarak aminoasitleri kullanan, karbonhidratları okside ya da fermente edemeyen, aerobik, fakültatif hücre içi paraziti Gram negatif çomak bakterilerdir (Fujii ve Yoshida, 1998).

Legionellaceae ailesinde yer alan *Legionella* cinsi bakteriler, bugün 70 farklı serogrup ve en az 50 türe sahiptir. Bütün türlerinin patojen olmamasına karşın, Avrupa'daki tüm *Legionella* salgınlarının %95'inden fazlasına sebep olan tür *Legionella pneumophila*'dır (Bartram ve diğ., 2007; Joseph ve Ricketts, 2010). Lejyoner hastalığı terimi, 1976 yılı Temmuz ayında Pensilvanya'daki, Philadelphia 58. geleneksel Amerikan askeri birliği toplantısında Belleveue-Statford Oteli'nde konaklayanlarda meydana gelen 221 katılımcının enfekte olduğu, 34 kişinin hayatını kaybettiği salgından sonra kullanılmaya başlanmıştır (Rosa, 1993).

Legionella cinsi bakteriler genel olarak doğal ve insan yapımı su sistemlerinde yer alırlar (Steinert ve diğ., 2002). Bu bakteriler duş başlıklarında, fışkiyelerde, soğutma kulelerinde, spalar, yüzme havuzları, nemlendiriciler, içme suları, sebze sulama cihazları, göz yıkama istasyonları ve dental ünite sularında bulunmaktadır (Atlas, 1999; Zanetti ve diğ., 2000). Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşine neden olan *Legionella* cinsi bakterilerin insana geçişi kontamine olmuş aerosollerin inhalasyonu ve aspirasyonu ile gerçekleşmektedir (Wellinghausen ve diğ., 2001; Fields ve diğ., 2002). Yaşlı ve bağışıklığı baskılanmış insanların *Legionella* enfeksiyonlarına yakalanma olasılığı daha fazladır (Broome, 1983). İnsandan insana geçişi belirlenmemiştir (Kwaik ve diğ., 1998).

Legionella bakterilerinin doğal su habitatlarından içme suyu sistemlerine geçişi insan sağlığını tehdit etmektedir. Özellikle en uygun yaşama alanlarından olan sıcak su sistemleri, bu bakterinin üremesini önemli ölçüde teşvik etmektedir (Sanden ve diğ., 1989).

Doğal su ortamlarında az sayıda bulunan *L. pneumophila* bakterileri, insan yapımı su sistemlerine geçtiklerinde uygun ortam şartlarında yüksek konsantrasyon seviyelerine

ulaşabilmektedirler (Stout ve diğ., 1985). Daha düşük konsantrasyonlarda *L. pneumophila* içeren sistemlerde, ortam koşullarına bağlı olarak *L. pneumophila* bakterileri çoğalıp yayılarak enfeksiyon oluşturma potansiyeli göstermektedirler. Bu nedenle az sayıda olsa bile su sistemlerinde *L. pneumophila* bakterilerinin varlığı kabul edilmemektedir (Çotuk, 1998).

L. pneumophila bakterilerinin geri kazanımının incelendiği çalışmalarda, geri kazanım oranının, *L. pneumophila* konsantrasyonuna, örneğin yoğunlaştırılmasında kullanılan yöntemlere (filtrasyon veya santrifüj), su örneğinin hacmine, çevresel koşullara ve ortamdaki mevcut diğer mikrofloraya bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir (Villari ve diğ., 1998; Wojcik-Fatla ve diğ., 2012; Bedrina ve diğ., 2013). Kültür yöntemi ile yapılan bir çalışmada, *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanımın kullanılan filtreye göre değiştiğini, en yüksek geri kazanımın ise polikarbonat filtre ile gerçekleştiği belirlenmiştir (Boulanger ve Edelstein, 1995; Villari ve diğ., 1998). Yapılan başka bir çalışmada, *L. pneumophila* içeren su sistemlerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının, bakteri konsantrasyonuna bağlı olduğu, düşük konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren örneklerde geri kazanımın düşük olduğu, hatta en etkili geri kazanım yöntemleri ile bile yanlış sonuçlar alınabileceği belirtilmektedir (Boulanger ve Edelstein, 1995).

Su örneklerindeki *L. pneumophila*'nın geri kazanımında, ortamda bulunan refakatçi floranın engellenebilmesi için, kültür yönteminde asit ve/veya sıcaklık uygulaması yapılması gerekmektedir. *Legionella* bakterilerinin yüksek oranda geri kazanımının sağlanabilmesi için, örneklerin, filtrasyon yöntemiyle yoğunlaştırılması ve asit ve/veya sıcaklık uygulaması yapılması gerekmektedir (Bopp ve diğ., 1981; EPA, 1985; Nguyen ve diğ., 1991; Ta ve diğ., 1995). Asit ile muamele aşamasında, diğer pek çok bakteriden farklı olarak *Legionella* bakterileri aside karşı direnç gösterdiklerinden dolayı izole edilebilmektedirler (Nguyen ve diğ., 1991). Yapılan çalışmalarda, kültür yönteminde sıcaklık ve asit uygulaması sonuçları değerlendirildiğinde, asit uygulaması ile *L. pneumophila* bakterilerinin sıcaklık uygulamasına göre daha yüksek oranda geri kazanıldığı, en yüksek geri kazanım oranının ise pH 2.2'ye 15 dakika ve 59 °C'ye maruz bırakılmış *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden elde edildiği tespit edilmiştir (Reinthal ve diğ., 1993; Bartie ve diğ., 2001).

Su örneklerin toplanması ve ön uygulama adımlarının ardından analizi yapılacak örnekler, uygun besiyerlerine ekilmelidir. *Legionella*, standart kültür besiyerlerinde üremez; çünkü besinsel ihtiyaçları ve yüksek oranda demir gereksinimi diğer bakterilere göre farklıdır (EPA, 1985). “Buffered charcoal yeast extract” (BCYE) agar, *Legionella* cinsi bakterilerin kültüre edilebilmesinde yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir (Edelstein, 1987).

Doğal ortamlarda ve insan yapımı su sistemlerinde bakteriler, çok çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlere maruz kalarak strese girmektedirler. Bakteriler, sıcaklık, pH, osmotik stres, biyosit, besin kıtlığı gibi çevresel faktörlerin zararlarından korunmak için adaptasyon ve direnç stratejileri geliştirebilmektedirler. Olumsuz çevresel şartlara maruz kalan bakterilerin, bu çevresel faktörlere cevap olarak VBNC fazına girdikleri bilinmektedir.

Sıcaklık, su ortamlarındaki *L. pneumophila* bakterilerinin yayılması ve canlılıklarını sürdürmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Su sıcaklığı çevresel örneklerde daha yüksek olduğu için insan yapımı su sistemlerinin *Legionella* bakterilerinin üremesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. *Legionella* spp., 20 °C -42 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde üreyebilen bir gamaprotebakterdir (Türetgen ve diğ., 2005; Diederer, 2008). Pek çok Lejyoner vakasının meydana gelişi, binalar, oteller ve hastaneler gibi *Legionella* bakterilerinin yaşam alanı olan yerlerdeki sıcaklık değişiminin olduğu yapılar (soğutma kuleleri ve buharlaştırıcı kondansatörler gibi) ile ilişkilidir (EPA 1985, Yu, 1997; EPA, 1998; Lin ve diğ., 1998).

L. pneumophila bakterilerinin optimum üreme sıcaklığı 30 °C -40 °C arasında olmasına rağmen düşük ve yüksek sıcaklık değerlerinde de canlılıklarını sürdürebildikleri belirlenmiştir. Sıcaklığa bağlı yapılan çalışmalarda geri kazanım sonuçları değerlendirildiğinde, 45 °C -55 °C gibi yüksek sıcaklık değerlerinde, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımın yüksek olduğu, düşük sıcaklık değerlerinde ise geri kazanım oranının azaldığı, 15 °C'nin altındaki ve 55 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara sahip su sistemlerinde ise *L. pneumophila* bakterilerinin tespit edilmesinde güçlükler yaşandığı belirlenmiştir (Dennis ve diğ., 1984; Kramer ve Ford, 1994).

L. pneumophila bakterilerinin hayatta kalabilmeleri ve üreyebilmeleri için sıcaklığın yanında, ortamın pH'sı da önemlidir. *Legionella* cinsi bakterilerin üremesi için en uygun pH değerinin 6.9 olduğu belirlenmiştir. *L. pneumophila* bakterileri, aside kısa süreli olarak direnç göstermektedir ve bu özellik onların ortamda bulunan diğer bakterilerden ayrılarak çevresel örneklerden izole edilebilmesini sağlamaktadır (Bopp, 1981). Asit uygulaması ile ilgili yapılan çalışmalarda, *L. pneumophila* bakterilerinin asite (pH 2.2) dirençli bakteriler olduğu ve pH 2.2'e maruz bırakılan örneklerden *L. pneumophila*'nın geri kazanımının yüksek olduğu; fakat asit ile muamele süresi arttıkça geri kazanımının azaldığı, en yüksek geri kazanım oranının ise pH 2.2'e 15 dakika maruz bırakılan örneklerde olduğu tespit edilmiştir (Ta ve diğ., 1995).

L. pneumophila bakterileri uygun koşullarda, sistemde yüksek konsantrasyon seviyelerine ulaşabilmektedir. Yüksek konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri sistemde kolonize olarak biyofilm oluşturabilmekte; böylelikle etkili biyosit uygulamalarını içeren yöntemler bile *Legionella* cinsi bakterileri yok edememektedir. Bu nedenle sistemde ciddi sorunlara neden olabilmekte ve insanlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir. Diğer yandan biyosit uygulamasından sonra sistemde bulunan *Legionella* cinsi bakteriler VBNC fazına geçerek besiyerinde üreme özelliklerini kaybedebilmektedirler. Bu yüzden bir biyositin, *Legionella* üzerindeki etkisini değerlendirmede kültür yönteminin yanında moleküler yöntemlerin de kullanılması gerekmektedir (Yamamoto ve diğ., 1992). Biyosit uygulamasına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su sistemlerinden alınan örnekler incelendiğinde, sistemden örneği almadan önce uygulanan biyosit konsantrasyonu ve temas süresinin *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında etkiliği olduğu, gerçekte ortamda mevcut olan *L. pneumophila* bakterilerinin stres koşulları nedeniyle VBNC fazına geçerek kültür yöntemi ile sistemden geri kazanılamadığı belirlenmiştir. Kültür ve moleküler yöntemler birlikte kullanıldığında çevresel koşullara maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su sistemlerinden geri kazanımın yüksek olduğu belirlenmiştir (Chae ve Schraft, 2001).

Yapılan çalışmalarda, PZR yönteminin düşük konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterilerinin tespitinde uygun bir yöntem olduğu ve PZR ve kültür yöntemlerinin su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında beraber kullanılması

gerektiği sonucuna varılmıştır. Kullanılan PZR yöntemleri arasında, semi-nested PZR'nin PZR inhibitörlerinden en az seviyede etkilendiği *Legionella* cinsi bakterilerin belirlenmesinde yüksek özgüllük gösteren bir yöntem olduğu tespit edilmiştir (Miyamoto ve diğ., 1997; Villari ve diğ., 1998). Kültür ve PZR yöntemleri kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerin geri kazanım oranının kültürde kullanılan asit ve sıcaklık uygulamalarına, PZR yönteminde ise DNA izolasyonuna bağlı olarak değiştiği, en yüksek geri kazanımın ise semi-nested PZR yöntemi kullanılarak gerçekleştiği belirlenmiştir (Wojcik-Fatla ve diğ., 2012).

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki (10^2 - 10^{10} h/L) *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ve evresel *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilen içme suyu örneklerinden geri kazanım olabilmesi için uygulanan kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri ile *L. pneumophila* bakterilerinin tespit etme limitlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, farklı sıcaklık (5 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C), pH (2.2, 5.8, 7.0 ve 8.2), biyosit (100 ppm ve 200 ppm) uygulamalarına maruz bırakılan 10^8 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren örneklerden, kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında en iyi yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu alışma, *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı ile ilgili gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *LEGIONELLA* CİNSİ BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

2.1.1. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Fenotipik Özellikleri

Legionella cinsi bakteriler, Gram negatif, 0.3-0.9 µm eninde, 2-20 µm boyunda, endospor oluşturmeyen, aerobik, hücre içinde çoğalabilen, polar veya subpolar olan bir ya da daha fazla sayıda flagellası ile hareketli, sporsuz, çomak şeklinde bir bakteridir. *Legionella* cinsi bakterilerin pek çok türü (*Legionella londiniensis*, *Legionella nautarum* ve *Legionella oakridgensis* türleri hariç), sudaki hareketlerini sağlayan unipolar flagellaya sahiptir (Fujii ve Yoshida, 1998). *Legionella* bakterileri ışık mikroskopunda uzun filamentöz yapı gösterirler (Steinert ve diğ., 2002).

Karbonhidratları okside ya da fermente edemezler. Temel enerji kaynağı olarak aminoasitleri kullanırlar, vitamine ihtiyaç duymazlar. Katalaz, β-laktamaz, jelatinaz aktivitesine sahiptirler ve oksidaz aktivitesi zayıftır. Üreaz reaksiyonları negatiftir. *L. pneumophila*'nın serogrup 4 ve 15 hariç tüm serogrupları hippuratu güçlü biçimde hidroliz ederler. Nitratı nitrite indirgemeleri onları Enterobacteriaceae'den ayıran bir özelliktir (George ve diğ., 1980).

Legionella cinsi bakteriler, 58 tür ve 70 farklı serogruba sahiptir. Her bir serogrup, hücre membranındaki farklı yüzey yapılarından dolayı alttipler içermektedir ve bu alttipler özel testlerle birbirinden ayırt edilmektedir (Euzeby, 2013).

2.1.2. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Keşfi ve Yaşam Alanları

Legionella cinsinin üyeleri ilk olarak 1943 yılında Tatlock tarafından, 1947'de Jackson ve arkadaşları tarafından kobaylarda kültüre edilebilmiş ve "Rickettsia-benzeri organizmalar" olarak karakterize edilmiştir (Huerta ve diğ., 2003).

L. pneumophila ilk kez 1976 yılı Haziran ayında Philadelphia'daki Pennsylvania Amerikan Ordu toplantısına katılan delegeler arasında ortaya çıkan 221 vakadan 34'ünün ölümüyle sonuçlandığı bir salgında keşfedilmiştir. Yoğun laboratuvar

çalışmalarına rağmen, hastalığın etkeni aylarca belirlenememiştir. Yaklaşık 6 ay sonra, Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers of Disease Control and Prevention, CDC)'nden Joseph McDade ve Charles Shepard adlı iki araştırmacı bu hastalık etkeninin Gram boyama sonrası soluk görünen, Gram-negatif bir çomak bakteri olduğunu tespit etmişlerdir. Hastalık etkeni olarak bakterinin tanısının konulması 3 ay sürmüştür. Amerikan Lejyon Birliği katılımlı toplantıda meydana geldiği için, bu hastalığa Lejyoner Hastalığı ve neden olan bu bakteri cinsine de *Legionella* adı verilmiştir (McDade ve diğ., 1977).

Legionella cinsi bakteriler protozoonlar içinde üreyebilen, mikrobiyal biyofilm toplulukları içinde hayatta kalabilen, hücre içi fakültatif, Gram negatif çomak bakterilerdir. Göller, göletler ve akarsu gibi doğal su kaynaklarında yaşadığı gibi, insan yapımı su sistemleri ve toprakta da yaşayabilmektedir. Kaplıca havuzları ve anafolar, buharlaştırıcı kondansatörler, ısı değiştiriciler, sıcak su sistemleri (musluklar, duş başlıkları, püskürtücüler) ve depoları, nemlendiriciler, dekoratif çeşmeler, solunum terapi cihazları, diş ünitesi sistemleri, metal işleme sistemleri, jakuziler, buz ve çay makinaları ve soğutma kuleleri gibi insan yapımı sistemler, *Legionella* bakterileri için uygun habitatlar sağlamaktadırlar. Doğal su ortamlarında *Legionella* konsantrasyonu oldukça düşük olmasına rağmen insan yapımı su sistemlerine geçtiklerinde buradaki koşulların etkisiyle çoğalmakta ve bu su sistemlerinde yüksek sayılara ($>10^4$ kob/L) ulaşabilmektedir. *Legionella* cinsi bakterilerinin çevreye yayılmasında soğutma kulelerinin önemli rolü vardır (Stout ve diğ., 1985; Muder ve Yuu, 2002; Castilla ve diğ., 2008; Ferre ve diğ., 2009; Guillemet ve diğ., 2010).

Legionella bakterileri genel olarak su sisteminde boru içleri, kör noktalar gibi suyun durgun olduğu kısımlarda bulunmaktadır. Bu bakteriler, suyun yavaş akışı ve durgunluğu nedeniyle çeşitli yüzeylerde ve uzun süre kullanılmayan sistemlerde gelişen biyofilm tabakasında çoğalarak antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gösterebilmektedir (Tobin ve diğ., 1980).

2.2. LEGIONELLA CİNSİ BAKTERİLERİN PATOGENEZİ

2.2.1. Legionella Cinsi Bakterilerin Neden Olduğu Hastalıklar

Legionella cinsi bakteriler, Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşi adı verilen iki ayrı hastalığa neden olmaktadır. İnkübasyon süresinin 2-10 gün arasında değiştiği Lejyoner hastalığının şiddet aralığı, hafif bir öksürük ve düşük ateşten, hızlıca ilerleyen pnömoniye kadar gidebilmektedir. Lejyoner hastalığı özellikle, erkeklerde, 50 yaş üstü erişkinlerde, sigara kullananlarda, hasta, bağışıklık sistemi zayıflamış ve akciğer rahatsızlığı bulunan kişilerde daha fazla meydana gelmektedir. Lejyoner hastalığı, pnömoninin akut tipi olup erken safhalarda ateş, baş ağrısı, kas ağrısı şikayetleri oluşurken, ileri safhalarda nefes darlığı, ishal, bulantı, merkezi sinir sistemi bozuklukları görülmektedir. Bu hastalığa bağlı ölüm oranının %10-15 olduğu belirlenmiştir (Szewzyk ve diğ., 2000).

Uzun bir süre etkeni bulunamayan non-pnömonik ateşli bir hastalık olan Pontiak ateşi salgınlarına da *Legionella* cinsi bakteriler sebep olmaktadır. Bu hastalık ilk olarak, Michigan eyaletinin Pontiac kasabasında görüldüğü için bu isimle adlandırılmaktadır (Glick ve diğ., 1978). Lejyoner Hastalığı gibi Pontiak ateşi salgını da ilk kez 1949 yılında henüz tanımlanamayan bir salgın olarak görülmüştür. Soğuk algınlığına benzer semptomlar göstermektedir. İnkübasyon periyodu 1-3 gün süren hastalıkta yüksek ateş görülmekte ve 2-5 gün içerisinde iyileşme sağlanabilmektedir. Pontiak ateşinde, pnömoni oluşmadığı sürece ölüm görülmemektedir (Szewzyk ve diğ., 2000; Boss ve Day, 2003).

Günümüzde Lejyoner hastalığına bağlı ölüm oranı, kısa sürede uygulanan laboratuvar testleri, *Legionella* spp.'ye özgü antibiyotiklerin kullanımı, bu hastalık hakkında bilgi sahibi olan uzman doktorların sayısının artmasıyla azalmıştır. Ancak belirlenen uygun tedavinin zamanında yapılmaması ölümlere sebebiyet verebilmektedir (Heath ve diğ., 1996). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) verilerine dayanarak 1980-1998 yılları arasında toplum kaynaklı Lejyoner salgınlarından ölüm oranının %26'dan %10'a düştüğü bildirilmiştir (Benin ve diğ., 2002). Diğer yandan yapılan çalışmalarda, Lejyoner vakalarında hızlı tanı yöntemlerinden biri olan üriner antijen testi uygulamasının artmasıyla birlikte, ölüm oranının %0-%5.5'a kadar düştüğü bildirilmektedir (Plouffe ve diğ., 2003; Yu ve diğ., 2004; Mykietiuk ve diğ., 2005).

L. pneumophila'ya ait 16 serogrup mevcuttur. Bazı *L. pneumophila* serogrupları, diğer serogruplara kıyasla daha virulandır. Özellikle *L. pneumophila* serogrup 1, Amerika ve Avrupa'da rastlanan Lejyoner hastalığının en az %70'ine neden olan etken olmakla birlikte Lejyoner hastalığına sebep olan birincil ajan olarak kabul edilmektedir. Soğutma kulelerinden meydana gelen salgınların çoğu *L. pneumophila* serogrup 1'den kaynaklanmaktadır (Lau ve Ashbolt, 2009). *L. pneumophila* serogrup 1 Lejyoner vakalarında birinci sırada yer alırken, *L. pneumophila* serogrup 2-14 bakterisi ise vakaların %7'sini oluşturmaktadır. Serogrup 2-14 arasında insanda enfeksiyona neden olan serogruplar genellikle 3, 4, 6 ve 13'tür. Serogrup 4 ve 6 ise, hastalıklarda, *L. pneumophila* serogrup 1'den sonra en sık izole edilen serogruplardır. Brezilya'da bir hastanede 2000-2001 yılları arasında pnömoni hastalarının %5.1'inin *L. pneumophila* serogrup 1-6 suşu ile enfekte olduğu belirlenmiştir (Luck ve Liebser, 2003; Zeybek ve diğ., 2003; Chedid ve diğ., 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, salgın oluşturan vakaların büyük çoğunluğunda etkenin serogrup 2-14 olduğu belirlenmiştir (Faris ve diğ., 2005). Yeni Zelanda'da meydana gelen vakalardan birinde nefes darlığı, yüksek ateş ve diare şikayetleri olan bir hastanın evinde bulunan yüzme havuzunun *L. pneumophila* serogrup 13 suşu ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Faris ve diğ., 2005).

1976'daki Avrupa'da görülen salgınlardan sonra kurulan EWGLI (European Working Group for *Legionella* infections)'nin 36 ülkede mevcut üyesi bulunmaktadır. Her yıl, Lejyoner hastalığı salgınlarının yıllık verileri EWGLI veritabanına göre rapor edilmektedir. EWGLI verilerine göre, 1998 yılında toplam 1442, 2008 yılında toplam 5960 Lejyoner vakası bildirilmiştir. 2007-2008 yılları arasında, Avusturya, Belçika, Kıbrıs, Danimarka, İngiltere ve Galler Ülkesi, Fransa, Almanya, İrlanda, İtalya, Hollanda, Polonya ve İspanya'daki hastaneler ve tedavi merkezlerinde 98 vakadan 28'inin Lejyoner salgını oluşturduğu belirlenmiştir. Bu vakaların 22'sinin kaynağı sıcak ve soğuk su sistemleri olarak tespit edilmiştir (Joseph ve Ricketts, 2010).

Danimarka'da 2005'ten bu yana, her yıl 115 ve 130 arasında Lejyoner hastalığı vakası olduğu bildirilmiştir (Uldum ve diğ., 2010). 2009'da bildirilen 116 vakadan 37'sinin seyahat ile ilişkili olup 18'inin ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Joseph ve Ricketts, 2010).

EWGLI verilerine göre ise İtalya'da seyahatla ilişkili olarak 106, İtalya'nın farklı bölgelerinde bulunan otel ve konularda toplam 45 Lejyoner hastalığı vakası bildirilmiştir (Rota ve diğ., 2008).

Almanya'da yapılan araştırmalarda, 2000 yılında 6000–12000 bildirilen vaka olduğu, ölüm oranının ise %25–35 düzeyinde olduğu belirtilmektedir. 1990'ların ortalarından itibaren ülkemizin önemli turizm merkezlerinde Lejyoner hastalığı vakalarının olduğuna dair Avrupa'dan yapılan bildirimler, hastalığın turizm, sağlık ve basın çevrelerinde ilgi odağı haline gelmesine yol açmıştır (Kalan, 2009).

2.2.2. *Legionella* Cinsi Bakteriler ile Konak Hücre Arasındaki İlişki

Amipler, mavi-yeşil algler, siyanobakteriler ve heterotrofik bakteriler, *Legionella* bakterilerinin çoğalmasını teşvik eden mikroorganizmalardır. Solunan bir *Legionella* ile enfekte bir protozoon kisti insana bulaşma kaynağı olabilmektedir (Steinert ve diğ., 2002). *L. pneumophila* bakterilerinin, 14 özgür yaşayan amip türü, 2 siliat protozoon türü (*Cyclidium* spp. ve *Tetrahymena pyriformis*) ve bir küf türü (*Dictyostelium discoideum*) içinde çoğalabildiği belirlenmiştir (Fields ve diğ., 2002). *Legionella* cinsi bakteriler, *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* ve *Hartmanella* gibi özgür yaşayan bazı amiplerin fakültatif hücre içi parazitidirler. Gereksinimlerini bu amiplerden elde edebilmektedirler. Amiplerin *L. pneumophila* ile enfeksiyonu, memeli hücreleri ve akciğer dokularının enfektivitelerini arttırmaktadırlar. *L. pneumophila*, enfeksiyondan sonra amip içinde 24-72 saat arasında yaklaşık 4 veya 5 log çoğalabilmektedir. *Legionella* ile aynı ortamda *Saccamoeba*, *Vexillifera* ve *Platyamoeba* gibi diğer amip cinsleri bulunmaktadır. Bir amip türü olan *T. pyriformis*, toprakta bulunan *Legionella longbeachae* türünün üremesinde rol oynamaktadır. *L. pneumophila* türünün epidemiyolojik görülme sıklığı ve virülansı ile spesifik konağa adaptasyonu arasında bir ilişki olup olmadığı halen cevaplanması beklenen sorular arasında yer almaktadır. Protozoonlar, hücre içi parazit olan *Legionella* bakterisi için sadece yiyecek temin etmezler; aynı zamanda bakteriyi uygun olmayan çevre koşullarından korurlar. *Legionella* cinsi bakteriler, özellikle *Acanthamoeba* cinsi amip kistleri içerisine alındıklarında, yüksek sıcaklık, dezenfektan uygulaması ve kuruma gibi olumsuz koşullardan etkilenmemektedirler (Kilvington ve Price, 1990; Barker ve diğ., 1992).

Legionella bakterileri amip hücreleri içerisine alındığında, insan fagositik hücrelerinde gözlenen bir virülans özellik olan fagolizozomal yıkım yolağını inhibe etmektedir (Gao ve diğ., 1997). *L. pneumophila*, kontamine aerosollerin inhalasyonu ile insanları enfekte etmektedir. Bakteri, makrofajlar aracılığıyla akciğer alveolar boşluğuna ilerler; fakat bu patojen, fagozomun asidifiye olmasını ve lizozom ile birleşmesini inhibe etmektedir. *L. pneumophila* içeren fagozom, endoplazmik retikulum ile çevrili hale gelir ve replikatif forma dönüşen bakteri vakuoller içinde korunur.

L. pneumophila'nın hayat devri iki faz içermektedir. İlk faz, replikasyon fazı olarak isimlendirilmektedir ve konak içinde gerçekleşmektedir. İkinci faz ise aktif enfeksiyon fazı olarak isimlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, bakterinin konak içerisindeyken daha dirençli olduğu belirtilmiştir (Steinert ve diğ., 1997).

L. pneumophila virulansı, bakterinin birbiri ardına üreme fazıyla ilişkilidir. Konak hücreden serbest kalan post-exponansiyel faz bakterileri kısa, kalın, flagellalı ve hareketlidir. Ayrıca biyositlere ve antibiyotiklere karşı daha dirençli ve farklı enfeksiyon modellerinde daha virulan ve invazivdir (Barker ve diğ., 1992; Barker ve diğ., 1995). Olgunlaşmış vakuol içindeki *L. pneumophila* hücrelerinin fizyolojisi değişir ve replikatif forma (exponansiyel üreme fazı) dönüşür. Bu replike olmuş bakteriler, sodyuma dirençlidir, flagella oluşturmaz ve sitotoksisiteyi azaltıcı etki göstermektedirler (Swanson ve Hammer, 2000).

2.2.3. Lejyoner Hastalığı Tedavisi

Yoğun bakım üniteleri gibi, yüksek risk alanlarında *Legionella* konsantrasyonunun incelenmesi ve belirlenmesi zorunludur. Eritromisin, rifampisin ve siprofloksasin, Lejyoner hastalığının tedavisinde kullanılan etkili antibiyotikler olmasına rağmen, bu tedavi uygulandıktan sonra hayatını kaybeden hastaların bulunduğu bilinmektedir (Breiman ve Butler, 1998). Tedavide kullanılan ilaçlar, genellikle hücre içindeki *L. pneumophila* bakterisini öldürür veya üremesini engeller. Daha yeni olan makrolidler (azitromisin ve klaritromisin) ve pek çok florokinolonların *in vitro* deneylerde *Legionella* türlerine karşı etkili ve eritromisinden daha az yan etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Roig ve Rello, 2003). Yapılan çalışmalarda, levofloksasine karşı makrolidlerin (eritromisin, klaritromisin ve azitromisin) etkisi incelenmiş ve levofloksasin tedavisi görmüş hastalarda iyileşme oranı ve hastanede kalma süresinin

daha kısa olduğu belirlenmiştir. Makrolid grubu antibiyotik tedavisinde ölüm oranı %4.5 iken levofloksasin tedavisinde ölüm oranının %1.1 olduğu bulunmuştur (Roig ve Rello, 2003; Blázquez Garrido ve diğ., 2005; Mykietiuk ve diğ., 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Amerika Hastalık Kontrol Merkezi (CDC), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi uluslararası sağlık kuruluşları, toplumun Lejyoner Hastalığından korunmasına yönelik yasal düzenlemelerle, hastalığın görülmesi durumunda “Bildirim Zorunluluğu”nu ve hastalığın önlenmesine yönelik tedbirleri açıklamışlardır. Ülkemizde ise ilk olarak 1996 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından TSHGM 30.05.1996/6076 sayılı genelge yayınlanmış ve uygulamaya konmuştur.

2.3. LEGIONELLA CİNSİ BAKTERİLERİN İZOLASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER

2.3.1. Geleneksel Kültür Yöntemi

Doğada çok geniş alanlara yayıldığı eskiden beri bilinen *L. pneumophila*'nın laboratuvar ortamında üretilmesi ve yaşatılmasında bazı zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle *Legionella* cinsi bakterilerin hayatta kalmasını mümkün kılan fiziksel ve kimyasal faktörlerin neler olduğu yönünde pek çok çalışma yapılmıştır. Kimyasal içeriği tanımlanmış besiyerleri ile yapılan çalışmalar *L. pneumophila*'nın tüm karbon ve enerji gereksinimini aminoasitlerden karşıladığını göstermektedir. Üreme için demir, L-sistein, α -ketoglutarat ve mangal kömürü içeren ve organik bir tampon ilave edilmiş Yeast Ekstrakt Agar (BCYE α Agar) tercih edilmektedir ve besiyerine N-2-asetamino-2-aminoetansulfonik asit (ACES) ilave edilerek pH 6.9'a ayarlanmaktadır (Maiwald ve diğ., 1998). pH ayarlamasında kullanılan NaOH, *Legionella* cinsi bakteriler üzerinde toksik etki gösterdiğinden çalışmada kullanılan besiyerlerinin pH'sı ayarlama KOH kullanılmaktadır (Elsmore, 1993).

Legionella bakterilerinin su örneklerinden yüksek oranda geri kazanımının yapılabilmesi için filtrasyon yöntemiyle yoğunlaştırılması, asit ve/veya sıcaklık uygulamasının yapılması gerekmektedir (Nguyen ve diğ., 1991; Ta ve diğ., 1995).

Asit ve sıcaklık uygulaması, ortamda bulunan refakatçi floranın üremesinin engellenebilmesi açısından tavsiye edilmektedir. Yapılan bir çok çalışmada, su

sistemlerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında, en uygun yöntemin filtrasyonla yoğunlaştırma ve sıcaklık uygulamasından sonra seçici bir besiyerine yayma ekim ile olduğu tespit edilmiştir (Reinthaler ve diğ., 1993).

Yapılan başka bir çalışmada, yapay olarak kontamine edilmiş su örneklerinden geri kazanım sonuçları standart kültür yöntemi ile incelendiğinde, kültüre edilebilir en düşük *L. pneumophila* sayısının 93 kob/ml olduğu, kullanılan filtrasyon yöntemi ile *L. pneumophila* bakterilerinin % 47'sinin geri kazanıldığı belirlenmiştir (Bedrina ve diğ., 2013). Diğer bir çalışmada ise, *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin tespit edilme limitinin 10^2 - 10^3 h/L olduğu saptanmıştır (Conza ve diğ., 2013).

2.3.2. Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

Doğada bulunan bakteri toplulukları, besin kıtlığı, sıcaklık, tuzluluk, osmotik stres, güneş ışınları, oksijen doygunluğundaki değişimlerden kaynaklanan streslere maruz kalmakta ve bu şartlar altında canlı fakat kültüre edilemeyen (VBNC) faza girmektedirler. VBNC fazındaki hücreler, normalde üredikleri rutin besiyerlerinde üreme gösterememektedirler. VBNC fazındaki pek çok bakteri, canlılıklarını korumakla birlikte, düşük seviyede metabolik aktivite ve solunum göstererek uygun şartlar altında tekrar kültüre edilebilir duruma gelebilmektedirler. VBNC fazına giren hücrelerde zar yapısı, protein içeriği ve lipit miktarında değişimler meydana gelmekte, toplam lipit ve protein miktarı hızlıca azalarak, sitoplazma daha yoğun hale gelmekte, zar yapısında değişimler olmasına rağmen zar bütünlüğü korunmaktadır. Bazı durumlar, hücrelerin yeniden canlanmasına ve VBNC döngüsünün tamamlanmasına neden olmaktadır. VBNC döngüsünün tamamlanmasına sebep olan faktörlerin besin eklemesi, taze besi ortamına transferi, sıcaklık yükselmesi veya sıcaklık şoku olabileceği üzerinde durulmaktadır. Sudaki mikroorganizmaların kültüre edilebilir kısmı %1 kadar düşük bir oranda olabilmektedir (Staley ve Konopka, 1985). Bundan dolayı çevresel örneklerdeki *Legionella* cinsi bakterilerin belirlenmesi için daha güçlü yöntemlerin kullanılması esastır. Geç üreyen, nazlı veya kültüre edilemeyen mikroorganizmaların, kültür yöntemi kullanılmaksızın 16S rRNA bölgesinin korunmuş hedef bir dizisine tamamlayıcı floresan işaretli cinse özgü oligonükleotid prob kullanılarak, floresan *in*

situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile belirlenebildiği tespit edilmiştir (Amann ve diğ., 1991; Kalmbach ve diğ., 1997; Declerck ve diğ., 2003).

FISH yöntemi, hücrelerin morfolojisini bozmadan, hücre içerisinde organizmaya özgü dizilimlere sahip nükleik asitlerin işaretli oligonükleotidlerle hibritlenmesi ve hedef moleküllerin mikroskop altında gözlemlenebilmesini sağlamaktadır. FISH, canlı fakat kültüre edilemeyen mikroorganizmaların tespitinde kullanılabilen moleküler yöntemlerden biridir. Mikroorganizmaların yerinde incelenmesini, ayrıca değişik çevre koşullarındaki mevcut mikroorganizmaların hızlı bir şekilde tespit edilmesi, sayılması ve konumlarının belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Llobert-Brossa ve diğ., 1998; Içgen ve Harrison, 2006).

Moleküler yöntemlerin bir çoğu gibi FISH yönteminde de spesifik filogenetik bir gruba ait organizmaların bir ekosistem içerisinde tayini için, hücre içerisinde mevcut olan 16S rRNA hedeflenmektedir. Bu yöntemlerde 16S rRNA'nın hedef alınmasının nedeni, bütün hücrelerin 16S rRNA'ya sahip olması, hücrelerde bu yapının yüksek kopyalarının bulunması ve 16S rRNA'nın korunmuş ve değişken bölgeler içerdiği için organizmaları birbirinden ayırt edebilmesi özelliklerinin bulunmasıdır. rRNA'yı hedef almanın en önemli avantajı, DNA'dan farklı olarak, tek zincirli olması nedeniyle hibridizasyon öncesinde denatürasyona (zincirlerin ayrılmasına) gerek olmamasıdır (Madigan ve Martinko, 2005).

FISH yöntemi fiksasyon ve permeabilizasyon, hibridizasyon, yıkama ve görüntüleme olmak üzere 4 temel adımdan meydana gelmektedir (Madigan ve Martinko, 2005).

- 1) Fiksasyon: Hücre duvarının geçirgen hale getirilmesi ve hücrede mevcut 16S rRNA moleküllerinin bütünlüğünün korunması

FISH yönteminde kullanılan fiksasyon aşaması hücre içindeki nükleik asitlerin yapısını ve hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka ve proteinlerle çapraz bağ oluşturarak hücre morfolojisini korumakta, diğer yandan hücrelerin fikse edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca hücre duvarının geçirgenliğini artırarak probun hücre içerisine ulaşmasını sağlar. Fiksasyon için paraformaldehit, etanol, formalin ya da parafin gibi fiksatifler kullanılmaktadır. Gram negatif bakteriler için paraformaldehit (PFA) ve fosfat-tuz çözeltisinden oluşan karışım fiksasyon çözeltisi olarak uygulanmaktadır. Fiksasyon

aşamasından sonra, örnek hücre geçirgenliğini sağlamak amacıyla kimyasal maddelerle muamele edilmektedir. Bu amaçla deterjan ya da triton ve RNAz-serbest proteinaz K gibi maddeler kullanılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2005).

2) Hibridizasyon: Prob ve hedeflediği 16S rRNA moleküllerinin birbirine bağlanması

Hibridizasyon aşaması, tampon çözelti içinde uygun sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında gerçekleşmektedir.

Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA parçasının FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye özgü bir probun kullanılması gerekmektedir. FISH yönteminde hedef DNA/RNA molekülüne tamamlayıcı işaretli nükleik asit dizisine “prob” adı verilmektedir. Prob-hedef hibridlerinin oluşumu ile ortaya çıkan floresanın (ışımının) saptanabilmesi için ortamda yeterli miktarda hedef molekül bulunması gerekmektedir. Kullanılan proplar floresan boyalar ile birlikte hücre içine girerek rRNA ile hibridize olarak çalışmaktadırlar (Hames ve Higgins, 1988; Leitch ve diğ., 1994).

Floresan boyası (florofor) ile oligonükleotid probun 5’ ucu arasında bir bağ bulunmaktadır. Temel olarak fluoresein, tetrametilrodamin, karbosiyanin gibi boyalar florofor olarak kullanılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2005). FISH yönteminde kullanılan boyalar, özgül emisyon dalga boylarına göre birbirlerinden ayrılmaktadır. Bu nedenle birlikte kullanılacakları zaman, emisyon spektrumlarının birbirleri ile çakışmamasına dikkat edilmelidir.

DAPI (4’-6-Diamino-2-fenilindol) floresan boyası, çalışılan örneklerdeki DNA’nın A-T baz bölgelerine tutunarak floresan ışımaya yapan canlı ve ölü mikroorganizmaların boyanarak epifloresan mikroskop altında incelenmesini sağlamaktadır (Madigan ve Martinko, 2005). DAPI ile boyanmış hücreler parlak mavi floresan ışık vermektedir.

3) Yıkama: Hedefe bağlanmayan propların ortamdaki uzaklaştırılması.

Mevcut diğer artık maddeler ve hedefe bağlanmayan probun ortamdaki uzaklaştırılması için her çalışmaya özel olarak hazırlanan yıkama tamponu kullanılır.

4) Görüntüleme: Bağlanmış propların epifloresan mikroskop altında, hücre içerisinde görüntülenmesi.

Her proba özgül dalga boyunda tasarlanmış epifloresan mikroskopta yer alan filtreler sayesinde, kullanılan boyaya bağlı olarak hedefe bağlanmış problemlerin verdiği sinyaller gözlemlenir. Çalışılan alan taranıp en az 10 temsili görüntü alınarak ortalama bakteri sayısı elde edilir.

Butchbinder ve diğ., (2002) yaptıkları çalışmada, *Legionella* cinsi bakterileri içeren 100 örnekten 22'sini kültür yöntemi, 32'sini FISH yöntemi, 67'sini ise PZR yöntemi ile geri kazandıklarını belirtmişlerdir Deloge-Abarkan ve diğ., (2007) havadaki *L. pneumophila* bakterilerini tespit etmek için yaptıkları çalışmada kültür ve FISH yöntemini kullanmışlar ve çalışma sonucunda, FISH yöntemi ile yaklaşık 10^5 h/m³, kültür yöntemi ile yaklaşık 10^4 h/m³ *L. pneumophila* bakterisi tespit etmişlerdir.

2.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), *in vitro* koşullar altında, istenilen bir genin ya da özgün DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi esasına dayanmaktadır (Saiki ve diğ., 1985; Mullis, 1990). PZR, 1985 yılında Kary Mullis tarafından ilk kez bilim dünyasına sunulmuş olup, günümüzde modern bilime önemli katkılar sağlamıştır (McPherson ve Moller, 2000).

Yapılan çalışmalarda, klasik PZR, multiplex PZR, real-time PZR, semi-nested PZR gibi yöntemlerin *Legionella* bakterilerinin tespit edilmesinde uygun yöntemler olduğu belirlenmiştir (Miyamoto ve diğ., 1997; Wellinghausen ve diğ., 2001; Dusserre ve diğ., 2008).

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenmektedirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilerine bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde hibridize olmaktadır. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlamaktadır. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşmaktadır.

1. DNA Zincirinin Açılması (Denatürasyon):

Kalıp DNA (template DNA)'nın, 92-95 °C'de 1-2 dakika tutulması ile çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılarak tek iplikli hale gelmektedir (Watson ve diğ., 1992).

Genel olarak, 95 °C'de 1-2 dakika, çift iplikli DNA'nın denatürasyonu için yeterli olmaktadır. Fakat GC (Guanin-Sitozin) bazlarınca zengin kalıp DNA zincirlerinde bu süre ve sıcaklığın daha fazla olması gerekmektedir (Innis ve Gelfand, 1990).

2. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Bağlanması (Annealing):

Oligonükleotid primerlerin, 37-65 °C'de açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışmasından ibaret olup işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir (Innis ve Gelfand 1990).

PZR uygulamalarında kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç duyulmaktadır. Primerler genelde 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Kullanılacak primerlerin tek iplikli DNA zincirine bağlanabilmesi için gerekli olan sıcaklık derecesi ve zaman aralığı primerlerin konsantrasyonuna, elde edilecek DNA'nın uzunluğuna ve kullanılan bazlara göre farklılık göstermektedir. Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması 37- 65 °C sıcaklıklarda gerçekleşir. Primerlerin tek iplikli DNA'ya bağlanması sırasında sıcaklığın artırılması primerlerin yanlış yerlere bağlanmasını ve hatalı DNA dizilerinin elde edilmesini önlemektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve diğ., 1993).

Yüksek primer konsantrasyonu primerlerin yanlış bağlanmasına ve spesifik olmayan DNA bantlarının üretilmesine sebep olmaktadır. Ayrıca primer-dimer oluşumunu teşvik ederek elde edilecek ürünün (DNA) istenenden daha az olmasına neden olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve diğ., 1993).

Primerlerin baz dizilişinde Guanin, Sitozin (GC) miktarı ve primerlerin yapışması için gerekli sıcaklık miktarı (Tm) arasında bir denge olması gerekmektedir. Bu denge sağlanmadığı takdirde PZR uygulamalarından iyi sonuç almak mümkün olmamaktadır. Bu bakımdan primer dizilerinde GC bazlarının toplam oranı % 50 veya daha yukarı olması istenmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve diğ., 1993).

3. Primer Uzaması (Primer Extension):

Primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzaması işlemidir. Taq DNA polimerazın çalışması için en uygun sıcaklık 72 °C'dir. PZR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır. Enzim gereksinimi kullanılan primer veya kalıp DNA'ya göre değişmesine rağmen, enzim konsantrasyonu düşük olursa az miktarda ürün elde edilirken, enzim konsantrasyonu yüksek olursa spesifik olmayan bantlar ortaya çıkabilmektedir (Innis ve Gelfand, 1990). Primerlerin DNA polimeraz tarafından uzatılması için gerekli zaman, çoğaltılması hedeflenen kalıp DNA parçasının uzunluğu, kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve ortam sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. Primerlerin uzatılması için gerekli süre ise baz uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve diğ., 1993).

Üç basamaktan (denatürasyon, bağlanma ve primer uzaması) oluşan işlem, bir PZR devrini belirtmektedir. Bu işlemin 25 ile 40 defa tekrar edilmesi sonucu başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA kopyası meydana gelmektedir. PZR yönteminde devir sayısı çoğaltılacak kalıp DNA miktarı ile yakından ilişkili olup ortalama 25-40 arasında olmaktadır. Devir sayısının fazla olması spesifik olmayan bantların ortaya çıkmasına, devir sayısının az olması üretilen DNA miktarının az olmasına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Watson ve diğ., 1992).

PZR işlemi sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromide (EtBr), Sybr Green ve gümüş nitrat (GN) ile boyanarak UV ışık altında gözlemlenebilmektedir.

Agaroz Jel Elektroforezi

DNA molekülünün analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber laboratuarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir. DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanmaktadır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkariddir. Ticari olarak üretilen agarozların saflık dereceleri farklı

olup DNA'nın göç hızını etkilemektedir. UV ışığı altında floresan etki gösteren Etidyum Bromür (EB) ya da SYBR Green boyalarının kullanımı ile çok düşük konsantrasyonlarda olsa bile, DNA'nın jel üzerindeki yerini belirlemek mümkündür. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi, bu boyaların DNA bağları arasına girerek farklı dalga boylarında ışığı absorblaması sonucu floresan etki göstermesi ile olmaktadır. SYBR Green I boyası, çift zincirli DNA'nın herhangi küçük bir bölümüne bağlanabilen floresan bir boyadır. Bu boyanın verdiği floresan sinyal gücü diğerlerine göre daha fazladır.

Semi-Nested PZR

Semi-nested PZR özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgünlükte bir PZR yöntemidir. İstenilen DNA dizisinin bulunup çoğaltılmasında hassasiyeti 10^4 kat artırdığı tahmin edilmektedir (Rosner ve diğ., 1997).

Bu yöntemde PZR, iki aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk adım PZR özgün olmayan ürünlerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. İkinci adım PZR ise ilk PZR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren primerler ile yapılmaktadır. İlk adım PZR ürünleri ikinci adım PZR için kalıp olarak kullanılıp istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilmektedir. Bu yöntemde iki farklı set primer çifti (P1, P3 ve P2, P3) kullanılmaktadır. İlk çoğaltma işleminde birinci set primerler (P1, P3) kullanılır ve bu işlem sonucunda elde edilen DNA dizisi üzerinde ikinci set primerler (P2, P3) kullanılarak yeniden çoğaltma işlemi yapılmaktadır. İkinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçası birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasından daha kısadır ve birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasının içerisinde yer almaktadır. İkinci adım PZR işleminden sonra ortada istenilmeyen DNA dizisi kalmamaktadır (Rosner ve diğ., 1997).

Yöntemin en önemli dezavantajı birincil amplifikasyon tüpünden ikincisine örnekler aktarılırken çok az da olsa çevreye örnek saçılması ve daha sonraki çalışmalarda hava yolu ile kontaminasyona neden olmasıdır.

Yapılan bir çalışmada üç farklı hastahanedan toplanan 77 adet su örneğinin PZR yöntemi ile 76'sında (%98.7), kültür yöntemi ile 54'ünde (%70.1) *Legionella* bakterilerinin varlığı tespit edilmiştir (Wellington ve diğ., 2001).

Villari ve diğ., (1998) tarafından yapılan çalışmada, düşük konsantrasyonda *L. pneumophila* bulunan örneklerde *L. pneumophila* bakterilerinin tespit edilmesinde PZR yönteminin, kültür yöntemi kadar duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Wojcik-Fatla ve diğ., (2012)'nin yaptıkları çalışmada, geri kazanım oranının kullanılan DNA izolasyon kitine bağlı olarak değiştiğini belirlemiş ve *Legionella* bakterilerinin tespiti için PZR yöntemi olarak semi-nested PZR'ın kullanılmasını önermişlerdir.

2.4. SU ÖRNEKLERİNDEN *L. PNEUMOPHILA*'NİN GERİ KAZANIMINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

L. pneumophila'nın sudaki kolonizasyonunu teşvik eden birçok faktör bulunmaktadır. Ortamın sıcaklığı, su sisteminin fiziksel yapısı, ortamda serbest yaşayan protozoonların varlığı bunlardan bazılarıdır. *Legionella* bakterileri laboratuvar ortamındaki kültürlerinde karbon kaynağı olarak aminoasitleri kullanmakta ve L-sisteine ihtiyaç duymaktadırlar. Yapılan çalışmalarda sıcaklık, pH, tuzluluk, kimyasal madde eklenmesi, UV maruz kalma gibi faktörlerin kolonizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir (Surman ve diğ., 1994).

2.4.1. Konsantrasyon

L. pneumophila konsantrasyonu sağlık riski oluşturabilme açısından önemlidir. Genellikle *L. pneumophila* SG1 litrede 100.000'i aştığı zaman tehlike oluşturabilmekte ancak bu durum, ortam yapısına, ferdin bağışıklık sistemine, farklı suşların sahip olduğu patojenite derecesine göre değişebilmektedir. Diğer yandan su ortamlarında düşük konsantrasyonlarda bulunan *Legionella* bakterileri, ortam koşulları uygun hale geldiğinde çoğalmaya ve yayılmaya başlayarak enfeksiyon oluşturma potansiyeli gösterdiğinden, su sistemlerinde varlığı kabul edilmemektedir (Çotuk, 1998). Yüksek konsantrasyonlara ulaşan *Legionella* bakterilerinin, Lejyoner salgınlarına neden olmasının engellenmesi için suda etkili bir şekilde dezenfeksiyon ve dekontaminasyon uygulamalarının yapılması gerekmektedir. Genel olarak, *Legionella* konsantrasyonunun 1 kob/ml'yi aşması durumunda bu uygulamalara gereksinim olmaktadır. Yoğun bakım ve organ nakli üniteleri gibi yüksek risk alanları için daha kısıtlayıcı standartlar uygulanmaktadır (Miyamoto ve diğ., 2000; Exner ve diğ., 2005; Hechard ve diğ., 2005).

Yapılan çalışmalarda su sistemlerinde bulunan *L. pneumophila* bakterilerinin konsantrasyonu düşük olduğunda *L. pneumophila* geri kazanım oranının düşük olduğu belirlenmiştir (Boulangier ve Edelstein, 1995; Bedrina ve diğ., 2001). Wojcik-Fatla ve diğ., (2012) düşük konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su sistemlerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında en uygun yöntemin semi-nested PZR yöntemi olduğu saptamışlardır.

2.4.2. Sıcaklık

Mikroorganizmaların hayatta kalabilmeleri ve üremeleri için optimum sıcaklık değeri, en yüksek ve en düşük sıcaklık değerleri arasında yer almaktadır. Bu sıcaklık değerinin üstüne çıkıldığında zar yapısında ve hücre yapısında bozulmalar meydana gelmektedir. Optimum değer in çok altındaki sıcaklık derecelerinde ise, zar daha az geçirgen hale gelerek aktif taşıma sistemi aksamalara uğramaktadır. Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar bakterilerin zar yapısında modifikasyonlar meydana geldiğini ve farklı sıcaklık değerlerine karşı adaptasyonlar geliştiğini göstermiştir (Vatansever, 2011).

Legionella'nın üremesi için en uygun sıcaklık 35-37 °C arasındır. Yapılan bir çalışmada, sıcaklığın 30-40 °C arasında olduğu koşullarda, *Legionella* bakterilerine yüksek oranda rastlanıldığı, sıcaklığın 50 °C'nin üzerine çıkarılması sonucunda *Legionella* sayısında ciddi bir azalma meydana geldiği ve 60 °C'nin üzerinde veya 70 °C sıcaklıkta ise dakikalar hatta saniyeler içinde mikroorganizmaların hızlı bir şekilde öldüğü rapor edilmiştir (Szewzyk ve diğ., 2000). Yapılan çalışmalarda, *L. pneumophila* bakterilerinin 60 °C -66 °C sıcaklıklarda bile geri kazanılabildiği belirlenmiştir (Botzenhart ve diğ., 1986; Henke ve Seidel, 1986).

Yapılan çalışmalarda, çok düşük sıcaklık derecelerinde *L. pneumophila* sayısının azaldığı, bununla beraber yüzme havuzları ve kaplıcalar gibi yüksek sıcaklıklara sahip su sistemlerinde *L.pneumophila*'nın geri kazanımının arttığı belirlenmiştir (Henke ve Seidel, 1986).

Doğadaki su kaynaklarında bulunan *Legionella* cinsi bakteriler, çevre koşullarına karşı canlılıklarını koruyabilmektedir. Paszko-Kolva ve diğerlerinin (1993) yaptıkları çalışmada içme ve dere sularına inokule edilen hem klinik hem de çevresel

L. pneumophila izolatlarının düşük besin koşulları altında 2.5 seneye kadar canlılıklarını koruyabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca düşük sıcaklığın bakterilerin metabolik aktivitesinde önemli derecede azalma meydana getirdiği, buna karşılık *L. pneumophila* bakterilerinin düşük sıcaklıklardaki sulara uzun süre canlı kalabildiği bulunmuştur.

2.4.3. pH

Mikroorganizmaların hayatta kalabilmeleri, metabolik faaliyetleri ve üreyebilmeleri için ortamın pH'sı önemlidir. *Legionella*'nın üremesi için en uygun pH değeri 6.9 olarak bildirilmiştir. Genellikle nötre yakın olan hücre içi pH'sı bakterinin optimum koşullarda devamını sağlamaktadır. *L. pneumophila*'nın kısa süreli olarak aside karşı gösterdiği direnç, mikroorganizmanın bu tür ekstrem koşullarda varlığını sürdürebilmesinin yanında çevresel örneklerden izolasyonunda da önemli rol oynamaktadır. pH değeri, klorun dezenfeksiyon gücünü etkilemekte ve dezenfeksiyonda yeterli verim alınmamaktadır. Düşük pH'da uygulanan klor sistemlerde korozyona ve insanlarda toksik etkilere sebep olmaktadır (Chae ve Schraft, 2001).

Yapılan çalışmalarda, farklı sürelerde (3 ve 15 dakika) asite (pH 2.2) maruz bırakılan su örneklerinde *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı incelendiğinde, kültürde en uygun yöntemin asit uygulaması ile gerçekleştiğini ve asit ile temas süresi uzadıkça geri kazanım oranının azaldığı tespit edilmiştir (Reinthal ve diğ., 1993; Ta ve diğ., 1995).

2.4.4. Biyosit

Su dağıtım sistemlerinin dezenfeksiyonunda çeşitli kontrol yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında termal (süper ısı ve akıtma), hiperklorlama, bakır-gümüş iyonizasyonu, ultraviyole ışık ile sterilizasyon, ozonlama sayılabilmektedir.

Biyositler, genel olarak okside edici (klor, kloramin ve klorindiyoksit) ve okside edici olmayan biyositler olarak ikiye ayrılmaktadır. Klorlama, normal içme suyu sisteminden daha yüksek oranlarda klorun (20-50 mg/L serbest klor) su sistemine eklenmesiyle gerçekleştirilen etkili fakat kalıcı olmayan bir dezenfeksiyon yöntemidir. 2,5 mg/L serbest klor içeren pH 7.4'teki suda, *Legionella* bakterilerinin 10 dakika canlı kalabildiği belirlenmiştir (Gilpin ve diğ., 1985). Şok hiperklorlama yöntemi, su sistemine klorun eklenerek bir iki saat içinde sistemdeki klorun yüksek seviyelere ulaşmasını içermektedir (Lin ve diğ., 1998). Devamlı hiperklorlamada ise, su sistemine

klor tuzlarının ilavesi yapılmaktadır (Muraca ve diğ., 1990; Stout ve Yu, 1997). Bu yöntem, kullanılan diğer yöntemlere göre daha yüksek maliyetlidir ve bazı dezavantajları vardır. Bu yöntemin 5-6 yıl uygulanması, boru sistemlerinde korozyona neden olmaktadır ve sistemdeki yapıların parçalanmasıyla da sonuçlanabilmektedir (Helms ve diğ., 1988; Muraca ve diğ., 1990; Nyugen ve diğ., 1991). Devamlı olarak gerçekleştirilen 1-2 ppm düzeyindeki serbest klorlamanın biyofilme karşı minimal düzeyde etkiliği olduğu belirlenmiştir.

Monokloramin, *Legionella* bakterilerin yok edilmesinde klora göre daha etkilidir. Klora göre daha stabildir ve daha az dezenfektan yan ürünü oluşturmaktadır.

Bakır-gümüş iyonizasyon yönteminde, pozitif yüklü bakır ve gümüş iyonları su sistemine verildiğinde, bu iyonlar negatif yüklü bakteri hücre duvarına bağlanarak *Legionella* bakterilerinin hücre membran geçirgenliğini bozarak proteinleri denatüre eder ve hücre lizisiyle birlikte hücrenin ölümüne sebep olur (Muraca ve diğ., 1990; Nguyen ve diğ., 1991). Ticari bir sistem olduğundan, bu iyonizasyon sisteminin yüklenmesi kolaydır; diğer yandan hiperklorlama işlemine göre maliyeti daha yüksektir. Bununla birlikte su dağıtım sistemleri arasında artık maddeleri ortadan kaldıracaktır (Muraca ve diğ., 1990; Nguyen ve diğ., 1991; Lin ve diğ., 1998).

Ultraviyole ışığı, hücrenin DNA sentezini bozarak *Legionella* bakterilerini öldürmektedir. Bir ultraviyole ışığı sterilizasyon sistemi, ortama kolaylıkla yerleştirilebilmektedir. Bu yöntem, sisteme gelen suyu dezenfekte edebilmekte ve boru sistemlerindeki istenen bölgelere yerleştirilebilmektedir. Ayrıca bu yöntem, biyofilm yapısındaki *Legionella* bakterileri üzerinde de etki göstermektedir. Ultraviyole ışık ile sterilizasyon sonucunda kimyasal yan ürün oluşmaz ve suda istenmeyen koku ve tat oluşumu gerçekleşmez (Muraca ve diğ., 1990).

Ozon, ticari olarak oluşturulan ozonlama sistemiyle *L. pneumophila* bakterilerini öldürmede kullanılmaktadır. Güçlü bir okside edici ajan olan ozon, 1-2 ppm doz gibi düşük seviyelerde su sistemlerindeki *Legionella* üzerinde etkili olmaktadır. Ozon, yarı ömrünün kısa olmasına rağmen *Legionella* bakterilerini hızlı bir şekilde inaktive eder. Ozonlama sistemi, hiperklorlamaya göre maliyeti daha yüksektir ve bir çok ekipmana

gereksinim duymaktadır. Ayrıca biyofilm yapısındaki *Legionella*'ya ve non-planktonik *Legionella*'ya karşı istenen etkiyi göstermemektedir (Muraca ve diğ., 1990).

Huwa-san TR 50, hidrojen peroksit içeren okside edici, düşük dozlarda yüksek düzeyde etki gösteren, geniş etki spektrumuna sahip, düşük maliyetli, korozif etki göstermeyen, biyofilm tabakası içerisindeki *Legionella* cinsi bakterileri yok etmede depolarda ve boru sistemlerinde kullanılan bir biyosittir.

Yapılan çalışmalarda, Huwa-San'ın içme suyu boru sistemlerindeki biyofilm tabakasını ortadan kaldırma yeteneğine sahip olduğu, uygulamadan sonra artık klor oluşmadığı ve çözülmüş oksijen oranının arttığı, uygulama sonrası mikroorganizma yoğunluğunun önemsenecek ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Armon ve diğ., 2000; Pedahzur ve diğ., 2000).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYDE KULLANILAN ŞİŞELERİN HAZIRLANMASI

Mavi kapaklı ısıya dayanıklı 1 litrelik şişeler içerisine 999 ml içme suyu konulmuş, 121 °C’de 1.2 atm basınçta 30 dakika otoklavda steril edilerek kullanıma hazır duruma getirilmiştir.

3.2. DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER

Çalışmamızda *L. pneumophila* türüne ait Philadelphia 1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterisi ile İstanbul ilindeki su kaynaklarından daha önceki bir çalışmadan izole edilen *L. pneumophila* serogrup 1 (SG1) izolatu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak *L. pneumophila* serogrup 1 bakterileri, herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı mikrobiyolojik olarak incelenmiştir (Şekil 3.1). Latex Aglütinasyon Kiti (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) ile *L. pneumophila* bakterisi olduğu doğrulanmış bakterilerin Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar besiyerinde, 37 °C’de %5 CO₂ ve %95 su buharı içeren ortamda üremiş 4 günlük taze kültürleri, içerisinde %37 gliserin bulunan cryo tüplerine konulmuş ve -86 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1: *L. pneumophila* bakterisinin Gram yöntemi ile boyanmış ışık mikroskobu görüntüsü (100x büyütme).

3.3. FARKLI KONSANTRASYONLARDA *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİ İLE KONTAMİNE SU ÖRNEKLERİNDEN *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ

3.3.1. Farklı Konsantrasyonlarda *L. pneumophila* Bakterilerinin Hazırlanması

Deney için kullanılacak olan *L. pneumophila* türüne ait Philadelphia 1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterisi ile İstanbul ilindeki su kaynaklarından izole edilen *L. pneumophila* serogrup 1 (SG1) izolatu BCYE agara ekilip 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda, Mc Farland bulanıklık tüpüne göre 10¹⁰ h/ml olacak şekilde bakteri konsantrasyonları hazırlanmış ve 600 nm dalga boyunda optik densiteleri ölçülmüştür. Hazırlanan 10¹⁰ h/ml bakteri konsantrasyonundan içerisinde 9 ml steril içme suyu bulunan cam tüplerde seri sulandırım yapılarak 10¹⁰ h/ml'den 10² h/ml'ye kadar konsantrasyon serisi elde edilmiştir. Sayım kontrolü için, her bir sulandırım tüpünden 1'er ml alınarak içerisinde 999 ml steril içme suyu bulunan mavi kapaklı 1000 ml'lik Schott şişesine ilave edilmiştir. Böylelikle 1000 kat sulandırma yapılarak sırasıyla 10¹⁰-10² h/L konsantrasyon serileri elde edilmiş, Schott şişeleri iyice karıştırıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiş ve steril koşullar altında 10, 25, 50 ve 100 µl örnek alınarak BCYE Agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır.

3.3.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti

Örneklerin süzüleceği naylon membran filtre (Sartorius-Sartolon) yerleştirilmiş çelik filtre sistemi (Sartorius-Watson), örneklerin süzülmesinden önce 10 dakika süreyle kaynar distile sudan geçirilerek steril edilmiştir. Sistem, filtrelenmiş ve otoklavlanmış soğuk distile su kullanılarak soğutulmuştur. Her örnekleme sonrası filtre sistemi steril edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (10^2 - 10^{10} h/L) *L. pneumophila* bakterilerini içeren örnekler iyice çalkalandıktan sonra 142 mm çaplı 0.2 µm por çaplı naylon membran filtre kağıdından peristaltik pompa yardımıyla süzülmüştür. Süzülmüş su miktarı ölçülerek kaydedilmiştir. Naylon filtre eldiven yardımıyla sistemden alınarak bakteri tutunmuş yüzeyi dışa gelecek şekilde ikiye katlanmış ve içerisinde 20 ml steril içme suyu bulunan naylon Stomacher poşete konulmuştur. Naylon filtre, yüzeyindeki bakterilerin suya geçmesi için 2 dakika boyunca ovalanmıştır. Süre sonunda, Stomacher poşeti içindeki örnek steril koşullar altında falkon tüplerine aktarılmıştır. Falkon tüplerindeki direkt örnek ve içme suyu içerisinde hazırlanmış 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} sulandırımından 10, 25, 50 ve 100 µl alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde BCYE Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Falkon tüplerinde kalan örneğin 10 ml'si asit ile muamele için 3500 g'de 15 dakika santrifüj edilerek yoğunlaştırılmış ve üstteki 5 ml'lik sıvı atılmıştır. Kalan 5 ml sıvı üzerine 1:1 oranında pH 2.2 olan HCl-KCl asit solüsyonundan 5 ml ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika beklenmiştir. Süre sonunda asitle muamele edilmiş direkt ve içme suyu içerisinde hazırlanmış 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} seri sulandırımından 100, 50 ve 25 µl örnek alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde BCYE agara yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Falkon tüpünde kalan 2 ml örnek, 50 °C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda sıcaklık uygulaması yapılmış direkt örnek ve içme suyu içerisinde hazırlanmış 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} seri sulandırımından 100, 50 ve 25 µl örnek alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde BCYE Agara besiyerine yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Tüm Petri kutuları 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda 3-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3. günden sonra üreyen koloniler morfolojik olarak gözlemlenmiş ve gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılmış ve litredeki *L. pneumophila* bakteri sayısı tespit edilmiştir.

3.3.3. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti

Kültür yöntemi ile çelik filtre sisteminden geçirilen ve Stomacher poşetinden toplanarak 50 ml' lik falkon tüplerine aktarılan farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklerden 3 ml alınarak, üzerine 1:1 oranında %50'lik etanol ilave edilmiştir. Etanol ilave edilmiş su örnekleri 6000 g'de 15-20 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvıları atılarak yerine 1 ml steril 1x PBS (fosfat tamponu) eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Örnekler, mikropipet yardımıyla steril koşullar altında steril Eppendorf tüplerine alınmıştır. 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak yerine 1 ml steril 1x PBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Tüpler tekrar 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış, her bir örneğe ait peletin üzerine 200 µl 1xPBS eklenmiştir. Örneğe 1:3 oranında olacak şekilde 600 µl %4'lük paraformaldehit (PFA) eklenerek pipetaj yapılmış ve +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnekler +4 °C'den alınarak 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı süpernatant atılarak yerine dipte kalan her bir pelet üzerine 1 ml steril 1xPBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Aynı yıkama işlemleri 1xPBS ile iki kez daha tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi sonrası süpernatant uzaklaştırılarak yerine 1:1.25 oranında %98'lik etanol eklenip iyice karıştırılmıştır (Manz ve diğ., 1998; Pernthaler ve diğ., 2001). Homojenize olan bu karışımdan alınan 10 µl örnek pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde teflon lam kuyucuğuna yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lam sırasıyla temiz bir Petri kutusundaki %50, %80 ve %96'lık etanol serilerinde 3'er dakika bekletilerek örneklerin lam üzerine fikse edilmesi sağlanmıştır. Fiksasyon aşamasından sonra etanolün uçması için örnekler 46 °C'lik etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan teflon lam kuyucuklarına önceden hazırlanmış Hibridizasyon Buffer (HB)'dan 10 µl konulmuş ve pipet yardımıyla teflon lamın bütün yüzeyine yayılması sağlanarak kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra üzerine her bir kuyucuğa ayrı ayrı olmak üzere *Legionella* türleri için spesifik olan LEG705 probundan 2 µl karanlık ortamda eklenmiş ve pipet yardımıyla yüzeye eşit bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Hibridizasyon işleminin gerçekleşeceği tüpü hazırlamak için, önceden steril edilmiş 50 ml'lik steril falkon tüpleri içerisine kağıt havlu katlanarak yerleştirilmiş ve örneklerin kurummasını önlemek ve hibridizasyonun sağlanması amacıyla, kağıt havlu kalan Hibridizasyon Buffer (HB) ile ıslatılmıştır. Falkon tüpün etrafı ışık görmemesi

için alüminyum folyo ile sarılmıştır. Daha sonra örnekleri içeren teflon lam, içerisinde nemli ortam sağlanan falkon tüpü içine dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Hibridizasyon tüpü bir gece boyunca 46 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Ertesi gün, falkon tüpü içerisinde bulunan teflon lam alınmış, her bir kuyucuk üzerine karanlık alanda 2'şer µl DAPI eklenerek tekrar falkon tüpü içerisine yerleştirilmiş ve önceden 48 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda teflon lamlar, önceden etrafı alüminyum folyo ile sarılı 50 ml'lik steril falkon tüpleri içerisinde hazırlanan ve 48 °C'ye ısınması sağlanan yıkama tamponu içerisine konularak 48 °C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lamlar, reaksiyonun sonlanması için su banyosundan alınarak soğuk steril distile su ile yıkanmış ve karanlık alanda kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan teflon lamlardaki her bir kuyucuk üzerine probun ve floresan boyanın solmasını önlemek amacıyla bir damla Citifluor (Invitrogen) ve bir damla immersiyon yağı konularak eşit şekilde kuyucuğa yayılması sağlanmış ve Epifloresan mikroskopta (Nikon Eclipse 80i) 100'lük objektif yardımıyla incelenmiştir. Sonuçlar her bir kuyucuktan en az 15 temsili görüntü olacak şekilde kaydedilmiştir. DAPI için 365 nm dalga boyunda ışık kullanılmış ve bakteriler mavi floresan renkli olarak gözlemlenmiştir. *Legionella* türlerine spesifik olan LEG705 probu için de 535 nm dalga boyunda ışık kullanılmış ve bakteriler Cy3 floresan boyasıyla işaretli proba yapılan hibridizasyon sonucunda turuncu floresan renkli olarak gözlemlenmiştir. McFarland 1'e (3×10^8 h/ml) göre ayarlanmış *L. pneumophila* SG1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) bakterisi pozitif kontrol, steril 1xPBS de negatif kontrol olarak kullanılarak tüm işlemler aynı şekilde tekrar edilmiştir.

Çekilen mikroskop fotoğraflarında tespit edilen bakteriler sayılarak ortalaması alınmış ve aşağıdaki formül kullanılarak litrede bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.

Bakteri sayısı / L = Ortalama bakteri sayısı x (Kuyu alanı / Fotoğraf alanı) x 1000

3.3.4. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanımlarının Semi-Nested PZR Yöntemi ile Tespiti

3.3.4.1. DNA izolasyonu

Kültür yönteminde filtrasyon sonrası toplanan ve FISH yönteminin uygulanmasının ardından falkon tüplerinde geriye kalan 1.5 ml örnek, PZR yöntemi için steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu kapsamda DNA izolasyonu için IDPURE™ Spin Column Bakteri Genomik DNA İzolasyon Kiti (IDLabs) kullanılmıştır. DNA izolasyonu, üretici firmanın verdiği talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. 50 ml'lik falkon tüplerine aktarılan farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* içeren örneklerden 1.5 ml alınarak Eppendorf tüplerine aktarılmış, 10000 g'de 15-20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak dipte kalan pelet üzerine önceden hazırlanmış 200 µl steril soğuk Tris-EDTA (TE; pH 8.0) Buffer eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra karışım üzerine kitin içerdiği 37 °C'de bekletilen 400 µl lizis solüsyonu eklenmiştir. Önceden 150 µl steril su ile sulandırılıp -20 °C'de saklanmış olan 2 mg Proteinaz K'dan 3 µl alınarak karışıma ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. 55 °C'de su banyosunda 5 dakika bekletilen karışım üstüne 260 µl saf etanolden eklenerek pipetaj yapılmıştır. İyi bir şekilde homojenize edilen bu karışımın tamamı mikropipet yardımıyla alınarak kitin içeriğinde bulunan 2 ml'lik toplama tüpüne aktarılmıştır. 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilen toplama tüpünün altında toplanan sıvı atılarak, 48 ml saf etanol konularak hazırlanan ve 37 °C'de bekletilen kit içeriğindeki yıkama solüsyonundan 500 µl eklenmiştir. 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar toplama tüpünün altındaki sıvı atılmış ve 37 °C'de bekletilen 500 µl yıkama solüsyonu ile yıkılarak maddelerin uzaklaşması sağlanmıştır. 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj sonucunda toplama tüpünün altındaki sıvı atılarak hiçbir ekleme yapmaksızın 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün altında toplanan sıvı atılarak steril bir 1.5 ml'lik Eppendorf tüpünün içine ayrıştırma kolonuna yerleştirilmiştir. Ayrıştırma kolonunun tam orta merkezine önceden 50 °C'lik su banyosunda ısınması sağlanmış elüsyon tamponundan 40-50 µl eklenmiştir. Bu şekilde 50 °C'de 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda DNA'yı kolondan ayırmak için hiçbir madde eklemesi yapılmaksızın 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Bu şekilde elde edilen farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklere ait DNA'lar, PZR

deneyi için kullanılmaya kadar -20 °C’de saklanmıştır. 10^7 h/ml konsantrasyonundaki *L. pneumophila* türüne ait Philadelphia 1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterisi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3.4.2. DNA’ nın agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi

Saflaştırılmış DNA örneklerinin miktarı nicel olarak temiz semikuvarz küvetler içinde 260 nm ve 280 nm dalga boyunda absorbanları ölçülerek kaydedilmiştir. -20 °C’de saklanan DNA örneklerinin nitel olarak analizi agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Beher içindeki 0.5 g agaroz üzerine, önceden hazırlanan steril 1xTAE’den 50 ml eklenerek iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan %1’lik agarozun mikrodalgada kaynamamasına dikkat edilerek erimesi sağlanmıştır. Homojenize olan agaroz biraz ılıdıktan sonra, kenarlarına kauçuk yapıları ve tarakları yerleştirilen ve su terazisi ile dengesi sağlanan jel dökme kabının kenarından baloncuk oluşturmadan dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Yaklaşık olarak 15-20 dakika sürede, şeffaftan beyaza dönerek donan agaroz kullanıma hazır hale gelmiştir. Agaroz jel üzerinde kuyucuk oluşturmak için kullanılan taraklar, yavaş ve dikkatli bir şekilde önce bir köşesinden kaldırılarak çıkartılmıştır. Jel dökme kabının kenarlarındaki kauçuk yapılar da çıkartıldıktan sonra içerisinde 1x TAE bulunan elektroforez tankına dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Agarozun üzerini örtecek kadar 1x TAE ilave edilmiştir. Jel üzerindeki kuyucuklara yüklenme yapılmadan önce; ince bir şekilde kesilen parafilm üzerinde, 9 µl DNA, 1 µl 6x jel yükleme boyası ve 0.5 µl SYBR Green, nitril eldiven kullanılarak ilave edilmiş ve iyice pipetaj yapılmıştır. Eldivenler her örnekleme arası değiştirilmiştir. Parafilm üzerinde hazırlanan karışım, kuyucuklara dikkatli bir şekilde taşırmadan ve kuyucukları delmeden yüklenmiştir. Pozitif kontrol olarak daha önceden elde edilip -20 °C’de saklanan 10^7 h/ml konsantrasyonundaki *L. pneumophila* türüne ait Philadelphia 1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakteri ile hazırlanan DNA örneği, negatif kontrol olarak ise ultra saf su kullanılmıştır. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak siyah – uçtan, kırmızı + uca doğru bağlanan sistem 110 V’da 30 dk boyunca çalıştırılmıştır. Elektroforez tankında kabarcıkların gözlemlenmesi, sistemin doğru çalıştığının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Süre sonunda sistem kapatılarak, jel sistem içinden alınmış ve vakit kaybetmeden UV Translüminatörde (Kodak GL 1500) gözlemlenmiştir.

3.3.4.3. Semi-Nested PZR Yöntemi

3.3.4.3.1. İlk Adım PZR

Buz kabı üzerindeki 0.2 ml hacmindeki steril PZR tüpçüklerine, 25 µl 2x PZR Master Mix (Biomatik), yaklaşık 100 ng her bir kalıp DNA örneği, 1 µl forward primer LEG 225 (10 µM, Biomatik), 1 µl reverse primer LEG 858 (10 µM, Biomatik) olacak şekilde bir karışım hazırlanmış ve hacim ultra saf su ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. İlk adım PZR' da 16S rRNA geninde 654 bp uzunluğunda fragment oluşturan amplimerler olarak LEG 225 (forward) ve LEG 858 (reverse) primerleri kullanılmıştır. 0.2 ml PZR tüpü içindeki örnekler vakit kaybedilmeden Techne Thermal Cycler cihazına yerleştirilmiş ve ilk adım PZR uygulaması, 95 °C'de 90 saniye başlangıç denatürasyonundan sonra 30 siklus, 95 °C'de 10 saniye denatürasyon, 64 °C'de 1 dakika bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzama ve 72 °C'de 5 dakika son uzama işlemi olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 10^7 h/ml'ye ayarlanmış *L. pneumophila* SG1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) kalıp DNA'sı, negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılarak tüm işlemler aynı şekilde tekrar edilmiştir.

Bu işlemde sonra elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 80 V'da 60 dakika yürütülmüştür. DNA marker olarak ultra saf su ile 1:5 oranında sulandırılan 100 bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılmıştır. Elde edilen ürünler, SYBR Green I (Invitrogen) ile boyanarak UV görüntüleme sistemi (Kodak GL 1500) ile görüntülenmiştir.

3.3.4.3.2. Semi-Nested PZR

Farklı konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterilerinin DNA'ları kullanılarak yapılan ilk adım PZR reaksiyonu ürünlerinden semi-nested PZR yapılmıştır. Bunun için; buz kabı üzerindeki 0.2 ml hacmindeki steril PZR tüpçüklerine, 25 µl 2x PZR Master Mix (Biomatik), 1 µl her bir ilk adım PZR ürünü, 1 µl forward primer LEG 448 (10 µM, Biomatik), 1 µl reverse primer LEG 858 (10 µM, Biomatik) olacak şekilde bir karışım hazırlanmış ve hacim ultra saf su ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. İkinci adım PZR'da 16S rRNA geninde 430 bp uzunluğunda fragment oluşturan amplimerler olarak LEG 448 (forward) ve LEG 858 (reverse) primerleri kullanılmıştır. 0.2 ml PZR tüpü içinde hazırlanmış örnekler vakit kaybedilmeden Techne Thermal Cycler cihazına yerleştirilmiştir. İkinci adım PZR uygulaması, 95 °C'de 90 saniye başlangıç

denatürasyonundan sonra 20 siklus, 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 66 °C'de 1 dakika bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzama ve 72 °C'de 5 dakika son uzama işlemi olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 10^7 h/ml'ye ayarlanmış *L. pneumophila* SG1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) ilk adım PZR ürünü, negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılarak kullanılarak tüm işlemler aynı şekilde tekrar edilmiştir.

Bu işlemde sonra elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 80 V'da 60 dakika yürütülmüştür. DNA marker olarak ultra saf su ile 1:5 oranında sulandırılan 100 bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılmıştır. Elde edilen ürünler, SYBR Green I (Invitrogen) ile boyanarak UV görüntüleme sistemi (Kodak GL 1500) ile görüntülenmiştir. Bu işlemlerden sonra SYBR Green I'in kanserojen etkisini yok etmek için nötralize edici solüsyon hazırlanmış ve bütün malzemeler daha sonra distile sudan geçirilerek bir dahaki çalışma için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.4. FARKLI ÇEVRESEL FAKTÖRLERE MARUZ BIRAKILAN ÖRNEKLERDEN *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ

3.4.1. Deneyde Kullanılan Bakterilerin Hazırlanması

Farklı çevresel faktörlere maruz bırakılan *L. pneumophila* serogrup 1 bakterilerinin geri kazanım oranlarını belirleyebilmek amacıyla standart ATCC 33152 bakterisi ve çevresel izolat kullanılmıştır. BCYE Agar besiyerinde logaritmik fazdaki 4 günlük taze kültürden koloniler alınarak, steril içme suyu içeren tüpte 10^8 h/ml bakteri konsantrasyonları hazırlanmış ve 600 nm dalga boyunda optik densiteleri ölçülmüştür. Bu konsantrasyondan 1ml alınarak, içerisinde 999 ml steril içme suyu bulunan Schott şişesine ilave edilmiş; böylelikle 10^8 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterisi elde edilmiştir. Sayım kontrolü için, bu konsantrasyon değerinin falkon tüplerindeki direkt örnek ve içme suyu içerisinde hazırlanmış 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} sulandırılmırlarından 10, 25, 50 ve 100 µl alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde BCYE Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır.

3.4.2. Farklı Sıcaklık Uygulamalarına Maruz Bırakılan Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti

10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri; Benmari'de 60 °C'de 3 dakika, 55 °C'de 15 dakika, 50 °C'de 30 dakika ve buzdolabında 5 °C'de 24 saat olmak üzere sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılmıştır (Tablo 3.1). Yukarıda belirtilen sıcaklık değerlerine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları, kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan sıcaklık ve süreler.

<i>L. pneumophila</i>	Sıcaklık (°C)/ süre			
ATCC 33152	60 °C/ 3 dakika	55 °C/ 15 dakika	50 °C/ 30 dakika	5 °C/ 24 saat
Çevresel izolat	60 °C/ 3 dakika	55 °C/ 15 dakika	50 °C/ 30 dakika	5 °C/ 24 saat

3.4.2.1. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti

10^8 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakıldıktan sonra kültür yöntemi ile analiz edilmiştir. Farklı sıcaklık uygulamalarına (Tablo 3.1) maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri, Bölüm 3.3.2'de belirtildiği gibi filtre sisteminden geçirilerek yoğunlaştırılmıştır. Naylon filtre, içerisinde 20 ml steril içme suyu bulunan Stomacher poşetine konularak, filtre yüzeyine tutunmuş bakterilerin suya geçmesi için 2 dakika boyunca ovalanmıştır. Stomacher poşeti içerisindeki örnek, steril koşullar altında falkon tüpüne aktarılmış ve sıcaklık uygulaması yapılmış her bir örnekten, direkt ve içme suyunda hazırlanmış 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} seri sulandırımından 100'er µl alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde BCYE Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Tüm Petri kutuları 37 °C'de %5 CO₂'li ve %95 nemli ortamda 3-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3. günden sonra üreyen koloniler morfolojik olarak

gözlemlenmiş ve gri renkli, camısı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılarak kaydedilmiş ve litredeki *L. pneumophila* bakteri sayıları tespit edilmiştir.

3.4.2.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti

Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan 10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri filtreden geçirilerek yoğunlaştırıldıktan sonra (Bölüm 3.3.2), 20 ml steril içme suyu eklenmiş ve Bölüm 3.3.3’de anlatıldığı şekilde FISH yöntemi uygulanarak epifloresan mikroskopta (Nikon Eclipse 80i) 100’lük objektif yardımıyla incelenmiştir. Sonuçlar her bir kuyucuktan en az 15 temsili görüntü olacak şekilde kaydedilmiştir.

Çekilen mikroskop fotoğraflarında tespit edilen bakteriler sayılarak ortalaması alınmış ve aşağıdaki formül kullanılarak litrede bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Bakteri sayısı / L} = \text{Ortalama bakteri sayısı} \times (\text{Kuyu alanı} / \text{Fotoğraf alanı}) \times 1000$$

3.4.2.3. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanımlarının Semi-nested PZR Yöntemi ile Tespiti

10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri, farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakıldıktan sonra filtrasyonla yoğunlaştırılmış (Bölüm 3.3.2) ve Bölüm 3.3.4.1’de belirtildiği gibi DNA izolasyonu yapıldıktan sonra ilk adım PZR (3.3.4.3.1.) ve semi-nested PZR (3.3.4.3.2.) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İlk adım PZR ve semi-nested PZR adımlarının her birinden sonra elde edilen PZR ürünleri, SYBR Green I boyası kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile UV Translüminatörde (Kodak GL 1500) görüntülenmiştir.

3.4.3. Farklı pH Uygulamalarına Maruz Bırakılan Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti

Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranını tespit etmek için; önceden 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiş 1M HCl, 3M HCl ile 1M KOH ve 3M KOH kullanılarak, pH’sı 2.2, 5.8, 7.0 ve 8.2’ye ayarlanmış 1000 ml’lik su örnekleri hazırlanmıştır. 10^8 h/L

konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilen ve pH'sı 2.2, 5.8, 7.0 ve 8.2'ye ayarlanmış her bir su örneği 0, 15, 30 dakika, 1 ve 24 saat olmak üzere farklı sürelerde bekletilmiştir (Tablo 3.2). Bekletilme süreleri sonunda, asidik pH değerleri için 1M KOH ve 3M KOH, bazik pH değerleri için 1M HCl ve 3M HCl kullanılarak örnekler nötralize edilmiştir. Tablo 3.2'de belirtilen pH değerlerine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranlarının tespit edilmesinde en uygun yöntemin belirlenebilmesi için kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılmıştır.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan pH değerleri/süre.

<i>L. pneumophila</i>	pH değeri /süre	
	pH değeri	Süre
ATCC 33152 ve Çevresel izolat	pH 2.2	0.dakika
		15 dakika
		30 dakika
		1 saat
		24 saat
	pH 5.8	0. dakika
		15 dakika
		30 dakika
		1 saat
		24 saat
	pH 7.0	0. dakika
		15 dakika
		30 dakika
		1 saat
		24 saat
	pH 8.2	0. dakika
		15 dakika
		30 dakika
		1 saat
		24 saat

3.4.3.1. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti

Farklı sürelerde farklı pH değerlerine maruz bırakılan 10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri, süre sonunda pH'ın etkisini durdurmak için nötralize edilmiş ve Bölüm 3.3.2'de belirtildiği gibi filtre sisteminden geçirilerek yoğunlaştırılmıştır. Naylon filtre, içerisinde 20 ml steril içme suyu bulunan Stomacher poşetine konularak, filtre yüzeyinde tutunmuş bakterilerin suya geçmesi için

2 dakika boyunca ovalanmıştır. Stomacher poşeti içerisindeki örnek, steril koşullar altında Falkon tüplerine aktarılmıştır. Farklı pH değerlerine farklı sürelerde maruz bırakılmış her bir örnekten, direkt ve içme suyu içerisinde hazırlanmış 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} seri sulandırımından 100'er µl alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde BCYE Agara besiyerine yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Tüm Petri kutuları 37 °C'de %5 CO₂'li ve %95 nemli ortamda 3-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3. günden sonra üreyen koloniler morfolojik olarak gözlemlenmiş ve gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılarak kaydedilmiş ve litredeki *L. pneumophila* bakteri sayısı hesaplanmıştır.

3.4.3.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti

Farklı sürelerde farklı pH değerlerine maruz bırakılan 10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri filtreden geçirilerek yoğunlaştırıldıktan sonra (Bölüm 3.3.2), 20 ml steril içme suyu eklenmiş ve Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı gibi FISH yöntemi uygulanarak epifloresan mikroskopta (Nikon Eclipse 80i) 100x'lik objektif yardımıyla incelenmiştir. Sonuçlar her bir kuyudan en az 15 temsili görüntü olacak şekilde kaydedilmiştir.

Çekilen mikroskop fotoğraflarında tespit edilen bakteriler sayılarak ortalaması alınmış ve aşağıdaki formül kullanılarak litrede bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Bakteri sayısı / L} = \text{Ortalama bakteri sayısı} \times (\text{Kuyu alanı} / \text{Fotoğraf alanı}) \times 1000$$

3.4.3.3. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanımlarının Semi-nested PZR Yöntemi ile Tespiti

10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilmiş 1000 ml'lik su örneklerinin her biri, pH 2.2, pH 5.8, pH 7.0 ve pH 8.2'de 0, 15, 30 dakika ve 1, 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır (Tablo 3.2). Belirtilen süreler sonunda, nötralize edilmiş ve filtrasyonla yoğunlaştırılmış su örnekleri (Bölüm 3.3.2), Bölüm 3.3.4.'te belirtildiği gibi DNA izolasyonu yapıldıktan sonra ilk adım PZR ve semi-nested PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İlk adım PZR ve semi-nested PZR adımlarının her birinden sonra elde edilen PZR ürünleri, SYBR Green I boyası kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile UV Translüminatörde (Kodak GL 1500) görüntülenmiştir.

3.4.4. Farklı Konsantrasyonlarda ve Sürelerde Biyosite Maruz Bırakılan Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti

3.4.4.1. Deneyde Kullanılan Biyosit

Huwa-san TR 50 aktif oksijen bazlı olup, koloidal gümüş ile stabilize edilmiş hidrojen peroksit içeren okside edici bir biyositir. Yüksek düzey dezenfeksiyon sağlayan, geniş etki spektrumuna sahip, düşük maliyetli, korozif etki göstermeyen bir biyositir. Düşük dozlarda yüksek düzeyde etki gösteren çevre dostu bir biyositir. Çevrede kalıntı bırakmadığından dezenfeksiyonda tercihen kullanılmaktadır. Sıcak ve soğuk su sistemlerinde, depolarda ve boru sistemlerinde kullanılabilir. Biyofilm tabakası içerisindeki *Legionella* cinsi bakterilere karşı etkilidir. National Science Foundation (NSF), Confirmed European (CE) ve uluslararası geçerli olan Control Union sertifikalarına sahip olup içme suyu temizleme kimyasalı olarak uygunluğu onaylanmıştır.

3.4.4.2. Biyosit Uygulaması

10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilmiş su örnekleri 100 ppm ve 200 ppm konsantrasyondaki Huwa-San TR 50 biyositine 0, 1, 3, 6 ve 24 saat süre maruz bırakılmıştır (Tablo 3.3). Belirtilen süreler sonunda biyositin, *L. pneumophila* bakterileri üzerindeki etkisini nötralize etmek için her bir su örneğine, 100 ppm için 500 µl, 200 ppm için 1 ml 0.1 N sodyumtiyosülfat eklenmiştir. Yukarıda belirtilen biyosit değerlerine maruz bırakılan örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan biyosit konsantrasyon ve süreleri.

Huwa-San TR 50 biyositi		
<i>L. pneumophila</i>	Konsantrasyon (ppm)	Süre (saat)
		0
		1
	100	3
		6
ATCC 33152		24
ve		0
Çevresel izolat		1
	200	3
		6
		24

3.4.4.3. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Kültür Yöntemi ile Tespiti

10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örnekleri, farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde (Tablo 3.3), Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakıldıktan sonra 0.1 N sodyum tiyosülfat ile nötralize edilmiş ve Bölüm 3.3.2’de belirtildiği gibi filtre sisteminden geçirilerek yoğunlaştırılmıştır. Naylon filtre, içerisinde 20 ml steril içme suyu bulunan Stomacher poşetine konularak filtre yüzeyinde tutunmuş bakterilerin suya geçmesi için 2 dakika boyunca ovalanmıştır. Stomacher poşeti içerisindeki örnek steril koşullar altında falkon tüplerine aktarılmıştır. Biyosit uygulaması yapılmış her bir örnekten, direkt ve içme suyu içerisinde hazırlanmış 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} seri sulandırılmalarından 100’er µl alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde BCYE Agar besiyerine yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Tüm Petri kutuları 37 °C’de %5 CO₂’li ve %95 nemli ortamda 3-14 gün inkübasyona bırakılmıştır.

3. günden sonra üreyen koloniler morfolojik olarak gözlemlenmiş ve gri renkli, camsı, mukoid ve kabarık morfoloji gösteren koloniler sayılarak kaydedilmiştir.

3.4.4.4. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının FISH Yöntemi ile Tespiti

Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan 10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri, belirlenen süreler sonunda nötralize edilmiştir. Nötralize edilen su örnekleri Bölüm 3.3.2’de belirtildiği gibi yoğunlaştırıldıktan sonra, 20 ml steril kullanma suyu eklenmiş ve Bölüm 3.3.3’de belirtildiği şekilde FISH yöntemi uygulanmıştır. FISH yöntemi sonuçları, epifloresan mikroskopta (Nikon Eclipse 80i) 100’lük objektif yardımıyla incelenmiştir. Sonuçlar her bir kuyucuktan en az 15 temsili görüntü olacak şekilde kaydedilmiştir.

Çekilen mikroskop fotoğraflarında tespit edilen bakteriler sayılarak ortalaması alınmış ve aşağıdaki formül kullanılarak litrede bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Bakteri sayısı / L} = \text{Ortalama bakteri sayısı} \times (\text{Kuyu alanı} / \text{Fotoğraf alanı}) \times 1000$$

3.4.4.5. *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanımlarının Semi-nested PZR Yöntemi ile Tespiti

10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örnekleri farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakıldıktan sonra, biyositin etkisi 0.1 N sodyum tiyosülfat ile nötralize edilmiş ve filtrasyonla yoğunlaştırılmıştır (Bölüm 3.3.2). Filtrasyonla yoğunlaştırılmış su örnekleri, Bölüm 3.3.4.’te belirtildiği gibi DNA izolasyonu yapıldıktan sonra ilk adım PZR ve semi-nested PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İlk adım PZR ve semi-nested PZR adımlarının her birinden sonra elde edilen PZR ürünleri, SYBR Green I boyası kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile UV Translüminatörde (Kodak GL 1500) görüntülenmiştir.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Değerlerin normal dağılıp gösterip göstermedikleri ve aralarındaki istatistiksel ilişkilerin belirlenmesi için SPSS 17.0 programı kullanılmıştır. Kültür yöntemi ile farklı

konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterilerinin ve farklı çevresel faktörlere maruz bırakılan su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımları açısından anlamlı bir fark olup olmadığı Post-Hoc testi ile saptanmıştır. Deney kapsamında, FISH yöntemi ile farklı konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterilerinin ve farklı çevresel faktörlere maruz bırakılan su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımları açısından anlamlı bir fark olup olmadığı ise Kruskalwallis H testi ve Post-Hoc testi ile saptanmıştır.

3.6. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.6.1. Charcoal Yeast Ekstract (CYE)

L. pneumophila bakterilerinin üretilmesi için kullanılan besiyeridir (Diederer, 2008).

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

Maya özütü, aktif kömür ve agar içeren hazır besiyerine (CYE Agar, Oxoid) 900 ml distile su eklenmiş ve besiyeri erimesi için 100 °C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 1-1.5 atmosfer basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir. Besiyerinin 45-50 °C'ye soğuması beklenmiş ve steril koşullar altında CYE Agar içerisine BCYE besiyeri katkı maddesi karıştırılmıştır. Steril Petri kutularına paylaştırılan ve oda sıcaklığında donması için beklenen besiyerleri 37 °C'de bir gece bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra iki hafta içerisinde kullanılmıştır.

3.6.2. BCYE Besiyeri Katkısı

ACES	5.0 g
Ferrik pirofosfat	0.125 g
L-sistein	0.20 g
α -ketoglutarat	0.50 g

Distile su 100 ml

pH: 6.9±0.2

Hazırlanan besiyeri katkısı üzerine 100 ml distile su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Karışım 30-40 °C'ye soğuduktan sonra 10 M KOH ile pH 6.9'a ayarlanmıştır. 0.22 µm por çaplı enjektör ucuna takılan filtre ile steril edilmiş ve steril koşullar altında 45-50 °C'ye soğuyan CYE Agara eklenmiştir.

3.6.3. Triptik Soya Agar (TSA) Besiyeri

L. pneumophila bakterilerinin doğrulanması amacıyla kullanılan besiyeridir (McDade ve diğ., 1977).

Tripton	15.0 g
Soya pepton	5.0 g
Sodyum klorit	5.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.3±0.2

Hazırlanan besiyeri üzerine erimesi için 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1-1.5 atm basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir. Steril Petri kutularına dökülerek donması beklenen besiyerleri 37 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır. Bu besiyeri +4 °C'de 30 gün saklanabilmektedir.

3.6.4. HCl-KCl Asit Solüsyonu

HCl	105 ml
KCl	14.9 g
Distile su	2 L

1 litre distile su üzerine 105 ml saf HCl ilavesiyle 1.2 mol/L HCl, 1 L distile su içine 14.9 g KCl eritilerek 0.2 mol/L KCl stok solüsyonu hazırlanmıştır. Stok HCl solüsyonundan 3.9 ml, stok KCl solüsyonundan 25 ml alınarak karıştırılmıştır. Bu asit

karişiminin pH'sı 1 mol/L KOH ile 2.2 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra karanlık bir ortamda steril cam şişede saklanmıştır.

3.6.5. 3x Fosfat Tamponu (3x PBS)

KH ₂ PO ₄	0.49 g
NaCl	2.3 g
Distile su	100 ml

Bu maddeler uzerine 60 ml distile su eklenerek kariştirilmıştır. pH 7.2'ye ayarlanmış ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra otoklavda 121 °C'de 1-1.5 atm basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir.

3.6.6. 1x PBS

3 x PBS	33 ml
Distile su	100 ml

Karişim otoklavda 121 °C'de 1-1.5 atm basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir.

3.6.7. 5 M NaCl

NaCl	29.5 g
Distile su	100 ml

Karişim otoklavda 121 °C'de 1-1.5 atm basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir. Steril edildikten sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. Daha sonra steril 2 ml'lik crio tüplerine eşit şekilde paylaştırılmış ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.8. 1 M NaOH

NaOH	4 g
Distile su	100 ml'ye tamamlanmıştır.

Karişim daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir.

3.6.9. 10 M NaOH

NaOH	10 g
Distile su	25 ml'ye tamamlanmıştır.

Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir.

3.6.10. 1 M HCl

%37'lik HCl	8.4 ml
Distile su	100 ml

İçerisinde 100 ml distile su bulunan temiz bir behere, çeker ocak içinde %37'lik HCl'den 8.4 ml yavaş yavaş damlatılmıştır. Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir.

3.6.11. %10 Sodyumdodesilsülfat (SDS)

SDS	2 g
Distile su	20 ml'ye tamamlanmıştır.

Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. Steril edildikten sonra 2 ml'lik crio tüplerine eşit şekilde paylaştırılmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.12. 1 M Tris-HCl

Tris	12.1 g
Distile su	100 ml

12.1 g Tris temiz bir kaba konularak üzerine 40 ml distile su eklenmiş ve çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH 8'e ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım, 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiş ve steril 2 ml'lik crio tüplerine eşit şekilde paylaştırılmıştır. Kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.13. 0.5 M EDTA

EDTA	18.1 g
Distile su	100 ml

18.1 g EDTA temiz bir behere konularak üzerine yaklaşık 60 ml steril distile su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. 10 M NaOH ile pH 8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım, 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir.

3.6.14. Tris-EDTA

1M Tris-HCl	1 ml
0.5 M EDTA	200 µl
Distile su	100 ml'ye tamamlanmıştır.

Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiş ve steril 2 ml'lik crio tüplerine eşit şekilde paylaştırılmıştır. Kullanılncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.15. Paraformaldehit (PFA)

1x PBS	6.5 ml
Paraformaldehit	0.4 g
1 M NaOH	1 damla
3x PBS	3.3 ml
1 M HCl	1 damla

pH: 7.2±0.2

Daha önceden 60 °C'ye ayarlanmış Benmari'de, temiz bir falkon tüpü içindeki 6.5 ml'lik 1x PBS, 60 °C'ye geldikten sonra çeker ocak içinde 0.4 g paraformaldehit eklenmiştir. Karışıma 1 damla 1 M NaOH eklenmiş ve şeffaflaşncaya kadar yaklaşık 1-2 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra solüsyon Benmari'den uzaklaştırılmış ve 3.3 ml 3x PBS eklenmiştir. Üzerine 1 damla 1 M HCl ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiş ve taze olarak kullanılmıştır.

3.6.16. DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol)

1 mg/ml stok için 50 mg DAPI, 50 ml bidistile su içerisinde çözünmüş ve 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. Hazırlanan bu stok solüsyondan 1 µl alınarak steril edilmiş bidistile su ile 1 ml'ye tamamlanarak 1 µg/ml'lik çalışma solüsyonu elde edilmiştir. Elde edilen karışım steril şartlar altında Eppendorf tüplerine paylaştırılıp kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.17. Hibridizasyon Tamponu

5 M NaCl	360 µl
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	40 µl
Formamid	400 µl
Bidistile su	1200 µl
%10 SDS	4 µl

3.6.18. Yıkama Tamponu

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1 ml
5 M NaCl	2250 µl
0.5 M EDTA	500 µl
Bidistile su	50 ml'ye tamamlanır
%10 SDS	50 µl

Karışım temiz bir 50 ml'lik santrifüj tüpüne konularak bidistile su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Karışım üzerine %10'luk SDS'ten 50 µl ilave edilmiştir.

3.6.19. 0.1 N HCl (Hidroklorik Asit) Çözeltisi

%37'lik HCl	8.28 ml
Distile su	1000 ml' ye tamamlanmıştır.

3.6.20. 0.01 M KCl (Potasyum Klorür)

KCl	0.745 g
-----	---------

Distile su 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.6.21. 10 M KOH (Potasyum Hidroksit)

KOH 5.6 g

Distile su 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.6.22. LEG705 Prob Konsantrasyonu

291 µl steril TE Buffer, LEG705 probu içeren tüpe eklenerek 100 µM stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok solüsyondan 1 µl alınarak içerisinde 9 µl TE Buffer bulunan Eppendorf tüpüne ilave edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de karanlık bir ortamda saklanmıştır.

3.6.23. 10x TAE

Trisma Base 48.4 g

%100'lük asetik asit 11.42 ml

0.5 M EDTA 20 ml

Distile su 1000 ml

10x TAE stok solüsyonu hazırlamak için 48.4 g Trisma Base tartılmış ve 1000 ml'lik temiz bir mavi kapaklı Schott şişesinin içine konulmuştur. Üzerine 750 ml filtrelenmiş ve otoklavlanmış bidistile su eklenerek iyice çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine %100'lük asetik asitten çeker ocak içinde 11.42 ml yavaş yavaş eklenmiştir. En son üzerine 0.5 M EDTA'dan 20 ml ilave edildikten sonra filtrelenmiş ve otoklavlanmış bidistile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1-1.5 atm basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra soğumaya bırakılmış ve +4 °C'de Schott şişesinde saklanmıştır.

3.6.24. 1x TAE

10x TAE stok solüsyonundan 100 ml alınarak içerisinde önceden filtrelenmiş ve otoklavlanmış 900 ml bidistile su bulunan mavi kapaklı 1000 ml'lik Schott şişesi içerisine steril şartlar altında konulmuş ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.6.25. %1'lik Agaroz Jel

1 g agaroz temiz bir Erlen'e tartılarak üzerine 100 ml +4 °C'de saklanan 1x TAE eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra mikrodalgada kaynamamasına dikkat edilerek eritilmiştir.

3.6.26. LEG225 Primer Konsantrasyonu

100 µM stok yapmak için 457 µl steril TE Buffer, LEG225 primeri bulunan tüpün içine eklenmiştir. Stok solüsyondan 1 µl alınarak içerisinde 9 µl TE Buffer bulunan Eppendorf tüpüne ilave edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de karanlık bir ortamda saklanmıştır.

3.6.27. LEG448 Primer Konsantrasyonu

100 µM stok yapmak için 397 µl steril TE Buffer, LEG448 primeri bulunan tüpün içine eklenmiştir. Stok solüsyondan 1 µl alınarak içerisinde 9 µl TE Buffer bulunan Eppendorf tüpüne ilave edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de karanlık bir ortamda saklanmıştır.

3.6.28. LEG858 Primer Konsantrasyonu

100 µM stok yapmak için 489 µl steril TE Buffer, LEG858 primeri bulunan tüpün içine eklenmiştir. Stok solüsyondan 1 µl alınarak içerisinde 9 µl TE Buffer bulunan Eppendorf tüpüne ilave edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de karanlık bir ortamda saklanmıştır.

3.6.29. %50'lik Alkol

Saf etanolden temiz bir 100 ml'lik mezür içine 50 ml konularak üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.30. %80'lik Alkol

Saf etanolden temiz bir 100 ml'lik mezür içine 80 ml konularak üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.31. %96'lık Alkol

Saf etanolden temiz bir 100 ml'lik mezür içine 96 ml konularak üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.32. %98'lik Alkol

Saf etanolden temiz bir 100 ml'lik mezür içine 98 ml konularak üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.33. SYBR Nötralizasyon Solüsyonu

A solüsyonu: 0.98 g KMnO_4 + 125 ml distile su

B solüsyonu: 1.25 g NaOH + 125 ml distile su

C solüsyonu: 2.56 ml HCl + 125 ml distile su

Ayrı ayrı hazırlanan A, B ve C solüsyonlarından öncelikle A ve C solüsyonları birbirine karıştırılmış daha sonra B solüsyonu ilave edilmiştir. Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanan karışım 1 saat oda ısısında bekletilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilen su örneklerinden, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımlarının belirlenmesinde uygun yöntemlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; hem farklı konsantrasyonlarda (10^2 - 10^{10} h/L) *L. pneumophila* bakterileri ile hem de pH, sıcaklık ve biyosit uygulamalarına maruz bırakılan 10^8 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranlarını tespit etmek için kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılmıştır.

4.1. FARKLI KONSANTRASYONLARDA *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİ İLE KONTAMİNE SU ÖRNEKLERİNDEN *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ

4.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları

Deneyde kullanılan 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ve 10^2 h/L konsantrasyonlarındaki standart *L. pneumophila* (ATCC 33152) bakterisi ve çevresel *L. pneumophila* izolatı ile kontamine edilmiş yapay su örneklerinden kültür yöntemiyle *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımlarına ait sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir. 10^2 - 10^{10} h/L konsantrasyonlarındaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilen su örneklerinde geri kazanım oranının kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.1). 10^2 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının olmadığı görülmektedir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının BCYE Agar besiyeri üzerindeki koloni görüntüleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

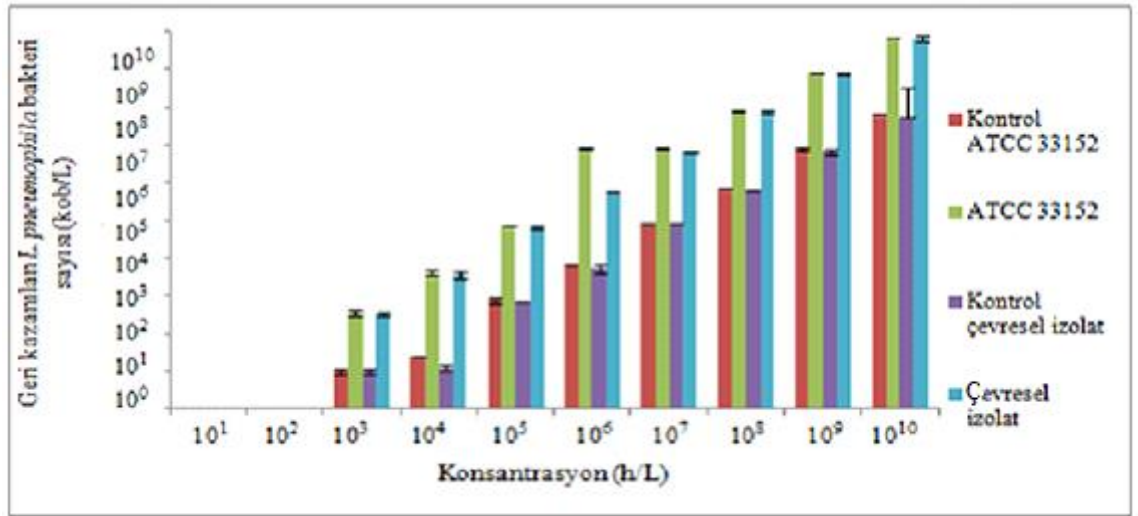
Deneyde kullanılan standart ve çevresel *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranı karşılaştırıldığında, standart *L. pneumophila* bakterisinin, çevresel *L. pneumophila* izolatına göre su örneklerindeki geri kazanımının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Kültür yönteminde, filtrasyon işlemi ile yoğunlaştırıldıktan sonra sıcaklık (50 °C'de 30 dakika) ve asit (pH 2.2) ile muamele edilen *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları incelendiğinde, asit ile muamele edilen örneklerden geri kazanılan (% 56) *L. pneumophila* sayısının sıcaklık uygulamasına göre (% 22) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

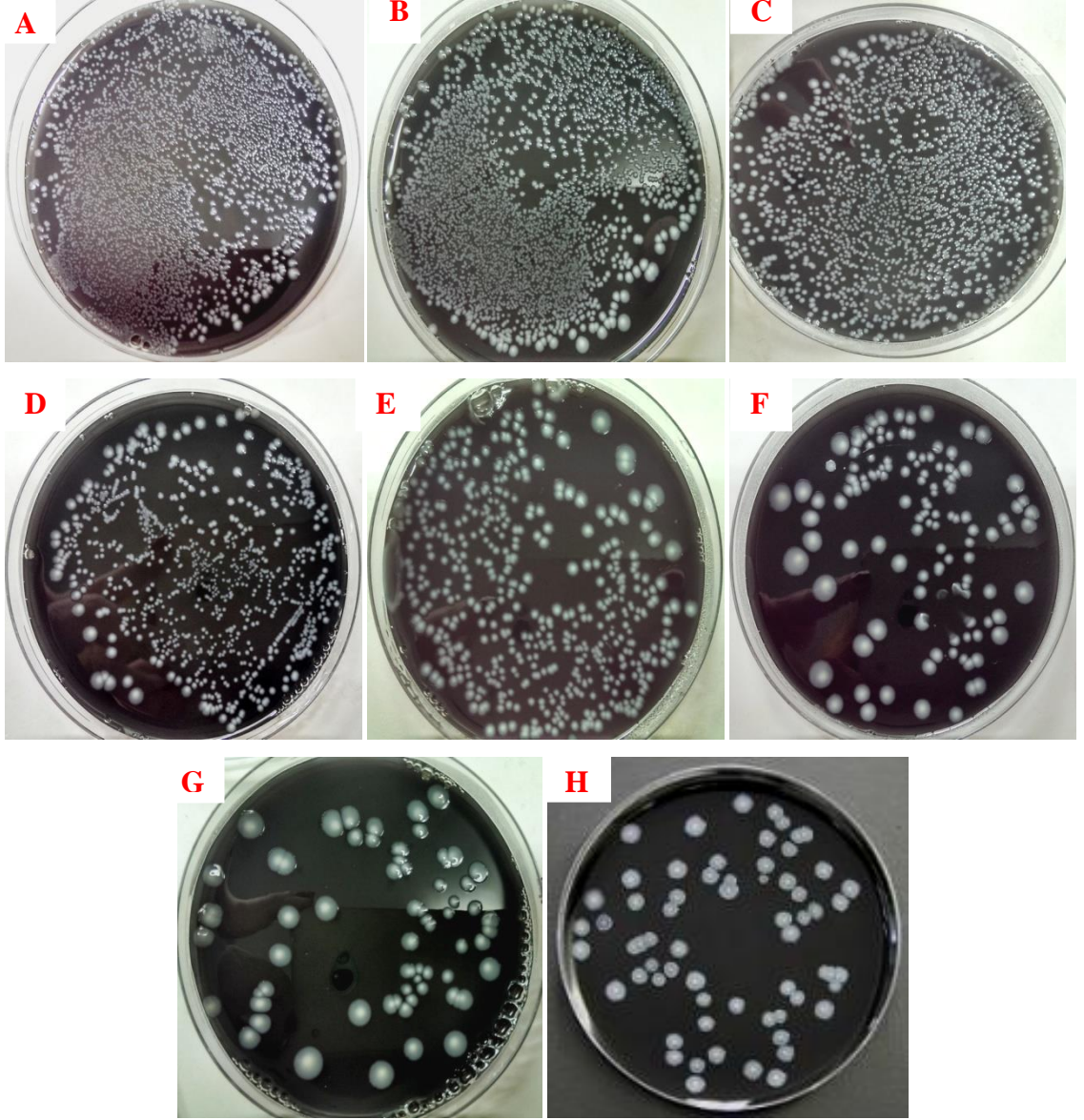
Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilmiş su örneklerinden, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı kültür yöntemi ile incelendiğinde, belirtilen farklı konsantrasyonlardaki bakteri sayıları arasında geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.05$).

Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} kob/L) \pm SS				
Konsantrasyon (h/L)	Kontrol		Kontrol	
	ATCC 33152	Çevresel izolat	ATCC 33152	çevresel izolat
10^{10}	9.8 \pm 0.007	9.4 \pm 0.01	7.8 \pm 0.06	7.7 \pm 0.12
10^9	8.9 \pm 0.01	8.2 \pm 0.04	6.8 \pm 0.05	6.8 \pm 0.19
10^8	7.8 \pm 0.02	7.3 \pm 0.06	5.8 \pm 0.14	5.8 \pm 0.11
10^7	6.9 \pm 0.01	6.2 \pm 0.04	4.9 \pm 0.05	5.8 \pm 0.05
10^6	5.7 \pm 0.05	5.6 \pm 0.07	3.8 \pm 0.06	3.7 \pm 0.06
10^5	4.8 \pm 0.01	4.4 \pm 0.02	2.8 \pm 0.07	2.8 \pm 0.09
10^4	3.6 \pm 0.07	3.7 \pm 0.05	1.3 \pm 0.03	0.09 \pm 0.04
10^3	2.5 \pm 0.06	2.8 \pm 0.03	1 \pm 0.07	1 \pm 0
10^2	0	0	0	0



Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.



Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden kültür yöntemi ile geri kazanılan *L. pneumophila*'nın BCYE Agar besiyeri üzerindeki koloni görüntüleri. A) 10^{10} h/L, B) 10^9 h/L, C) 10^8 h/L, D) 10^7 h/L, E) 10^6 h/L, F) 10^5 h/L, G) 10^4 h/L, H) 10^3 h/L.

4.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları

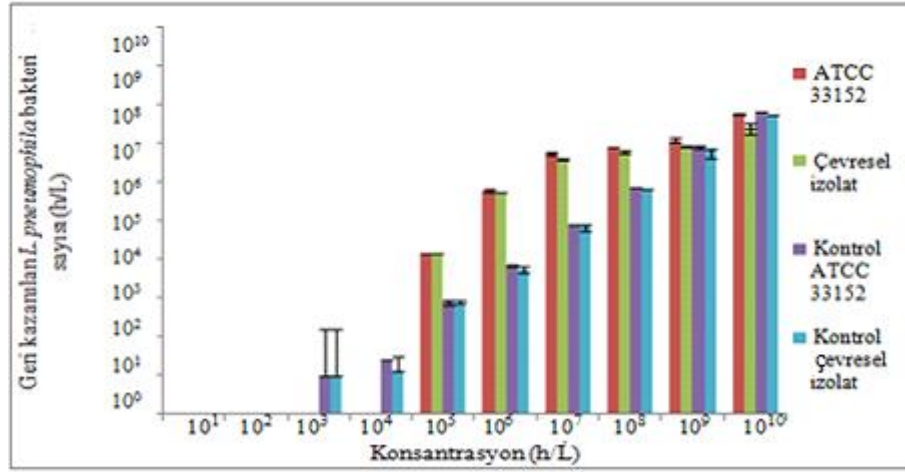
Deneyde kullanılan 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ve 10^2 h/L konsantrasyonlarındaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilmiş yapay su

örneklerinden FISH yöntemiyle elde edilen bakteri geri kazanım sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ve çevresel *L. pneumophila* izolatı ile farklı konsantrasyonlarda kontamine edilmiş yapay su örneklerinden, bakterilerin geri kazanımı incelendiğinde, belirtilen farklı konsantrasyonlardaki bakteri sayıları arasında geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olduğu ($p \leq 0.05$), 10^2 , 10^3 ve 10^4 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* içeren su örneklerinden *L. pneumophila* geri kazanımının olmadığı saptanmıştır. İncelenen bakterilerin geri kazanım oranları karşılaştırıldığında, standart *L. pneumophila* bakterisinin geri kazanım oranının, çevresel izolata göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.3).

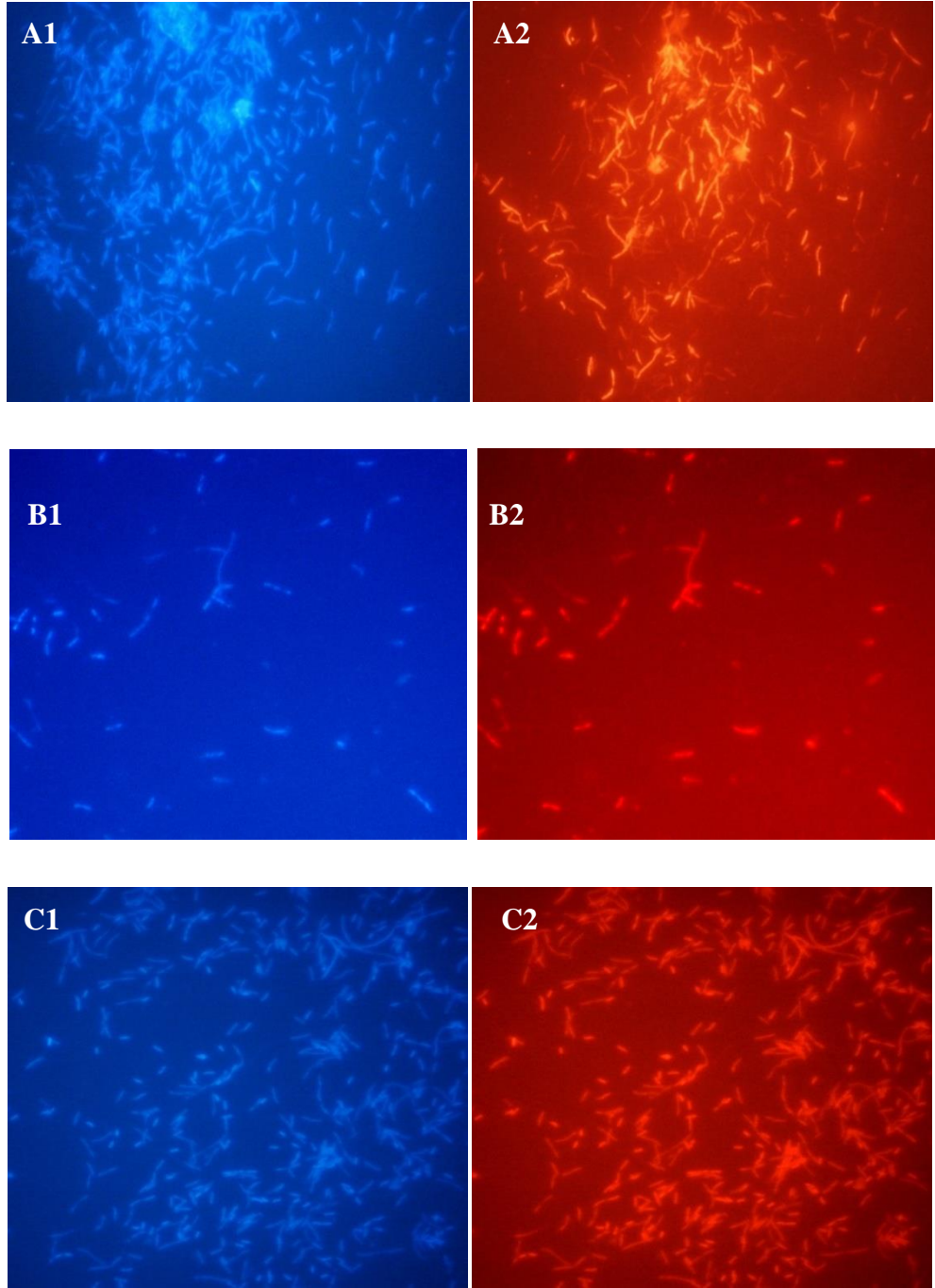
Tablo 4.2: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Konsantrasyon (h/L)	Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} h/L) \pm SS			
	ATCC 33152	Çevresel izolat	Kontrol ATCC 33152	Kontrol çevresel izolat
10^{10}	7.71 \pm 0.06	7.52 \pm 0.01	7.8 \pm 0.06	7.7 \pm 0.12
10^9	7.06 \pm 0.03	6.90 \pm 0.07	6.8 \pm 0.05	6.8 \pm 0.19
10^8	6.87 \pm 0.04	6.80 \pm 0.02	5.8 \pm 0.14	5.8 \pm 0.11
10^7	6.67 \pm 0.07	6.59 \pm 0.03	4.9 \pm 0.05	5.8 \pm 0.05
10^6	5.74 \pm 0.04	5.70 \pm 0.07	3.8 \pm 0.06	3.7 \pm 0.06
10^5	3.14 \pm 0	3.14 \pm 0	2.8 \pm 0.07	2.8 \pm 0.09
10^4	0	0	1.3 \pm 0.03	0.09 \pm 0.04
10^3	0	0	1 \pm 0.07	1 \pm 0
10^2	0	0	0	0

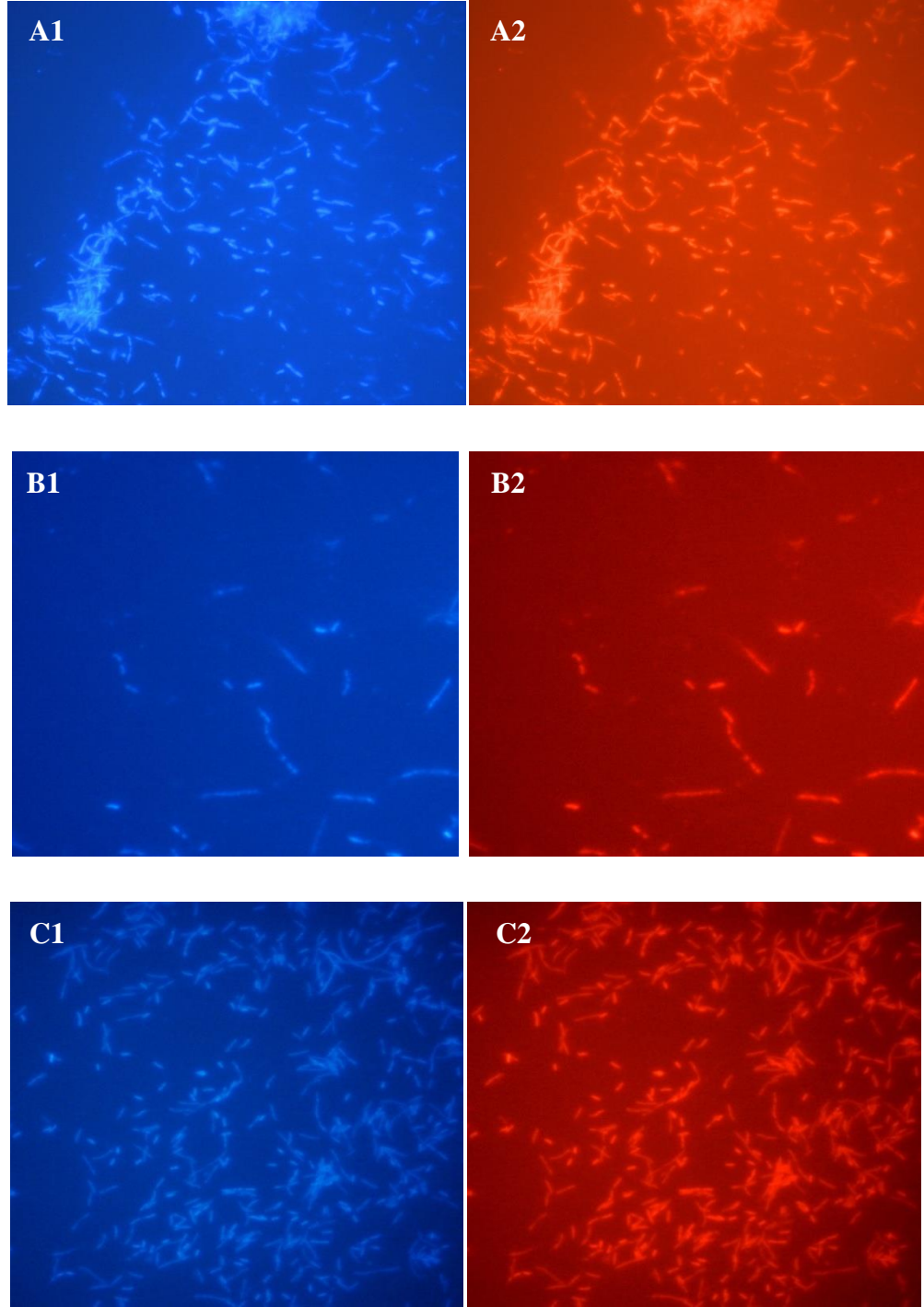


Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Farklı konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden FISH yöntemine göre geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerinin epifloresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



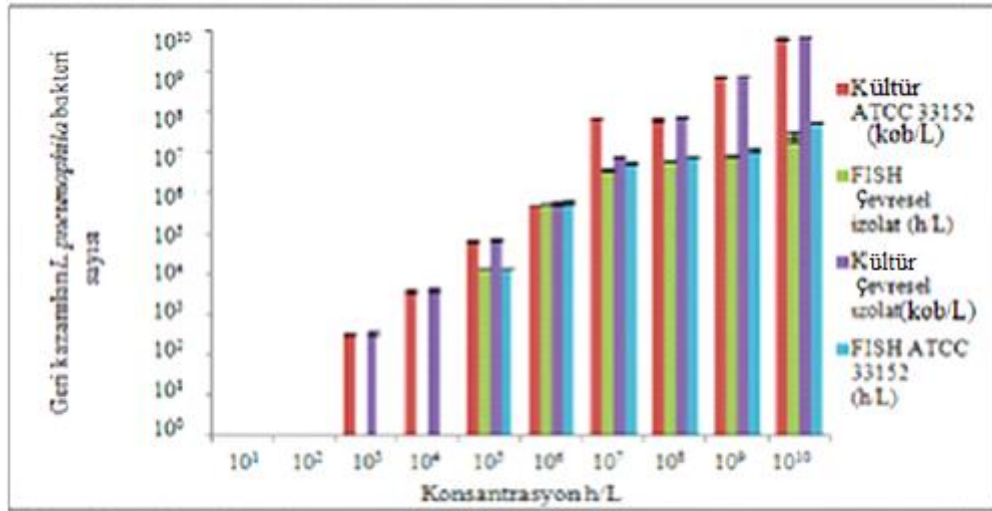
Şekil 4.4: Farklı konsantrasyonlarda standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 10¹⁰ h/L, B) 10⁵ h/L, C) Pozitif kontrol, 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü.
A) 10¹⁰ h/L, B) 10⁵ h/L, C) Pozitif kontrol,
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.

4.1.3. Farklı Konsantrasyonlarda *L. pneumophila* Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Kültür ve FISH Yöntemine Göre Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırılması

Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila*'nın geri kazanımı, kültür ve FISH yöntemine göre karşılaştırılmıştır. Kültür yöntemi ile *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranının, FISH yöntemine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kültür yönteminde 10^3 - 10^{10} h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden *L. pneumophila* geri kazanımı olurken, FISH yönteminde ancak 10^5 - 10^{10} h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren örneklerden geri kazanım olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

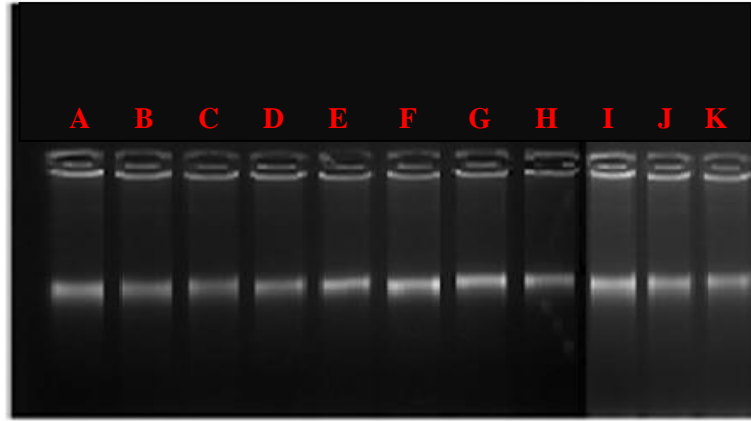


Şekil 4.6: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilmiş su örneklerinden, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı kültür ve FISH yöntemi ile incelendiğinde, belirtilen farklı konsantrasyonlardaki bakteri sayıları arasında geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.05$).

4.1.4. Semi-Nested PZR Sonuçları

Farklı konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilen su örnekleri filtrasyonla yoğunlaştırıldıktan sonra *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA'lar izole edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* içeren örneklerdeki *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyon görüntüleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir. DNA izolasyon bant görüntüleri incelendiğinde, 10^6 - 10^{10} h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren su örneklerinden DNA izole edilirken, 10^2 - 10^5 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren örneklerde *L. pneumophila* DNA'sının izole edilemediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüsü. A) Kontrol. Standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi; B) 10^{10} h/L, C) 10^9 h/L, D) 10^8 h/L, E) 10^7 h/L, F) 10^6 h/L, Çevresel *L. pneumophila* izolatı; G) 10^{10} h/L, H) 10^9 h/L, I) 10^8 h/L, J) 10^7 h/L, K) 10^6 h/L.

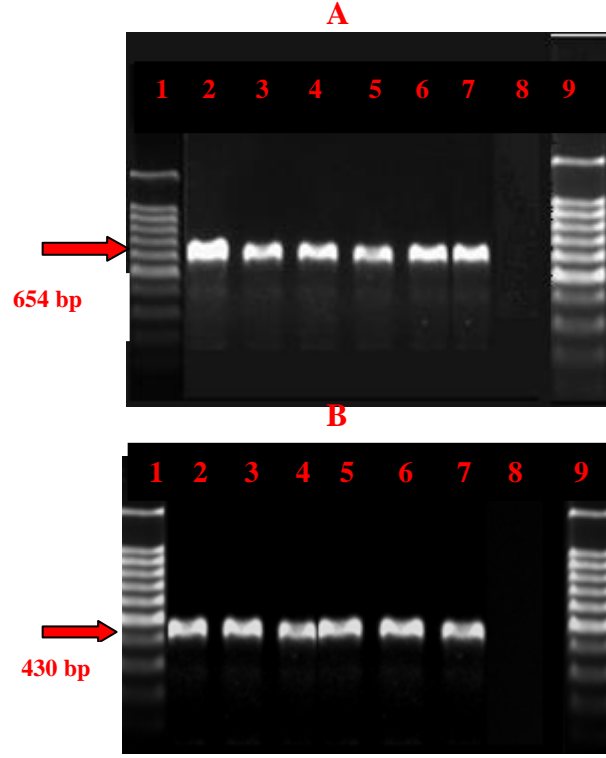
Farklı konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, DNA izolasyonu yapılan 10^6 - 10^{10} h/L konsantrasyondaki örneklerden standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürünleri oluştuğu tespit edilmiştir. Ancak çevresel *L. pneumophila* izolatının 10^7 - 10^{10} h/L konsantrasyondaki örneklerinden ilk adım ve semi-nested PZR ürünleri oluştuğu, 10^6 h/L konsantrasyonda ilk adım PZR ürünü oluştuğu, semi-nested PZR'da ilk adım PZR kalıp olarak kullanıldığında ikinci adım PZR ürünü oluşmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumu.

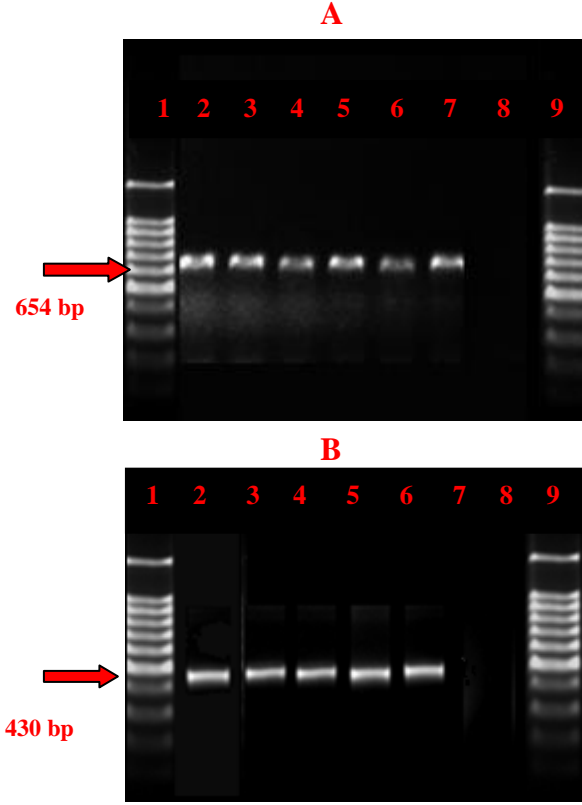
<i>L. pneumophila</i>	Konsantrasyon (h/L)	İlk adım PZR ürünü	Semi-nested PZR ürünü
ATCC 33152	10 ¹⁰	+	+
	10 ⁹	+	+
	10 ⁸	+	+
	10 ⁷	+	+
	10 ⁶	+	+
Çevresel izolat	10 ¹⁰	+	+
	10 ⁹	+	+
	10 ⁸	+	+
	10 ⁷	+	+
	10 ⁶	+	-

L. pneumophila bakterilerine ait DNA'lar, LEG 225 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ilk adım PZR yöntemi yapılmıştır. İlk adım PZR sonucu elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve elde edilen PZR ürünleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. İlk adım sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 654 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.

L. pneumophila bakterilerine ait ilk adım PZR reaksiyonu ürünlerinden, LEG 448 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ikinci adım (semi-nested) PZR yöntemi yapılmıştır. İkinci adım PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve elde edilen PZR ürünleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. İkinci adım sonucunda elde edilen semi-nested PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 430 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlarda standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol, 3) 10^{10} h/L, 4) 10^9 h/L, 5) 10^8 h/L, 6) 10^7 h/L, 7) 10^6 h/L, 8) Negatif kontrol, 9) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.



Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlardaki çevresel *L. pneumophila* izolatı ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol, 3) 10^{10} h/L, 4) 10^9 h/L, 5) 10^8 h/L, 6) 10^7 h/L, 7) 10^6 h/L, 8) Negatif kontrol, 9) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.

4.2. FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARA MARUZ BIRAKILAN *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİ İLE KONTAMİNE SU ÖRNEKLERİNDEN *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN GERİ KAZANIM ORANLARININ FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK TESPİTİ

4.2.1. Farklı Sıcaklık Uygulamalarına Maruz Bırakılan *L. pneumophila* Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti

Çalışmada, 10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilen su örnekleri, belirli sürelerde farklı sıcaklıklara (5 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C) maruz bırakılmıştır.

Sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmış *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları, kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

4.2.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları

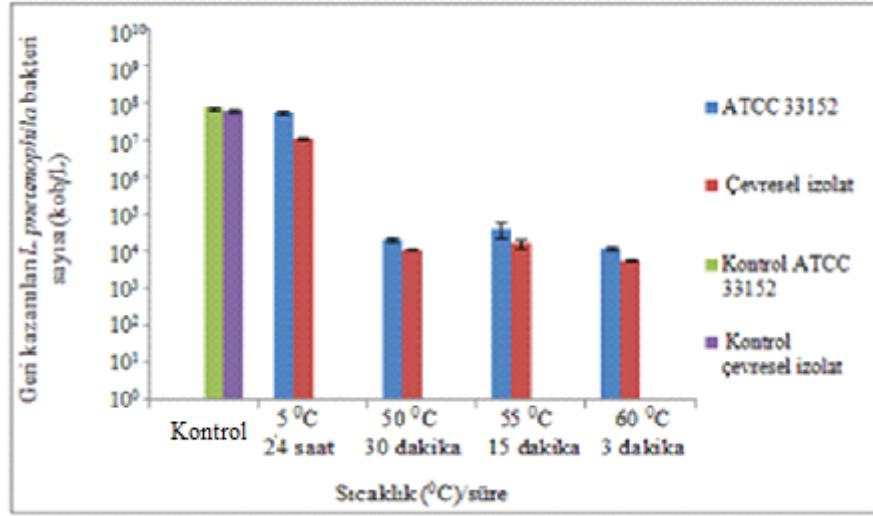
Farklı sıcaklıklara maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları Tablo 4.4 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, standart *L. pneumophila* ATCC 33152 ve çevresel *L. pneumophila* bakterilerinde yüksek oranda geri kazanım sağlayan sıcaklık ve sürenin ATCC 33152 bakterisinde % 73, çevresel izolatta % 17.5 geri kazanım oranı ile 5 °C'de 24 saat olduğu tespit edilmiştir. *L. pneumophila* bakterileri üzerine en etkili sıcaklık değeri ve sürenin ise her iki bakteride ancak %0.01 geri kazanım oranı ile 60 °C'de 3 dakika olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4). 60 °C'ye 3 dakika maruz bırakılan *L. pneumophila* sayısında kontrole göre yaklaşık 4 log, 50 °C'de 30 dakika ve 55 °C'de 15 dakika uygulamalardan sonra ise kontrole göre 3 log azalma olduğu görülmüştür. 5 °C'de 24 saat sıcaklık uygulamasına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakteri sayılarının kontrole yakın değerlerde olduğu ve geri kazanım oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Farklı sürelerde, farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları kültür yöntemi ile değerlendirildiğinde, 50 °C’de 30 dakika, 55 °C’de 15 dakika, 60 °C’de 3 dakika sıcaklık değerleri arasında, geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$), 5 °C’de 24 saat ile yukarıda belirtilen sıcaklık değerleri arasında ise anlamlı bir farkın olduğu ($p \leq 0.05$) belirlenmiştir.

Tablo 4.4: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Sıcaklık (°C)/ süre	Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} kob/L) \pm SS		Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri yüzdesi (%)	
	ATCC 33152	Çevresel izolat	ATCC 33152	Çevresel izolat
60 °C’ de 3 dakika	4.08 \pm 0.05	3.77 \pm 0.02	%0.01	%0.01
55 °C’ de 15 dakika	4.60 \pm 0.2	4.73 \pm 0.86	%0.05	%0.02
50 °C’ de 30 dakika	4.34 \pm 0.04	4.05 \pm 0.26	%0.13	%0.017
5 °C’ de 24 saat	7.75 \pm 0.03	7.05 \pm 0.21	%73	%17.5
Kontrol	7.87 \pm 0.04	6.78 \pm 0.01		



Şekil 4.10: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

4.2.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları

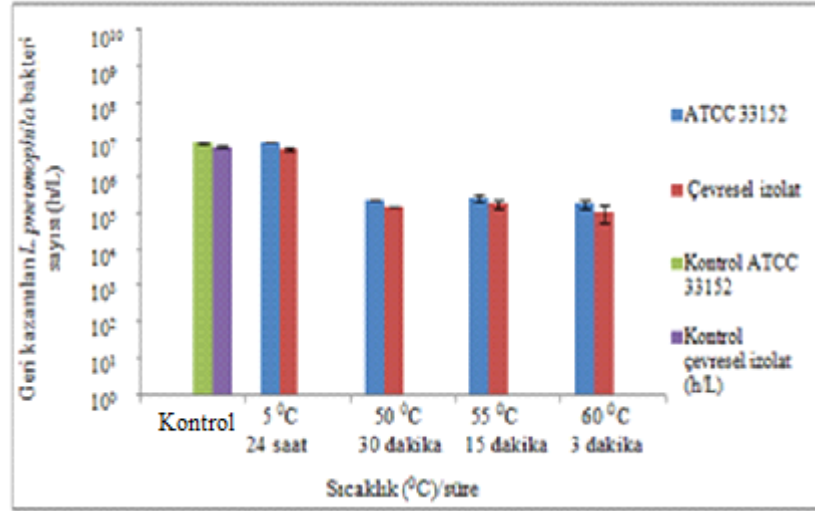
60 °C'de 3 dakika, 55 °C'de 15 dakika, 50 °C'de 30 dakika ve 5 °C'de 24 saat sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan 10⁸ h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilmiş su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları Tablo 4.5 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

FISH yöntemi sonuçlarında da, kültür yönteminde olduğu gibi, *L. pneumophila* ATCC 33152 ve çevresel *L. pneumophila* izolatında yüksek oranda geri kazanım sağlayan sıcaklık ve sürenin, ATCC 33152 bakterisinde % 100 ve çevresel izolatta % 88 geri kazanım oranı ile 5 °C'de 24 saat olduğu tespit edilmiştir. *L. pneumophila* bakterilerinin yok edilmesinde en etkili sıcaklık ve sürenin ise *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisinde %2.8, çevresel izolatta %1.7'lik geri kazanım oranı ile 60 °C'de 3 dakika olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.5). *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örnekleri, 60 °C'de 3 dakika, 55 °C'de 15 dakika, 50 °C'de 30 dakika maruz bırakıldığında, FISH yöntemiyle incelenen her iki *L. pneumophila* bakterisinin geri kazanım oranının birbirine yakın değerlerde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.5: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

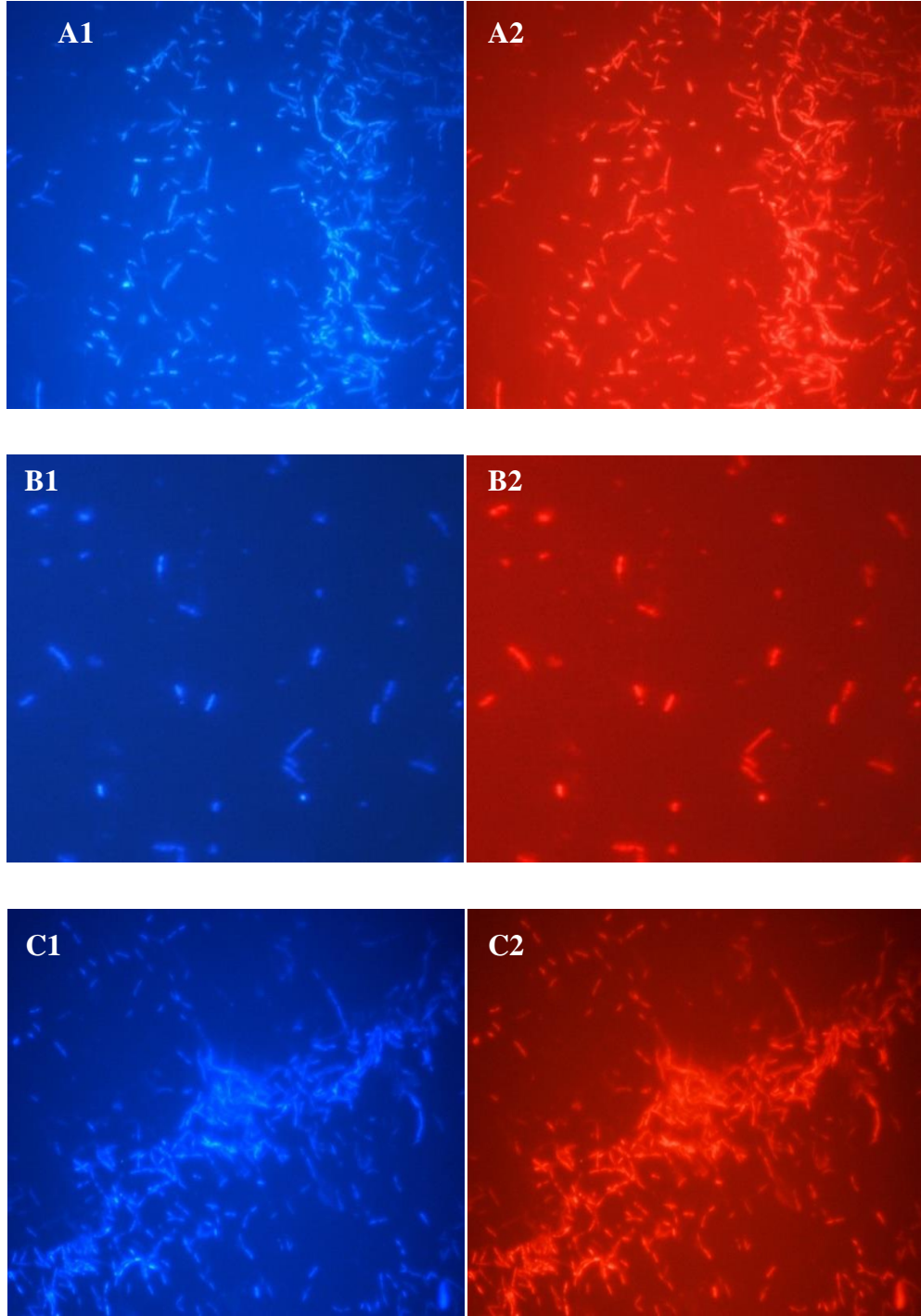
Sıcaklık (°C)/ süre	Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} h/L) \pm SS		Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri yüzdesi (%)	
	ATCC 33152	Çevresel izolat	ATCC 33152	Çevresel izolat
60 °C' de 3 dakika	5.32 \pm 0	5.14 \pm 0	%2.18	%1.7
55 °C' de 15 dakika	5.38 \pm 0.08	5.32 \pm 0	%2.62	%2.3
50 °C' de 30 dakika	5.32 \pm 0	5.14 \pm 0	%3	%2.85
5 °C' de 24 saat	6.92 \pm 0.04	6.78 \pm 0.02	%100	%88
Kontrol	6.90 \pm 0.02	6.84 \pm 0.01		

Farklı sürelerde, farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları FISH yöntemi ile değerlendirildiğinde, 50 °C'de 30 dakika, 55 °C'de 15 dakika, 60 °C'de 3 dakika sıcaklık değerleri arasında, geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olmadığı ($p > 0.05$), 5 °C'de 24 saat ile yukarıda belirtilen sıcaklık değerleri arasında ise anlamlı bir farkın olduğu ($p \leq 0.05$) belirlenmiştir.

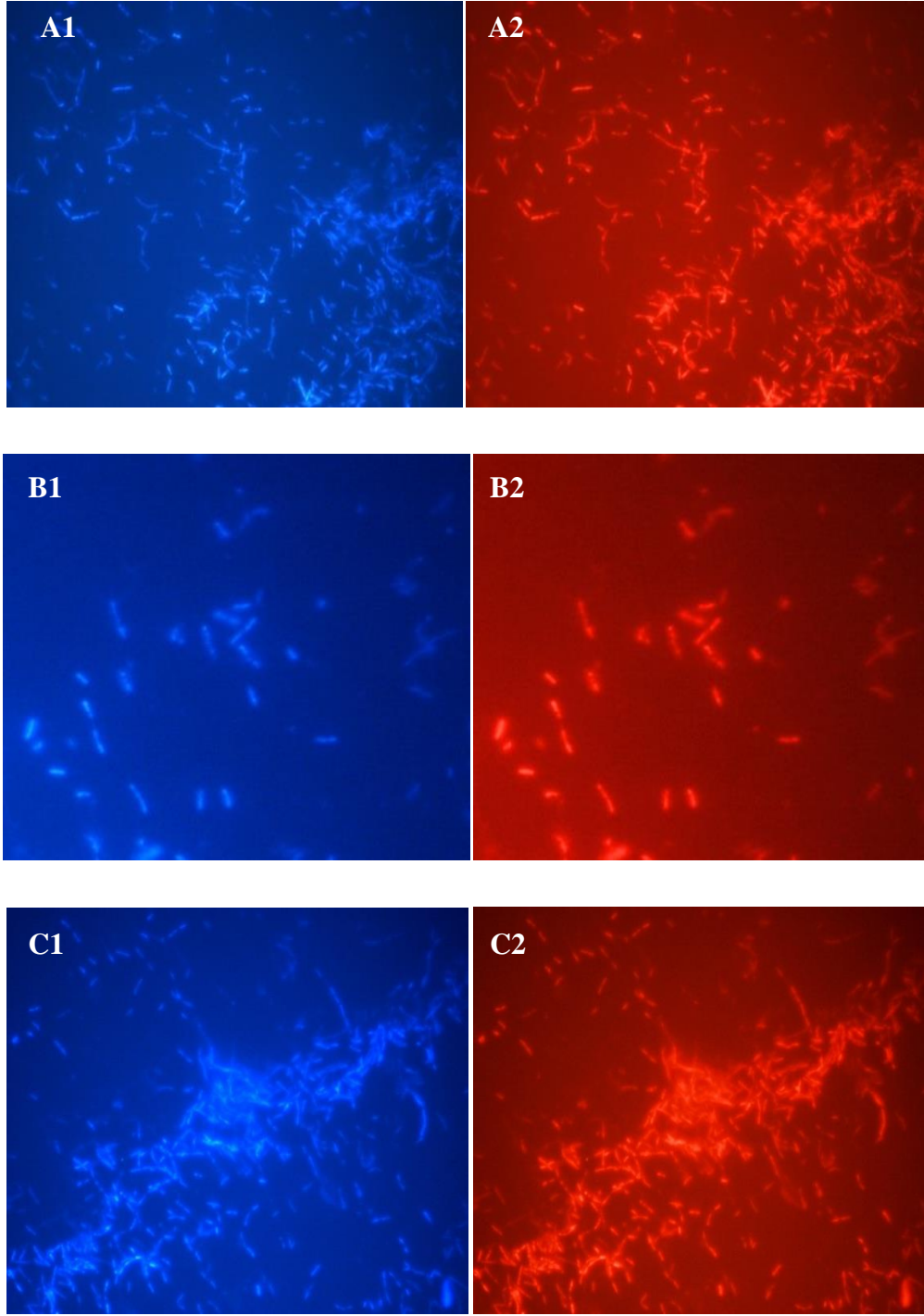


Şekil 4.11: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilen su örneklerinden FISH yöntemine göre geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerinin epifloresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.12: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 5 °C’de 24 saat, B) 60 °C’de 3 dakika, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.

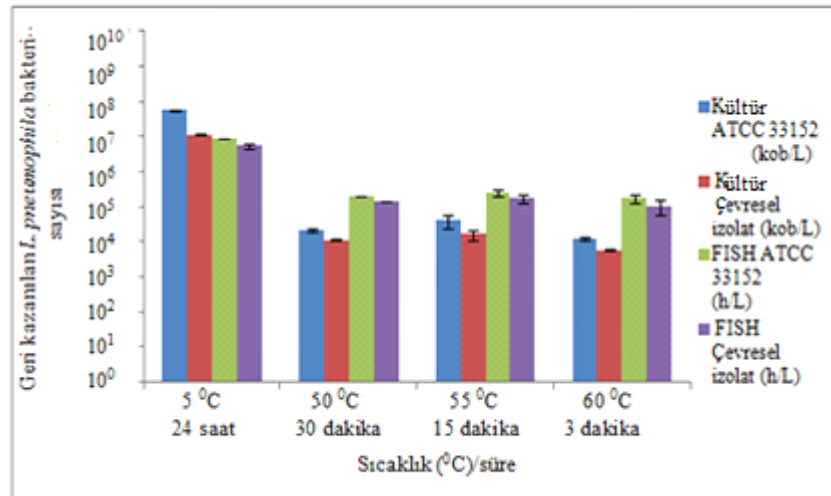


Şekil 4.13: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatı ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 5 °C’de 24 saat, B) 60 °C’de 3 dakika, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.

4.2.1.3. Farklı Sıcaklık Uygulamalarına Maruz Bırakılan *L. pneumophila* Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Kültür ve FISH Yöntemine Göre Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırılması

Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı kültür ve FISH yöntemine göre karşılaştırıldığında, FISH yönteminde geri kazanım oranının kültür yöntemine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

Farklı sürelerde, farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları kültür ve FISH yöntemi ile değerlendirildiğinde, kullanılan her iki yöntemde de 50 °C’de 30 dakika, 55 °C’de 15 dakika, 60 °C’de 3 dakika sıcaklık değerleri arasında, geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$), 5 °C’de 24 saat ile yukarıda belirtilen sıcaklık değerleri arasında ise anlamlı bir farkın olduğu ($p \leq 0.05$) belirlenmiştir.



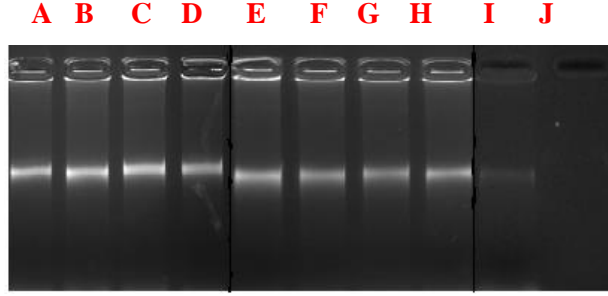
Şekil 4.14: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

4.2.1.4. Semi-Nested PZR Sonuçları

Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örnekleri filtrasyonla yoğunlaştırıldıktan sonra *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA’lar izole edilmiştir. Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan örneklerdeki

L. pneumophila bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüleri Şekil 4.15’de gösterilmiştir.

Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan bütün örneklerde *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA’ların izole edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüsü. A) Pozitif kontrol. *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi; B) 5 °C’de 24 saat, C) 50 °C’de 30 dakika, D) 55 °C’de 15 dakika, E) 60 °C’de 3 dakika. Çevresel *L. pneumophila* izolatı; F) 5 °C’de 24 saat, G) 50 °C’de 30 dakika, H) 55 °C’de 15 dakika, I) 60 °C’de 3 dakika, J) Negatif kontrol.

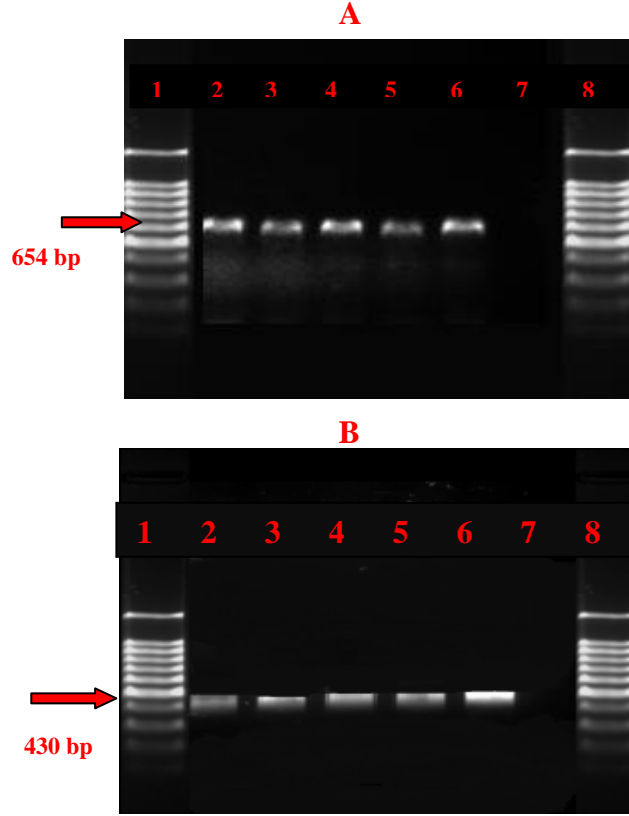
Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan su örneklerindeki *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumları Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

Tablo 4.6: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumu.

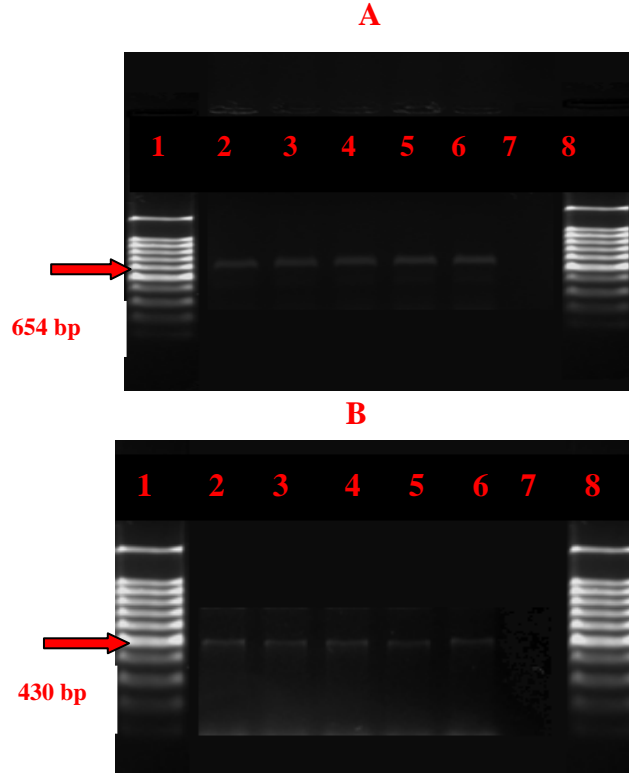
<i>L. pneumophila</i>	Sıcaklık (°C)	Süre	İlk adım PZR ürünü	Semi-nested PZR ürünü
ATCC 33152	5 °C	24 saat	+	+
	50 °C	30 dakika	+	+
	55 °C	15 dakika	+	+
	60 °C	3 dakika	+	+
Çevresel izolat	5 °C	24 saat	+	+
	50 °C	30 dakika	+	+
	55 °C	15 dakika	+	+
	60 °C	3 dakika	+	+

Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA'lar, LEG 225 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ilk adım PZR yapılmıştır. Sıcaklık uygulamasına ait ilk adım PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir. İlk adım sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 654 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.

L. pneumophila bakterilerine ait ilk adım PZR ürünleri, LEG 448 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ikinci adım (semi-nested) PZR yapılmıştır. Sıcaklık uygulamasına ait *L. pneumophila* ikinci adım PZR ürünleri, agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir. İkinci adım sonucunda elde edilen semi-nested PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 430 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) 5 °C’de 24 saat, 3) 50 °C’de 30 dakika, 4) 55 °C’de 15 dakika, 5) 60 °C’de 3 dakika, 6) Pozitif kontrol, 7) Negatif kontrol, 8) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.



Şekil 4.17: Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) 5 °C’de 24 saat, 3) 50 °C’de 30 dakika, 4) 55 °C’de 15 dakika, 5) 60 °C’de 3 dakika, 6) Pozitif kontrol, 7) Negatif kontrol, 8) 100 bp marker.

A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.

4.3.1. Farklı pH Uygulamalarına Maruz Bırakılan *L. pneumophila* Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti

Çalışmada, 10^8 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilmiş su örnekleri farklı pH uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Süre sonunda, pH’ın *L. pneumophila* bakterileri üzerindeki etkisi nötralize edilmiştir. Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılmış su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

4.3.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları

Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları Tablo 4.7 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

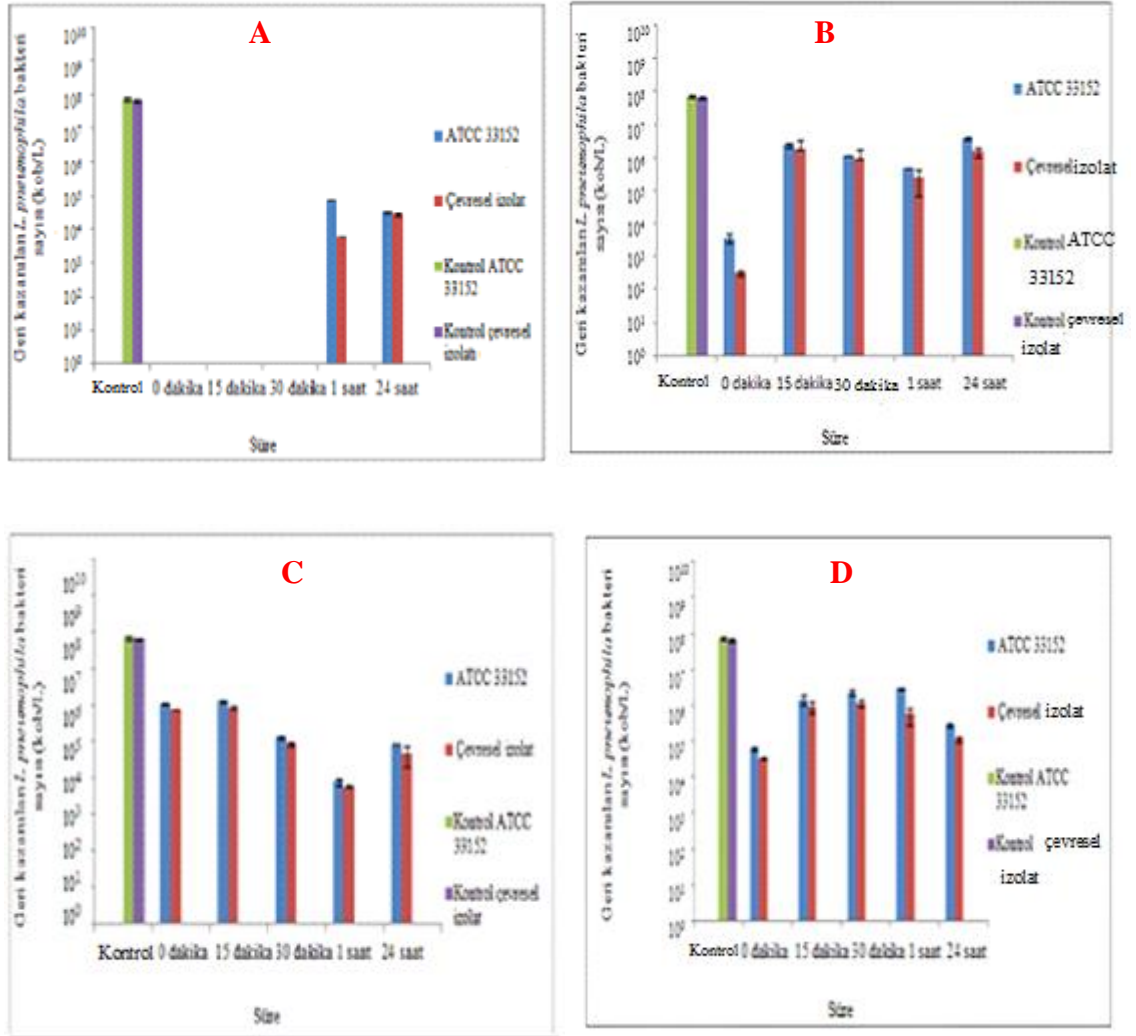
pH 2.2'e maruz bırakılan örneklerde, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranının diğer pH uygulamalarına göre düşük olduğu tespit edilmiştir. pH 2.2'e, 0, 15 ve 30 dakika maruz bırakılmış su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının yapılamadığı belirlenmiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.18).

Farklı pH değerlerine (2.2, 5.8, 7.0 ve 8.2) maruz bırakılmış *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilmiş su örneklerinden *L. pneumophila*'nın geri kazanım oranları incelendiğinde, en yüksek geri kazanımı sağlayan pH ve sürenin *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisinde pH 8.2'de 1 saat (%4), çevresel *L. pneumophila* izolatında pH 5.8'de 15 dakika (%2.6) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.7).

Farklı sürelerde, farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları kültür yöntemi ile değerlendirildiğinde, pH değerleri arasında, geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0.05$).

Tablo 4.7: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Uygulama	Süre	Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} kob/L) \pm SS		Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri yüzdesi (%)	
		ATCC 33152	Çevresel izolat	ATCC 33152	Çevresel izolat
pH 2.2	0. dakika	0	0	%0	%0
	15 dakika	0	0	%0	%0
	30 dakika	0	0	%0	%0
	1 saat	4.8 \pm 0.003	3.77 \pm 0.002	%0.09	%0.008
	24 saat	4.5 \pm 0.04	4.44 \pm 0.04	%0.04	%0.04
pH 5.8	0. dakika	3.5 \pm 0.14	2.49 \pm 0.05	%0.005	%0.004
	15 dakika	6.3 \pm 0.07	6.23 \pm 0.08	%3.3	%2.6
	30 dakika	6.06 \pm 0.01	5.96 \pm 0.02	%1.5	%1.4
	1 saat	5.6 \pm 0.008	5.34 \pm 0.35	%0.6	%0.4
	24 saat	6.5 \pm 0.50	6.17 \pm 0.12	%5	%2.3
pH 7.0	0. dakika	6.05 \pm 0.01	5.89 \pm 0.005	%1.5	%1.1
	15 dakika	6.1 \pm 0.01	5.94 \pm 0.04	%1.7	%1.3
	30 dakika	5.1 \pm 0.05	4.96 \pm 0.004	%1.7	%0.1
	1 saat	3.9 \pm 0.10	3.76 \pm 0.02	%0.2	%0.008
	24 saat	4.9 \pm 0.004	4.67 \pm 0.27	%0.1	%0.07
pH 8.2	0. dakika	4.7 \pm 0.03	4.51 \pm 0.02	%0.08	%0.05
	15 dakika	6.1 \pm 0.12	5.96 \pm 0.17	%2	%1.4
	30 dakika	6.3 \pm 0.06	6.06 \pm 0.08	%3	%1.7
	1 saat	6.4 \pm 0.03	5.73 \pm 0.23	%4	%0.8
	24 saat	5.4 \pm 0.04	5.05 \pm 0.07	%0.3	%0.16
Kontrol	-	7.8 \pm 0.04	6.8 \pm 0.04		



Şekil 4.18: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları. A) pH 2.2, B) pH 5.8, C) pH 7.0, D) pH 8.2.

4.3.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları

Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan 10⁸ h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları Tablo 4.8 ve Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

Farklı pH değerlerine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilmiş su örneklerinden FISH yöntemine göre *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları karşılaştırıldığında, en yüksek geri kazanımın *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisinde % 94 ve çevresel *L. pneumophila* izolatında % 100’lük geri kazanım

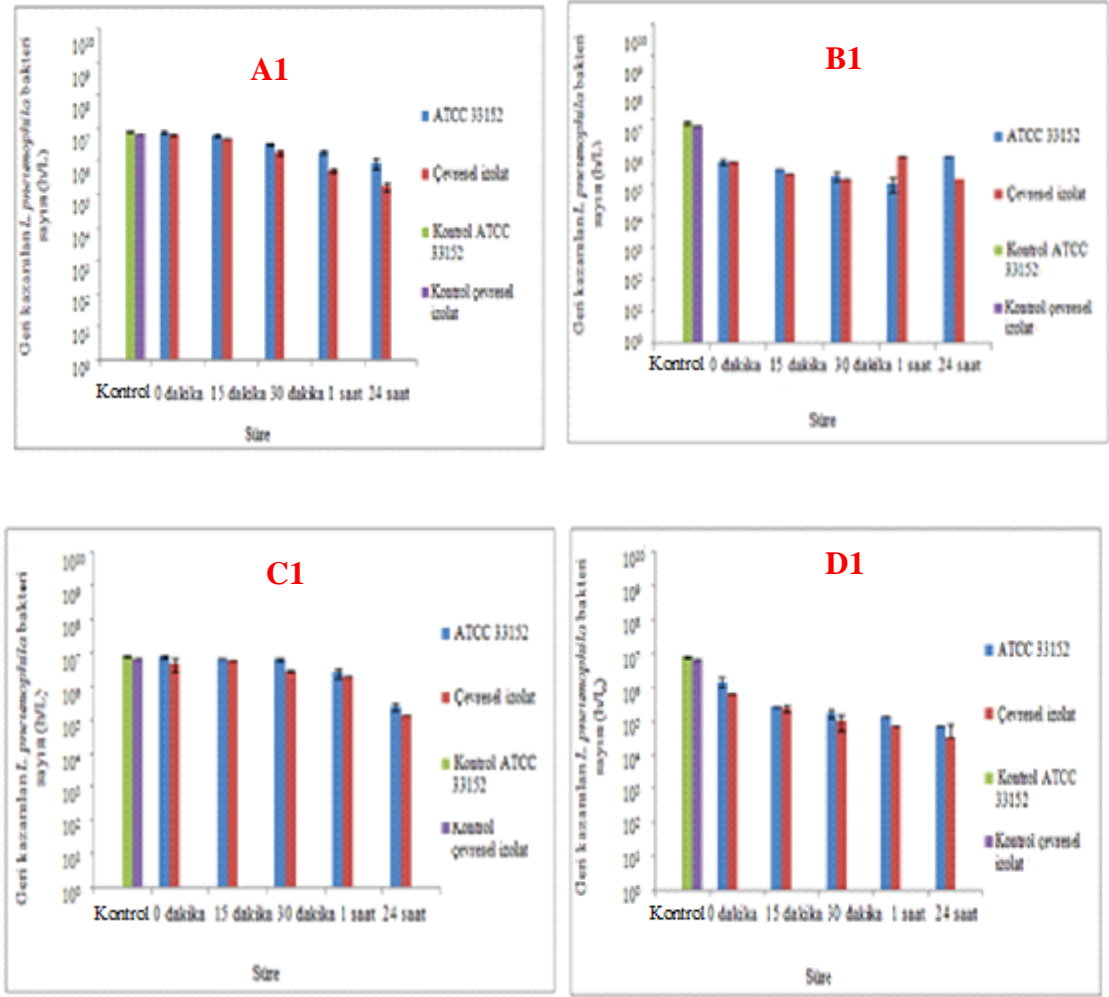
oranıyla pH 2.2’de 0 dakika, en düşük geri kazanım oranının ise *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisinde % 0.8 ve çevresel *L. pneumophila* izolatında % 0.5’lik geri kazanım oranıyla pH 8.2’de 24 saat olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

pH 2.2’e 0, 15 ve 30 dakika maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden standart *L. pneumophila* ATCC 33152 ve çevresel *L. pneumophila* bakteri sayılarının kültür yönteminde elde edilen sonucun aksine kontrole yakın değerler gösterdiği saptanmıştır. pH 7’e 0, 15, 30 dakika ve 1 saat maruz bırakılan örneklerde, FISH analizlerinde *L. pneumophila* ATCC 33152 ve çevresel *L. pneumophila* bakteri sayılarının kontrole yakın değerlerde olduğu, 24 saat maruz bırakılan örneklerde ise kontrole göre yaklaşık 1-2 log azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.8).

Farklı pH değerlerine maruz bırakılan örneklerde, FISH yöntemi ile incelenen her iki *L. pneumophila* bakterisi arasında geri kazanım açısından anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0.05$). Uygulanan pH değerleri (2.2, 5.8, 7.0 ve 8.2) ve süreler (0, 15, 30 dakika ve 1, 24 saat) arasında, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olduğu ($p \leq 0.05$), pH 2.2 ve pH 7.0 arasında ise geri kazanım açısından anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$) tespit edilmiştir.

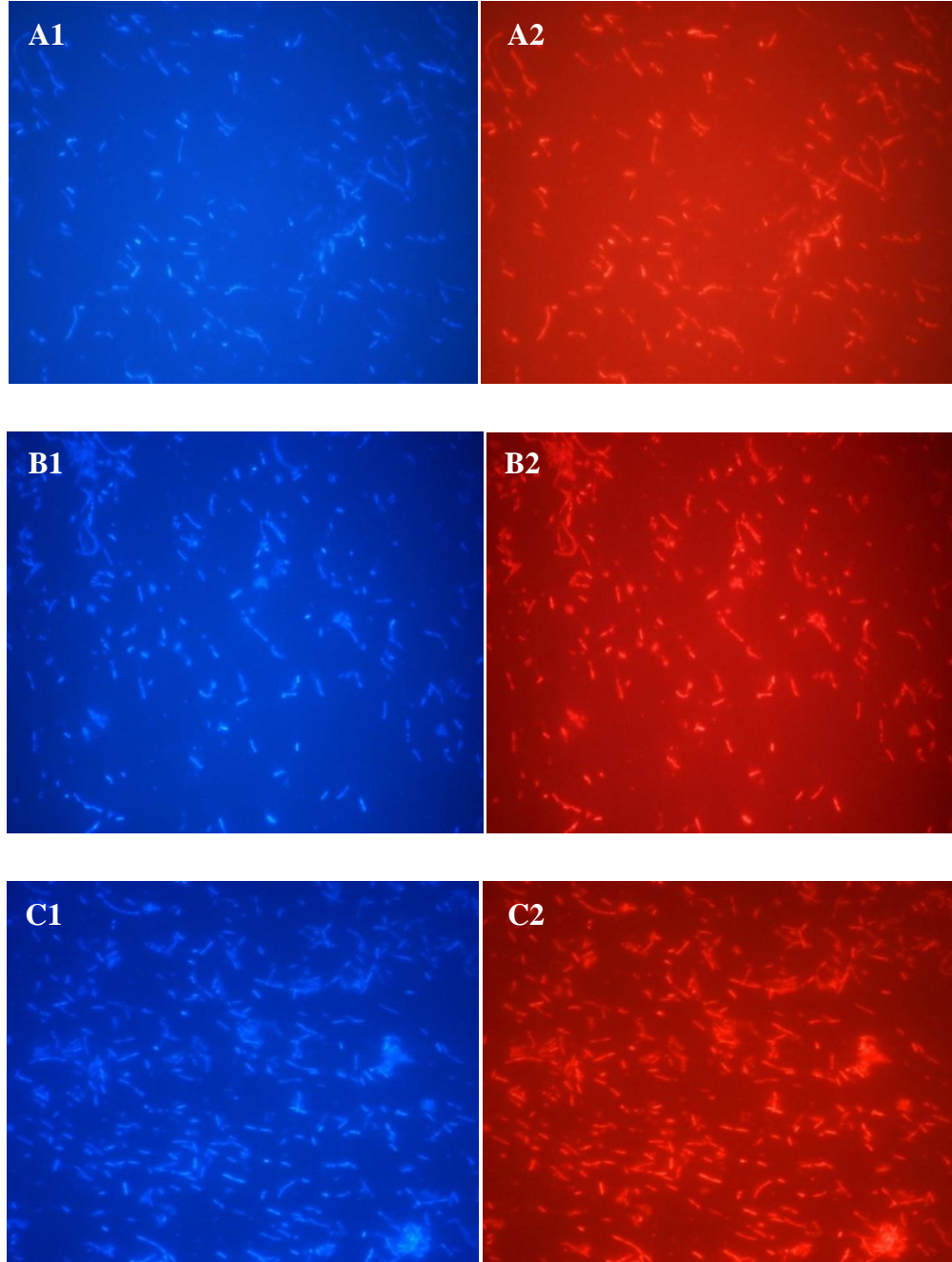
Tablo 4.8: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Uygulama	Süre	Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} h/L) \pm SS		Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri yüzdesi (%)	
		ATCC 33152	Çevresel izolat	ATCC 33152	Çevresel izolat
pH 2.2	0. dakika	6.87 \pm 0.04	6.82 \pm 0.03	%94	%100
	15 dakika	6.79 \pm 0.04	6.69 \pm 0	%79	%74.4
	30 dakika	6.54 \pm 0.02	6.27 \pm 0.06	%44	%28.7
	1 saat	6.29 \pm 0.04	5.71 \pm 0.04	%24.5	%8
	24 saat	5.94 \pm 0.14	5.23 \pm 0.12	%11.3	%2.6
pH 5.8	0. dakika	5.68 \pm 0.08	5.69 \pm 0	%6	%7.4
	15 dakika	5.44 \pm 0	5.32 \pm 0	%3.5	%3.2
	30 dakika	5.23 \pm 0.12	5.14 \pm 0	%2.2	%2.1
	1 saat	4.99 \pm 0.21	5.84 \pm 0	%1.3	%10.6
	24 saat	5.84 \pm 0	5.14 \pm 0	%8.7	%2.1
pH 7.0	0. dakika	6.87 \pm 0.02	6.64 \pm 0.178	%93.5	%70
	15 dakika	6.84 \pm 0	6.77 \pm 0	%87.3	%91.4
	30 dakika	6.80 \pm 0.04	6.45 \pm 0.02	%80.3	%43
	1 saat	6.42 \pm 0.14	6.32 \pm 0	%34	%32
	24 saat	5.38 \pm 0.08	5.14 \pm 0	%30.5	%2.1
pH 8.2	0. dakika	6.15 \pm 0.14	5.84 \pm 0	%18.3	%10.6
	15 dakika	5.44 \pm 0	5.38 \pm 0.08	%3.5	%3.8
	30 dakika	5.23 \pm 0.12	4.99 \pm 0.21	%2.2	%1.6
	1 saat	5.14 \pm 0	4.84 \pm 0	%1.7	%1
	24 saat	4.84 \pm 0	2.42 \pm 3.42	%0.8	%0.5
Kontrol	-	6.90 \pm 0.02	6.81 \pm 0.02		

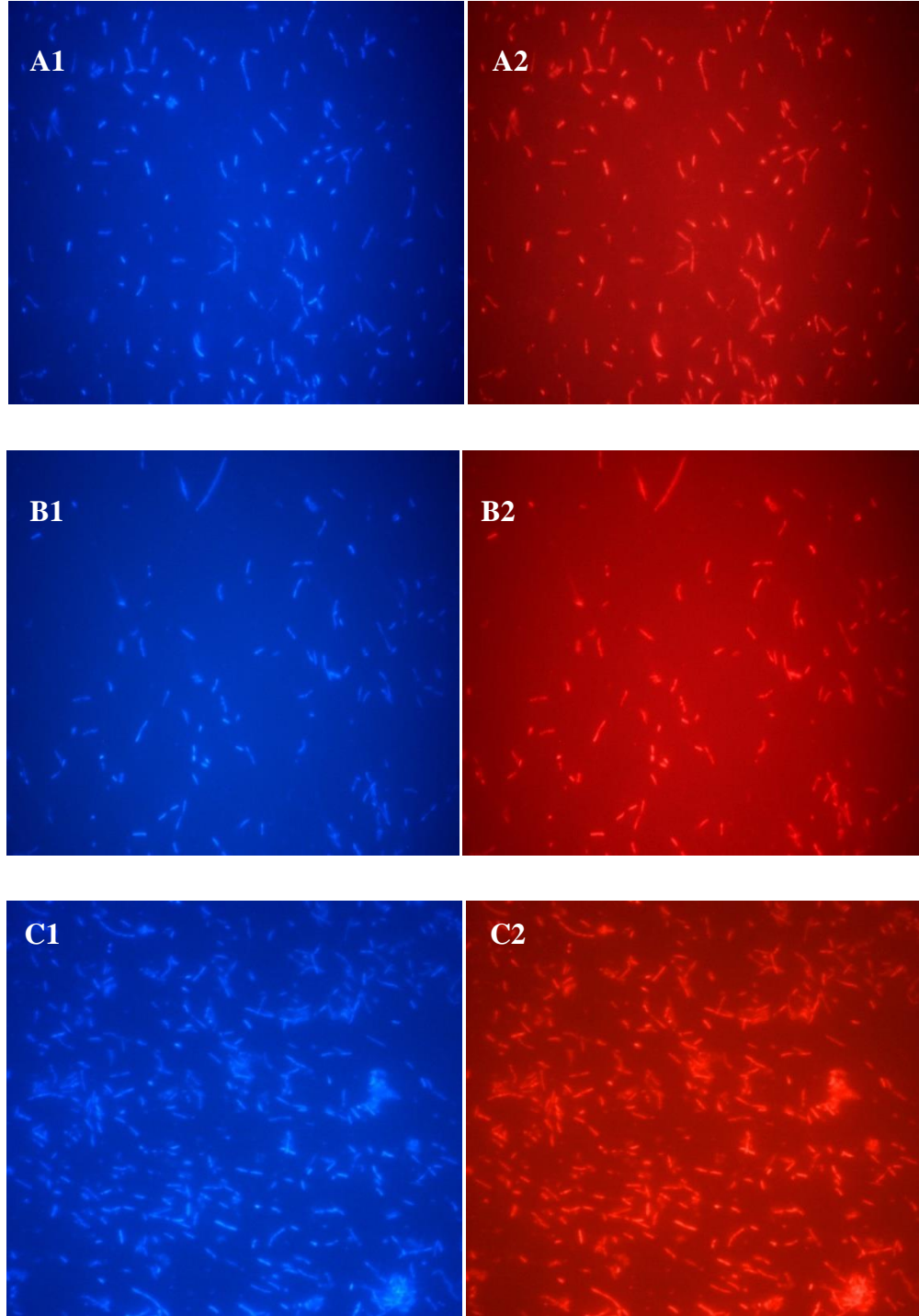


Şekil 4.19: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerine ait su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları. A: pH 2.2, B: pH 5.8, C: 7.0, D: 8.2.

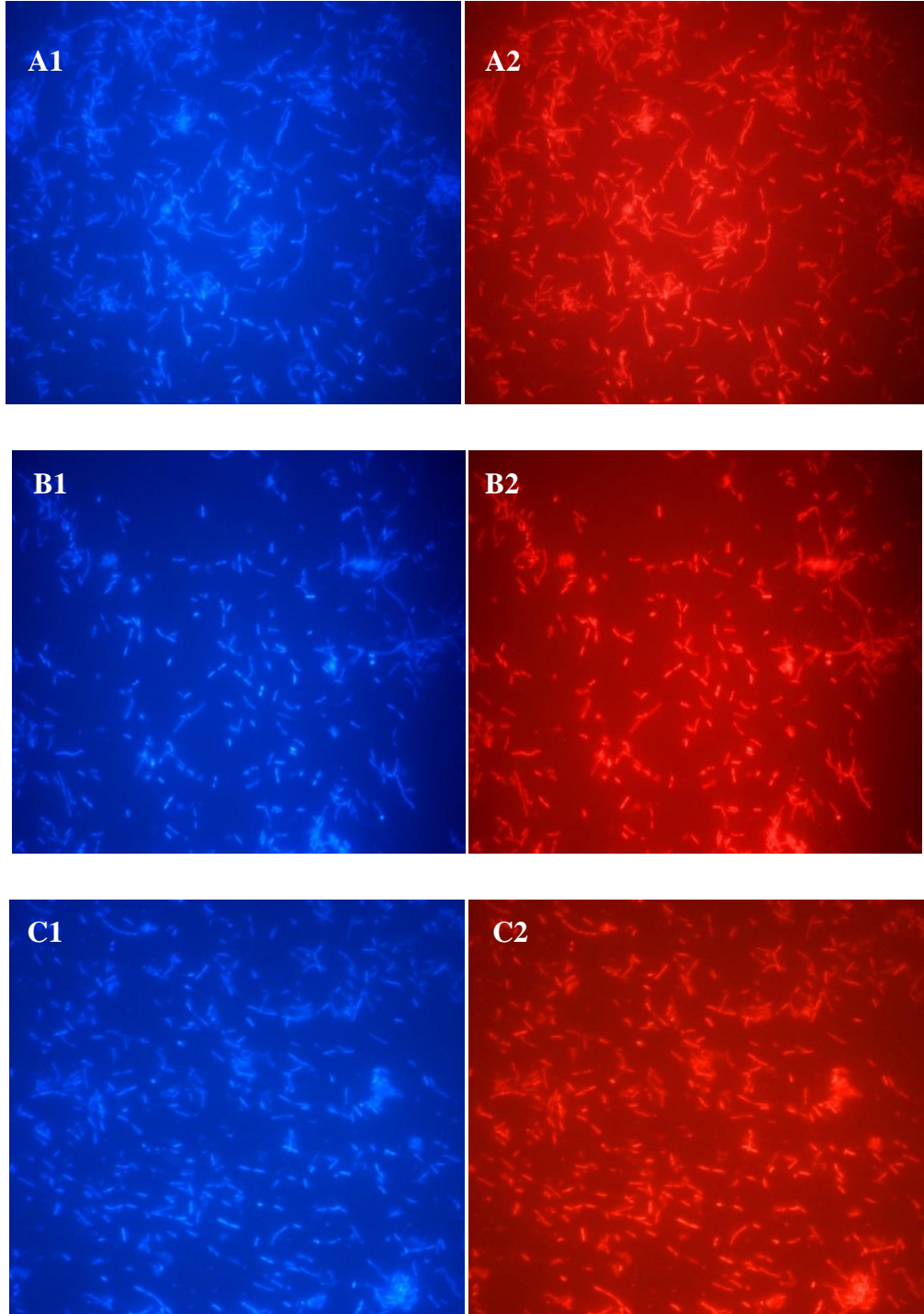
Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerinin epifloresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.20-4.27’de verilmiştir.



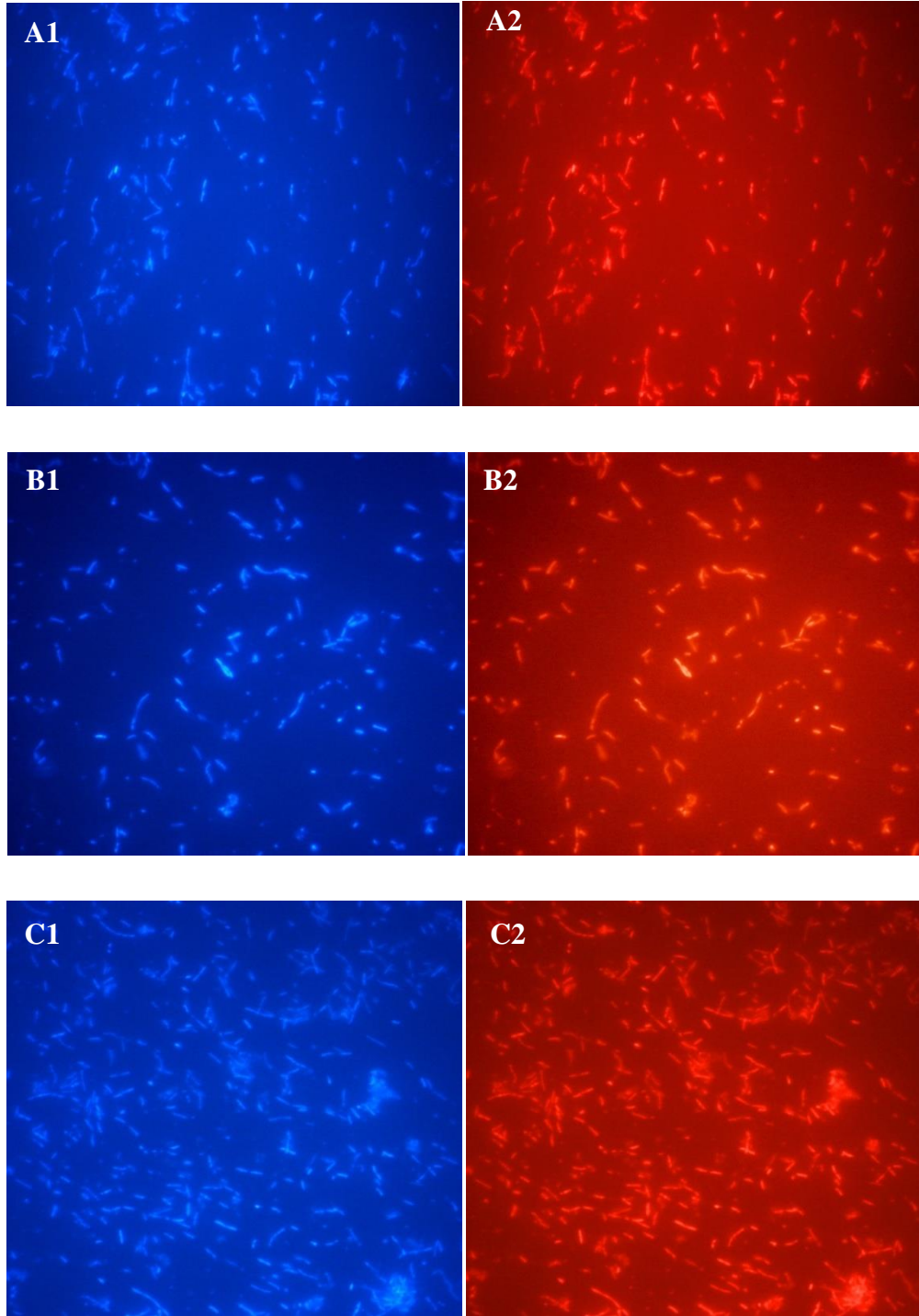
Şekil 4.20: Farklı sürelerde pH 2.2'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol.
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



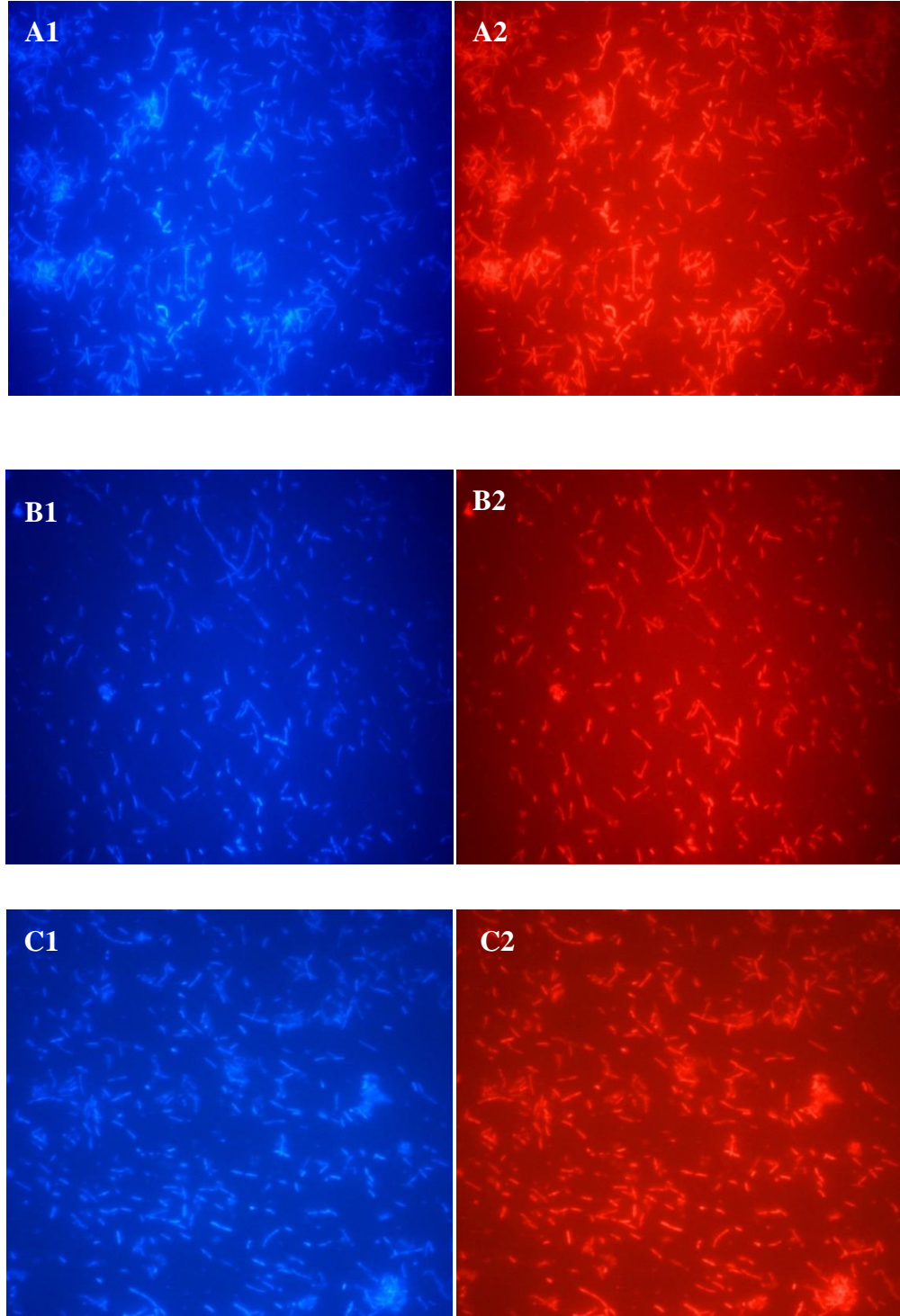
Şekil 4.21: Farklı sürelerde pH 5.8'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 24 saat, B) 1 saat, C) Pozitif kontrol.
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



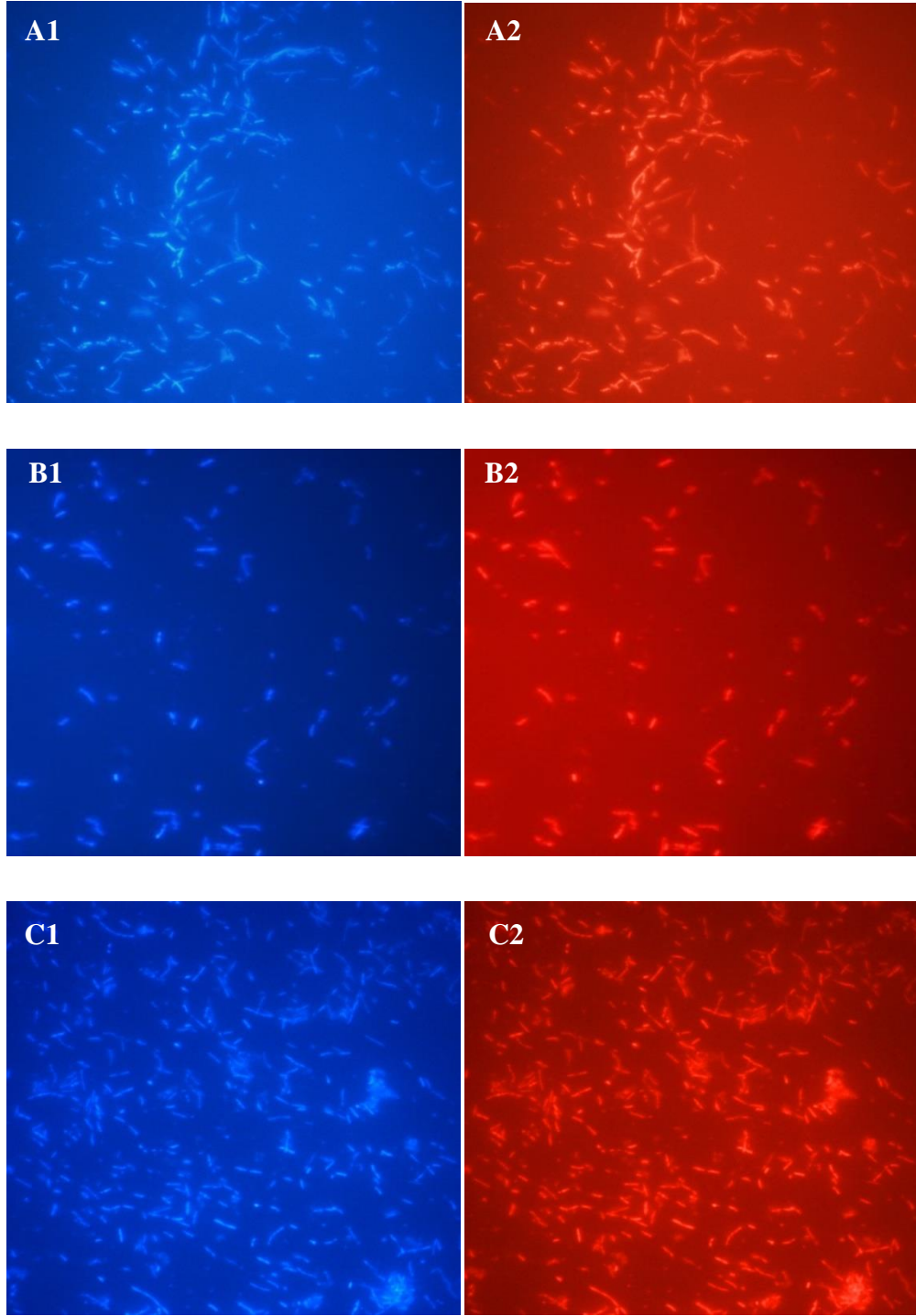
Şekil 4.22: Farklı sürelerde pH 7.0'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol.
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



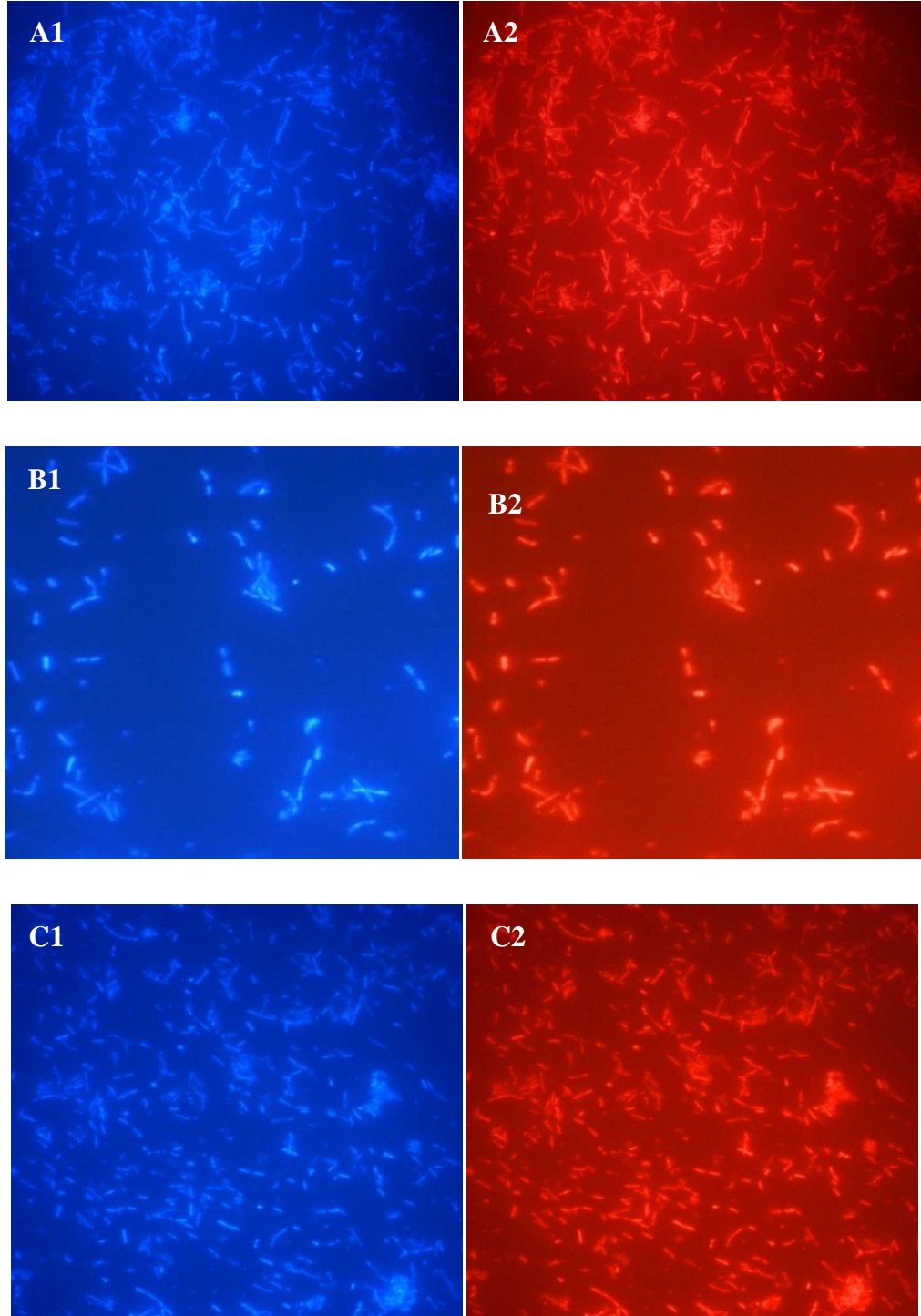
Şekil 4.23: Farklı sürelerde pH 8.2'e maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol.
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



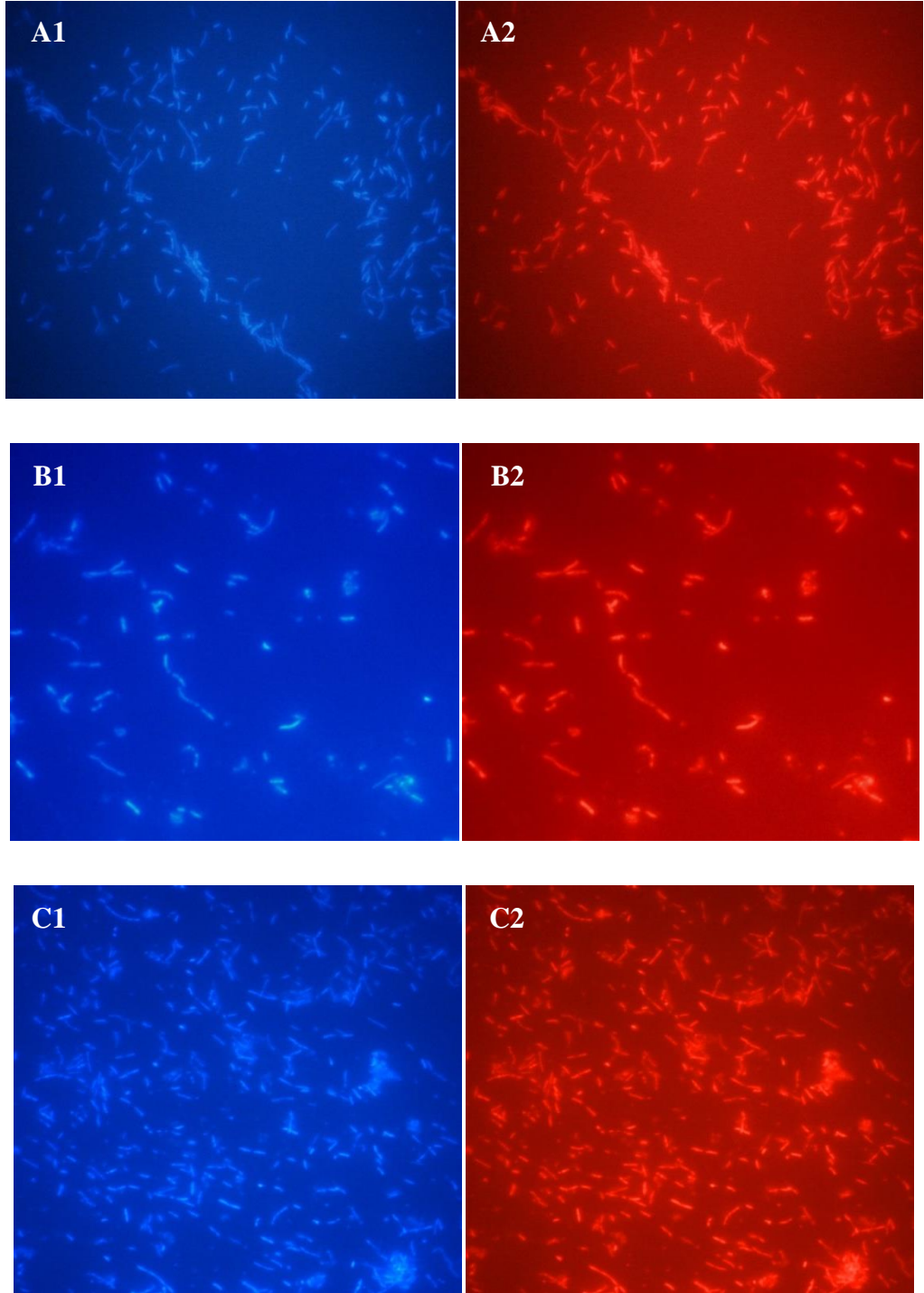
Şekil 4.24: Farklı sürelerde pH 2.2'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



Şekil 4.25: Farklı sürelerde pH 5.8'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 24 saat, B) 1 saat, C) Pozitif kontrol.
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



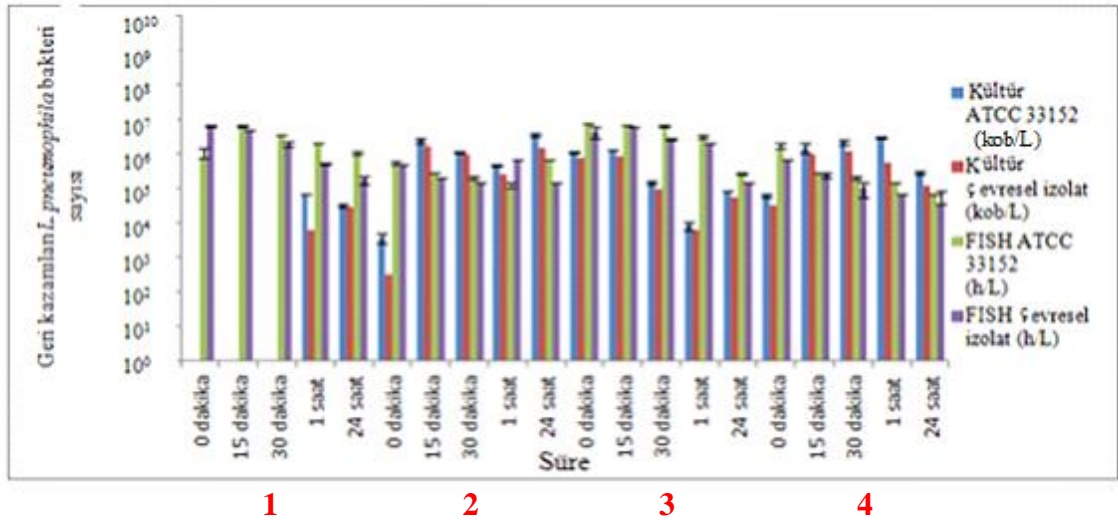
Şekil 4.26: Farklı sürelerde pH 7.0'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol.
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



Şekil 4.27: Farklı sürelerde pH 8.2'e maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. dakika, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol.
1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.

4.3.1.3. Farklı pH Uygulamalarına Maruz Bırakılan *L. pneumophila* Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Kültür ve FISH Yöntemine Göre Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırılması

Farklı sürelerde, farklı pH değerlerine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila*'nın geri kazanım oranları kültür ve FISH yöntemine göre karşılaştırıldığında, geri kazanım sonuçlarının pH değerlerine göre farklılık gösterdiği, FISH yöntemi ile, genel olarak kültür yöntemine göre daha yüksek oranda geri kazanım sağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca pH 2.2'e 0, 15 ve 30 dakika maruz bırakılan örneklerde, kültür yöntemi ile *L. pneumophila* bakterileri tespit edilemezken, FISH yöntemi ile pH 2.2 ile 0, 15 ve 30 dakikada en yüksek geri kazanımın gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.28).

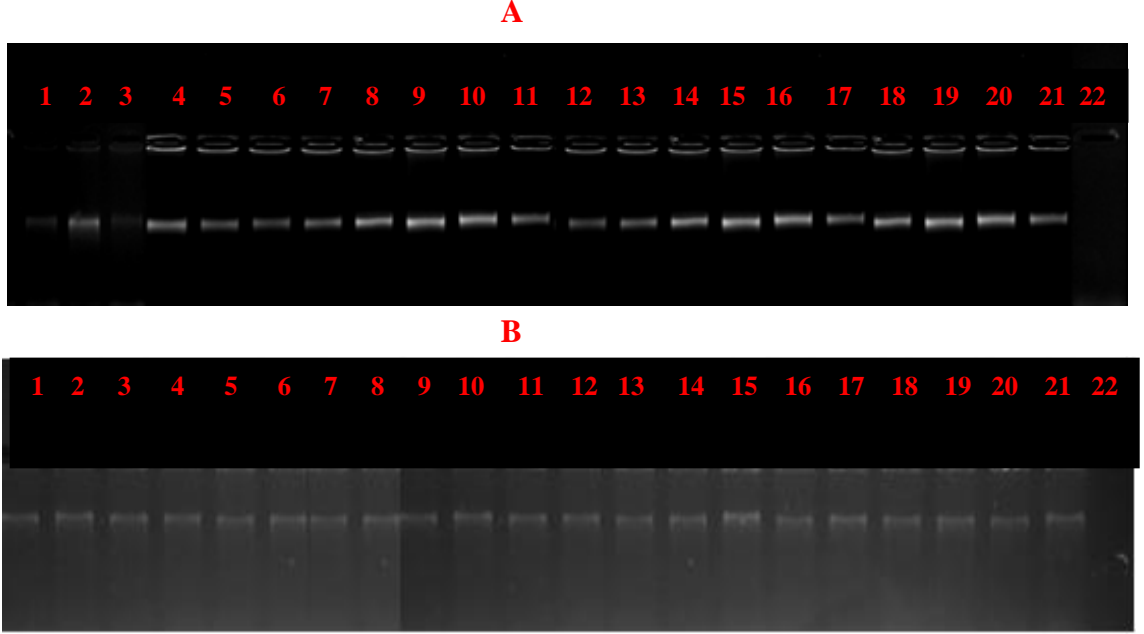


Şekil 4.28: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları. 1) pH 2.2, 2) pH 5.8, 3) pH 7.0, 4) pH 8.2.

4.3.1.4. Semi-Nested PZR Sonuçları

Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan 10⁸ h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilen su örnekleri, filtrasyonla yoğunlaştırıldıktan sonra *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA'lar izole edilmiştir. Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan örneklerdeki *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüleri Şekil 4.29'da gösterilmiştir.

Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan bütün örneklerde *L. pneumophila* bakterilerinin DNA'larının izole edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüsü. pH 2.2; 1) 0. dakika, 2) 15 dakika, 3) 30 dakika, 4) 1 saat, 5) 24 saat. pH 5.8; 6) 0. dakika, 7) 15 dakika, 8) 30 dakika, 9) 1 saat, 10) 24 saat. pH 7.0; 11) 0. dakika, 12) 15 dakika, 13) 30 dakika, 14) 1 saat, 15) 24 saat. pH 8.2; 16) 0. dakika, 17) 15 dakika, 18) 30 dakika, 19) 1 saat, 20) 24 saat. 21) Pozitif kontrol, 22) Negatif kontrol. A: ATCC 33152 bakterisi, B: Çevresel izolat.

Farklı sürelerde, farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumları Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

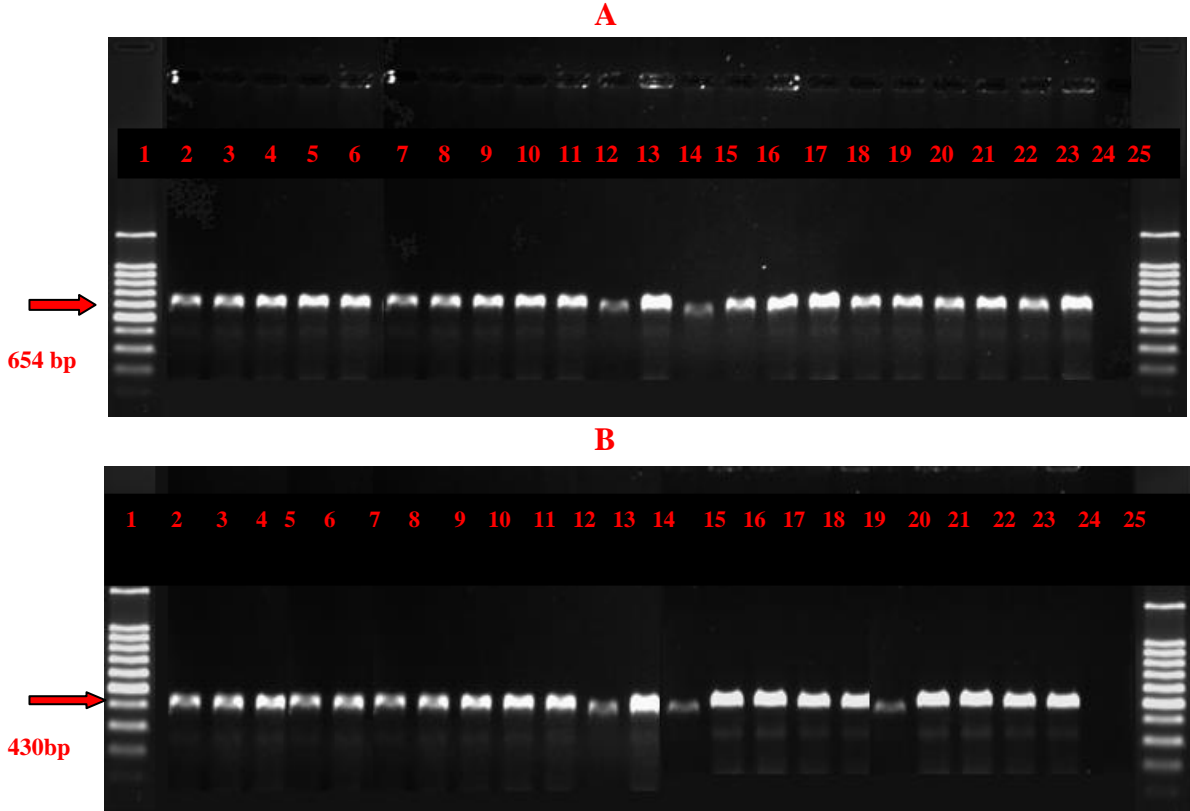
Tablo 4.9: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürünü oluşumu.

<i>L. pneumophila</i>	pH	Süre	İlk adım PZR ürünü	Semi-nested PZR ürünü
ATCC 33152 ve Çevresel izolat	2.2	0 dakika	+	+
		15 dakika	+	+
		30 dakika	+	+
		1 saat	+	+
		24 saat	+	+
	5.8	0 dakika	+	+
		15 dakika	+	+
		30 dakika	+	+
		1 saat	+	+
		24 saat	+	+
	7.0	0 dakika	+	+
		15 dakika	+	+
		30 dakika	+	+
		1 saat	+	+
		24 saat	+	+
	8.2	0 dakika	+	+
		15 dakika	+	+
		30 dakika	+	+
		1 saat	+	+
		24 saat	+	+

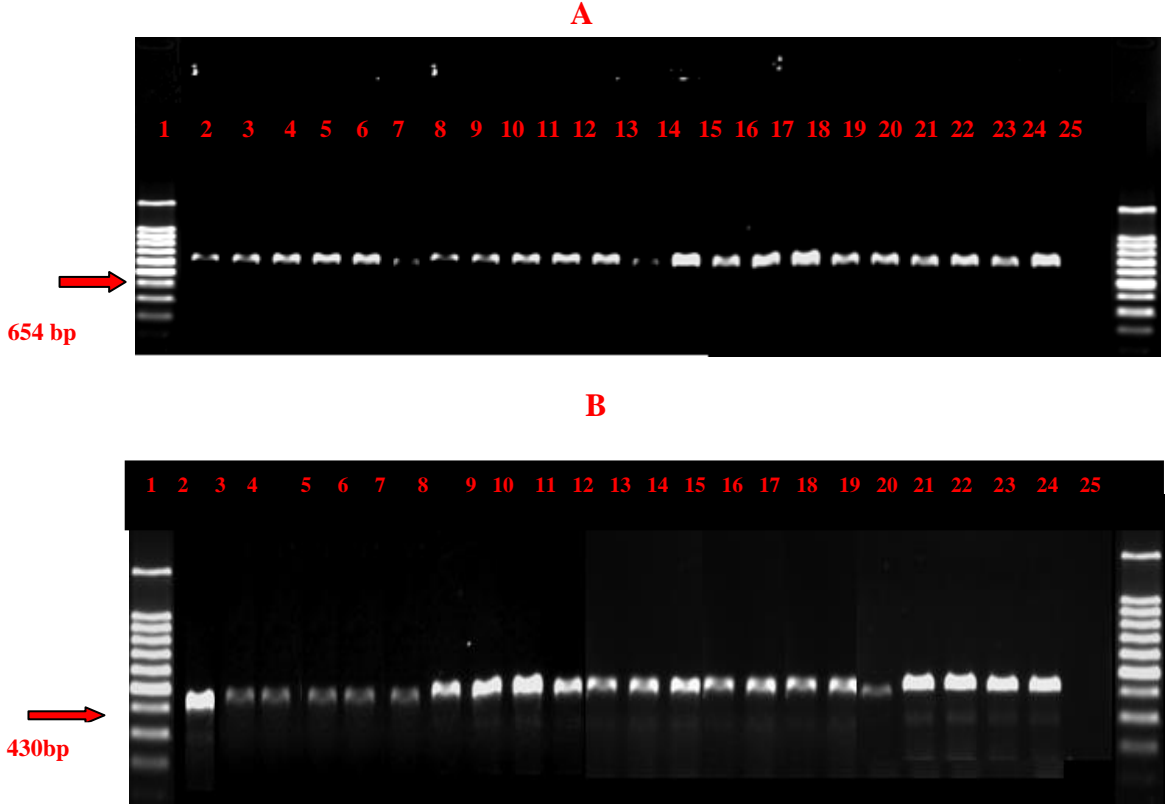
Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA'lar, LEG 225 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ilk adım PZR yöntemi yapılmıştır. Asit uygulamasına ait ilk adım PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de gösterilmiştir. İlk adım sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 654 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.

L. pneumophila bakterilerine ait ilk adım PZR ürünleri, LEG 448 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ikinci adım (semi-nested) PZR yöntemi yapılmıştır. Asit uygulamasına ait *L. pneumophila* ikinci adım PZR ürünleri, agaroz jel

elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de gösterilmiştir. İkinci adım sonucunda elde edilen semi-nested PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 430 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.30: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2)Pozitif kontrol. pH 2.2; 3) 0. dakika, 4) 15 dakika, 5) 30 dakika, 6) 1 saat, 7) 24 saat. pH 5.8; 8) 0. dakika, 9) 15 dakika, 10) 30 dakika, 11) 1 saat, 12) 24 saat. pH 7.0; 13) 0. dakika, 14) 15 dakika, 15) 30 dakika, 16) 1 saat, 17) 24 saat. pH 8.2; 18) 0. dakika, 19) 15 dakika, 20) 30 dakika, 21) 1 saat, 22) 24 saat. 23) Pozitif kontrol. 24) Negatif kontrol. 25) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.



Şekil 4.31: Farklı pH uygulamalarına maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatı ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker. 2)Pozitif kontrol. pH 2.2; 3) 0. dakika, 4) 15 dakika, 5) 30 dakika, 6) 1 saat, 7) 24 saat. pH 5.8; 8) 0. dakika, 9) 15 dakika, 10) 30 dakika, 11) 1 saat, 12) 24 saat. pH 7.0; 13) 0. dakika, 14) 15 dakika, 15) 30 dakika, 16) 1 saat, 17) 24 saat. pH 8.2; 18) 0. dakika, 19) 15 dakika, 20) 30 dakika, 21) 1 saat, 22) 24 saat. 23) Pozitif kontrol. 24) Negatif kontrol, 25) 100 bp marker, A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.

4.4.1. Farklı Konsantrasyon ve Sürelerde Biyosite Maruz Bırakılan *L. pneumophila* Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanım Oranlarının Farklı Yöntemler Kullanılarak Tespiti

Çalışmada, 10^8 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilen su örnekleri farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde okside edici bir biyosit olan Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılmıştır.

Süre sonunda, farklı konsantrasyonlardaki Huwa-San TR-50'e maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

4.4.1.1. Kültür Yöntemi Sonuçları

Farklı konsantrasyonlardaki Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile yapay olarak kontamine edilmiş su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları Tablo 4.10 ve Şekil 4.32’de gösterilmiştir.

100 ppm ve 200 ppm konsantrasyonda Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine örneklerde, her iki bakteri için kültür yöntemi ile geri kazanım oranının çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Süreye bağlı olarak en yüksek geri kazanım oranı, her iki konsantrasyon için, 0. saat olarak belirlenmiştir. 24 saat Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan örneklerde *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.10).

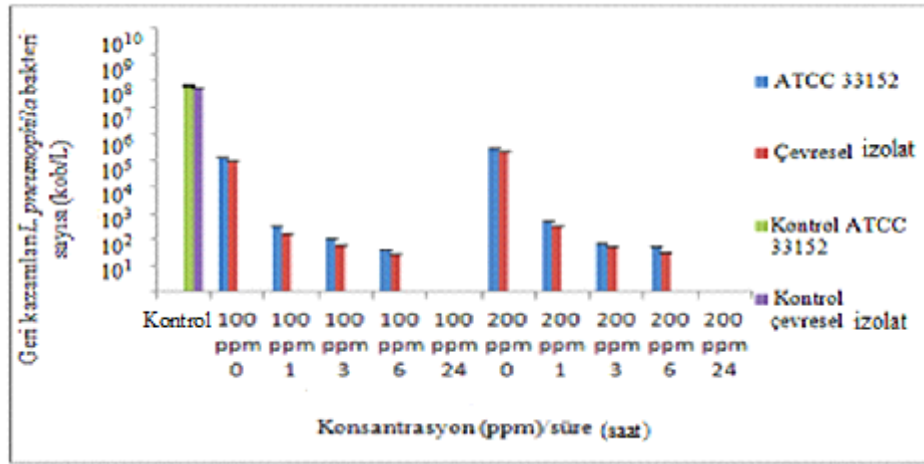
Farklı sürelerde farklı Huwa-San TR 50 biyosit konsantrasyonuna maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilmiş su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre en yüksek geri kazanımı sağlayan biyosit konsantrasyonu ve süre için, *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisinde % 0.41, çevresel *L. pneumophila* izolatında % 0.4 geri kazanım oranıyla 200 ppm dozunda 0. saat olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10).

Farklı sürelerde, farklı konsantrasyonlardaki biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanımları karşılaştırıldığında, her iki bakteri için en yüksek geri kazanımın 100 ppm ve 200 ppm biyosit konsantrasyonu için 0. saat olduğu tespit edilmiştir. 100 ppm ve 200 ppm konsantrasyonlardaki biyosite 24 saat maruz bırakılan örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı yapılamamıştır (Tablo 4.10, Şekil 4.32).

Biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları değerlendirildiğinde, farklı konsantrasyon ve sürelerde Huwa-San TR 50 biyosit değerleri arasında geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0.05$).

Tablo 4.10: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Konsantrasyon (ppm)	Süre (saat)	Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} kob/L) \pm SS		Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri yüzdesi (%)	
		ATCC 33152	Çevresel izolat	ATCC 33152	Çevresel izolat
100	0	5.1 \pm 0.08	5.0 \pm 0.01	%0.18	%0.17
	1	2.5 \pm 0.08	2.2 \pm 0.03	%0.0004	%0.0003
	3	2.0 \pm 0.04	1.8 \pm 0.04	%0.0001	%0.0001
	6	1.6 \pm 0.07	1.4 \pm 0	%0.00006	%0.00004
	24	0	0	%0	%0
200	0	5.4 \pm 0.02	5.3 \pm 0.05	%0.41	%0.4
	1	2.7 \pm 0.04	2.5 \pm 0.07	%0.0007	%0.0005
	3	1.8 \pm 0.05	1.7 \pm 0.04	%0.0001	%0.00009
	6	1.7 \pm 0.04	1.4 \pm 0.06	%0.00008	%0.00005
	24	0	0	%0	%0
Kontrol	-	7.8 \pm 0.005	7.75 \pm 0.005		



Şekil 4.32: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

4.4.1.2. FISH Yöntemi Sonuçları

Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan 10⁸ h/L konsantrasyonundaki *L. pneumophila* ile kontamine örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları Tablo 4.11 ve Şekil 4.33'de

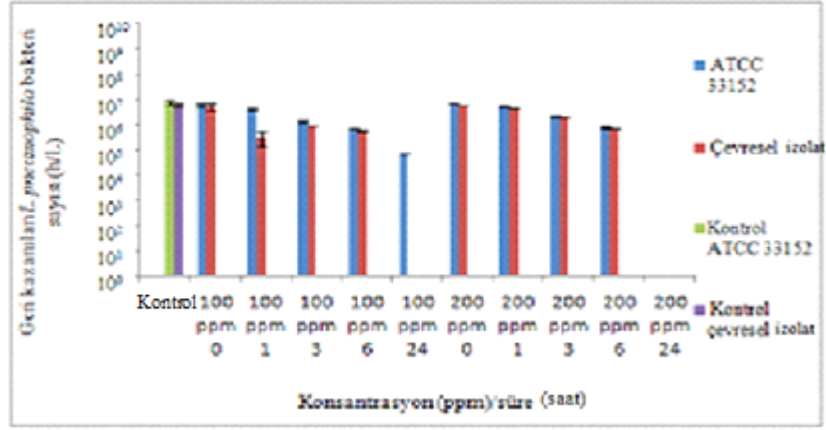
gösterilmiştir. 100 ppm ve 200 konsantrasyonlarında Huwa-San TR 50 biyositine 0, 1 ve 3 saat maruz bırakılan her iki *L. pneumophila* bakterisinin sayılarının kontrole yaklaşık değerler gösterdiği tespit edilmiştir. 200 ppm biyosit konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan örneklerden her iki *L. pneumophila* bakterisinin FISH yöntemi ile geri kazanım sağlanamadığı belirlenmiştir (Şekil 4.33).

Farklı sürelerde farklı biyosit konsantrasyonuna maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilmiş su örneklerinden en yüksek geri kazanımı sağlayan biyosit konsantrasyonu ve sürenin *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisinde % 91.5, çevresel *L. pneumophila* izolatında % 100 oranı ile 200 ppm'de 0. saat olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.11).

Biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları değerlendirildiğinde, farklı konsantrasyon ve süreler arasında geri kazanım oranları açısından anlamlı bir farkın olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.05$).

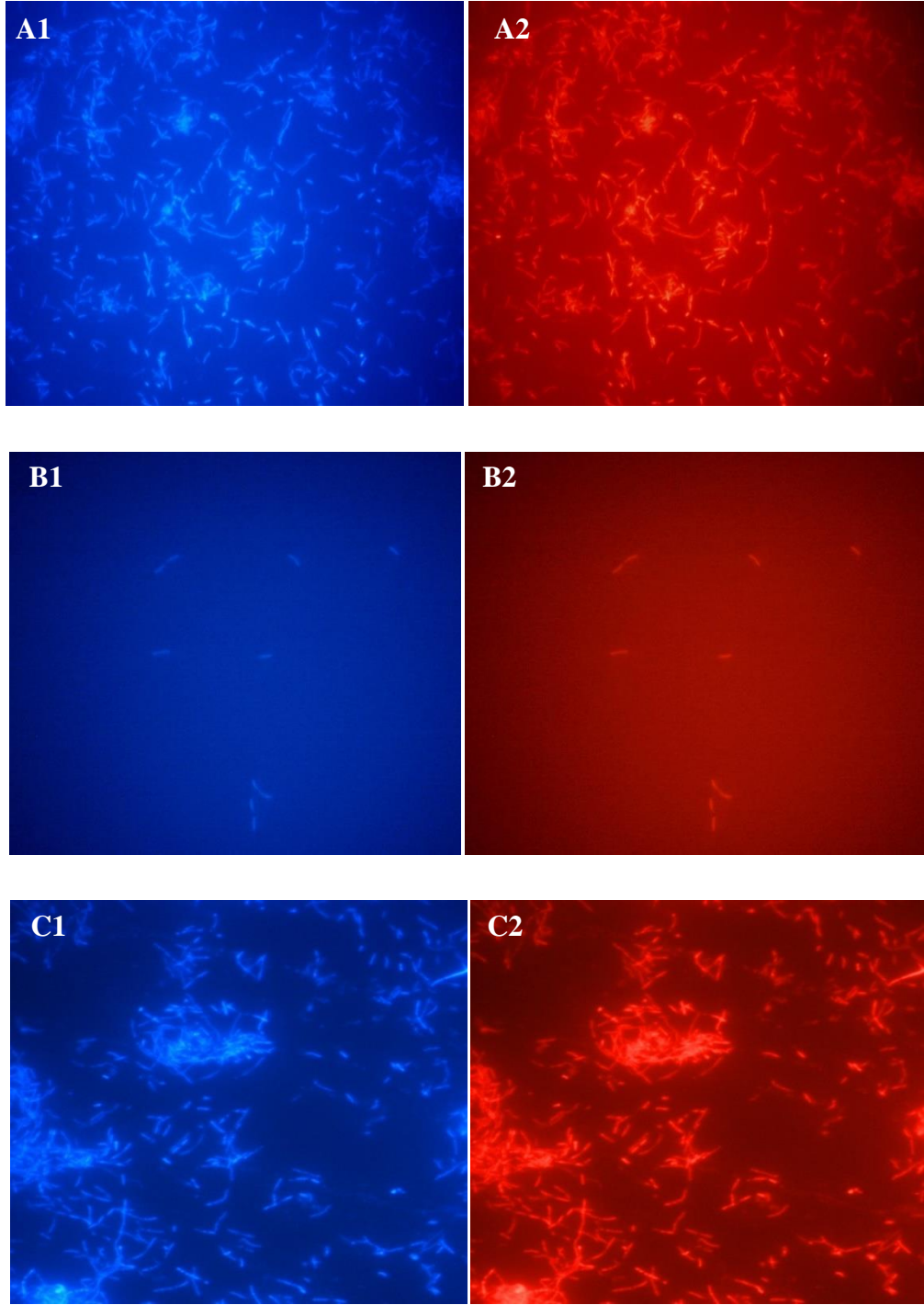
Tablo 4.11: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerine ait su örneklerinde *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

Konsantrasyon (ppm)	Süre (saat)	Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri sayısı (\log_{10} h/L) \pm SS		Geri kazanılan <i>L. pneumophila</i> bakteri yüzdesi (%)	
		ATCC 33152	Çevresel izolat	ATCC 33152	Çevresel izolat
100	0	6.78 \pm 0.08	6.73 \pm 0.06	%82.8	%82.5
	1	6.60 \pm 0.06	6.52 \pm 0.02	%54.2	%55
	3	6.34 \pm 0.03	6.32 \pm 0	%18.6	%16
	6	5.84 \pm 0	5.77 \pm 0.03	%9.3	%9.7
	24	4.84 \pm 0	0	%0.93	%0
	200	0	6.83 \pm 0	6.83 \pm 0	%91.5
200	1	6.72 \pm 0.03	6.64 \pm 0	%71	%72.6
	3	6.32 \pm 0	6.14 \pm 0.06	%30	%34.3
	6	5.99 \pm 0.04	5.88 \pm 0.05	%10	%10.8
	24	0	0	%0	%0
Kontrol	-	7.75 \pm 0.07	6.87 \pm 0.08		

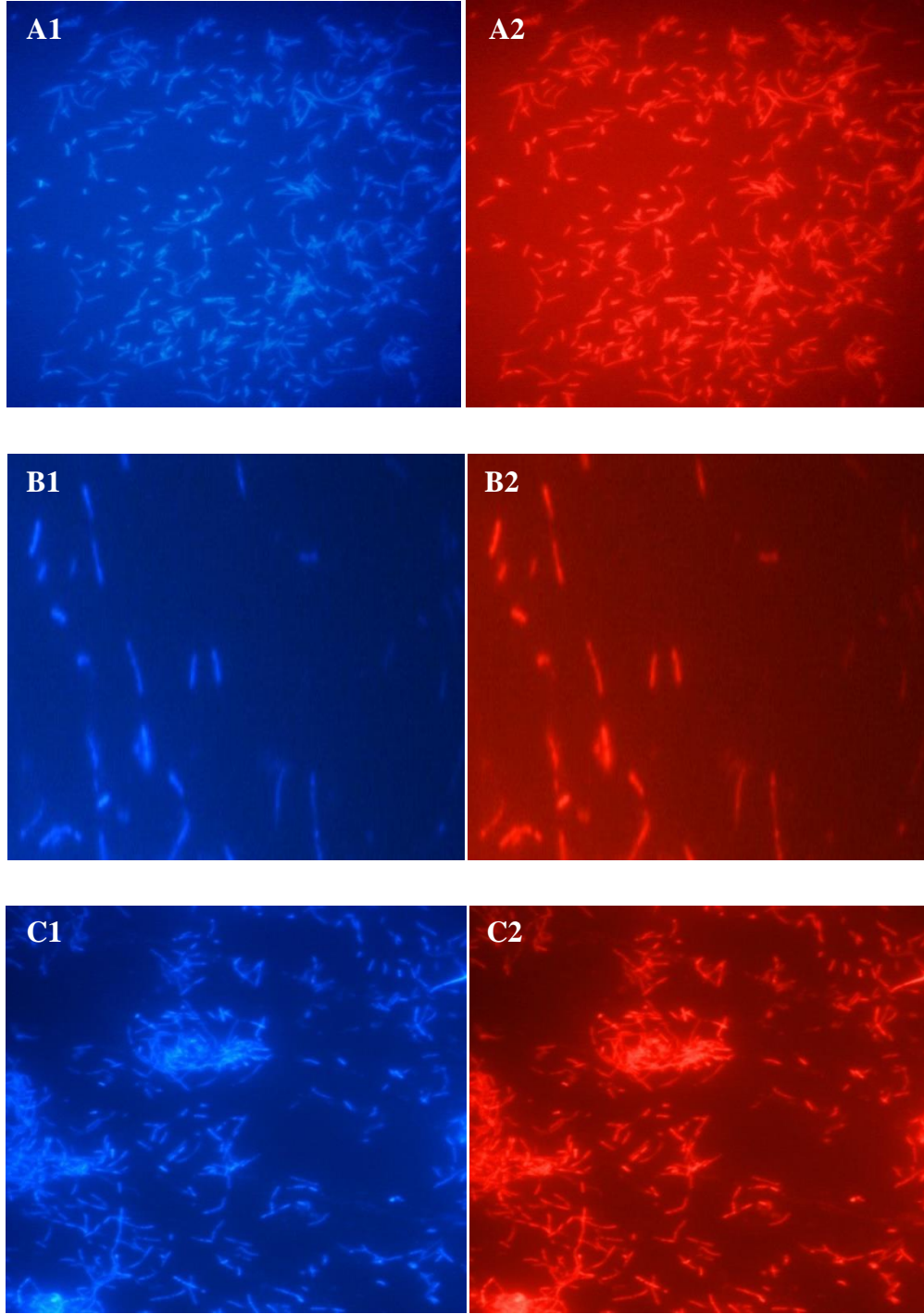


Şekil 4.33: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

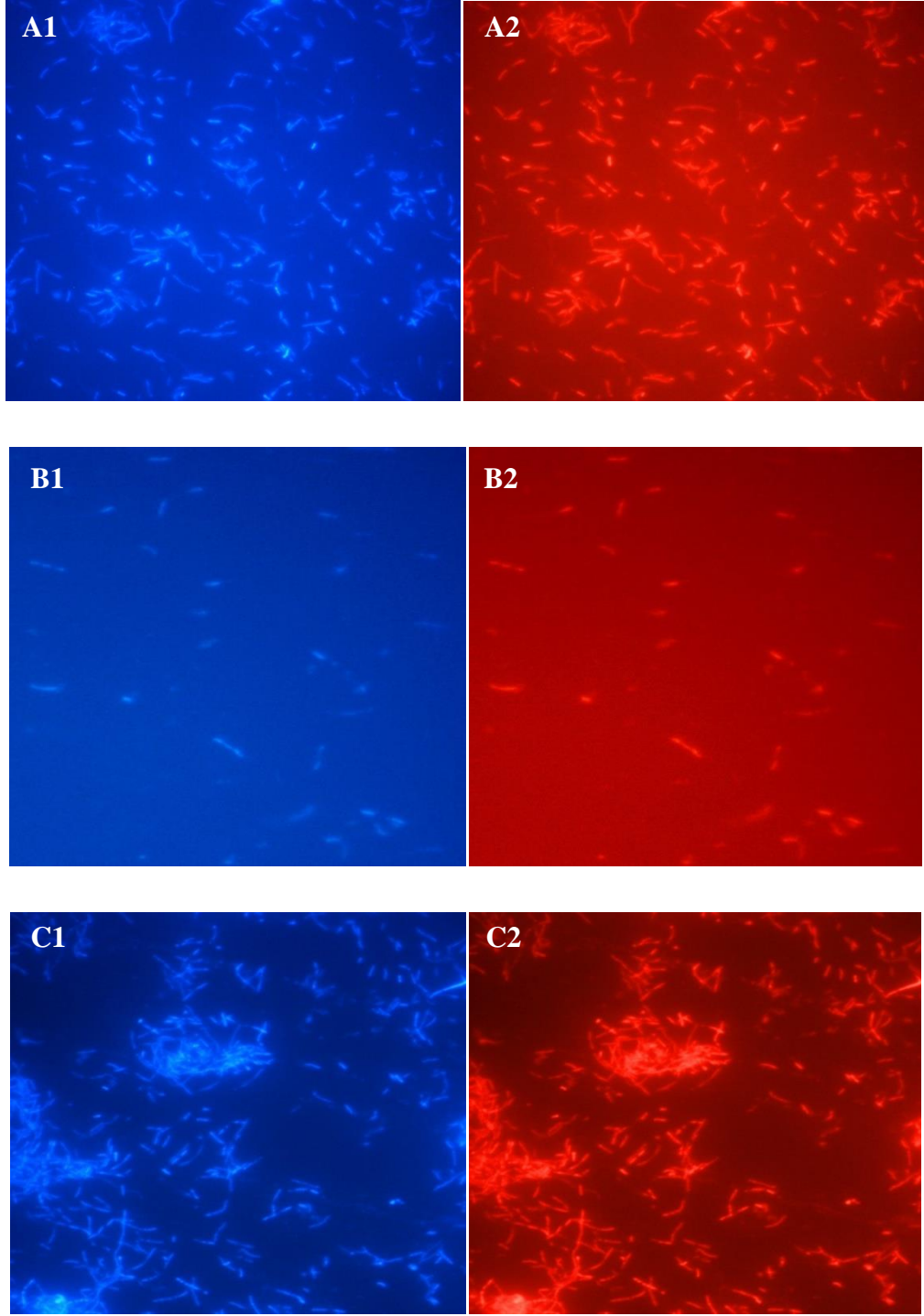
Farklı sürelerde farklı konsantrasyonlarda biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden geri kazanılan sonuçlarının *L. pneumophila* bakterilerinin epifloresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.34- Şekil 4.37’de gösterilmiştir.



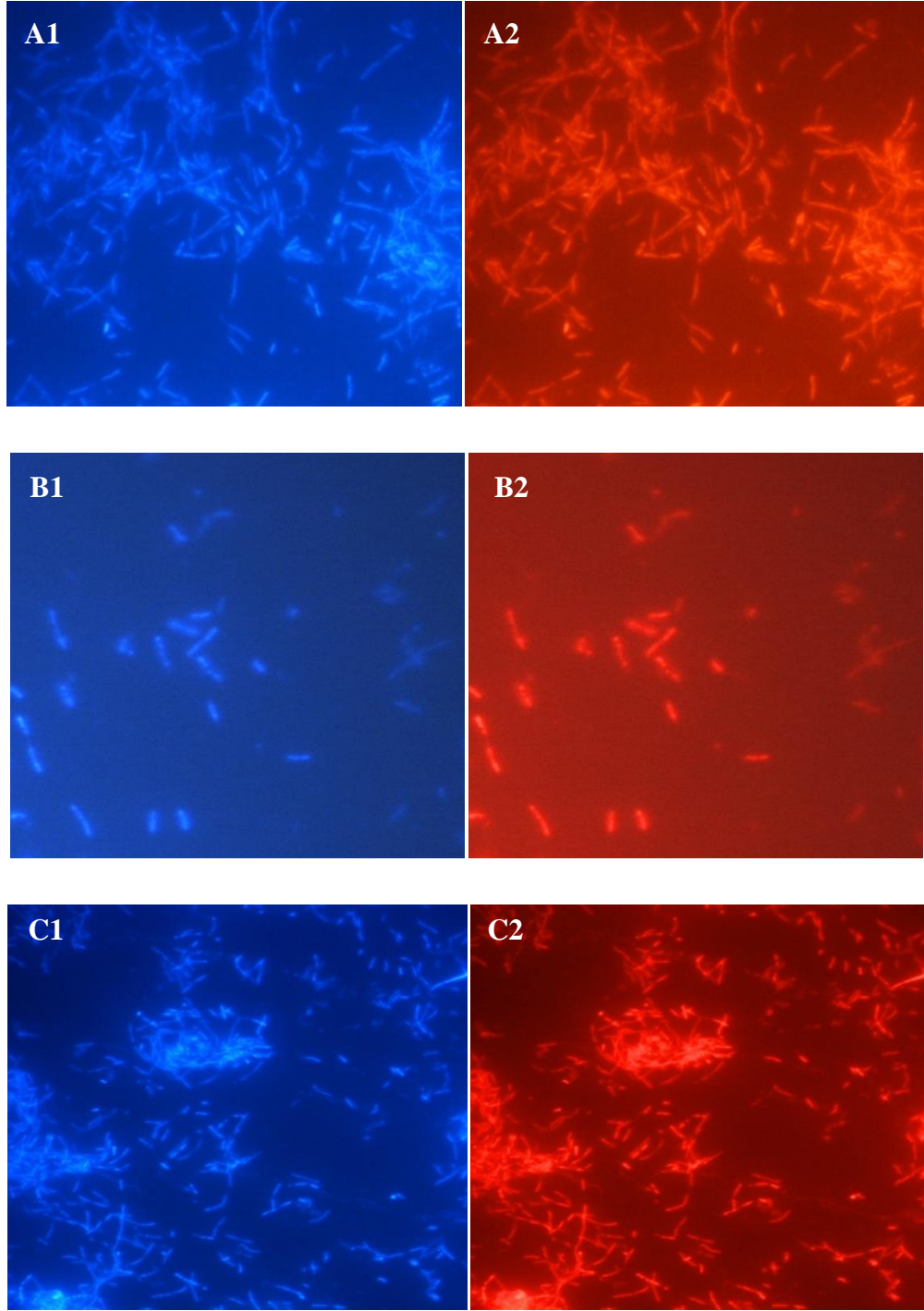
Şekil 4.34: 100 ppm konsantrasyondaki biyosite maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. saat, B) 24 saat, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



Şekil 4.35: 200 ppm konsantrasyondaki biyoite maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. saat, B) 6 saat, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



Şekil 4.36: 100 ppm konsantrasyondaki biyosite maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin sonuçlarının epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. saat, B) 6 saat, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.



Şekil 4.37: 200 ppm konsantrasyondaki biyosite maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterisinin epifloresan mikroskop görüntüsü. A) 0. saat, B) 6 saat, C) Pozitif kontrol. 1: DAPI boyama görüntüsü, 2: Cy3 işaretli Leg 705 probu ile boyama görüntüsü.

4.4.1.3. Farklı Konsantrasyon ve Sürelerde Biyosite Maruz Bırakılan *L. pneumophila* Bakterileri ile Kontamine Su Örneklerinden *L. pneumophila* Bakterilerinin Kültür ve FISH Yöntemine Göre Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırılması

Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları kültür ve FISH yöntemi sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranlarının kültür ve FISH yönteminde farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Huwa-San TR 50, 100 ppm ve 200 ppm konsantrasyonuna 0, 1, 3, 6 ve 24 saat maruz bırakılan örneklerdeki geri kazanım oranının, FISH yönteminde, kültür yöntemine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 200 ppm konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan her iki *L. pneumophila* bakterisinin kültür ve FISH yöntemi ile geri kazanımları yapılamamıştır (Şekil 4.38).



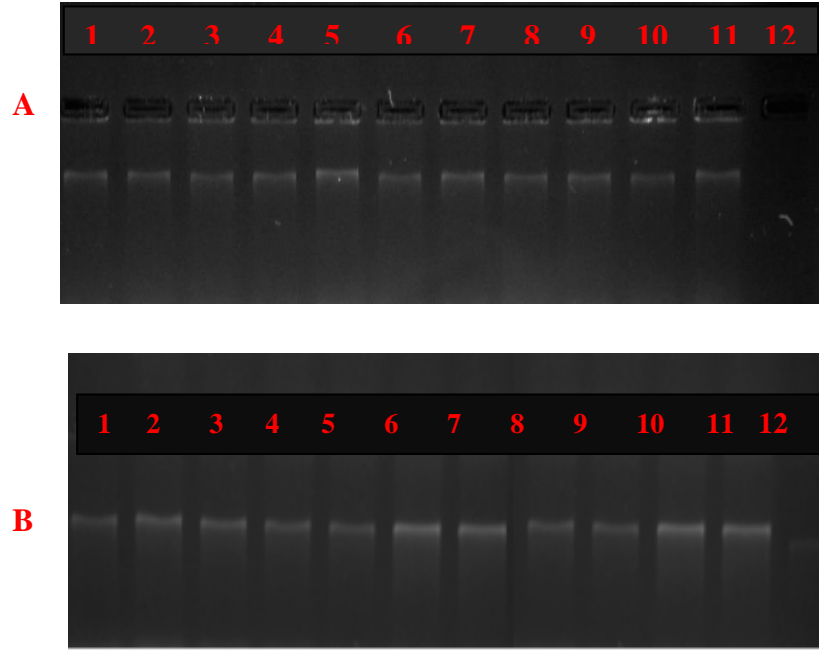
Şekil 4.38: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin kültür ve FISH yöntemine göre geri kazanım sonuçları.

4.4.1.4. Semi-Nested PZR Yöntemi Sonuçları

Farklı konsantrasyon ve sürelerde Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan 10⁸ h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine edilen su örnekleri filtrasyonla yoğunlaştırıldıktan sonra *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA'lar izole edilmiştir. Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan örneklerdeki

L. pneumophila bakterilerine ait DNA izolasyon bant görüntüleri Şekil 4.39'da gösterilmiştir.

Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin DNA'larının izole edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39: Farklı konsantrasyon ve sürelerde Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA bant görüntüsü. 100 ppm; 1) 0. saat, 2) 1 saat, 3) 3 saat, 4) 6 saat, 5) 24 saat, 6) Pozitif kontrol. 200 ppm; 7) 0. saat, 8) 1 saat, 9) 3 saat, 10) 6 saat, 11) 24 saat, 12) Negatif kontrol. A: ATCC 33152 bakterisi, B: Çevresel izolat.

Farklı konsantrasyon ve sürelerde Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumları Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

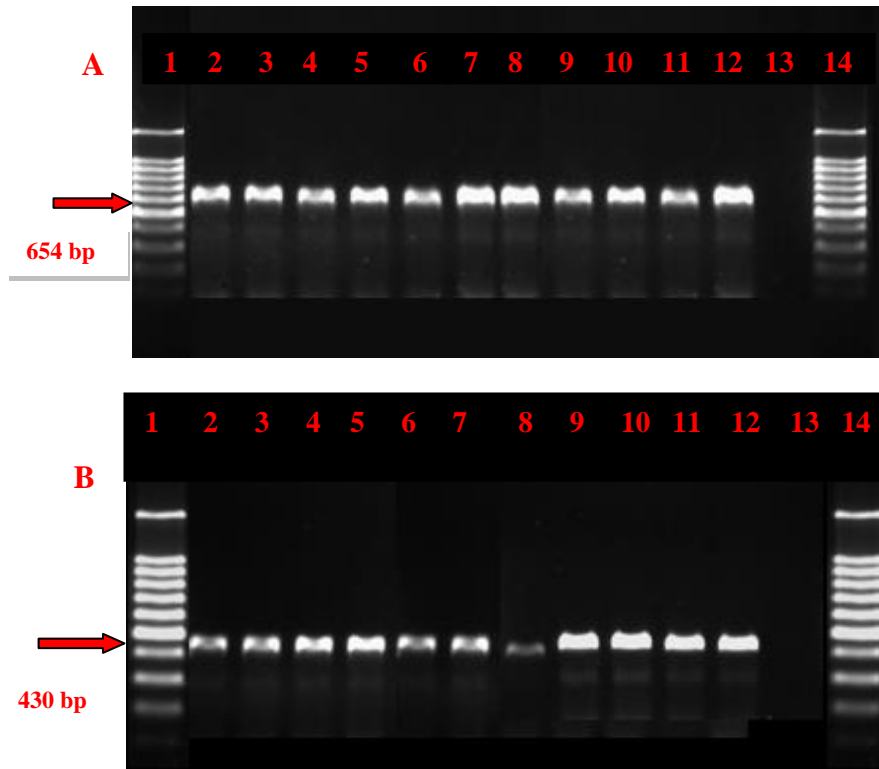
Tablo 4.12: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait ilk adım ve semi-nested PZR ürün oluşumu.

<i>L. pneumophila</i>	Biyosit Konsantrasyonu (ppm)	Süre (saat)	İlk adım PZR ürünü	Semi-nested PZR ürünü
ATCC 33152	100	0	+	+
		1	+	+
		3	+	+
		6	+	+
		24	+	+
	200	0	+	+
		1	+	+
		3	+	+
		6	+	+
		24	+	+
Çevresel izolat	100	0	+	+
		1	+	+
		3	+	+
		6	+	+
		24	+	+
	200	0	+	+
		1	+	+
		3	+	+
		6	+	+
		24	+	+

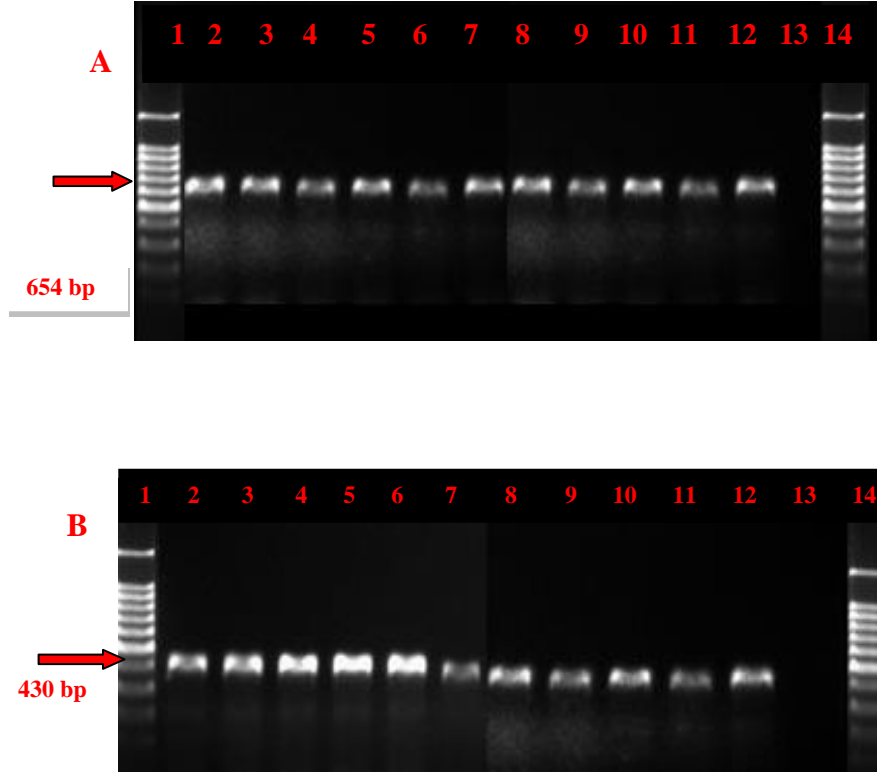
Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosit uygulamalarına maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden izole edilen *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA'lar, LEG 225 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ilk adım PZR yapılmıştır. Biyosit uygulamasına ait ilk adım PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve Şekil 4.40 ve Şekil 4.41'de gösterilmiştir. İlk adım sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 654 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.

L. pneumophila bakterilerine ait ilk adım PZR ürünleri, LEG 448 (forward primer) ve LEG 858 (reverse primer) kullanılarak ikinci adım (semi-nested) PZR yapılmıştır. Biyosit uygulamasına ait *L. pneumophila* ikinci adım PZR ürünleri, agaroz jel

elektroforezi yöntemi kullanılarak SYBR Green I ile UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiş ve Şekil 4.40 ve Şekil 4.41’de gösterilmiştir. İkinci adım sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin, 100bp DNA Ladder (Biomatik) kullanılarak 430 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.40: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol. 100 ppm; 3) 0. saat, 4) 1 saat, 5) 3 saat 6) 6 saat, 7) 24 saat, 200 ppm; 8) 0. saat, 9) 1 saat, 10) 3 saat, 11) 6 saat, 12) 24 saat, 13) Negatif kontrol, 14) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.



Şekil 4.41: Farklı konsantrasyon ve sürelerde biyosite maruz bırakılan çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden geri kazanılan *L. pneumophila* bakterilerine ait PZR ürünü jel görüntüsü. 1) 100 bp marker, 2) Pozitif kontrol, 100 ppm; 3) 0. saat, 4) 1 saat, 5) 3 saat 6) 6 saat, 7) 24 saat, 200 ppm; 8) 0. saat, 9) 1 saat, 10) 3 saat, 11) 6 saat, 12) 24 saat, 13) Negatif kontrol, 14) 100 bp marker. A: İlk adım, B: Semi-nested PZR.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal su ortamlarında *Legionella* konsantrasyonu oldukça düşük olmasına rağmen insan yapımı su sistemlerine geçtiklerinde buradaki koşulların etkisiyle çoğalarak yüksek sayılara ($>10^4$ kob/L) ulaşabilmektedir (Stout ve diğ., 1985; Muder ve Yuu, 2002). İnsanlarda Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşi gibi hastalıklara sebep olan *Legionella* cinsi bakterilerin bu sistemlerden insana geçişi, kontamine olmuş aerosollerin inhalasyonu ve aspirasyonu ile gerçekleşmektedir (Wellinghausen ve diğ., 2001; Fields ve diğ., 2002). *L. pneumophila* SG1 bakterilerinin litrede 100.000'i aştığı zaman risk oluşturduğu, daha düşük konsantrasyonlarda bulunan *L. pneumophila* bakterilerinin ise ortam koşulları uygun hale geldiğinde çoğalmaya ve yayılmaya başlayarak enfeksiyon oluşturma potansiyeli gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı *L. pneumophila* bakterilerinin su sistemlerinde varlığı kabul edilmemektedir (Çotuk, 1998).

Yapılan bir çalışmada, Lejyoner vakalarının %91.5'inin *L. pneumophila*, %3.9'unun *Legionella longbeachae* ve %2.4'ünün *Legionella bozemanii* kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Muder ve Yuu, 2002). Yapılan çalışmalarda doğal ve yapay su sistemlerinde en fazla bulunan ve insanda enfeksiyon oluşturmada bakımından ilk sırada yer alan *Legionella* cinsi bakterinin *L. pneumophila* serogrup 1 olduğu belirlenmiştir (Kwaik, 1998; Muder ve Yuu, 2002). Bu nedenle çalışmamızda standart *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 ve çevresel *L. pneumophila* izolatu ile yapay olarak kontamine edilmiş su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında en etkili yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın ilk aşamasında, farklı konsantrasyonlarda (10^2 - 10^{10} h/L) standart *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterisi ve çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı için kullanılan kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemlerindeki en düşük tespit etme değerleri belirlenmiştir.

Sularda çok düşük konsantrasyonlarda bulunan *Legionella* cinsi bakterilerin tespiti, ortamda kontamine edici bakteriler veya inhibitör maddeler olmasa bile çok güçtür.

Çalışmalar, kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* sayısının tespit edilmesinin güç ve düşük duyarlılıkta olduğunu göstermiştir. Su örneklerindeki *L. pneumophila* konsantrasyonu yüksek ise konsantrasyona bağlı hataların önlenildiği belirtilmektedir (Boulanger ve Edelstein, 1995).

Boulanger ve Edelstein (1995), yaptıkları çalışmada *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımın, bakteri konsantrasyonuna bağlı olduğunu, düşük konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren örneklerde geri kazanımın düşük olduğunu, hatta en etkili geri kazanım yönteminde bile yanlış sonuçlar alınabileceğini belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada kültür, FISH ve semi-nested PZR yönteminde, incelenen her iki *L. pneumophila* bakterisinin de bakteri konsantrasyonu arttıkça geri kazanım oranının arttığı belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterilerinin su örneklerinden geri kazanımını belirlemek için kullanılan kültür, FISH ve semi-nested PZR sonuçları değerlendirildiğinde, kültür yönteminde 10^2 h/L, FISH yönteminde 10^2 , 10^3 , 10^4 h/L, semi-nested PZR yönteminde ise DNA izolasyonuna bağlı olarak 10^2 , 10^3 , 10^4 ve 10^5 h/L konsantrasyonlarında bakteri içeren örneklerde, incelenen her iki *L. pneumophila* bakterisinin de tespit edilemediği belirlenmiştir. Semi-nested PZR yönteminde, 10^2 - 10^5 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden DNA izolasyonu yapılamadığı için ilk adım PZR ve semi-nested PZR yöntemi bu konsantrasyonlarda uygulanmamıştır. En yüksek geri kazanımın, kültür yönteminde 10^{10} h/L, FISH yönteminde 10^{10} h/L, semi-nested PZR yönteminde 10^6 - 10^{10} h/L konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, uygulanan yöntemlerde geri kazanım olabilmesi için su örneğinde, kültür yöntemi için en az 10^3 h/L, FISH yöntemi için 10^5 h/L, semi-nested PZR yöntemi için 10^6 h/L *L.pneumophila* bakterisinin olması gerektiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda sıcaklık ve asit gibi herhangi bir işleme maruz kalmamış örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında en iyi yöntemin kültür yöntemi olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, herhangi bir işleme maruz bırakılmayan *L. pneumophila* bakterilerinin VBNC fazına geçmeyerek BCYE Agar besiyerinde üreme özelliği gösterebilmesidir.

Bedrina ve diğ., (2013), standart ATCC 33152 ve çevresel *L. pneumophila* serogrup 1 bakterileri ile yapay olarak kontamine edilmiş kullanma suyu ve soğutma kulesi su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım sonuçlarını, standart kültür yöntemi ve enzim immunoassay deneyleri ile karşılaştırmışlardır. Deney sonucunda, kültüre edilebilir en düşük *L. pneumophila* sayısının 93 kob/ml olduğu, *L. pneumophila* ile kontamine su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin %47'sinin filtrasyonla geri kazanıldığını rapor etmişlerdir.

Delgado ve diğ., (2005), geri kazanım oranlarını tespit etmek için farklı yöntemler kullanmışlar ve Fransız standartlarına göre yaptıkları çalışmada kültür yöntemi ile tespit etme limitinin 50 L^{-1} ($\log 10=1.7$) olduğunu belirtmişlerdir. Delgado ve diğ., (2005) aynı zamanda tespit etme limitinin filtre edilen suyun hacmine, incelenen mikroskop alanı sayımlarına bağlı olarak değişebileceklerini öne sürmüşlerdir. Yaptığımız çalışma sonucunda, kültür yönteminde tespit etme limitinin 10^3 L^{-1} ($\log 10=2.5$) olarak saptanmıştır.

Conza ve diğ., (2013)'nin, kültür yönteminde tespit etme limitinin 10^2 - 10^3 h/L olarak belirten çalışma sonucu, çalışmamızdan elde edilen veriler ile uygunluk göstermektedir.

Villari ve diğ., (1998), farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklerden, incelenen bütün konsantrasyonlarda *L. pneumophila*'nın kültür yöntemi ile geri kazanımının polikarbonat filtreyle gerçekleştiğini belirtmişlerdir. EnviroAmp *Legionella* kiti kullanılarak DNA izolasyonunun yapıldığı PZR yönteminde 10 kob/ml (10^4 kob/L)'den daha fazla *L. pneumophila* içeren örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin tespit edilebildiğini belirtmişlerdir. Villari ve diğ., (1998), 10 kob/ml'den daha düşük konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren örneklerde bile *L. pneumophila* bakterilerinin tespit edilebildiğini, düşük konsantrasyonda *L. pneumophila* bulunan örneklerde *L. pneumophila* bakterilerinin tespit edilmesinde PZR yönteminin, kültür yöntemi kadar duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Villari, eğer örneklerde *L. pneumophila* bakterileri PZR yöntemi ile tespit edilememişse daha büyük hacimdeki su örneklerinin filtre edilerek daha düşük sayılardaki bakterilerin tespit edilebileceğini belirtmişlerdir. Villari ve diğ., (1998), PZR ve kültür yöntemlerinin, su örneklerinin incelenmesinde birbirini tamamlayıcı yöntemler olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamız kapsamında farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden

L. pneumophila bakterilerinin geri kazanımının tespit edilmesinde kullanılan semi-nested PZR yöntemi için DNA izolasyonu yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* içeren örneklerden *L. pneumophila* bakterilerine ait DNA izolasyonu, 10^6 - 10^{10} h/L konsantrasyonlarda *L. pneumophila* içeren örneklerde gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, çalışmada semi-nested PZR yönteminde 10^6 h/L konsantrasyonda *L. pneumophila* içeren örneklerde *L. pneumophila* bakterilerini tespit edebilmemiz DNA izolasyon kitinde bakteri tespit etme limitinin 10^6 h/L olmasından kaynaklanmaktadır. 10^6 h/L konsantrasyondaki çevresel *L. pneumophila* bakterisine ait ikinci adım PZR ürününün elde edilememesinin sebebinin ise ortamdaki olası inhibisyon faktörlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Miyamoto ve diğ. (1997), su örneklerindeki *L. pneumophila* bakterilerinin tespit edilmesinde semi-nested PZR'nin, PZR inhibitörlerinin üstesinden gelebildiğini belirtmişlerdir.

Wojcik-Fatla ve diğ. (2012), farklı konsantrasyonlarda *L. pneumophila* serogrup 2-14 bakterileri ile kontamine su örneklerinden *Legionella*'nın tespit edilmesinde kültür ve farklı PZR yöntemlerinin etkinliğini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda, tek adım PZR ile kültür yöntemi sonuçları arasında bir korelasyon olmadığını, ancak semi-nested PZR ve real-time PZR yöntemlerinden elde edilen sonuçların, kültür yöntemi sonuçlarıyla yüksek korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. Bununla birlikte DNA izolasyonunda filtrasyon yönteminin santrifüj yöntemine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Kültür ve tek adım PZR yönteminde, *Legionella* bakterilerinin tespitinin 10^6 dilüsyona kadar, semi-nested PZR yönteminde ise 10^7 dilüsyona kadar tespit edilebildiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada, geri kazanım oranının kullanılan yöntem ve DNA izolasyonunun da kullanılan kite bağlı olarak değiştiği belirlenmiş ve *Legionella* bakterilerinin tespiti için PZR yöntemi olarak semi-nested PZR' in kullanılması önerilmiştir.

L. pneumophila bakterilerini içeren su örneklerinden FISH yöntemi ile *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının yapılabilmesi için minimum 10^5 h/L konsantrasyonda olması gerektiği belirlenmiştir. Bu nedenle FISH yöntemi, daha yüksek konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterilerinin tespitinde kullanılan moleküler bir yöntem olarak tercih edilebilmektedir. FISH yöntemi, hücresel rRNA içeriği düşük

olduğu zaman sınırlamalar getirmektedir. Bu yüzden birden fazla tekniğin kullanılması güvenilirlik açısından önemlidir.

Su örneklerindeki *L. pneumophila*'nın geri kazanımında, ortamda bulunan refakatçi floranın üremesinin engellenebilmesi için, kültürden önce asit ve/veya sıcaklık uygulaması yapılması gerekmektedir. Ancak *Legionella* cinsi bakteriler, pH değişikliklerine hassastır ve pH değerlerindeki artış, bakterileri strese sokarak VBNC fazına girmesine neden olabilmektedir (Elsmore, 1993). VBNC fazındaki bakteriler kültür yönteminde yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Çevresel faktörlere maruz bırakılmış *Legionella* cinsi bakterileri içeren su örnekleri laboratuvar ortamında incelendiğinde, bakterilerin *Legionella* bakterilerine özgü besiyerlerinde koloni oluşturmadığı bilindiğinden besiyerinde üreme olmaması bakterinin o ortamda var olmadığı anlamına gelmemektedir (Chae ve Schraft, 2001). Reinthaler ve diğ., (1993), tarafından yapılan bir çalışmada, kültürden önce asit (pH 2.2 15 dakika) ve sıcaklık (59 °C 3 dakika) uygulaması yapıldığında, asit ile muamele edilen örneklerde geri kazanım oranının sıcaklık uygulamasına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bartie ve diğ. (2001), steril kullanma suyunda, herhangi bir ön işleme tabi tutulmamış örneklerde kültür yöntemi ile *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının % 85.9, asit ile muamele sonrası % 76.9, sıcaklık uygulaması sonrası ise % 1 olduğunu tespit etmişlerdir. Bartie aynı zamanda, standart suşların sıcaklık, asit muamelesi gibi işlemlere çevresel suşlardan daha dayanıklı olduklarını ve sıcaklık ve asit uygulamasının çevresel *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında ters etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bopp ve diğ. (1981), yaptıkları çalışmada, kültür yönteminde asit uygulaması yapılmaksızın direkt besiyerine ekim yapıldığında çevresel örneklerden *L. pneumophila* geri kazanım oranının daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada kültür yönteminde, filtrasyon işlemi ile yoğunlaştırıldıktan sonra sıcaklık (50 °C'de 30 dakika) ve asit (pH 2.2) ile muamele edilen *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları incelendiğinde, asit ile muamele edilen örneklerden geri kazanılan (% 56), *L. pneumophila* sayısının sıcaklık uygulamasına göre (% 22) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Legionella, düşük pH değerlerine kısa bir süre zarfında nispeten dirençlidir. Bopp ve diğ. (1981), yaptıkları çalışmada *L. pneumophila* bakterilerinin, pH 2.2'e farklı sürelerde maruz bırakıldığında, 30 dakikaya kadar pH 2.2'e dirençli olduğu, süre uzadıkça geri kazanım oranının düştüğünü belirtmişlerdir. İncelenen beş örneğin ikisinden *L. pneumophila* serogrup 1'in geri kazanımının yapıldığını tespit etmişlerdir.

Asit uygulaması ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, farklı sürelerde (3 ve 15 dakika) pH 2.2'e maruz bırakılan su örneklerinde *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı incelendiğinde, süre uzadıkça *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranının azaldığı belirlenmiştir (Ta ve diğ., 1995). Normalde pH 2.2'e dirençli olduğu bilinen *Legionella* cinsi bakteriler, tez kapsamında pH 2.2'e 0, 15 ve 30 dakika maruz bırakıldığında, *L. pneumophila* bakterilerinde düşük pH değerinin oluşturduğu etkiden dolayı VBNC fazına girerek kültürde üreme göstermedikleri belirlenmiştir. Nitekim pH 2.2'e 0, 15 ve 30 dakika maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örneklerinden her iki *L. pneumophila* bakteri sayılarının kontrole yakın değer göstermesi, geri kazanım oranlarının yüksek olması bu görüşümüzü desteklemektedir. Ayrıca yaptığımız çalışma sonucunda, pH uygulamalarından geri kazanımın süreye bağlı olmadığı tespit edilmiştir.

Sıcaklık, biyolojik membran kompozisyonu, organizasyonu ve fonksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Sıcaklık, su ortamlarındaki *Legionella* bakterilerinin yayılması ve canlılığını sürdürmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. *Legionella* cinsi bakteriler 20-45 °C sıcaklık aralığında üreyebilmesine rağmen optimum üreme sıcaklığı 30-40 °C'dir. *Legionella* cinsi bakteriler, 45-55 °C içme suyunda yüksek konsantrasyon seviyelerine ulaşabilmekte ve su sistemlerinde yaygın olarak bulunan diğer mikroorganizmalara karşı üstünlük sağlamaktadır (Kramer ve Ford, 1994). Çok düşük sıcaklık değerlerinde, *Legionella* popülasyonunun geri kazanım oranının azaldığı, yüzme havuzları ve kaplıcalar gibi yüksek sıcaklığa sahip alanlarda ise bu bakterilerin sıcaklıkla birlikte geri kazanım oranının arttığı bulunmuştur (Henke ve Seidel, 1986; Lee ve West, 1991; Heller ve diğ., 1998).

Yapılan bir çalışmada, *Legionella* bakterilerinin yaşayabildiği en düşük sıcaklık değerinin 16.5 °C olduğu belirtilmiştir (Farrell ve diğ., 1990; Bentham ve diğ., 1993). Soğuk su depolarının sıcaklığının 20 °C'nin üzerine çıkması, *Legionella* cinsi

bakterilerin sistemde kolonize olmasını ve yayılmasını etkilemektedir (Dennis ve Lee, 1988). Başka bir çalışmada da, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanılabildiği en yüksek sıcaklık değerinin 64 °C olduğu saptanmıştır (Botzenhart ve diğ., 1986). Sıcaklıkla ilgili yapılan diğer bir çalışmada, *Legionella* cinsi bakterilerin yüksek sıcaklıklarda bile canlılıklarını koruyabilen ısıya dirençli organizmalar olduğu ve sıcaklığı 60 °C'ye kadar olan doğal sularda ve 66.3 °C sıcaklıktaki yapay su sistemlerinde *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının yapılabildiği belirtilmiştir (Henke ve Seidel, 1986). Bununla birlikte 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, *Legionella* cinsi bakterilerin geri kazanım oranı, zamana bağlı olarak azalmaktadır. 50 °C'ye iki saat maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin ancak %10'unun geri kazanılabildiği belirlenmiştir (Coulbourne ve Dennis, 1989).

Kullanma suyu sistemlerinde *Legionella* bakterilerinin kontrolü için su sıcaklığının 50 °C'nin üzerinde tutulması gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada *L. pneumophila* bakterilerinin mevcut olduğu bir sistemde sıcaklığın 60-70 °C'ye yükseltilmesi ve sisteme günde iki kez sıcak su pompalanmasından sonra ortamdaki geri kazanılan *L. pneumophila* bakteri konsantrasyonunun 50 kob/L'nin altına düştüğü saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, dekontaminasyondan sonra su sıcaklığının 60 °C'nin altına düştüğü noktalardan alınan su örneklerinde, *L. pneumophila* bakterilerinin ortamdaki yeniden geri kazanılabildiği belirlenmiş ve şok sıcaklık uygulamasının geçici bir yöntem olup belirli zaman aralıklarıyla termal dezenfeksiyonun tekrarlanması gerektiği sonucuna varılmıştır (Zacheus ve Martikainen, 1996).

Soğuk su sistemleri için 15 °C'nin altında, sıcak su sistemleri için ise en az 55 °C'de bir süre su akışının gerçekleştirildiği sistemlerden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranının çok düşük olduğu belirlenmiştir (Dennis ve diğ., 1984).

Yapılan bir çalışmada, sıcaklıkları 43-45 °C olan sıcak su depolarından *L. pneumophila* bakterileri geri kazanılabilirken, su sıcaklığı 58-60 °C olan iki hastanenin sıcak su depolarından *L. pneumophila* geri kazanımının yapılamadığı belirlenmiştir (Plouffe ve diğ., 1983). Bir diğer çalışmada, 60 °C'deki hastane su sistemindeki sıcak su tankından alınan örnekte *Legionella*'nın geri kazanıldığını, fakat 77 °C'deki su tankından alınan örnekte *Legionella*'nın geri kazanımının yapılamadığı belirlenmiştir (Best ve diğ., 1983).

Muraca ve diğ., (1990) tarafından yapılan bir çalışmada, 60 °C'e 1.3-10 dakika, 70 °C'e 0.7-2.6 dakika, 80 °C'e 0.3-0.7 dakika maruz bırakılan örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının yapılamadığı belirtilmiştir.

Stout ve diğ., (1986) tarafından yapılan bir çalışmada, 80 °C'e 5 dakika, 70 °C'e 10 dakika ve 60 °C'e 25 dakika maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin 8 log azaldığı, sıcaklık uygulamasında temas süresinin önemli olduğu ve su sıcaklığına karşı direncin *L. pneumophila* bakterileri arasında değişken olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, 10⁸ h/L konsantrasyonda standart ATCC 33152 bakterisi ve çevresel *L. pneumophila* izolatu ile kontamine su örnekleri, farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakıldıktan sonra kültür, FISH ve semi-nested PZR yöntemi kullanılarak *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları incelenmiş ve kültür ve FISH yönteminde en düşük geri kazanım oranının 60 °C'de 3 dakika olduğu tespit edilmiştir. Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan örneklerin tümünde semi-nested PZR yöntemi ile geri kazanımın yapıldığı saptanmıştır.

Legionella cinsi bakterilerin geniş sıcaklık aralığında canlı kalabildiği ve sistemden geri kazanımının yapılabildiğini belirten çalışmalar, bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmalarda, *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklerden FISH yöntemi ile sağlanan geri kazanımın kültür yöntemine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Butchbinder ve diğ., 2002; Deloge-Abarkan ve diğ., 2007).

Tez kapsamında, farklı sürelerde farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım sonuçları karşılaştırıldığında, *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemi ile geri kazanım oranının kültür yöntemine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun sebebinin, geniş sıcaklık aralıklarında yaşayabilen *L. pneumophila* bakterilerinin, ortam sıcaklığı arttıkça strese girerek VBNC fazına girdiği; bu nedenden dolayı da kültürde BCYE Agar besiyerinde üreyemediği düşünülmektedir. Nitekim, farklı sıcaklıklara maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren su örneklerinden *L. pneumophila* bakterilerinin FISH yöntemiyle geri kazanımının kültür yöntemine göre daha yüksek olması bu görüşümüzü destekler niteliktedir.

Yaptığımız çalışmada, en yüksek geri kazanım sağlayan sıcaklık ve sürenin 5 °C'de 24 saat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 5 °C'de 24 saat ile yüksek sıcaklık değerleri arasında anlamlı bir farkın ($p \leq 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. En yüksek geri kazanım sağlayan sıcaklığın 5 °C olarak saptanması, düşük sıcaklıkta hücrelerin canlılıklarını korumalarını sağlayan ve düşük sıcaklıkta teşvik edilen CIP (soğukla teşvik edilen proteinler) veya CSP (soğuk şok proteinleri) olarak adlandırılan proteinlerin sentez edilmesinden kaynaklanabilir (Vatansever, 2011).

Su örneklerinde yaygın olarak bulunan ve enfeksiyon oluşturan *L. pneumophila* bakterilerine karşı en etkili biyositin seçilmesi ve vakit kaybetmeden su sistemlerinin dezenfeksiyonunun yapılması gerekmektedir (Yamamoto ve diğ., 1991).

Legionella'nın kontrolünü de içeren biyosit uygulamaları mikrobiyolojik kontrol programları içinde önemli bir yere sahiptir. Biyosit uygulamasından sonra, *Legionella* bakterileri laboratuvar ortamında yeniden üreme özelliklerini kaybettiklerinden yani VBNC formuna dönüştüklerinden, bir biyositin *Legionella*'nın kontrolü üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde sadece kültür yönteminin kullanılması yetersiz kalmaktadır.

Biyositin su sistemlerindeki *Legionella* üzerine etkisinin değerlendirildiği birçok çalışmada, başlangıç seviyesindeki biyosit dozunun *Legionella* üzerinde geçici etkiye sahip olduğu ve *L. pneumophila* bakterilerinin hızlı bir şekilde geri kazanıldığı belirlenmiştir (Stout ve diğ., 1986; Mietzener ve diğ., 1997; Thomas ve diğ., 2004; Saby ve diğ., 2005; Stout ve diğ., 2005; Mouchtouri ve diğ., 2007).

Çalışmamızda okside edici bir biyosit olan Huwa-San TR 50'nin 100 ve 200 ppm'lik konsantrasyonları kullanılmıştır (Dodds ve diğ., 1999). Daha önce yapılan çalışmalarda, Huwa-San'ın içme suyu boru sistemlerindeki biyofilm tabakasını ortadan kaldırma yeteneğine sahip olduğu, uygulama sonrası mikroorganizma yoğunluğunun önemsenecek ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Pedahzur ve diğ., 2000). Yapılan bir çalışmada, dezenfeksiyonda kullanılan aşırı dozda klorun artık klor oluşumuna neden olduğu, Huwa-San TR 50 ile uygulamadan sonra ise artık klor oluşmadığı ve çözünmüş oksijen oranının da arttığı tespit edilmiştir. Biyositin *L. pneumophila* bakterileri

üzerindeki etkisi, Huwa-San'ın konsantrasyonuna, temas zamanına ve uygulamanın durgun suda ya da sirkülasyon esnasında kullanılmasına bağlıdır (Armon ve diğ., 2000).

Kültür ve FISH yöntemleri sonuçlarına göre *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımı değerlendirildiğinde, geri kazanım oranının FISH yönteminde kültür yöntemine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Semi-nested PZR yönteminde, farklı konsantrasyon ve sürelerde Huwa-San TR 50 biyositine maruz bırakılan tüm örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımının yapılabildiği saptanmıştır.

Doğal su ortamlarındaki bakterilerinin tespit edilmesinde FISH yönteminin kullanımıyla ilgili iki problemle karşılaşılmaktadır. Bunlardan biri ölü hücreleri canlı hücrelerden ayırma yeteneğinin olmamasının diğeri ise hedef rRNA miktarının düşük olmasından (düşük floresan) kaynaklanmaktadır (Villarino ve diğ., 2000; Garcisa-Armisen ve Servais 2004). Bu problemleri ortadan kaldırmak için FISH yönteminden önce zenginleştirme aşaması kullanılması önerilmektedir. Yaptığımız çalışmada, çevresel faktörlere maruz bırakılan örneklerde geri kazanım oranının FISH yönteminde yüksek olmasının nedeninin FISH yöntemi öncesi filtrasyonla yoğunlaştırma işlemi uygulamasının olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, 10^8 h/L konsantrasyondaki *L. pneumophila* bakterileri ile kontamine su örnekleri, farklı sıcaklık, pH ve biyosit uygulamalarına maruz bırakıldıklarında, kantitatif yöntemler olan kültür ve FISH yöntemine göre *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanım oranları değerlendirildiğinde, geri kazanım oranının FISH yönteminde kültür yöntemine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Farklı çevresel şartlara (sıcaklık, pH ve biyosit) maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklerin tümünde her iki *L. pneumophila* bakterisinin de semi-nested PZR yöntemi ile geri kazanımının yapıldığı saptanmıştır.

Çok farklı PZR uygulamalarının mevcut olmasından dolayı, bu uygulamanın en iyi şekilde çalışması için her laboratuvar ortamında yeniden optimize edilmesi gerekmektedir. Eğer PZR şartları her yeni PZR uygulaması için yeniden düzenlenmezse bazı problemlerle karşılaşılabilmektedir (Innis ve Gelfand 1990).

PZR hassas, özgül ve güvenilir bir yöntem olmakla beraber amacı çok küçük miktarlardaki DNA veya RNA'nın kısa sürelerde milyarlarca kopyasının elde edilebilmesine dayanmaktadır. Elde edilen ürünlerdeki hata payı diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında daha düşük olmaktadır (Dusserre ve diğ., 2008).

Miyamoto ve diğ., (1997) yaptıkları çalışmada, kültür ve semi-nested PZR yöntemleri ile, *L. pneumophila* bakterilerinin tespit etme limitini incelemişler ve semi-nested PZR'nin, ortamdaki mevcut PZR inhibitörlerinin etkisini azalttığı 15 örneğin 14'ünde *L. pneumophila*'ya özgü DNA bantlarının oluştuğunu, *L. pneumophila* bakterilerinin kültür yöntemiyle % 79.5, semi-nested PZR yöntemiyle % 91.8 oranında geri kazanıldığını belirlemişlerdir. Çalışmalarında, filtrasyonla yoğunlaştırılan *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklerde PZR inhibitörleri arttığından dolayı tek adım PZR'de 15 örnekten 8'inde *L. pneumophila*'ya ait PZR ürünü oluştuğu tespit edilmiştir. Semi-nested PZR'de ise, ilk adım sonucunda oluşan PZR ürünlerinden alınarak PZR mater mix'e eklendiği için otomatik olarak 50 kat sulandırma yapıldığı, böylece ortamdaki PZR inhibitörleri en aza indirilerek *L. pneumophila*'ya ait PZR ürünü oluşan örnek sayısının 8'den 14'e yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Çevresel örneklerdeki inhibisyon bileşiklerinin varlığında PZR yönteminde yanlış negatif sonuçlar gözlemlenebildiğinden dolayı inhibisyon kontrolünün yapılması tavsiye edilmektedir. PZR inhibisyonu örneklerin sulandırılmasını veya uygulamanın yeniden yapılmasını gerektirmektedir. Yanlış pozitif sonuçlar, serbest DNA parçalarının varlığına ve örnekler arasındaki farklılığın PZR yöntemi ile belirlenememesine neden olmaktadır (Buchbinder ve diğ., 2002).

Çalışmamızdan çıkarılan sonuçlar kısaca şöyle özetlenebilir;

- *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında kullanılan yöntemler karşılaştırıldığında; farklı çevresel koşullara maruz bırakılan örneklerdeki *L. pneumophila* bakterileri strese girip VBNC fazına geçtiklerinden kültür yöntemi, düşük konsantrasyonlardaki *L. pneumophila* bakterilerini içeren örneklerdeki düşük hücresel rRNA içeriğine sahip olduklarından FISH yöntemi, *L. pneumophila* DNA'sının tespit edilme limitinin kullanılan DNA izolasyon

kitine bağılı olduğundan ve ortamdaki olası PZR inhibitörlerinden dolayı semi-nested PZR yöntemi, *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında sınırlamalar getirmektedir.

- Düşük konsantrasyonda *L. pneumophila* bakterilerini içeren herhangi bir çevresel strese maruz bırakılmamış örnekler için geri kazanımda en iyi yöntemin kültür yöntemi olduğu tespit edilmiştir.
- *L. pneumophila* bakterilerinin tespit etme limiti kültür yönteminde 10^3 h/L, FISH yöntemi için 10^5 h/L, semi-nested PZR için ise DNA izolasyonuna bağılı olarak 10^6 h/L olduğu saptanmıştır.
- *L. pneumophila* bakterileri, farklı çevresel koşullara (sıcaklık, pH, biyosit) maruz bırakıldığında, VBNC fazına girebilmekte ve kültür yönteminde BCYE Agar besiyeri üzerinde üreyememektedir.
- Farklı sürelerde çevresel faktörlere (sıcaklık, pH, biyosit) maruz bırakılan *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında kültür yönteminin yanında, FISH ve semi-nested PZR gibi moleküler yöntemler de kullanılarak sonuçların doğrulanması gerekmektedir.
- PZR ve FISH yönteminin *L. pneumophila* bakterilerinin kültüre edilemediği örneklerden *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında kullanılabilir uygun yöntemler olduğu tespit edilmiştir.
- Semi-nested PZR, ilk ve ikinci adım PZR aşamalarından oluşup 3 primer seti ile çalışılıp PZR inhibitörlerini en aza indirdiği ve kullanılan bakteriye özgü, spesifik ürünler meydana geldiği için *L. pneumophila* bakterilerinin geri kazanımında en uygun yöntemin olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, kullanılan bakterinin epidemiyolojik olarak belirlenmesinde kültür yönteminin temel alındığından, çalışmalarda sadece kültür ya da sadece moleküler yöntem değil, her iki yöntemin de kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C., Frere, J., 2008, Long-term survival of *L. pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment, *Current microbiology*, 57, 497-502.
- Amann, R.I., Springer, N., Ludwig, W., Gortz, H.-D. and Schliefer, K.-H., 1991, Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts, *Nature*, 351, 161-164.
- Armon, R., Laot, N., Lev, O., Shuval, H. and Fattal, B., 2000, Controlling biofilm formation by hydrogen peroxide and silver combined disinfectant, *Water science and technology*, 42, 187-192.
- Atlas, R.M., 1999, Handbook of Microbiological Media, CRC Press, United States, ISBN 0-493-2944-2.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P., 1992, Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation, *Applied and environmental microbiology*, 58 (8), 2420-2425.
- Barker, J., Scaife, H., Brown, M.R., 1995, Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 39 (12), 2684-2688.
- Bartie, C., Venter, S.N., Nel, L.H., 2001, Evaluation of detection methods for *Legionella* species using seed water samples, *Water SA*, 27 (4), 523-528.
- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J.V., Pond, K., Surman-Lee, S., 2007, *Legionella* and prevention of Legionellosis, WHO, ISBN: 92-4-156297-8.
- Bedrina, B., Macian, S., Solis, I., Fernandez-Lafuente, Baldrich, E., Rodriguez, G., 2013, Fast immunosensing technique to detect *Legionella pneumophila* in different natural and anthropogenic environments: comparative and collaborative trials, *BMC microbiology*, 13 (88), 1471-2180.
- Benin, A.L., Benson, R.F., Arnold, K.E., 2002, An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis, *Journal infectious disease*, 185, 237-243.
- Bentham, R.H., Broadbent, C.R., Marwood, L.N., 1993, The influence of the sessile population in the *Legionella* colonization of cooling towers, In: *Legionella-Current status and emerging perspectives*, ASM Press, Washington, DC.

- Best, M., Yu, V.L., Stout, J., Goetz, A., Muder, R.R., Taylor, F., 1983, Legionellaceae in the hospital water supply, *Lancet*, 2, 307-310.
- Blazquez Garrido, R.M., Espinoza Parra, F.J., Alemany, F.L., Ramos Guevara, R.M., Sanchez-Nieto, J.M., Segovia, H.M., 2005, Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires' disease: levofloxacin versus macrolides, *Clinical infectious disease*, 40 (6), 800-806.
- Bopp, C.A., Sumner, J.W., Morris, G.K., Wells, J.G., 1981, Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium, *Journal of clinical microbiology*, 13 (4), 714-719.
- Boss, M.J. ve Day, D.W., 2003, Biological risk engineering handbook: Infection control, *Legionella* and cooling Towers, CRC, Chapter 11.
- Botzenhart, K., Heizmann, W., Sedaghat, S., Heeg P., Hahn, T., 1986, Bacterial colonization and occurrence of *Legionella pneumophila* in warm and cold water in faucet aerators and in drains of hospitals, *Zentralblatt für bakteriologie mikrobiologie und hygiene [B]*, 183 (1), 79-85.
- Boulanger, C.A., and Edelstein, P.H., 1995, Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation, *Applied and environmental microbiology*, 61 (5), 1805-1809.
- Breiman, R.F. and Butler, J.C., 1998, Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspective, *Seminars in respiratory infections*, 13 (2), 84-89.
- Broome, C.V., 1983, Current issues in the epidemiology of legionellosis, in *Legionella*-proceedings, Second International Symposium, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 205-209.
- Buchbinder, S., Trebesius, K., Heesemann, J., 2002, Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence *in situ* hybridization, PCR amplification and bacterial culture, *International journal of medical microbiology*, 292 (3-4), 241-245.
- Castilla, J.A., Barricarte, J., Aldaz, C.M., Garcia, T., Ferrer, T., Pelaz, C., Pineda, S., Baladron, B., Martin, I., Goni, B., Aratajo, P., Chamorro, J., Lameiro, F., Torroba, L., Dorronsoro, I., Martinez-Artola, V., Esparza, M.J., Gastaminza, M.A., Fraile, P., Aldaz, P., 2008, A large Legionnaires' disease outbreak in Pamplona, Spain: early detection, rapid control and no case fatality, *Epidemiology and infection*, 136, 823-832.
- Chae, M.S. and Schraft, H., 2001, Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains, *Infectious journal of food microbiology*, 62 (1-2), 103-111.
- Chedid, M.B., Ilha, D.O., Chedid, M.F., Dalcin, P.R., Buzzetti, M., Jaconi, S.P., Griza, D., Menna, B.S., 2005, Community-acquired pneumonia by *Legionella pneumophila* serogroups 1-6 in Brazil, *Respiratory medicine*, 99 (8), 966-975.

- Colbourne, J.S., Dennis, P.J., 1989, The ecology and survival of *Legionella pneumophila*, Thames water authority, *Journal of the Institution of water and environmental management*, 3 (4), 345-350.
- Conza, L., Casati, S., Gaia, V., 2013, Detection limits of *Legionella pneumophila* in environmental samples after co-culture with *Acanthamoeba polyphaga*, *BMC microbiology*, 13 (49), 1471-2180.
- Çotuk, A., 1998, Su sistemlerinde Lejyoner hastalık etkeni bakterilerin kontrolü, *Kükem Dergisi*, 21 (3), 13-16.
- Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A., Ollevier, F., 2003, A detection method for *Legionella* spp., in (cooling) water: fluorescent *in situ in situ* hybridisation (FISH) on whole bacteria, *Water science and technology*, 47, 143-146.
- Deloge-Abarkan, M., Thi-Lan, H., Robine, E., Zmirou-Navier, D., Mathieu, L., 2007, Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), *Journal of environmental monitoring*, 9, 91-97.
- Delgado-Viscogliosi, P., Simonart, T., Parent, V., Machand, G., Dobbelaere, M., Pierlot, E., Pierzo, V., Menard-Szczebara, F., Gaudard-Ferveur, E., Delabre, K., Delattre, J.M., 2005, Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water, *Applied environmental microbiology*, 71 (7), 4086-4096.
- Dennis, P.J., Green, D., Jones, B.P., 1984, A note on the temperature tolerance of *Legionella*, *Journal of applied bacteriology*, 56 (2), 349-350.
- Dennis, P.J. and Lee, J.V., 1988, Differences in aerosol survival between pathogenic and nonpathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1, *Journal of applied bacteriology*, 65, 135-141.
- Diederer, B.M.W., 2008, *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *Journal of Infection*, 56 (1), 1-12.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S., 1993, General concepts for PCR primer design, *PCR methods application*, 3, 30-37.
- Dodds, L., King, W., Woolcott, Pole, J., 1999, Trihalomethanes in public water supplies and adverse birth outcomes, *Epidemiology*, 10, 233-237.
- Dusserre, E., Ginevra, C., Hallier-Soulier, S., Vandenesch, F., Festoc, G., Etienne, J., Jarraud, S., Molmeret, M., 2008, A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability, *Applied environmental microbiology*, 74 (15), 4817-4824.

- Edelstein, P.H., 1987, Laboratory diagnosis of infections caused by *Legionellae*, *European journal clinical microbiology*, 6 (1), 4-10.
- Elsmore, R., 1993, Practical experience of the use of bromine based biocides in cooling towers, *Biodeterioration and biodegradation*, 9, 114-122.
- EPA, 1985, *Legionella* criteria document, United States Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.
- EPA, 1998, *Legionella* drinking water criteria document, United States Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.
- Euzeby J.P., 2013, List of prokaryotic names with standing in nomenclature-genus *Legionella*. <http://www.bacterio.cict.fr/l/legionella.html> [Ziyaret tarihi: 27 Şubat 2014].
- Exner, M., Kramer, H.M., Lajoie, L., Gebel, J., Engelhart, S., Harteman, P., 2005, Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities, *American journal of infection control*, 33 (5), 26-40.
- Faris, B., Faris, C., Schousboe, M., Heath, C.H., 2005, Legionellosis from *Legionella pneumophila* serogrup 13, *Emerging infectious diseases*, 11 (9), 1405-1409.
- Farrell, I.D., Barker, J.E., Miles, E.P., Hutchison, J.P.G., 1990, A field study of the survival of *Legionella pneumophila* in a hospital hot-water system, *Epidemiology and infection*, 104, 381-387.
- Ferre, M.R., Arias, C., Oliva, J.M., Pedrol, A., Garcia, M., Pellicer, T., Roura, P., Dominguez, A., 2009, A community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Vic and Gurb, Catalonia (Spain) in 2005, *European journal clinical microbiology infectious disease*, 28 (2), 153-159.
- Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002, *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clinical microbiology reviews*, 15 (3), 506-526.
- Fujii, J. and Yoshida, S., 1998, *Legionella* infection and control in occupational and environmental health, *Reviews on environmental health*, 13(4), 179-203.
- Gao, L.Y., Harb, O.S., Abu Kwaik, Y., 1997, Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa, *Infectious immunology*, 65 (11), 4738-4746.
- Garcia-Armisen, T. and Servais, P., 2004, Enumeration of viable *E. coli* in rivers and waste waters by fluorescent *in situ* hybridization, *Journal of microbiological methods*, 58, 269-279.
- George, J.R., Pine, L., Reeves, M.W., Harrell, W.K., 1980, Amino acid requirements *Legionella pneumophila*, *Journal of clinical microbiology*, 11 (3), 286-291.

- Gilpin, R.W., Dillon, S.B., Keyser, P., Androkites, M., Berube, N., Carpendale, J., Skorina, J., Hurley, J., Kaplan, A.M., 1985, Disinfection of circulating water systems by ultraviolet light and halogenation, *Water research*, 19, 839-848.
- Glick, T.H., Gregg, M.H., Berman, B., 1978, Pontiac fever, An epidemic of unknown etiology in a health department, *American journal epidemiology*, 107, 149-160.
- Guillemet, T.A., Levesque, B., Gauvin, D., Brousseau, N., Giroux, J.P., Cantin, P., 2010, Assessment of real-time PCR for quantification of *Legionella* spp. in spa water, *Letters applied microbiology*, 51 (6), 639-644.
- Hames, B.D. and Higgins, J., 1988, Nucleic acid hybridisation: A practical approach, IRL Press, Oxford, England.
- Heath, C.H., Grove, D.I., 1996, Delay in appropriate therapy of *Legionella pneumophila* associated with increased mortality, *European journal clinical microbiology infectious disease*, 15, 286-290.
- Hechard, Y., Ferraz, S., Bruneteau, E., Steinert, M., Berjeaud, J.M., 2005, Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide, *FEMS microbiology*, 252 (1), 19-23.
- Heller, R., Höller, C., Sübmuth, R., Gundermann, K.-O., 1998, Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*, *Letters in applied microbiology*, 26, 64-68.
- Helms, C.M., Massanari, R.M., Wenzel, R.P., Pfaller, M.A., Moyer, N.P., Hall, N., 1988, Legionnaires' disease associated with a hospital water system: A five-year progress report on continuous hyperchlorination, *Jama*, 259 (16), 2423-2427.
- Henke, M. and Seidel, K.M., 1986, Association between *Legionella pneumophila* and amoebae in water, *Israel journal of medical sciences*, 22, 690-695.
- Huerta, M., Castel, H., Grotto, I., Shpillberg, O., Alkan, M., Harman-Boehm, I., 2003, Clinical and epidemiologic investigation of two *Legionella-Rickettsia* co-infections, *Israel medical association journal*, 5(8), 560-563.
- Icgen, B. and Harrison, S., 2006, Identification of population dynamics in sulfate-reducing consortia on exposure to sulfate, *Research in microbiology*, 922-927.
- Innis, M.A. and Gelfand, D.H., 1990, Optimization of PCRs. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Chapter 1, 3-12.
- Joseph, C.A. and Ricketts, K.D., on behalf of the European Working Group for *Legionella* infections. Legionnaires' disease in Euro Surveill, 2010, 15 (8), 19683.
- Kalan, O., 2009, Lejyoner hastalığının istatikselsel risk analizi, Yüksek Lisans Tezi, C. U. Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U., 1997, Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes, *Applied and environmental microbiology*, 63, 4164-4170.
- Kilvington, S., Price, J., 1990, Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure, *Journal applied bacteriology*, 68 (5), 519-525.
- Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., Kendall, A.M., 2002, *Water research*, 36 (18), 4433-4444.
- Kramer, M.H. and Ford, T.E., 1994, Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease, *Zentralblatt für Bakteriologie Supplementum*, 195 (5-6), 470-482.
- Kwaik, A.Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C., Harb, O.S., 1998, Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis, *Applied and environmental microbiology*, 64 (9), 3127-3133.
- Lau, H.Y. and Ashbolt, N.J., 2009, The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water, *Journal applied microbiology*, 107 (2), 368-378.
- Lee, J.V. and West, A.A., 1991, Survival and growth of *Legionella* species in the environment, *Society for applied bacteriology symposium series*, 20, 121-129.
- Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Jackson, D. ve Leitch, I.J., 1994, *In situ* hybridization: A Practical Approach. Microscopy Handbooks 27, Bios Scientific Publishers Limited.
- Lin, Y.E., Vidic, R.D., Stout, J.E., Yu, V.L., 1998, *Legionella* in water distribution systems: regular culturing of distribution systems samples is the key to successful disinfection, *Journal American water works association*, 90, 112-121.
- Llobert-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R., 1998, Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization, *Applied environmental microbiology*, 64, 2691-2696.
- Luck, P.C. and Liebscher, B., 2003, Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by quantitative culture and an antigen detection assay, *International journal of hygiene environmental health*, 206 (3), 201-204.
- Madigan, M., and Martinko, J., 2005, *Brock Biology of Microorganism*, 11th ed., Prentice Hall, London, 0-13-144329-1.
- Maiwald, M., Helbig, J., Luck, P.C., 1998, Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections, *Journal of microbiological methods*, 33, 59-79.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., Dowdle, W.R., 1977, Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its

role in other respiratory disease, *The New England journal of medicine*, 297 (22), 1197-1203.

McPherson, M.J. and Moller, .G., 2000, PCR, *Bios scientific publishers*, Oxford, ISBN: 1-85996-017-0.

Mietzner, S., Schwille, R.C., Farley, A., Wald, E.R., Ge, J.H., States, S.J., Libert, T., Wadowsky, R.M., 1997, Efficacy of thermal treatment and copper-silver ionization for controlling *Legionella pneumophila* in high-volume hot water plumbing systems in hospitals, *American journal of infection control*, 25 (6), 452-457.

Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T., Yoshida, S., 1997, Development of a new semi-nested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water, *Applied and environmental microbiology*, 63, 2489- 2494.

Miyamoto, M., Yamaguchi, Y., Sasatsu, M., 2000, Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculosis *Mycobacteria*, *Microbios*, 101, 7-13.

Mouchtouri, V., Velonakis, E., Tsakalof, A., Kapoula, C., Goutziana, G., Vatopoulos, A., Kremastinou, J., and Hadjichristodoulou, 2007, Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by *Legionella* species, *Applied and environmental microbiology*, 73 (5), 1489-1492.

Muder, R.R. ve Yu, V.L., 2002, Infection due to *Legionella species* other than *L. pneumophila*, *Emerging infections*, 35, 990-998.

Mullis, K.B., 1990, The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction, *Scientific American*, 262 (4), 56-61.

Muraca, P.W., Yu, V.L., Goetz, A., 1990, Disinfection of water distribution systems for *Legionella*: a review of application procedures and methodologies, *Infection control and hospital epidemiology*, 11 (2), 79-88.

Mykietiuk, A., Carratala, J., Fernandez-Sabe, N., 2005, Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella pneumonia* in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy, *Clinical infectious disease*, 40, 794-799.

Nguyen, M.H., Stout, J.E., Yu, V.L., 1991, Legionellosis, *Infectious disease clinics of North America*, 5 (3), 561-584.

Paszko-Kolva, C., Shamamat, M., Colwell, R.R., 1993, Effect of temperature on survival of *Legionella pneumophila* in the aquatic environment, *Microb releases*, 2 (2), 73-79.

- Pedahzur, R., Katzenelson, D., Barnea, N., 2000, The efficacy of long-lasting residual drinking water disinfectants based on hydrogen peroxide and silver, *Water science and technology*, 42, 293-298.
- Plouffe, J.F., Breiman, R.F., Fields, B.S., 2003, Azithromycin in the treatment of *Legionella* pneumonia requiring hospitalization. *Clinical infectious disease*, 37, 1475-1480.
- Plouffe, J.F., Para, M.F., Maher, W.E., Hackman, B., Webster, L., 1983, Subtypes of *Legionella pneumophila* serogroup 1 associated with different attack rates, *Lancet*, 2 (8351), 649-650.
- Reinthal, F.F., Sattler, J., Schaffler-Dulnig, K., Weinmayr, Marth, E., 1993, Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals, *Journal of clinical microbiology*, 31 (5), 1213-1216.
- Roig, J. and Rello, J., 2003, Legionnaires' disease: a rational approach to therapy, *Journal antimicrobial chemotherapy*, 51 (5), 1119-1129.
- Rosa, F., 1993, Legionnaires' disease: Prevention and Control. Troy, Mich.: Business News Publishing Co.
- Rosner, J.L. and Storz, G., 1997, Regulation of bacterial responses to oxidative stress, *Current topics in cellular regulation*, 35,163-177.
- Rota, M.C., Caporali, M.G., Caleo, G.M., Mandarino, G., Scaturro, G., Ricci, R.M., 2008, La legionellosi in Italia nel 2006, Rapporto annuale, *Istituto superiore di Sanita*, 21, 5-10.
- Saby, S., Vidal, A., Stuty, H., 2005, Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems, *Water science technology*, 52 (8), 15-28.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230 (4732), 1350-1354.
- Sanden G., Fields, B.S., Barbaree, J.M., Feeley, J.C., 1989, Viability of *Legionella pneumophila* in chlorine-free waters at elevated temperatures, *Current microbiology*, 61-65.
- Staley, J.T. and Konopka, A., 1985, Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats, *Annual review microbiology*, 39, 321-346.
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R., Hacker, J., 1997, Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, *Applied and environmental microbiology*, 63, 2047-2053.

- Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J., 2002, *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray, *FEMS microbiology*, 26 (2), 149-162.
- Stout, J.E., Best, M.G., Yu, V.L., Rihs, J.D., 1986, A note on symbiosis of *Legionella pneumophila* and *Tatlockia micdadei* with human respiratory flora, *Journal of applied microbiology*, 4, 297-299.
- Stout, J.E., Sens, K., Mietzner, S., Obman, A., Yu, V.L., 2005, Comparative activity of quinolones, macrolides, and ketolides against *Legionella* species using in vitro broth dilution and intracellular susceptibility testing, *International journal of antimicrobial agents*, 25, 302-307.
- Stout, J.E. and Yu, V.L., 1997, Legionellosis, *New England journal of medicine*, 337, 682-687.
- Stout, J.E., Yu, V.L., Best, M.G., 1985, Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems, *Applied and environmental microbiology*, 49 (1), 221-228.
- 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, *International biodeterioration&biodegradation*, 33 (3), 223-236.
- Swanson, M.S. and Hammer, B.K., 2000, *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoeba to macrophages, *Annual review of microbiology*, 54, 567-613.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K.H., 2000, Microbiological safety of drinking water, *Annual review microbiology*, 54, 81-127.
- Ta, Q.C., Stout, J.E., Yu, V.L., Wagener, M.M., 1995, Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods, *Journal of clinical microbiology*, 33 (8), 2118-2123.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., 2004, Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence, *Journal of applied microbiology*, 97 (5), 950-963.
- Tobin, J.O'H., Dunnill, M.S., French, M., Morris, P.J., Beare, J., Fisher-Hoch, S., Mitchell, R.G., Muers, M.F., 1980, Legionnaires' disease in a transplant unit: isolation of the causative agent from shower baths, *Lancet*, 19, 118-121.
- Türetgen, İ., 2005, Su sistemlerinde mikrobiyal biyofilm oluşumunun incelenmesi, Doktora Tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Uldum, S., ST-Martin, G., Molbak, K., 2010, *Legionella pneumonia* 2009, *EPI News*. <http://www.ssi.dk/English/News/EPI-NEWS/2010/No%2041%20-%202010.aspx> [Ziyaret Tarihi: 07.05.2014].

- Vatansever, C., 2011, Mikrobiyal biyofilm tabakası üzerine farklı fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Villari, P., Motti, E., Farullo, C., Torre, I., 1998, Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of *Legionella pneumophila* in water, *Letters applied microbiology*, 27 (2), 106-110.
- Villarino, A., Bouvet, O.M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., Grimont, P.A.D., 2000, Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat-or UV –killed cells, *Research microbiology*, 151, 755-768.
- Watson, J.M., Harrison, T.G., Joseph, C.A., 1992, Legionnaires' diseases surveillance: England and Wales, 1992, *Communicable disease report review*, 3 (9), R124-126.
- We'ry, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgenes, J.P., Garrelly, L. and Godon, J.J., 2008, Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in cooling tower facility, *Applied and environmental microbiology*, 74, 3030-3037.
- Wellinghausen, N., Frost, C., Marre, R., 2001, Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR, *Applied and environmental microbiology*, 67, 3985-3993.
- Wojcik-Fatla, A., Stojek, N.M., Dutkiewicz, J., 2012, Efficacy of the detection of *Legionella* in hot and cold water samples by culture and PCR, I. Standardization of methods, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 19 (2), 289-293.
- Yamamoto, Y., Klein, T.W., Friedman, H., 1992, Genetic control of macrophage susceptibility to infection by *Legionella pneumophila*, *FEMS*, 3, 137-146.
- Yu, V.L., 1997, Prevention and control of *Legionella*: An idea whose time has come, *Infectious diseases in clinical practice*, 6 (7), 420-421.
- Yu, V.L., Richard, M.D., Greenberg, M.D., 2004, Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired Legionellosis, *Chest*, 125, 2135-2139.
- Zacheus, O.M., Martikainen, P.J., 1996, Effect of heat flushing on the concentrations of *Legionella pneumophila* and other heterotrophic microbes in hot water systems of apartment buildings, *Canadian journal of microbiology*, 42, 811-818.
- Zanetti, F., Stampi, S., De Luca, G., Fateh-Moghadam, P., Antonietta, M., Sabattini, B., Checchi, L., 2000, Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units, *European journal oral sciences*, 108 (1), 22-28.

Zeybek, Z., Kimiran, A., Çotuk, A., 2003, Distribution of bacteria causing Legionnaires' disease at potable water in Istanbul, *Biologia Bratislava*, 58 (6), 1023-1027.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Adı Soyadı	İPEK ADA
Uyruğu	TC
Doğum tarihi, Yeri	BAKIRKÖY, 25.06.1988
Telefon	0535 739 22 26
E-mail	adaipekk@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji Anabilim Dalı/ Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı	2014
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Bahçelievler Lisesi	2005