



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İSTANBUL'DAKİ YÜZME HAVUZLARINDAN ALINAN SU
VE BİYOFİLM ÖRNEKLERİNİN MİKROBİYOLOJİK
ANALİZİ**

**Ayşenur TÜRKMEN
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı**

**Danışman
Yard. Doç. Dr. Zuhâl ZEYBEK**

Mayıs, 2012

İSTANBUL

Bu çalışma 14/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ



Üye (Danışman)

Yard.Doç.Dr.Zuhal ZEYBEK

Üye

Prof.Dr.Ayşın ÇOTUK



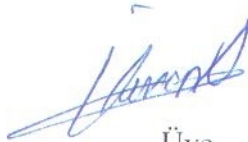
Üye

Doç.Dr.Ayten KİMİRAN ERDEM



Üye

Doç.Dr.Esra İLHAN SUNGUR



Üye

Doç.Dr.Ümran SOYOĞUL GÜRER

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yürütücü Sekreterliğinin 9269 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca değerli fikirleri ile bana yol gösteren, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan sevgili danışmanım Yard. Doç. Dr. Zuhâl ZEYBEK'e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her konuda desteğini hissettiğim Sayın Prof. Dr. Aşın ÇOTUK'a,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM, Doç. Dr. Esra İLHAN SUNGUR, Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN, Araş. Gör. Miray ÜSTÜNTÜRK, Araş. Gör. Duygu GÖKSAY KADAIÇILER, Araş. Gör. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR, Araş. Gör. Nazmiye Özlem ŞANLI YÜRÜDÜ, Araş. Gör. Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yanımda olan her konuda yardımlarını, dostluklarını hissettiğim değerli arkadaşlarım Uzman Biyolog Cansu VATANSEVER, Uzman Biyolog Tuğçe TÜCCAR, Biyolog Nesrin ÖZ, Biyolog İpek ADA, Biyolog Sena SİNAN, Biyolog Zaven AGAY ve Uzman Biyolog Ali Rıza BİNAY'a,

Tez çalışmalarım boyunca her konuda yardımını gördüğüm Yusuf ÖZDEMİR'e,

Yüksek lisans öğrenimim ve tüm hayatım boyunca yanımda olan, kararlarımı destekleyen sevgili babam Faik TÜRKMEN, sevgili annem Selma TÜRKMEN, sevgili anneannem Hayriye ZORLU, sevgili kardeşlerim Mustafa TÜRKMEN ve Mervenur TÜRKMEN'e

tüm kalbimle teşekkür ederim.

Mayıs, 2012

Ayşenur TÜRKMEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ	VI
SEMBOL LİSTESİ.....	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. YÜZME HAVUZLARININ TABİ OLACAĞI SAĞLIK ESASLARI.....	4
2.2. TOPLAM AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİLER.....	6
2.3. <i>LEGIONELLA</i> CİNSİ BAKTERİLER.....	6
2.4. BİYOFİLM VE EPS.....	8
2.5. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLER.....	10
2.6. KLOR.....	11
2.7. PH.....	13
2.8. SICAKLIK.....	13
2.9. ALKALİNİTE.....	14
2.10. İLETKENLİK.....	14
2.11. TOPLAM ÇÖZÜNÜŞ KATI MADDE (TÇM).....	14
2.12. FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİ.....	15
3. MALZEME VE YÖNTEM	17
3.1. ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	17
3.2. MİKROBİYOLOJİK ANALİZ.....	19
3.2.1. Örneklerin Kültür Yöntemine Göre İncelenmesi.....	19
3.2.1.1 Yüzme Havuz Sularından Toplam Aerobik Heterotrofik Bakterilerin Analizi.....	19
3.2.1.2 Yüzme Havuz Sularından Özgür Yaşayan Amiplerin Analizi.....	19
3.2.1.3. Yüzme Havuz Sularından Legionella Cinsi Bakterilerin Analizi.....	20
3.2.1.4 Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Toplam Aerobik	

<i>Heterotrofik Bakterilerin Analizi</i>	21
3.2.1.5 <i>Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Özgür Yaşayan</i>	
<i>Amiplerin Analizi</i>	22
3.2.1.6 <i>Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Legionella Cinsi</i>	
<i>Bakterilerin Analizi</i>	22
3.2.2. Örneklerin Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemine Göre	
İncelenmesi	22
3.2.2.1. <i>Yüzme Havuz Sularından Özgür Yaşayan Amiplerin Analizi</i>	22
3.2.2.2. <i>Yüzme Havuz Sularından Legionella Cinsi Bakterilerin Analizi</i>	23
3.2.2.3 <i>Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Özgür Yaşayan</i>	
<i>Amiplerin Analizi</i>	24
3.2.2.4 <i>Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Legionella Cinsi</i>	
<i>Bakterilerin Analizi</i>	25
3.3. FİZİKSEL VE KİMYASAL ANALİZ	27
3.3.1 Ekstrasellüler Polimerik Matriks (EPS) Eldesi ve Toplam Karbonhidrat	
Miktarının Tayini	27
3.3.2 Serbest Klor ve pH	28
3.3.3 Sıcaklık	28
3.3.4 Alkalinite	28
3.3.5 Toplam Çözünmüş Katı Madde Miktarı (TÇM)	29
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	29
3.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL	
MADDELER	30
3.5.1. Charcoal Yeast Ekstrakt (CYE)	30
3.5.2. BCYE Besiyeri Katkısı	30
3.5.3. Water Plate Count Agar	30
3.5.4. Non-nutrient Agar	30
3.5.5. Page Saline	31
3.5.6. Escherichia coli Süspansiyonu	31
3.5.7 %0.5'lik Sodyum Tiyosülfat	31
3.5.8 HCl-KCl Asit	31
3.5.9 3xFosfat Tamponu (PBS)	31
3.5.10 1x PBS	32
3.5.11 5 M Sodyum Klorür	32
3.5.12 1 M Sodyum Hidroksit	32
3.5.13 10 M Sodyum Hidroksit	32

3.5.14 1 M Hidrojen Klorür.....	32
3.5.15 %10 Sodyumdodecylsulfate (SDS).....	32
3.5.16 1 M Tris HCl.....	32
3.5.17 0.5 M EDTA.....	33
3.5.18 Tris EDTA.....	33
3.5.19 Paraformaldehit (PFA).....	33
3.5.20 Hibridizasyon Tamponu.....	33
3.5.21 Yıkama Tamponu.....	34
3.5.22 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI).....	34
3.5.23 Fenolftalein İndikatör Çözeltisi.....	34
3.5.24 Metil Oranj İndikatör Çözeltisi.....	34
3.5.25 NaCl-Formaldehit Çözeltisi.....	34
3.5.26 % 5'lik Fenol Çözeltisi.....	35
3.5.27 0.1 N Hidroklorik Asit Çözeltisi.....	35
3.5.28 0.01 M Potasyum Klorür.....	35
3.5.29 10 M Potasyum Hidroksit.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. KÜLTÜR YÖNTEMİNE GÖRE SONUÇLAR.....	37
4.1.1. Yüzme Havuzlarında Kültür Yöntemine Göre Saptanan Toplam Aerobik Heterotrofik Bakteriler.....	37
4.1.2. Yüzme Havuzlarında Kültür Yöntemine Göre Saptanan Özgür Yaşayan Amipler.....	39
4.1.3. Yüzme Havuzlarında Kültür Yöntemine Göre Saptanan <i>Legionella</i> Cinsi Bakteriler.....	41
4.2. FISH YÖNTEMİNE GÖRE SONUÇLAR.....	42
4.2.1. Yüzme Havuzlarında FISH Yöntemine Göre Saptanan Özgür Yaşayan Amipler.....	42
4.2.2. Yüzme Havuzlarında FISH Yöntemine Göre Saptanan <i>Legionella</i> Cinsi Bakteriler.....	45
4.3. ANKET SONUÇLARINA GÖRE YÜZME HAVUZLARININ ÖZELLİKLERİ...47	
4.4. YÜZME HAVUZLARININ FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....49	
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1:	Membran filtrasyon cihazı.....	20
Şekil 3.2:	Peristaltik pompaya sahip filtre sistemi.....	21
Şekil 3.3:	6 kuyucuklu teflon lam.....	23
Şekil 3.4:	Fenol sülfürik asit yöntemiyle glukoz konsantrasyonlarından hazırlanan standart eğri.....	28
Şekil 4.1:	Water PCA besiyerinde üreyen toplam aerobik heterotrofik bakteriler.....	38
Şekil 4.2:	NNA besiyerinde üremiş özgür yaşayan amiplerin ışık mikroskobunda görüntüsü (100x) a) Trofozoit, b) Kist.....	40
Şekil 4.3:	<i>Legionella</i> cinsi bakteriler a) BCYE agar Petrisinde b) Gram boyama (1000x).....	41
Şekil 4.4:	<i>Acanthamoeba</i> 'nin epifloresan mikroskoptaki görüntüleri a) EUK516-CY3 (500x) b) ACANTHA-FAM (500x) c) ACANTHA-DAPI (500x) d) ACANTHA-FAM (500x) e) ACANTHA-DAPI (1000x) f) ACANTHA-FAM (1000x).....	43
Şekil 4.5:	<i>Hartmannella</i> 'nin epifloresan mikroskoptaki görüntüleri a) HART 498-DAPI (500x) b) HART 498-FAM (500x)	44
Şekil 4.6:	<i>Legionella</i> cinsi bakterilerin epifloresan mikroskoptaki görüntüleri a,c) Leg 705-DAPI (500x) b, d) Leg 705-FAM (500x).....	46
Şekil 4.7:	<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 1'in epifloresan mikroskoptaki görüntüsü a, c) Leg PNE 1- DAPI (1000x) b, d) Leg PNE1-CY3 (1000x)	47

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1:	Yüzme havuzlarında bulunabilen mikroorganizmalar ve sebep oldukları hastalıklar.....	4
Tablo 2.2:	Yüzme havuz sularının mikrobiyolojik özellikleri.....	4
Tablo 2.3:	Yüzme havuz sularının fiziksel özellikleri.....	5
Tablo 2.4:	Yüzme havuz sularının kimyasal özellikleri.....	5
Tablo 3.1:	Havuz bilgi formu.....	18
Tablo 3.2:	FISH deneyinde kullanılan probalar.....	26
Tablo 4.1:	İncelenen havuzlarda kültür yöntemine göre saptanan mikroorganizmaların dağılımı.....	37
Tablo 4.2:	İncelenen havuzlarda FISH yöntemine göre saptanan mikroorganizmaların dağılımı.....	37
Tablo 4.3:	Yüzme havuzlarında toplam aerobik heterotrofik bakterilerin dağılımı.....	38
Tablo 4.4:	Yüzme havuzlarında özgür yaşayan amiplerin dağılımı.....	39
Tablo 4.5:	Yüzme havuzlarında <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin dağılımı.....	41
Tablo 4.6:	FISH yöntemine göre saptanan özgür yaşayan amipler.....	42
Tablo 4.7:	FISH yöntemine göre saptanan <i>Legionella</i> cinsi bakteriler.....	45
Tablo 4.8:	Anket sonuçlarına göre yüzme havuzlarının özellikleri.....	48
Tablo 4.9:	İncelenen yüzme havuzlarına ait fiziksel ve kimyasal değerler.....	49
Tablo 4.10:	Biyofilm örneklerindeki toplam aerobik heterotrofik bakteriler ve EPS glukoz konsantrasyonları.....	50
Tablo 4.11:	Havuzlara ait toplam aerobik heterotrofik bakteriler (TAHB) ile fiziksel ve kimyasal değerler.....	51
Tablo 4.12:	Havuzlara ait özgür yaşayan amipler ile fiziksel ve kimyasal değerler.....	52
Tablo 4.13:	Havuzlara ait <i>Legionella</i> cinsi bakteriler ile fiziksel ve kimyasal değerler.....	53

SEMBOL LİSTESİ

kob	: koloni oluşturan birim
μm	: mikrometre
μl	: mikrolitre
ml	: mililitre
g	: gram
dk	: dakika
$^{\circ}\text{C}$: santigrat
FISH	: floresan in situ hibridizasyon
TÇM	: toplam çözünmüş katı madde
TAHB	: toplam aerobik heterotrofik bakteri
ÖYA	: özgür yaşayan amip
Water PCA	: water plate count agar
NNA	: non-nutrient agar
BCYE	: Buffered charcoal yeast extract
TSA	: tryptone soya agar

ÖZET

İSTANBUL'DAKİ YÜZME HAVUZLARINDAN ALINAN SU VE BİYOFİLM ÖRNEKLERİNİN MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ

Günümüzde insanlar yüzme havuzlarını spor, eğlence, sağlık amacıyla sıklıkla kullanmakta ve yüzme esnasında havuzlardaki çeşitli mikroorganizmalar tarafından olumsuz yönde etkilenmektedirler. Bu mikroorganizmalardan olan ve suyun kirliliği hakkında bilgi veren toplam aerobik heterotrofik bakterilerin sayısının ≤ 200 kob/ml olması gerektiği, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından bir yönetmelik ile yayınlanmıştır. Bu yönetmelikte yer almayan, *Legionella* cinsi bakteriler ile özgür yaşayan amipler de yüzme esnasında insan sağlığını tehdit edebilecek diğer mikroorganizmalar arasındadır. Birçok su ortamında sıklıkla rastlanan bu mikroorganizmalar, uygun ortam bulduklarında havuz sularında da serbest halde yaşayabilirler. Ayrıca havuzların çeşitli yüzeylerinde oluşmuş biyofilm tabakasına da tutunarak sayılarını arttırabilir hatta zamanla bu tabakadan koparak tekrar suya geçebilirler.

Yüzme havuzlarının sağlık riski bakımından değerlendirilmesi amacıyla çalışmada 25 adet yüzme havuzuna ait hem su (25) hem biyofilm örneklerinde (25) toplam aerobik heterotrofik bakteriler (TAHB), *Legionella* cinsi bakteriler ve özgür yaşayan amipler (ÖYA) araştırılmıştır. Çalışmada hem kültür hem floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılmıştır. Su ve biyofilm örneklerinin kültür yöntemine göre incelenmesinde toplam aerobik heterotrofik bakteriler için water plate count agar, *Legionella* cinsi bakteriler için buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar, özgür yaşayan amipler için non nutrient agar (NNA) kullanılmıştır. Aynı örneklerin FISH yöntemine göre incelenmesinde, özgür yaşayan amiplerden *Acanthamoeba* ve *Hartmanella* cinsleri için spesifik olan sırasıyla ACANTHA ve HART 498 problemleri ile *Legionella* cinsi bakteriler için spesifik olan Leg 705 ve *Legionella pneumophila* serogrup 1 için spesifik olan Leg PNE1 problemleri kullanılmıştır.

İncelenen havuz sularının 20'sinde (%80), toplam aerobik heterotrofik bakteriler ≤ 200 kob/ml olarak saptanmıştır. *Legionella* cinsi bakterilere kültür yöntemine göre su ve biyofilm örneklerinde sırasıyla %0 ve %4 oranında rastlanırken, FISH yöntemine göre %24 ve %28 oranında rastlanmıştır. Özgür yaşayan amiplere kültür yöntemine göre su örneklerinin %16'sında biyofilm örneklerinin %8'inde rastlanırken FISH yöntemiyle inceleme sonucunda su ve biyofilm örneklerinde sırasıyla %28 ve %20 *Acanthamoeba*, %0 ve %4 *Hartmanella* cinsi özgür yaşayan amipler tespit edilmiştir.

Çalışmanın sonuçlarından ilimizde bulunan ve kontrolleri yapılan havuzların T.C. Sağlık Bakanlığı'nın yayınlamış olduğu yönetmeliğe göre genellikle temiz olduğu anlaşılmıştır. Mikroorganizmaların tespiti için FISH yönteminin kültür yöntemine göre daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla beraber mikroorganizmaların elde edilmesi için kültür yönteminin altın standart olduğu bir kez daha anlaşılmıştır. Nitekim

Çalışma esnasında bu yöntemle izole edilen tüm bakteri ve protozoonların patojen olup olmadıklarının araştırılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

SUMMARY

THE MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF WATER AND BIOFILM SAMPLES TAKEN FROM SWIMMING POOLS IN İSTANBUL

Today people use the swimming pools frequently for sport, fun and health. During the swimming activity they meet with various microorganisms. Number of total aerobic heterotrophic bacteria group which is one of the these microorganisms and gives information about the water pollution, should be ≤ 200 cfu / ml according to the a regulation which is issued by the Ministry of Health. *Legionella* bacteria and free-living amoeba which are not included in this regulation, are among the other microorganisms that might threat human health during the swimming. These microorganisms are often found in many aquatic environments and when they find a suitable environment, they can live freely in the water of the pools. In addition, they may increase their number with holding the biofilm layer which is formed on the various surfaces of the pools. Even they can pass into the water again with break from this layer in time.

We aimed to investigate total aerobic heterotrophic bacteria (TAHB), *Legionella* bacteria and free living amoebae (FLA) in both water and biofilm samples taken from 25 swimming pools. For this purpose, either culture or fluorescent in situ hybridization (FISH) methods were used. The examination of water and biofilm samples by culture method, were carried out using plate count agar for the total aerobic heterotrophic bacteria, BCYE agar for *Legionella* bacteria, non-nutrient agar (NNA) for the free-living amoebae. For the FISH method we used ACANTHA and HART 498 probes specific for free-living amoebae, respectively *Acanthamoeba* and *Hartmanella* genera, and also Leg 705 and Leg PNE1 probes specific for *Legionella* type bacteria.

The count of total aerobic heterotrophic bacteria were determined as ≤ 200 cfu/ml in 20 of examined pool water (80%), *Legionella* bacteria were detected in 0% and 4% of the water and biofilm samples, respectively by culture method. The results of FISH analyses showed that *Legionella* bacteria were abundant as a result of FISH analysis, in the samples of water and biofilm, respectively 24% and 28% *Legionella* bacteria. Free living amoebae were detected 16% and 8% of the water and biofilm samples, respectively by culture method. The results of FISH analyses showed that free living amoebae were abundant as a result of FISH analysis, in the samples of water and biofilm, respectively 28% and 20% *Acanthamoeba*, 0% and 4% *Hartmanella* free-living type amoebae have been identified.

The results of this study shows that, according to the regulations published by the Ministry of Health, the pools which were controlled and located in the city are generally clean. FISH method for the detection of microorganisms are found to be superior than the method of culture. However, to obtain of microorganisms, it's again understood that

the culture method is the gold standard. Indeed, new studies are needed to investigate all the isolated bacteria and protozoa whether they are pathogenic or not with this method.

1. GİRİŞ

Ülkemizde turizmin yaygın olduğu bölgelerde, otellerde, sitelerde, özel konutlarda, okullarda, spor salonlarında yüzme havuzlarını sıklıkla görmek mümkündür. Bakımı, temizliği ve dezenfeksiyonu iyi yapılmayan yüzme havuzları birçok mikroorganizmanın kaynağı haline gelip, pek çok hastalığa sebebiyet verebilir. Bu mikroorganizmalardan, toplam aerobik heterotrofik bakteriler havuz sularının kirliliğinin belirlenmesinde kullanılan önemli kriterlerdir. Ayrıca su ortamlarında yaşayan ve aerosol halde suyun solunmasıyla insanlara bulaşarak Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşi gibi hastalıklara sebep olan *Legionella* cinsi bakterilerin yüzme havuzlarında da bulunması mümkündür. Bu bakterilere ek olarak *Acanthamoeba* gibi özgür yaşayan amipler de pek çok su ortamında yaşayabildiği gibi yüzme havuzlarında da bulunarak granülatöz amibik ensefalit (GAE), keratit ve deri ile kemikte süregelen granülatöz infeksiyonlara neden olabilirler. Bu protozoonun insan vücuduna giriş yolu burundur ve bu giriş yüzme, dalma veya buruna su çekme esnasında rahatlıkla gerçekleşir. Ayrıca *Legionella* cinsi bakteriler, *Acanthamoeba* gibi özgür yaşayan amiplerin varlığında onların hücre içlerine girip çoğalma yeteneklerine sahip olduklarından havuz sularında bu iki mikroorganizmanın birlikte bulunması bu havuzlarda yüzen insanlar için daha büyük sağlık riski oluşturabilir. Havuz sularındaki serbest klor, sıcaklık, pH, iletkenlik, toplam çözülmüş madde miktarı, alkalinite gibi fiziksel ve kimyasal değerler de havuzların sağlıklı olup olmadığının anlaşılmasında kullanılan diğer parametrelerdir.

Yüzme havuz sularının mikroorganizmalar açısından incelenmesinde, su örneklerinin yanı sıra havuzların çeşitli yüzeylerinden alınan biyofilm örneklerinin de incelenmesi önemlidir. Çünkü havuzlarda biyofilm tabakası, derz aralarında, havuz içi sirkülasyonun oluşmadığı ölü bölgelerde, kum filtrelerinin içinde kumların üzerinde rahatlıkla oluşabilmektedir.

Bu proje kapsamında İstanbul'daki yüzme havuzlarından alınan su ve biyofilm örneklerinde toplam aerobik heterotrofik bakterilerin, *Legionella* cinsi bakterilerin ve özgür yaşayan amiplerin varlığının/sayılarının araştırılması amaçlanmıştır. Böylece gerek spor, gerek eğlence amaçlı olarak kullanılan yüzme havuzlarının insan sağlığı açısından tehlikeli olup olmadıkları hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Ayrıca örnek alınan havuzların serbest klor, sıcaklık, pH, alkalinite, iletkenlik, toplam çözünmüş madde miktarı ve EPS ölçümleri de yapılarak bu parametreler ile mikroorganizmalar arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.

Mikroorganizmaların tespit edilmesinde kültüre dayalı olan ve kültüre dayalı olmayan metotlar rahatlıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada havuzlardan alınan örneklerde mikroorganizmaların varlığı/sayısı araştırılırken kültür yönteminin yanı sıra moleküler yöntemlerden olan FISH yöntemi kullanılmış ve bu yöntemin daha avantajlı olduğu görülmüştür. Ancak çalışmada saptanan tüm mikroorganizmaların patojen olup olmadıklarının araştırılması planlandığından, bu planın gerçekleşebilmesi için mikroorganizmaların izole edilmiş olması şarttır. Bu da ancak kültür metodunu kullanmak ile mümkündür.

2. GENEL KISIMLAR

Yüzme havuzları; eğitim, eğlence ve tedavi gibi çeşitli amaçlara yönelik olarak işletilen alanlardır. Konumlarına göre; açık, kapalı ve açılıp kapanabilen havuzlar, kullanım amaçlarına göre; özel, yarı özel (otel, okul, sağlık kulüpleri) ve genel havuzlar (belediye havuzları), yapım tekniğine göre; hazır, betonarme ve prefabrik havuzlar, kullanım sularına göre; tatlı su, deniz suyu, mineral su kullanan havuzlar olarak gruplandırılırlar [1, 2].

Havuz suyunun en azından berraklığını bozan unsurların tümünün meydana getirdiği etkiye kirlenme denir. Havuzlarda kirlenme mineral ve organik tabiatlı olabilir. Mineral tabiatlı kirlenme etkenleri havuz çevresinde bulunabilen kum, kil, toprak gibi maddelerdir, tehlike oluşturmazlar, havuz suyunun berraklığını olumsuz yönde etkilerler, filtrasyon ile uzaklaştırılırlar. Organik tabiatlı kirlenme ise yaprak, böcek, polen, yosun, bakteri, mantar, virüs, parazit gibi etkenler tarafından oluşturulur. Bu faktörler havuz suyunda bulanıklığa ve daha da önemlisi patojen mikroorganizmaların üremesine neden olarak tehlike oluştururlar. Filtrasyonla ve kimyasal maddelerle muamele edilerek uzaklaştırılırlar. Havuza giren kişiler vücutlarındaki organik ve inorganik kirlilikleri havuz suyuna bırakırlar. Bunlar özellikle saç, kepek, cilt pudrası, sabun parçaları, kozmetik, sümük, ter, tükürük, idrar, dışkı, bakteri, mantar, virüs, parazit gibi mikroorganizmalardır. Açık havuzlarda suyun kirlilik yükü vücuda sürülen güneş yağları, kum, toprak, ot, yaprak gibi çevresel faktörlerle de artar [1, 2, 3].

Havuz sularındaki mikroorganizmalar su sıcaklığının uygun olduğu durumlarda çoğalarak suyu sağlıksız hale getirirler. Bu mikroorganizmalar arasında; *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium marinum*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Neisseria* ve *Legionella* gibi bakteriler, *Acanthamoeba*, *Hartmanella*, *Naegleria* gibi özgür yaşayan amipler,

Molluscipoxvirüs, Papillomavirüs, Adenovirüs, Hepatit A, Norovirüs, Enterovirüs gibi virüsler, *Trichophyton*, *Epidermophyton floccosum* gibi mantarlar bulunmaktadır [2, 4, 5]. Bu mikroorganizmaların yüzücülerde Tablo 2.1’de gösterilen hastalıklara neden olduğu belirtilmiştir [6].

Tablo 2.1: Yüzme havuzlarında bulunabilen mikroorganizmalar ve sebep oldukları hastalıklar [6]

HASTALIK	SEBEP OLAN MİKROORGANİZMA
Foliküler dermatit (deri yangısı), yüksek ateş	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Deri, göz ve kulak enfeksiyonu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , Papilloma virus, <i>Acanthamoeba</i>
Solunum yolu enfeksiyonları	<i>Legionella</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., Enterobacteriaceae, Adenovirus
Genital ve üriner sistemle ilgili enfeksiyonlar	<i>Pseudomonas</i> spp, Enterobacteriaceae, <i>Trichomonas</i> , maya ve mantar
Mide ve bağırsakla ilgili enfeksiyonlar	<i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidium</i> , Enterobacteriaceae, <i>Klebsiella</i> , <i>Yersinia</i>

2.1. YÜZME HAVUZLARININ TABİ OLACAĞI SAĞLIK ESASLARI

Ülkemizde yüzme havuzlarının tabi olacağı sağlık esasları ve şartları T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından son olarak 6 Mart 2011 tarihinde resmi gazetede yayımlanan yönetmelik ile bildirilmiştir [7]. Bu yönetmelik yüzme havuzlarında olması gereken mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri kapsamaktadır (Tablo 2.2, 2.3, 2.4).

Tablo 2.2: Yüzme havuz sularının mikrobiyolojik özellikleri

Parametre	Önerilen metot ¹	Analiz sıklığı ²	Sınır değerler
Toplam koloni sayısı	TS EN ISO 6222	Ayda bir defa	≤ 200 kob/ml
Toplam koliform bakteri	TS EN ISO 9308-1		0/100 ml
<i>E. coli</i>	TS EN ISO 9308-1		0/100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TS EN ISO 16266		0/100 ml

1. Laboratuvarlar önerilen metot dışında, referanslarını göstermek şartı ile başka bir metodu da kullanabilir.

2. Yüzme havuzu kullanımının yoğun olduğu dönemlerde analiz sıklığı ayda iki defa olmalıdır.

Tablo 2.3: Yüzme havuz sularının fiziksel özellikleri

Parametre	Analiz aralığı	İstenen değer	
Renk	Ayda bir defa	Pt/Co olarak 10 birim	
Bulanıklık		SiO ₂ veya Jakson birimi olarak 5 birim	
Sıcaklık	Ayda bir defa	En az	En çok
	Kapalı	26 °C	28 °C
	Açık	26 °C	38 °C

Pt/Co: Platin/kobalt

SiO₂ / Jakson: Bulanıklık birimi

Tablo 2.4: Yüzme havuz sularının kimyasal özellikleri

Parametre	Analiz aralığı	Birim	Sınır değerler		
			En az	En çok	
pH	Ayda bir defa	mg/L	6,5	7,8	
Amonyum				0,5	
Nitrit				0,5	
Nitrat				50	
Siyanürik asit ¹				100	
Bakır				1	
Alüminyum				0,2	
Hidrojen peroksit ²				40	80
Toplam alkalinite (CaCO ₃)				30	180
Bağlı klor ¹					0,2
Kapalı havuzlar için serbest klor ¹				1	1,5
Açık havuzlar için serbest klor ¹				1	3
Serbest klor ²				0,3	0,6

1. Suyun dezenfeksiyonunda klor ve klorlu bileşiklerin kullanıldığı havuzlarda bakılır.

2. Suyun dezenfeksiyonu için ozon, UV, klordioksit ve diğer dezenfeksiyon sistemlerinin kullanıldığı havuzlarda bakılır.

2.2. TOPLAM AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİLER

Toplam aerobik heterotrofik bakteri terimi, çeşitli kaynaklarda toplam canlı bakteri, toplam koloni sayısı ya da plate count olarak adlandırılmaktadır [8, 9]. Havuz sularındaki toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının belirlenmesi için genellikle kullanılan metot T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından önerilen TS EN ISO 6222' dir. Bu metot ile suda yaşayan ve kültürü yapılabilen mikroorganizmaların, 36°C ve 22°C'de aerobik inkübasyonu sonucu besiyerinde oluşan kolonilerinin sayılması mümkün olur. Böylece suyun kirlilik durumu ve havuzlara uygulanan dezenfektan dozunun kirlilik kontrolünde yeterli olup olmadığı gösterilir [8, 10]. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yüzme havuzlarının denetimi konusunda en son 6 Mart 2011 tarihinde yayınlanan yönetmeliğe göre havuzlarda olması gereken toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı ≤ 200 kob/ml olarak belirlenmiştir [10]. Bu bakteri sayısı, havuzda fazla yüzücü olduğu ya da suyun klor, sıcaklık, pH, alkalinite, iletkenlik, toplam çözünmüş katı madde (TÇM) gibi değerlerinde sapmalar olduğu durumlarda yükselebilir. Ayrıca havuz filtrelerinde ya da havuz mühendisliğinde oluşan hatalar da (havuz suyunun atık suyla kirlenmesi gibi) havuzlardaki bu bakterilerin sayısının artmasında etkilidir. Böyle yüzme havuzlarının patojen mikroorganizmalarla kirliliği yüzücülerde deri, göz, kulak, enfeksiyonlarına, solunum, genital, üriner, mide ve barsak sistemiyle ilgili rahatsızlıklara neden olmaktadır [8].

2.3. LEGIONELLA CİNSİ BAKTERİLER

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın yukarıda belirtilen yüzme havuzlarıyla ilgili yönetmeliğinde yer almayan *Legionella* cinsi bakteriler, yüzme havuzlarını kullanan kişiler için risk oluşturup pnömoni şeklinde ciddi hastalıklara yol açabilirler. Bu bakteriler göl, nehir, yer altı, deniz suları gibi doğal çevrelerde yaşayabildiği gibi sıcak ve soğuk su depolama tankları, soğutma kuleleri, sıcak su tesisatları, itfaiye donanımları, klimalar, yüzme havuzları ve kaplıcalar gibi insan yapımı su sistemlerinde de su sıcaklığının uygun olması nedeniyle rahatlıkla üreyebilmektedirler [1, 3, 4].

Legionella cinsi bakteriler, Legionellaceae ailesinin üyesi olup Gram negatif, çomak şeklinde, aerob, hareketli, sporsuz, kapsülsüz bakterilerdir. Bakteri klora dirençli, aside toleranslıdır ve pH'nın 2.7-8.3 arasında olduğu çevresel ortamlardan izole edilebilirler.

35 – 37 °C üremeleri için uygun sıcaklık aralığıdır [1]. Bu güne kadar tanımlanmış 59 türü ve 70 serogrubu vardır. *Legionella* türlerinin içerisinde en patojen tür *L. pneumophila*'dır. *L. pneumophila* infeksiyonlarından ise en fazla *L. pneumophila* serogrup 1 sorumludur [11, 12].

Legionella cinsi bakteriler aerosol halde suyun solunması ile vücuda alınıp solunum sisteminde üreyip hastalık meydana getirebilirler. Bu bakteriler tarafından meydana getirilen legionelloz 2 farklı klinik tablo şeklinde görülür. Bunlardan ilki Lejyoner hastalığıdır. İlk olarak 1976 yılında Amerika Lejyon toplantısının yapıldığı Philadelphia'da bir otelde ortaya çıkan salgın sonucu tespit edilmiştir [1, 13, 14, 15]. Hastalığın belirtileri bakterinin alınmasından sonraki 2-10 gün arasında ortaya çıkar. Hastada halsizlik ve yorgunluk yakınması olur, ateş yükselir (>38.5°C), alt solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gelişir, baş ağrısı, kaslarda ağrı, öksürük, göğüs ağrısı ve nefes darlığı ortaya çıkar [14, 16]. Yapılan çalışmalarda ölümlerle sonuçlanan hastalık oranı % 12 olarak gösterilmiştir. Bu oranı solunum yolu direnci veya genel vücut direnci zayıf olan kişiler oluşturmaktadır. 45 yaş üzeri kişiler, sigara kullananlar, alkol tüketenler, şeker, kanser hastaları, kronik böbrek ya da solunum rahatsızlığı bulunanların hastalığa yakalanma riski yüksektir. Ayrıca erkeklerde hastalığa yakalanma riski kadınlardan daha yüksektir [3, 4, 14, 17].

Legionella bakterisinin meydana getirdiği hastalıklardan diğeri Pontiac ateşidir. Grip benzeri seyreden bir hastalıktır ve inkübasyon periyodu 2-3 gündür. En sık belirtiler; halsizlik, adale ağrıları, ateş, üşüme, titreme ve baş ağrısıdır [14].

Yüzme havuzlarında *Legionella* cinsi bakteriler gibi patojen mikroorganizmaların büyümesine olanak sağlayan şartlar, hacim başına düşen organik madde miktarı, klor miktarı, pH değeri ve su sıcaklığıdır. Örneğin 25°C'nin üzerindeki sıcaklık ve organik maddeler dezenfeksiyonun etkisini azalttığından *Legionella* cinsi bakterilerin havuz sularında yaşama şansını arttırmakta, yüzme esnasında da rahatlıkla solunum yolundan vücuda girebilmektedir [1, 3, 17].

Havuzlarda mikrobiyal büyümenin önlenmesi için su kaynaklarının kontrolü önemlidir. Eğer su kaynağı heterotrofik mikroorganizma ya da fazla miktarda organik madde

içeriyorsa havuzun depolama sistemleri, su altında bulunan ışıklandırmalar gibi sıcaklığın uygun olduğu bölgelerde *Legionella* türlerinin üremesi için uygun koşullar sağlanır. Sıcak su sistemlerinin dizaynı ve yerleşimi mikrobiyal büyümeyi kontrol edecek şekilde yapılmamışsa sistem *Legionella* cinsi bakterilerin üremesi açısından da uygun hale gelmiş olur. Havuzlarda *Legionella* cinsi bakterilerin daha çok sistemdeki boru içleri, kör nokta gibi suyun durgun olduğu kısımlarda bulunduğu görülmüştür. Bakterinin bu sularda tespit edilmesi halinde, filtrasyon ve dezenfeksiyon yöntemleri kontrol edilmeli, havalandırma ve boru sistemleriyle ilgili ekipmanların fiziksel temizliği yapılmalıdır [5]. Bu kısımların temizliğinin ve dezenfeksiyonunun zor olması *Legionella* cinsi bakterilerin kontrolünü de güçleştirmektedir. Suda bulunan bu bakteriler zamanla suyun yavaş akışı ve durgunluğu nedeniyle çeşitli yüzeylerde, zeminlerde, kör noktalarda biyofilm oluşmasına neden olmaktadır [1].

2.4. BİYOFİLM VE EPS

Yüzeyle ilişkili mikrobiyal aktivite ve kolonizasyon ya da diğer bir deyişle biyofilm, canlı ya da cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir [18]. Biyofilm oluşumu, doğal ve yapay çevrelerde, farklı yüzeylerde meydana gelmektedir [1, 4].

Mikroorganizmalar su ortamlarında serbest olmak yerine bir yüzeye tutunmayı tercih ederler. Tutunduğu yüzeyin besin kaynağı olması, suyun akışıyla tutunduğu yere besin maddesi taşınması ya da su akışı sayesinde bol oksijen bulunması bunun nedenleri arasındadır. Biyofilmdeki hücreler, yakınında bulunan diğer hücrelere bağlanarak büyür ve ürerler [1, 19]. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar hücre dışına saldırdığı maddeler ile jelsi tabaka olan ekstrasellüler polimerik matriks (EPS) oluştururlar. Mikroorganizmalar polisakkarit yapıdaki bu matriks içine gömülüdür. Bu tabaka organizmaya besin, sağlamlık sağlar ve toksik etkilerden korur. Matriks içindeki besin, pH, oksijen değişimi heterojen populasyonda değişik ihtiyaçları olan farklı mikroorganizmaların gelişimine olanak sağlamaktadır. EPS, biyofilm tabakası içindeki total organik karbon miktarının % 50-90'ını oluşturur [1, 20, 21].

Biyofilm ortamdaki besin ve gaz değişimini kolaylaştırır ve mikroorganizmaları yalnız biyositlerin etkisinden değil sıcaklık ve fiziksel değişimlerden de korur. Biyofilm tabakasının oluşumundaki ilk basamak yaklaşımadır. Bakteri, tutunacağı yüzeye aktif hareket ya da konveksiyon hareketi ile yaklaşır. Yüzey yeterli uzaklıkta olduğu anda da bakteri itici ve çekici güçlerin etkisiyle yüzeye yapışır ya da yüzeyden itilir. Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde bakterinin tutunmasını kolaylaştıran hücre dışı yapıları, pH, besin miktarı, sıcaklık etkili role sahiptir. Bakteri, sahip olduğu hücre dışı uzantılar ya da saldığı polimerler ile yüzeye sıkıca bağlanır. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokoloniler de büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur [4]. Biyofilmin gelişmesi sonrasında ince bir tabaka biyofilmden ayrılarak suya geçer. Bu aktivite ile biyofilm içindeki mikroorganizmaların sistem suyuna geçmesi ve sistemin diğer parçalarına ulaşarak uygun yerlerde kolonize olması sağlanır [1].

Su sistemlerinde bakterilerin çoğalması ve biyofilm tabakasının oluşumu halk sağlığı açısından büyük bir problem oluşturur. Biyofilm tabakası, filtrasyon sistemini bozduğu için havuz suyu kalitesinin bozulmasına da neden olmaktadır. Dezenfektanlara karşı dayanımının yüksek olmasının yanı sıra, karmaşık fiziksel yapısı ve dinamik doğasından ötürü ölçümü, izlenmesi, kontrolü ve mücadelesi çok zordur [4].

Havuzlarda biyofilm tabakası, derz aralarında, havuz içi su dolaşımının oluşmadığı ölü bölgelerde, boruların bağlantı sisteminde ve kum filtrelerinin içinde kumların üstünde oluşabilmektedir. Özellikle kışın kullanılmayan havuz sistemlerinde ve kum filtrelerinde biyofilm oluşumu daha fazla gözlenmektedir. Havuzlarda biyofilm oluşumunu engellemek için yapılabilecekler arasında; havuz duvarlarının sürekli fırçalanması, düzenli olarak yosun önleyicilerin kullanılması, kum filtrelerine periyodik aralıklarla klor koyulması ve havuz suyuna düzenli aralıklarla şok klorlama yapılması sayılabilir [4].

Biyofilmde yaşayan pek çok mikroorganizma arasında *Legionella* cinsi bakterilerin yanı sıra özgür yaşayan amipler de sayılmaktadır. Steril musluk suyu ve steril distile su ile yapılan çalışmalar, *L. pneumophila*'nın bu ortamlarda canlılığını koruduğu halde çoğalamadığını göstermiştir. Biyofilmdeki özgür yaşayan amiplerin, *Legionella* cinsi

bakterilerin doğal ve yapay çevrelerde büyümesi ve canlılığını koruması için önemli araçlar olduğu, onları biyositlerin, dezenfektanların etkisinden, sıcaklıktan koruduğu bilinmektedir [1, 22, 23, 24, 25, 26].

2.5. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLER

Özgür yaşayan amipler (ÖYA) su ve toprak habitatlarında yaygın olarak bulunurlar. *Acanthamoeba*, *Naegleria* ve *Hartmanella* cinsi özgür yaşayan amipler insanlarda ciddi enfeksiyonlara, hatta ölümlere yol açabilirler. Bu organizmaların insanların kullandığı sulardaki varlığı ve kontrolü genel sağlık mikrobiyolojisi açısından oldukça önemlidir [27].

Acanthamoeba cinsi amipler toprakta, suda, çamurda, havada, göllerde, denizlerde musluk sularında, kontakt lens solüsyonlarında, diş ünitelerinde buldukları gibi yüzme havuzlarında da bulunabilirler [27, 28, 29, 30]. Yaşam döngülerinde kist ve trofozoit olmak üzere iki formu vardır. Trofozoit şekli hareketli ve beslenen formu olup 24-56 µm büyüklüğündedir ve mitoz bölünmeyle çoğalır. Sahip olduğu akantapod tipi yalancı ayaklarla *Naegleria* türlerinden ayırt edilir. Bakteri, mantar, alg gibi organizmaları fagosite ederek beslenir. Kötü koşullar altında kist forma dönüşebilir. *Acanthamoeba* kistleri tipik bir görünüme sahiptir ve kalın bir duvarla sarıdır. Kist çapı türe bağlı olarak 15–28 µm arasında olabilir. Dış kist duvarı düz veya buruşuk görünümde içteki ise yıldız, beşgen veya altıgen görünümündedir [24, 29]. Uygun sıcaklık, ortamda hazır bakteri bulunması gibi koşullarda kist çatlar ve trofozoit form ortaya çıkar. *Acanthamoeba* kistleri sıcaklık, besinsizlik, pH değişimleri, dezenfeksiyon ve kurumaya karşı dirençlidir. Buldukları sistemden filtrasyon ile uzaklaştırılabilirler [24, 27].

Acanthamoeba türleri insanlarda merkezi sinir sistemi ve korneayı etkileyen 2 önemli enfeksiyon oluştururlar. Bunlardan Granülatöz Amibik Ensefalit (GAE); yüzme havuzlarını, spaları ya da jakuzileri kullanan immün sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. Amip burun yoluyla giriş yapıp direk olarak merkezi sinir sistemine ulaşabilir, ya da alt solunum yolları, deri ve mukozada yerleşerek kan dolaşımı yoluyla merkezi sinir sistemine yayılır. *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu hastalıklardan

diğeri keratittir. Bu hastalık kornea yüzeyinde hasara yol açar ve çoğunlukla kontak lens kullanıcılarında korneanın amiplerle direkt teması sonucunda meydana gelmektedir [24, 27, 29]. Tedbir amaçlı olarak kontak lens kullanıcılarının suya girmeden önce lenslerini çıkartması, koruyucu gözlük takması, yüzme sonrası kontak lenslerini uygun lens solüsyonu ile yıkaması ve tek kullanımlık lensler kullanması önerilir [5].

Hartmanella Tubulinida takımının Hartmannellidae ailesinde yer alan özgür yaşayan amiptir. Önceleri *Acanthamoeba* cinsinin farklı görünen şekli olarak açıklanmış fakat daha sonra aralarında farklılıkların bulunduğu anlaşılmıştır. Bu amipler pseudopodlarıyla hareket ederler, ince uzun morfoloji gösterirler ve boyları enlerinden 6 kat fazladır. En önemli türü olan *H.vermiformis* tıpkı *Acanthamoeba* türlerinde olduğu gibi insanlar için patojen olan bakterilere ev sahibi rolünü üstlenir. Bu patojen bakterilerden en iyi bilineni *L. pneumophila*'dır. Ayrıca sıklıkla *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu keratit hastalığının da bir diğer etkenidir [31].

Yüzme havuzlarının yüzücülerin sağlığı açısından güvenilir olup olmadığının anlaşılabilmesi için bu havuzlardaki toplam aerobik heterotrofik bakteriler, *Legionella* cinsi bakteriler, özgür yaşayan amipler gibi mikroorganizmaların varlığı/yokluğu son derece önemlidir. Bunun yanı sıra havuz sularının klor, pH değerleri, sıcaklık, alkalinite, iletkenlik, toplam çözünmüş katı madde miktarı gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri de havuzların sağlık açısından uygunluğunu gösteren diğer önemli parametrelerdir.

2.6. KLOR

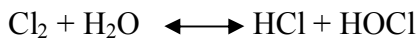
Yüzme havuzlarında sağlık açısından zararlı olabilecek patojen mikroorganizmaları etkisiz hale getirmek için en yaygın olarak kullanılan madde klordur. Klorlamadan önce filtrasyon yöntemi ile havuz suyunda fiziksel dezenfeksiyon yapılır. Yani, havuz suyu içindeki kirlilik yaratan katı parçacıklar ilk önce ızgaralar yardımıyla filtre edilir, daha sonra katmanlar halinde bulunan kum filtrelerinden geçirilir. Ancak çoğu zaman küçük kirlenici parçacıklar bu filtrelerden kaçmayı başarırlar. Bu nedenle fiziksel dezenfeksiyonun ardından klor ve klora alternatif olarak bakır-gümüş iyonizasyonu,

ozon, ultraviyole gibi çeşitli kimyasal yöntemlerin kullanılmasıyla dezenfeksiyon işlemi tamamlanır [32, 33].

Yüzme havuzlarında klorlama ilk kez 1924 yılında Avustralya’da yapılmış ve bunu izleyen dönemde Sidney’de bir spor kulübünün havuzunun klorlamasının yapıldığı bildirilmiştir. Yüzme havuzlarında modern klorlama teknikleri 1950’lerde İngiltere’de geliştirilmiştir ve daha sonra Palin’in yaptığı araştırmada kloramin oluşumu geliştirilmiştir [33]. Klor içeren dezenfektanlar bilinen patojen mikroorganizmaların birçoğuna etkili olup, ya tamamen yok eder veya üremesini durdururlar. Çok yönlü etki göstermesi (algisit, mikrobisit vb.), boruları ve cihazları tıkayabilecek, arızaya neden olabilecek veya depolarda gelişebilecek canlıların oluşumunu engellemesi, ekonomik ve kolay uygulanabilir olması yüzme havuzu dezenfeksiyonunda tercih edilme sebeplerindedir [34].

T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yüzme havuzlarının denetimi konusunda yayınlanan yönetmeliğe göre serbest klor miktarı, kapalı havuzlarda 1-1,5 mg/L, açık havuzlarda 1-3 mg/L aralığında olmalıdır. Havuz suyunda maksimum bağlı klor miktarı ise 0,2 mg/L olmalıdır [7].

Havuz suyunda serbest halde dolaşan ve suyu kirletebilecek inorganik ve organik maddeleri okside etmek için bekleyen klora, serbest klor denir. Havuz sularına katılan klor, öncelikle su ile reaksiyona girerek hipoklorik asite (HCl) ve hipokloröz asite (HOCl) dönüşür. Havuzdaki kirleticilerle reaksiyona girip öldüren hipokloröz asittir [4, 33, 34].



Hipokloröz asit, organik maddeleri parçalarken bunların yapısı içerisine girerek, kloramin basamaklarını oluşturur (monokloramin, dikloramin, trikloramin). Kloramin basamaklarındaki organik maddeler tekrar hipokloröz asit ile reaksiyona girerek parçalanıp su içinden uzaklaşır. Yetersiz klorlama, organik maddelerin kloramin basamağında kalmasına sebep olur. Havuz suyu içinde organik kirleticilerle reaksiyona girmiş ama parçalayamayıp kloramin formuna dönüşmüş olan bu klora bağlı klor denir. Bağlı klorun yok edilmesi için havuz suyunda klor şoklaması yapılması gereklidir. Klor şoklaması, genel piyasa şartlarına göre yapılmış havuzlarda havuzun günlük klor

ihtiyacının en az 4 katının havuza verilmesi, TSE 11899 normlarına göre yapılmış havuzlarda ise bağlı klor miktarının 10 katı klor kullanılması şeklinde yapılır. Bağlı klor; suda klor kokusuna, gözde ve ciltte iritasyona, orta kulak iltihabına, mayo ve boyalı saçlarda renk atmasına sebep olur [4].

Klorla dezenfeksiyona suyun pH derecesi, sıcaklık, temas süresi ve kullanılan klor cinsi gibi bazı faktörler etki etmektedir. Klor bakterilerde glukoz oksidasyonunu inhibe ederek bakterisit etki gösterir. Bakterilerle karşılaştırıldığında sporlu bakterilerin, virüslerin, protozoonların sudan giderilmesi için daha yüksek klor dozu ile daha uzun süre temas ettirilmesi gerekmektedir. Serbest ve bağlı klorun bakterisit etkisi sıcaklıkla birlikte yükselir. Yüksek pH'ta klorun bakterisit etkisi azalmaktadır. Serbest klor ve hipoklorik asit, bağlı klor formları ve kloraminlere göre çok daha aktiftirler [35].

2.7. pH

T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yüzme havuzlarının tabi olacağı sağlık esasları konusunda yayınlanan yönetmeliğe göre havuzlardaki pH değeri 6,5-7,8 arasında olmalıdır [7]. Havuzlardaki pH miktarı, klorun dezenfeksiyon gücünü önemli derecede etkilemektedir. pH havuz suyuna katılan klorun su ile reaksiyona girerek bakterileri öldürecek olan hipokloröz asit'e ve hipoklorik iyonuna dönüşmesinde etkin rol oynar. Yüksek pH'da verilen klor, organik maddelerin oksidasyonu ve dezenfeksiyonu için hipokloröz aside yeterince dönüşmemektedir. Böylece sudaki mikroorganizmaların dezenfeksiyonunda yeterli verim sağlanamamaktadır. Bundan dolayı klorlama işleminin öncesinde pH istenen aralığa getirilmelidir. Ayrıca suda kimyasal madde sarfiyatının artması ve yüzücünün gözlerinde rahatsızlık meydana gelmesi gibi etkiler de yüksek pH sonucu oluşabilir. Havuz pH'sının düşük olması durumunda ise klorun tüketiminin arttığı, korozyon oluştuğu ve yüzücünün gözlerinde yanma meydana geldiği gözlenmiştir [4, 33].

2.8. SICAKLIK

T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2011 yılında yayımlanan yönetmeliğe göre yüzme havuzlarındaki su sıcaklığı, kapalı havuzlarında 26-28°C, açık havuzlarda 26-38°C arasında olmalıdır [7]. Havuzlarda su sıcaklığı arttıkça organizmaların büyüme hızı ve

buna bağlı olarak kimyasal madde tüketimi de artmaktadır. Havuz suyu sıcaklığının hava sıcaklığına bağlı olarak arttığı durumlarda, kimyasal madde tüketimini azaltmak amacıyla, havuzlar için özel tasarlanmış sistemler ile soğutma yapılmaktadır [4].

2.9. ALKALİNİTE

Alkalinite, suyun pH değişimine gösterdiği direncin derecesidir. Su içerisinde çözünmüş bulunan karbonatlar, bikarbonatlar ve hidrositlerin toplam değerini ifade eder. Alkalinite değeri yüksek olan suların pH değerini düşürmek için normalden daha fazla asit kullanmak gerekmektedir. Yüksek alkalinite değerine sahip sularda pH değeri düşmeye karşı direnç gösterir ve bir müddet sonra havuz suyunun pH değeri tekrar eski değerine geri döner. Ayrıca yüksek alkalinite değeri ve yüksek pH değeri su içerisinde sertlik veren maddelerin çökmesine, havuz fayanslarının üzerinde kireç bağlamasına ve filtre kumunun topaklaşmasına sebep olur. Alkalinite değerinin aşırı düşürülmesi havuzda derzlerin sökülmesi, havuz korkuluklarının yenmesi gibi problemlere sebep olmaktadır. Düşük alkaliniteli sularda pH değerini dengede tutmakta sıkıntı yaşanmaktadır, pH değeri asidik veya bazik ortam arasında hızlı dalgalanmalar yaşatabilir [4]. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2011 yılında yayımlanan yönetmeliğe göre yüzme havuz suyundaki alkalinite değeri 30 - 180 mg/L arasında olmalıdır [7].

2.10. İLETKENLİK

İletkenlik bir su numunesinin elektrik taşıyabilme özelliğinin sayısal ifadesidir. Suyun iletkenliği sudaki iyonların konsantrasyonlarına, hareketliliğine ve ölçüm sıcaklığına bağlıdır. İnorganik bileşikler iyi iletkenlik gösterirlerken, organik bileşikler çok zayıf bir akım geçiricilik kabiliyetlerine sahiptir [36].

2.11. TOPLAM ÇÖZÜNMÜŞ KATI MADDE (TÇM)

Toplam çözünmüş katı madde (TÇM), su içinde çözünmüş halde bulunan ve kum filtresi gibi basit filtrasyon yöntemleri ile tutulamayan mineralleri, katyonları, anyonları, ağır metal iyonlarını ve az miktarda organik maddeleri içerir. Su içerisinde TÇM ne kadar yüksek ise suda o kadar çok yabancı madde var demektir. TÇM miktarının yüksekliği dezenfeksiyonu zorlaştırır, havuz suyunun mat görünmesine sebep olur ve

boru içlerinde birikim oluşumunu artırır. Havuz suyunda maksimum TÇM 2.500 mg/L olmalıdır [4].

2.12. FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİ

FISH yöntemi, hücrelerin morfolojisini bozmadan, hücre içerisinde spesifik dizilimlere sahip nükleik asitlerin, işaretli oligonükleotidlerle (prob) hibritlenmesi, böylelikle hedef moleküllerin hücre içerisinde mikroskopla gözlemlenebilmesini sağlayan yöntemdir [37, 38, 39].

Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye özgü bir probun kullanılması gerekir. FISH yönteminde hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine “prob” denir. Problar haptenler, florokromlar, enzimler veya koloidal altın işaretli olabilirler. Günümüzde pratik olmaları ve ticari olarak bulunabilmeleri nedeniyle direkt ve florokromlarla işaretli problemler kullanılmaktadır [39].

FISH yöntemi 4 temel adımdan meydana gelmektedir;

- 1) Fiksasyon: Hücre duvarının geçirgen hale getirilmesi ve hücrede mevcut 16S rRNA moleküllerinin bütünlüğünün korunması
- 2) Hibritleme: Prob ve hedeflediği 16S rRNA moleküllerinin birbirine bağlanması
- 3) Yıkama: Hedefe bağlanamayan problemlerin ortamdan uzaklaştırılması
- 4) Görüntüleme: Bağlı problemlerin mikroskop altında, hücre içerisinde görüntülenmesi [37, 38, 39].

Genel FISH prosedürü kromozomların ya da dokuların lam üzerinde fikse edilmesini (yerleştirilmesi) gerektirir. Bu amaçla kullanılan fiksatifler paraformaldehit, formalin ya da parafindir. Fiksasyondan sonra örnek, hücre geçirgenliğini sağlayan kimyasal maddelerle muamele edilir. Bu amaçla kullanılan kimyasal maddeler, deterjan ya da triton ve RNAz-serbest proteinaz K gibi proteinazlardır. Probun hedefe bağlanması için hücre içine yeterli giriş yapmış olması gerekmektedir. Çünkü bu aşamadan sonra floresan özellikteki nükleik asit probu ilave edilerek denatüre edilmiş ilgili zincir bölgesiyle melezleme (hibritlenme) sağlanır. Hibritlenme, tampon çözelti içinde uygun sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında gerçekleşir. Son aşama olan hibritlenmiş problemleri görüntüleme işlemi için farklı mikroskopi yöntemleri bulunmaktadır.

Radyoaktif ya da peroksidaz, alkalın fosfatazla işaretlenmiş problemlerin görüntülenmesinde ışık mikroskobu, floresanla işaretlenmiş problemlerin görüntülenmesinde floresan mikroskobu kullanılmaktadır. FISH tekniği ile moleküler yöntemlerin kesinliği mikroskopla elde edilen görsel bilgiyle birleştirilir. Böylece mikroorganizmaların su, çamur, biyofilm gibi doğal ortamlarında tespit edilmesi, sayılması ve konumlarının belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bu avantajın yanı sıra tm hücrelerin kolayca geçirgen hale getirilememesi, saf kültürü elde edilemeyen organizmalar için spesifik hibritlenme koşullarının tespitinin zor olması, hücrenin rRNA miktarı düşükse tespit edilmesinin zor olması gibi bazı dezavantajları da vardır [37, 38, 39].

Günümüzde yazlık ve kışık konutlarda, otellerde, okullarda, spor salonlarında yüzme havuzlarının yaygın olarak bulunması ve eğitim, sağlık, eğlence amaçlı kullanımı onların mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal kontrollerinin de düzenli bir Şekilde yapılmasını önemli kılmaktadır. Çünkü bakımı, temizliği ve dezenfeksiyonu iyi yapılmayan yüzme havuzları mikroorganizma kaynağı haline gelip pek çok hastalığa sebep olabilmektedir. Bilindiği gibi toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının ≤ 200 kob/ml olması gerektiği T.C. Sağlık Bakanlığı'nın en son 6 Mart 2011'de yayınladığı yönetmelikte belirtilmiştir. Ancak yüzme esnasında insanlara rahatlıkla bulaşıp ciddi enfeksiyonlara yol açabilecek olan *Legionella* cinsi bakteriler ve zgr yaşayan amipler bu yönetmelikte henüz yer almamaktadır. Bu amaçla çalışmamızda ilimizde bulunan farklı yüzme havuzlarında toplam aerobik heterotrofik bakteriler, *Legionella* cinsi bakteriler ve zgr yaşayan amiplerin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece ilimizde mevcut olan yüzme havuzlarında adı geçen mikroorganizmaların varlığı/yokluğu/sayısı hakkında bilgi sahibi olunacaktır. Ayrıca incelenen havuzların fiziksel ve kimyasal özellikleri ve bu özelliklerin araştırılan mikroorganizmalar üzerindeki etkisi de ortaya çıkarılacaktır. Sonuçların değerlendirilmesiyle bu havuzları kullanan yüzücülerin yüzme esnasında sağlığının risk altında olup olmadığı anlaşılacaktır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada İstanbul genelindeki 25 adet açık ve kapalı yüzme havuzlarından alınan su örnekleri mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal açıdan, biyofilm tabakasından alınan sürüntü örnekleri mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir.

3.1. ÖRNEKLERİN ALINMASI

Yüzme havuzlarının su ve biyofilmindeki toplam aerobik heterotrofik bakteriler, *Legionella* cinsi bakteriler ve özgür yaşayan amiplerin incelenmesi amacıyla ilk önce aşağıda belirtilen şekilde örnekler alınmıştır.

Yüzme havuz sularından toplam aerobik heterotrofik bakterilerin ve özgür yaşayan amiplerin analizi için 500'er ml'lik steril cam şişeler, *Legionella* cinsi bakterilerin analizi için 3000 ml'lik steril plastik bidonlar kullanılmıştır. Ayrıca aynı havuzlara ait alkalinite, iletkenlik ve toplam çözünmüş katı madde analizi için 1000 ml'lik cam şişeler kullanılmıştır. Su numuneleri T.C. Sağlık Bakanlığı havuz suyu yönetmeliğinde belirtildiği gibi havuz kenarının 50 cm ötesinden ve su yüzeyinin 20 cm altından, şişeler tamamen doldurulmak suretiyle alınmıştır ve en kısa zamanda laboratuvara götürülmüştür [7, 40, 41]. Örneklerin alınmasından önce havuz suyunda bulunan kloru nötralize etmek amacıyla örnek kaplarının içerisine 0.5 ml/L % 0.5'lik sodyum tiyosülfat eklenmiştir [11, 33, 42, 43]. Havuz sularına ait serbest klor, sıcaklık ve pH değerleri örneklerin alınması sırasında ölçülerek kaydedilmiştir [7].

Aynı yüzme havuzlarına ait biyofilm örnekleri havuz cidarının 10 cm²'lik alanından steril eküvyon yardımıyla alınmıştır. Bu eküvyon, içerisinde 10 ml steril çeşme suyu bulunan santrifüj tüpü içerisine koyularak laboratuvara getirilmiştir.

Alınan örneklerin mikrobiyolojik analizi toplam aerobik heterotrofik bakteriler için kültür yöntemine, diğer mikroorganizmalar için hem kültür hem de FISH yöntemine göre yapılmıştır. Ayrıca havuz bilgi formu oluşturularak örnekleme yapılan havuzlara ait olan ve Tablo 3.1’de görülen bazı özellikleri yetkililere sorularak kaydedilmiştir.

Tablo 3.1: Havuz bilgi formu

HAVUZ BİLGİ FORMU	
Havuz Adı/Kodu	
Örnekleme Tarihi	
İlgili Kişi Adı/Telefonu	
Havuz Yaşı	
Havuz İç Malzemesi	
Kullanım Özelliği (Açık-Kapalı)	
Kullanım Sıklığı (kişi/gün)	
Dezenfeksiyon Yöntemi	
Sıcaklık (°C)	
pH	
Serbest klor (mg/L)	

3.2. MİKROBİYOLOJİK ANALİZ

3.2.1. Örneklerin Kültür Yöntemine Göre İncelenmesi

3.2.1.1 Yüzme Havuz Sularından Toplam Aerobik Heterotrofik Bakterilerin Analizi

Havuz suyu örneklerinden toplam aerobik heterotrofik bakterilerin analizi için Water Plate Count Agar (Water PCA) besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla 100 ml su örneği olası bakterilerin yoğunlaştırılması için 0.45 µm por çaplı steril membran filtre kullanılarak çelik filtre sisteminden geçirilmiştir (Şekil 3.1). Daha sonra bu filtre Water PCA içeren Petri kutusuna yerleştirilmiştir. Ayrıca örneklerin 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırım tüpleri de hazırlanmıştır. Bu amaçla filtre sisteminden geçirilen su örneklerine ait membran filtre 10 ml steril çeşme suyu içeren naylon poşete koyulmuş ve 2 dk stomacher (IUL Instruments 120 sn/50 hz) cihazında tutulmuştur. Poşetin içinden alınan örnekle hazırlanan sulandırım tüplerinden 0.1 ml örnek Water PCA içeren Petri kutularına yayma yöntemiyle ekilmiştir. Tüm ekimler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Ekim yapılan tüm Petri kutuları 22°C 'de 72 saat ve 37°C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır [44, 45, 46, 47, 48]. Süre sonunda Petri kutularında üremiş olan bakteri kolonileri sayılıp kaydedilmiştir.

3.2.1.2 Yüzme Havuz Sularından Özgür Yaşayan Amiplerin Analizi

Havuz suyu örneklerinden özgür yaşayan amiplerin analizi için 100'er ml su örneği 0.45 µm por çaplı steril selüloz nitrat membran filtreler kullanılarak çelik filtre sisteminden süzülmüştür (Şekil 3.1). Filtrasyon sonrasında sistemden steril şartlarda alınan filtreler, önceden 200 µl cansız *Escherichia coli* (*E.coli*) süspansiyonu yayılmış olan besleyici değeri olmayan Non-nutrient Agar (NNA) içeren Petri kutularına ters olarak yerleştirilerek 28°C 'de bekletilmiştir [49]. Ayrıca 28°C 'de üreyen özgür yaşayan amiplerin termotolerant aktivitelerinin araştırılması için taze NNA besiyerlerine pasajları yapılarak 44°C 'de inkübe edilmiştir [50, 51]. Tüm ekimler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. İnkübasyondan itibaren 3-10 gün süreyle özgür yaşayan amiplerin trofozoit ve kist şekilleri günlük olarak ışık mikroskobu altında 100x büyütmede incelenmiş sonuçlar kaydedilmiştir.

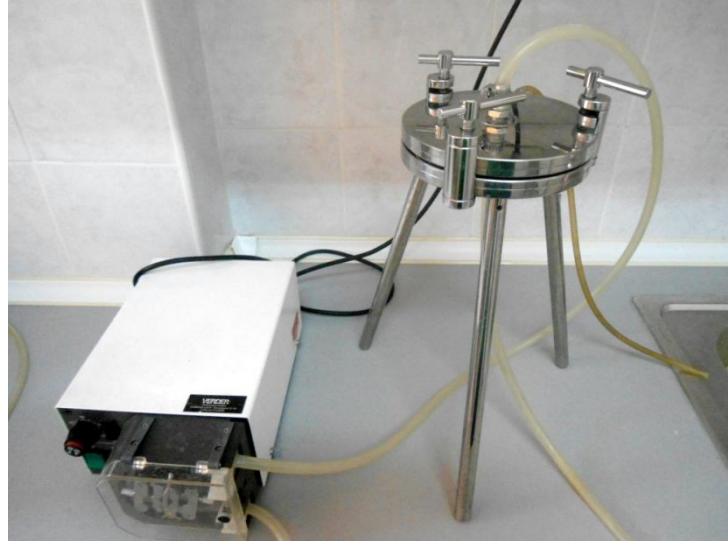


Şekil 3.1: Membran filtrasyon cihazı

3.2.1.3. Yüzme Havuz Sularından *Legionella* Cinsi Bakterilerin Analizi

Havuzlardan alınan 3000 ml su örneği *Legionella* cinsi bakterilerin yoğunlaştırılması amacıyla 142 mm çaplı, 0.2 µm por çaplı naylon membran filtreler (Sartorius-Sartolon) kullanılarak peristaltik pompa aracılığıyla çelik filtre sisteminden süzümüştür (Şekil 3.2). Daha sonra filtre, içerisinde 20 ml steril çeşme suyu bulunan steril naylon poşete koyulmuş ve filtre yüzeyindeki bakterilerin suya geçmesi için 2 dk stomacher (IUL Instruments 120 sn/50 hz) cihazında tutulmuştur. Süre sonunda bu poşetten direkt ekim için alınan 0.1 ml örnek *Legionella* Buffer Chorcoal Yeast Extract (BCYE) agara yayma yöntemiyle ekilmiştir [52, 53, 54, 55]. Poşette kalan sıvının bir kısmı *Legionella* cinsi bakteriler dışındaki diğer bakterileri elimine etmek amacıyla asit ile ve diğer kısmı sıcaklıkla muamele edilmiştir [56]. Asit ile muamele için poşetten alınan 10 ml sıvı 6000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve 5 ml'lik üst sıvı atılmıştır. Tüpün üzerine HCl - KCl asit karışımından 5 ml eklenerek 5 dk beklenmiştir. Süre sonunda Petri kutusundaki *Legionella* BCYE agara 0.1 ml yayma metoduyla ekim yapılmıştır. Sıcaklıkla muamele için poşetten alınan 2 ml örnek 50°C'de 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda Petri kutusundaki *Legionella* BCYE agara 0.1 ml yayma metoduyla ekim yapılmıştır [11]. Ayrıca örneklerin 10⁻¹ ve 10⁻² sulandırılmaları da hazırlanarak aynı miktarlarda aynı besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Tüm Petriker 37°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır [57, 58]. Süre sonunda gözlenen şüpheli kolonilerden Gram boyama yapılmış ve Gram negatif çomak olduğu tespit edilen kolonilerin Tryptone Soya

Agar'da (TSA) üreme özelliklerine bakılmıştır. Üreme gözlenmemesi halinde bakterinin *Legionella* latex aglütinasyon kitiyle (OXOID) aglütinasyon özelliklerine bakılmıştır [57]. Tüm mikrobiyolojik ekimler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.



Şekil 3.2: Peristaltik pompaya sahip filtre sistemi

3.2.1.4 Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Toplam Aerobik Heterotrofik Bakterilerin Analizi

Laboratuvar ortamına getirilen biyofilm örnekleri 10 ml steril çeşme suyu içeren stomacher poşetine aktararak eküvyon üzerindeki mikroorganizmaların suya geçmesi için 2 dk. stomacher cihazında tutulmuştur. Süre sonunda 0.1 ml örnek toplam aerobik heterotrofik bakterilerin (TAHB) analizi için Water PCA besiyeri içeren Petri kutularına yayma metoduyla ekilmiştir. Yoğun ve sayılamayacak kadar çok koloni üreme ihtimali düşünülerek 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırım tüpleri hazırlanmış ve bu tüplerden de ekimler yapılmıştır. Tüm Petri ler 22°C 'de 72 saat ve 37°C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüm ekimler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Süre sonunda Petri kutularında üreyen bakteri kolonileri sayılarak kaydedilmiştir [9, 47, 59].

Yukarıda belirtildiği gibi stomacher cihazında tutulan sıvının kalan miktarı özgür yaşayan amipler (ÖYA) ve *Legionella* cinsi bakterilerin analizi için kullanılmıştır.

3.2.1.5 Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Özgür Yaşayan Amiplerin Analizi

Yukarıda belirtildiği gibi 2 dk. stomacher cihazında tutulmuş olan sıvının içinden alınan 1 ml örnek, 200 µl cansız *E.coli* süspansiyonu yayılmış olan besleyici değeri olmayan NNA besiyerlerine koyulup 28°C’de 10 güne kadar inkübasyona bırakılmıştır [27]. Tüm ekimler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Tüm Petri kutuları özgür yaşayan amiplerin trofozoit ve kist şekilleri açısından günlük olarak ışık mikroskobu altında 100x büyütmede incelenmiştir. 28°C’de üreyen özgür yaşayan amiplerin termotolerant aktivitelerinin gözlenmesi için taze NNA besiyerlerine pasajları yapılarak 44°C’de kültüre edilmiştir [50].

3.2.1.6 Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden *Legionella* Cinsi Bakterilerin Analizi

Yukarıda belirtildiği gibi 2 dk. stomacher cihazında tutulmuş olan sıvıdan *Legionella* cinsi bakterilerin analizi için *Legionella* BCYE agar içeren Petri kutularına direk ekim yapılmasının yanı sıra, sıcaklık ve asit uygulamasından sonra ve 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırım yapılarak 0.1 ml ekim yapılmıştır. Petriler 37°C’de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüm ekimler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda şüpheli kolonilerden Gram boyama yapılmış ve Gram negatif çomak olduğu tespit edilen kolonilerin TSA’da üreme özelliklerine bakılmıştır. Bu besiyerinde üreme gözlenmemesi halinde bakterinin *Legionella* latex aglütinasyon kitiyle (OXOID) aglütinasyon özelliklerine bakılmıştır [57, 60, 61].

3.2.2. Örneklerin Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemine Göre İncelenmesi

3.2.2.1. Yüzme Havuz Sularından Özgür Yaşayan Amiplerin Analizi

Yüzme havuzlarına ait su örneklerinin floresan in situ hibridizasyon yöntemine göre incelenmesi amacıyla havuzlardan alınan 3000 ml su örneği 142 mm çaplı, 0.2 µm por çaplı naylon membran filtreden (Sartorius-Sartolon) geçirilerek 20 ml steril çeşme suyu içeren naylon poşet içerisine koyulmuştur. Poşet içerisinden alınan 3 ml örnek üzerine 1/1 oranında % 50 etanol eklenmiştir.

FISH analizi için hazırlanan su örnekleri 6000 g’de 15-20 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıları atılarak steril 1 ml 1x fosfat tamponu (PBS) eklenmiş ve pipetaj

FISH analizi için hazırlanan su örnekleri 6000 g'de 15-20 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıları atılarak steril 1 ml 1xPBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Santrifüj tüplerindeki sıvı ependorfa alınarak 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu üst sıvı uzaklaştırılarak 200 µl 1xPBS eklenmiştir. %4 PFA eklenerek +4°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler 3 defa 1xPBS ile yıkama yapılmış, üst sıvı atılarak dipten alınan 10'ar µl örnek, teflon lamın her bir kuyucuğuna koyularak kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.3). Kuruyan lam sırasıyla %50, %80 ve %96 alkolde 3'er dakika tutulmuştur. Kuyucuklara 10'ar µl hibridizasyon tamponu koyulduktan sonra üzerlerine her bir kuyucuğu ayrı ayrı olmak üzere 2'şer µl *L. pneumophila* serogrup 1 için spesifik olan Leg PNE1, *Legionella* türleri için spesifik olan Leg705 problemleri ilave edilmiştir (Tablo 3.2). Daha sonra teflon lam, içerisinde nemli ortam sağlanan santrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek 48°C'de 1 gece hibridizasyona bırakılmıştır. Ertesi gün etüvden çıkarılan lamın her bir kuyucuğu üzerine 2 µl DAPI eklenerek 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lamlar önceden hazırlanan yıkama tamponu içerisine koyularak 48°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Reaksiyonun sonlanması için lamlar soğuk distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamlar epifluoresan mikroskop altında incelenmiş ve sonuçları kaydedilmiştir [62, 64, 65, 66]. Ayrıca pozitif kontrol amacıyla diğer bir lamın kuyucuklarına *Legionella pneumophila* serogrup 1 (ATCC 33152) ve *Legionella pneumophila* serogrup 3 (ATCC 33155) suşları ile sırasıyla Leg PNE 1 ve LEG 705 problemleri koyularak tüm işlemler tekrar edilmiştir. Negatif kontrol amacıyla bakteri suşları yerine steril 1xPBS ve yukarıda belirtilen spesifik problemler kullanılarak tüm işlemler tekrar edilmiştir.

3.2.2.3 Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden Özgür Yaşayan Amiplerin Analizi

Yüzme havuzlarına ait biyofilm örneklerinin FISH yöntemine göre incelenmesi amacıyla havuzların yan yüzeyinden steril eküvyon ile alınan sürüntü örnekleri 10 ml steril çeşme suyu içeren santrifüj tüpü içerisine koyularak laboratuvara getirilmiştir. Örnekler, içerisinde 10 ml steril çeşme suyu bulunan naylon poşete koyulmuş ve 2 dakika stomacher cihazında çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra poşetin içinden alınan örnek üzerine 1/1 oranında % 50 etanol eklenmiştir.

FISH analizi için bu şekilde hazırlanan biyofilm örnekleri 6000g'de 15-20 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıları atılarak dipte çöken kısmın üzerine steril 1 ml 1xPBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Santrifüj tüplerindeki sıvı 1,5 ml'lik küçük steril tüplere alınarak 8800 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu üst sıvı uzaklaştırılarak 200 µl 1xPBS eklenmiştir. %2 PFA eklenerek +4°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 3 defa 1xPBS ile yıkama yapılmış, üst sıvı atılarak dipten alınan 10'ar µl örnek, teflon lamın her bir kuyucuğuna koyularak kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.3). Kuruyan lam sırasıyla %50, %80 ve %96 alkolde 3'er dakika tutulmuştur. Kuyucuklara 10'ar µl hibridizasyon tamponu koyulduktan sonra üzerlerine her bir kuyucuğu ayrı ayrı olmak üzere 2'şer µl *Acanthamoeba* cinsi amipler için spesifik olan ACANTHA, *Hartmanella* cinsi amipler için spesifik olan HART 498 ve ökaryotlar için spesifik olan EUK 516 probu ilave edilmiştir (Tablo 3.2). Daha sonra teflon lam, içerisinde nemli ortam sağlanan santrifüj tüpüne yerleştirilerek 48°C'de 1 gece hibridizasyona bırakılmıştır. Ertesi gün etüvden çıkarılan lamın her bir kuyucuğu üzerine 2 µl DAPI eklenerek 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lamlar önceden hazırlanan yıkama tamponu içerisine koyularak 48°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Reaksiyonun sonlanması için lamlar soğuk distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamlar epifluoresan mikroskop altında incelenmiş ve sonuçları kaydedilmiştir [62, 63]. Ayrıca pozitif kontrol amacıyla diğer bir lamın kuyucuklarına *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50373) suşu ve üzerine ACANTHA probu, *Hartmanella vermiformis* (ATCC 30966) suşu ve üzerine HART 498 probu koyularak tüm işlemler tekrar edilmiştir. Negatif kontrol amacıyla amip suşları yerine steril 1xPBS ve yukarıda belirtilen spesifik problemler kullanılarak tüm işlemler tekrar edilmiştir.

3.2.2.4 Yüzme Havuzlarından Alınan Biyofilm Örneklerinden *Legionella* Cinsi Bakterilerin Analizi

Yüzme havuzlarına ait biyofilm örneklerinin FISH yöntemine göre incelenmesi amacıyla havuzların yan yüzeyinden steril eküvyon ile alınan sürüntü örnekleri 10 ml steril çeşme suyu içeren santrifüj tüpü içerisine koyularak laboratuvara getirilmiştir. Örnekler, içerisinde 10 ml steril çeşme suyu bulunan naylon poşete koyulmuş ve 2 dakika stomacher cihazında çalkalanmıştır. Bu işlemten sonra poşetin içinden alınan örnek üzerine 1/1 oranında % 50 etanol eklenmiştir.

FISH analizi için bu şekilde hazırlanan biyofilm örnekleri 6000g'de 15-20 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıları atılarak dipte kalan çöken kısım üzerine steril 1 ml 1xPBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Santrifüj tüplerindeki sıvı 1,5 ml'lik küçük steril tüplere alınarak 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu üst sıvı uzaklaştırılarak 200 µl 1xPBS eklenmiştir. %4 PFA eklenerek +4°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 3 defa 1xPBS ile yıkama yapılmış, üst sıvı atılarak dipten alınan 10'ar µl örnek, teflon lamin her bir kuyucuğuna koyularak kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.3). Kuruyan lam sırasıyla %50, %80 ve %96 alkolde 3'er dakika tutulmuştur. Kuyucuklara 10'ar µl hibridizasyon tamponu koyulduktan sonra üzerlerine her bir kuyucuğu ayrı ayrı olmak üzere 2'şer µl *Legionella pneumophila* serogrup 1 için spesifik olan LegPNE1, *Legionella* türleri için spesifik olan Leg705 problemleri ilave edilmiştir (Tablo 3.2). Daha sonra teflon lam, içerisinde nemli ortam sağlanan santrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek 48°C'de 1 gece hibridizasyona bırakılmıştır. Ertesi gün etüvden çıkarılan lamin her bir kuyucuğu üzerine 2 µl DAPI eklenerek 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lamlar önceden hazırlanan yıkama tamponu içerisine koyularak 48°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Reaksiyonun sonlanması için lamlar soğuk distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamlar epifluoresan mikroskop altında incelenmiş ve sonuçları kaydedilmiştir [62, 64, 65, 66]. Ayrıca pozitif kontrol amacıyla diğer bir lamin kuyucuklarına *Legionella pneumophila* serogrup 1 (ATCC 33152) ve *Legionella pneumophila* serogrup 3 (ATCC 33155) suşları ile sırasıyla Leg PNE 1 ve LEG 705 problemleri koyularak tüm işlemler tekrar edilmiştir. Negatif kontrol amacıyla bakteri suşları yerine steril 1xPBS ve yukarıda belirtilen spesifik problemler kullanılarak tüm işlemler tekrar edilmiştir.

Tablo 3.2: FISH deneyinde kullanılan problemler

PROB ADI	PROB DİZİLİMİ
Leg PNE1	5-ATC-TGA-CCG-TCC-CAG-GTT-3 CY3
Leg 705	5-CTG-GTG-TTC-CTT-CCG-ATC-3 FAM
ACANTHA	5-TTC-ACG-GTA-AAC-GAT-CTG-GGC-C-3 FAM
HART 498	5-TCG-CGG-AGA-GGT-GTC-GGT-3 FAM
EUK 516	5-ACC-AGA-CTT-GCC-CTC-C-3 CY3

FAM: Carboxyfluorescein
CY3: Cyanin 3

3.3. FİZİKSEL VE KİMYASAL ANALİZ

3.3.1 Ekstrasellüler Polimerik Matriks (EPS) Eldesi ve Toplam Karbonhidrat Miktarının Tayini

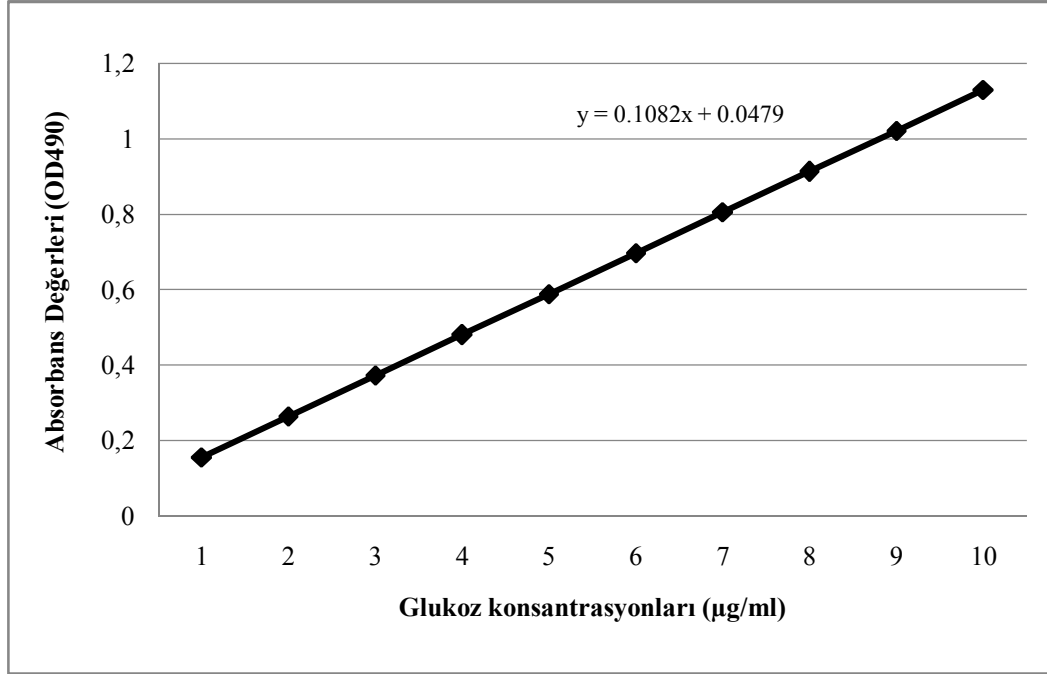
Yüzme havuzlarından alınan biyofilm örneklerinden ilk önce EPS eldesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen EPS örneğinden daha sonra fenol sülfirik asit yöntemiyle karbonhidrat tayini yapılmıştır [67, 68].

EPS eldesi 4 aşamada gerçekleştirilmiştir:

1. Yıkama: Havuz yan yüzeyinin 10 cm² lik alanından steril eküvyon yardımı ile 10 ml steril çeşme suyu içeren santrifüj tüpüne alınan biyofilm örnekleri 20 ml steril distile su içerisine koyularak 6000 g (8800 rpm) de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı başka bir tüpe alınarak oda sıcaklığında saklanmıştır.
2. Ayırma: Yıkama işlemi sonucunda dipte kalan pellet kısmı üzerine 25 ml % 8.5 NaCl ve % 0.22 formaldehit karışımı koyularak 1 dakika en yüksek devirde (2.500 rpm) vorteks yapılmıştır. Daha sonra birinci ve ikinci basamaktaki örnekler birleştirilmiştir.
3. Ekstraksiyon: Birleştirilen örnekler 11227 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Filtrasyon ve Toplama: Ekstraksiyon ile ayrılan örneklerin üst kısmı 0.22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan örnek karbonhidrat tayininde kullanılmıştır.

Havuz biyofilminden karbonhidrat tayini için kullanılan fenolsülfirik asit yöntemine göre [67], önce 1'er ml örneğin üzerine polisakkaritleri monomerlerine ayırmak amacı ile 1 ml %5'lik fenol ve hemen ardından 5 ml %96'lık H₂SO₄ eklenerek 10 dakika reaksiyon oluşması için beklenmiş ve turuncu renk oluşumu gözlenmiştir. Süre sonunda örnekler vortekslenerek karıştırılmış ve reaksiyonun durması için 10-20 dakika 25-30 °C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Deney sonucunda oluşan sarı-portakal rengin koyuluğu 490 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV 150-02) ile ölçülmüştür. Karbonhidrat miktarı, spektrofotometredeki ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerinin standart glukoz çözeltilerinden hazırlanmış eğriye ait denklemde yerine koyularak hesaplanmıştır. Ölçümler 4 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Standart eğriyi oluşturmak için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/ml konsantrasyonlarda

standart glukoz çözeltileri hazırlanmış ve fenol sülfürik asit yöntemi uygulanarak elde edilen absorbens değerleri ile grafik çizilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Fenol sülfürik asit yöntemiyle glukoz konsantrasyonlarından hazırlanan standart eğri

3.3.2. Serbest Klor ve pH

Havuz sularının serbest klor değerleri örneklerinin alınması sırasında klor ölçüm kitiyle (Aquarosa), pH değerleri ise pH ölçüm kitiyle yapılmıştır (Aquarosa).

3.3.3. Sıcaklık

Havuz suyunun sıcaklığı örneklerin alınması sırasında termometre kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.4. Alkalinite

Havuz suyundaki alkalinite miktarının ölçümü için 2 basamaklı asit titrasyon deneyi uygulanmıştır [69]. Bu deneyde ilk basamakta fenolftalein alkalinitesi, ikinci basamakta toplam alkalinite ölçülmüştür. Su örneği alkalinite ölçümünden önce sudaki asılı halde bulunan maddeleri uzaklaştırmak için 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius) süzölmüştür. Daha sonra 100 ml örneğe 2-3 damla fenolftalein indikatör çözeltisi

damlatılarak pembe renk oluşumu gözlenmiştir. Bu basamakta gözlenen pembe renk fenolftalein alkalinitesinin varlığını göstermektedir. Ardından renk kaybolana kadar 0.1 N hidroklorik asit (HCl) ile titrasyon yapılmış ve harcanan HCl miktarı kaydedilmiştir. İkinci basamakta toplam alkaliniteyi ölçmek için aynı örneğin üzerine 4-8 damla metil oranj indikatörü damlatılmış ve sarı renk oluşumu gözlenmiştir. Sarı renk turuncuya dönene kadar 0.1 N HCl ile titrasyon yapılmış ve harcanan HCl miktarı kaydedilmiştir. Toplam alkalinite miktarı aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam alkalinite (mg/L)} = \frac{(\text{S}).(\text{N}).(50).(1000)}{\text{Örnek hacmi (ml)}}$$

S: Örneğin titrasyonu sırasında metil oranj noktasına kadar harcanan HCl miktarı (ml)

N: HCl normalitesi

3.3.5. Toplam Çözünmüş Katı Madde Miktarı (TÇM)

Havuz suyunun toplam çözünmüş katı madde (TÇM) miktarı WTW LF-95 kondüktivitemetre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sırasında su örneğinin sıcaklığının 25°C'de olması sağlanmıştır. Ayrıca kullanılan cihaz her kullanımdan önce 25 °C'de 0.01 M potasyum klorür (KCl) ile kalibre edilmiştir [70].

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerinin ve aralarındaki istatistiksel ilişkilerin belirlenmesi için SPSS 16.0 programı kullanılmıştır. Bakteri sayıları, karbonhidrat miktarı, suyun fiziksel ve kimyasal parametreleri arasındaki ilişki Sperman korelasyon katsayıları testi ile gösterilmiştir. Anlamlılık değeri $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

3.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.5.1. Charcoal Yeast Ekstract (CYE) Agar

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

121 °C'de 20 dk. steril edilir. 45-50 °C' ye soğuması beklenir. Ardından BCYE besiyeri katkı maddesi ilave edilir.

3.5.2. 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

Su banyosunda 10 dakika kaynatılır. 30-40°C'ye soğuduktan sonra 10 M KOH ile pH 6.9'a ayarlanır. 0.22 μ m por çaplı filtreden geçirilerek steril edilir ve CYE Agara eklenir.

3.5.3. Water Plate Count Agar

Tripton	6.0 g
Maya özütü	3.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.2 ± 0.2 121 °C'de 15 dk steril edilir.

3.5.4. Non-nutrient Agar

Bakteriyolojik agar	15 g
Distile su	1000 ml

121 °C'de 15 dk steril edilir.

3.5.5. Page Saline

NaCl	120.0 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	4.0 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.0 mg
Na ₂ HPO ₄	142.0 mg
KH ₂ PO ₄	136.0 mg
Distile su	1000 ml

pH: 6.8±0.1 121 °C'de 15 dk steril edilir.

3.5.6. *Escherichia coli* Süspansiyonu

Nutrient Agar besiyerinde üretilen 24 saatlik *E.coli* kültürü Page Saline içerisine eklenerek yoğun bir bulanıklık elde edilir. Bu karışım 121 °C'de 20 dk bekletilerek *E.coli* bakterilerinin ölmesi sağlanır. Elde edilen süspansiyon özgür yaşayan amiplere besin kaynağı olarak kullanılır.

3.5.7. %0.5'lik Sodyum Tiyosülfat

Sodyum tiyosülfat	2.5 g
Distile su	500 ml

3.5.8. HCl-KCl Asit

HCl	105 ml
KCl	14.9 g
Distile su	2 lt

1 lt distile su üzerine 105 ml saf HCl ilavesiyle 1.2 mol/L HCl, 1 lt distile su içine 14.9 gr KCl eritilerek 0.2 mol/L KCl stok solüsyonu hazırlanır. Stok HCl solüsyonundan 3.9 ml, stok KCl solüsyonundan 25 ml alınarak karıştırılır. Bu asit karışımının pH'sı 1 mol/L KOH ile 2.2 ± 0.2 ye ayarlandıktan sonra karanlıkta cam şişede saklanır ve taze olarak kullanılır [11].

3.5.9. 3x Fosfat Tamponu (PBS)

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

NaCl ile pH 7.2'ye ayarlanır.

3.5.10. 1x PBS

3xPBS	33 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

3.5.11. 5 M Sodyum Klorür

NaCl	292.5 g
Distile su	1000 ml

0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.12. 1 M Sodyum Hidroksit

NaOH	4 g
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.13. 10 M Sodyum Hidroksit

NaOH	10 g
Distile su	25 ml'ye tamamlanır.

0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.14. 1 M Hidrojen Klorür

HCl	0.015 g
Distile su	25 ml

3.5.15. %10 Sodyumdodecylsulfate (SDS)

SDS	2 g
Distile su	20 ml'ye tamamlanır.

0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.16. 1 M Tris HCl

Tris	6.05 g
Distile su	25 ml

HCl ile pH 8'e ayarlanır.

Distile su ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlanır.
0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.17. 0.5 M EDTA

EDTA 9.05 g

Distile su 40 ml

10 M NaOH ile pH 8.0 ayarlanır.

Distile su ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlanır.

0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.18. Tris EDTA

1 M Tris HCl 1 ml

0.5 M EDTA 200 µl

Distile su 100 ml'ye tamamlanır.

pH: 8 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.19. Paraformaldehit (PFA)

1xPBS 6.5 ml

Paraformaldehit 0.4 g

1 M NaOH 1 damla

3xPBS 3.3 ml

1 M HCl 1 damla

pH 7.2. 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilir.

3.5.20. Hibridizasyon Tamponu

5 M NaCl 360 µl

1m Tris/HCl (pH 8.0) 40 µl

Formamid:

Legionella türleri için 400 µl

Özgür yaşayan amipler için 600µl

Bidistile su:

Legionella türleri için 1200µl

Özgür yaşayan amipler için 1000µl

%10 SDS 4 µl

3.5.21. Yıkama Tamponu

Tris/HCl (pH 8.0) 1ml

5M NaCl:

Legionella türleri için 2250µl

Özgür yaşayan amipler için 1120µl

0.5M EDTA:

Legionella türleri için 500µl

Özgür yaşayan amipler için 500µl

Santrifüj tüpü 50 ml'ye kadar bidistile su ile doldurulur.

%10 SDS 50 µl

3.5.22. 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)

1 mg/ml stok için 50 mg DAPI, 50 ml filtre edilmiş bidistile su içinde çözülür ve bidistile su ile 50 kat sulandırılarak 20 mg/L'lik çalışma süspansiyonu elde edilir. Elde edilen süspansiyon Eppendorf tüplerine bölünüp -20 °C' de saklanır.

3.5.23. Fenolftalein İndikatör Çözeltisi

Fenolftalein 0.5 g

%95'lik etil alkol 50 ml

Distile su 5 ml

3.5.24. Metil Oranj İndikatör Çözeltisi

Metil oranj 0.05 g

Distile su 100 ml

3.5.25. NaCl-Formaldehit Çözeltisi

NaCl 8.5 g

%37'lik formaldehit 0.22 ml

Distile su 100ml

3.5.26. % 5'lik Fenol Çözeltisi

Fenol	5 ml
Distile su	100 ml

3.5.27. 0.1 N Hidroklorik Asit Çözeltisi

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

3.5.28. 0.01 M Potasyum Klorür

KCl	0.745 g
Distile su	1000 ml

3.5.29. 10 M Potasyum Hidroksit

KOH	5.6 g
Distile su	10 ml'ye tamamlanır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda İstanbul genelinde bulunan 25 adet yüzme havuzuna ait su ve biyofilm örnekleri kültür ve FISH yöntemi kullanılarak mikrobiyolojik açıdan incelenmiş, örnek alınan havuz sularının fiziksel ve kimyasal özellikleri araştırılmıştır.

Yüzme havuzlarına ait su örneklerinin kültür yöntemine göre incelenmesinde havuzların 23'ünde (%92) toplam aerobik heterotrofik bakteriler, 4'ünde (%16) özgür yaşayan amipler saptanmış, fakat havuzların hiçbirinde *Legionella* cinsi bakterilere rastlanmamıştır. Aynı havuzlara ait biyofilm örneklerinin kültür yöntemiyle incelenmesi sonucunda havuzların 21'inde (%84) toplam aerobik heterotrofik bakteriler, 2'sinde (%8) özgür yaşayan amipler, 1'inde (%4) *Legionella* cinsi bakteriler görülmüştür (Tablo 4.1).

Su örneklerindeki özgür yaşayan amipler ve *Legionella* cinsi bakterilerin FISH yöntemine göre incelenmesi sonucunda yüzme havuzlarının 7'sinde (%28) özgür yaşayan amiplere, 6'sında (%24) *Legionella* cinsi bakterilere rastlanmıştır. Havuzlara ait biyofilm örneklerinin FISH yöntemine göre incelenmesi sonucunda havuzların 6'sında (%24) özgür yaşayan amipler, 7'sinde (%28) *Legionella* cinsi bakteriler görülmüştür (Tablo 4.2).

Tablo 4.1: İncelenen havuzlarda kültür yöntemine göre saptanan mikroorganizmaların dağılımı

Mikroorganizmalar \ Örnekler	Su		Biyofilm	
	Sayı	%	Sayı	%
Toplam Heterotrofik Bakteriler	23	92	21	84
Özgür Yaşayan Amipler	4	16	2	8
<i>Legionella</i> Cinsi Bakteriler	0	0	1	4

Tablo 4.2: İncelenen havuzlarda FISH yöntemine göre saptanan mikroorganizmaların dağılımı

Mikroorganizmalar \ Örnekler	Su		Biyofilm	
	Sayı	%	Sayı	%
Özgür Yaşayan Amipler	7	28	6	24
<i>Legionella</i> Cinsi Bakteriler	6	24	7	28

4.1. KÜLTÜR YÖNTEMİNE GÖRE SONUÇLAR

4.1.1. Yüzme Havuzlarında Kültür Yöntemine Göre Saptanan Toplam Aerobik Heterotrofik Bakteriler

Yüzme havuzlarından alınan su ve biyofilm örneklerinde kültür yöntemine göre saptanan toplam aerobik heterotrofik bakteriler Tablo 4.3 ve Şekil 4.1’de görülmektedir. 22°C’de kültüre edilen su örneklerinin 5’inde (%20) (1, 2, 10, 14, 25), 37°C’de kültüre edilen örneklerin 5’inde (%20) (1, 2, 10, 14, 25) ml’ de üreyen toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısınının 200’ü aştığı saptanmıştır (>200 kob/ml). Aynı havuzlara ait biyofilm örneklerinin incelenmesi sonucu 22°C’de inkübe edilen örneklerin 4’ünün (2, 8, 10, 25), 37°C’de inkübe edilen örneklerin 3’ünün (8, 10, 25) >200 kob/ml olduğu görülmüştür.

Tablo 4.3: Yüzme havuzlarında toplam aerobik heterotrofik bakterilerin dağılımı

Havuz No	Su (kob/ml)		Biyofilm (kob/cm ²)	
	22°C	37°C	22°C	37°C
1	345	280	128	80
2	240	397	218	157
3	57	66	1.3	0
4	0	0	15	59
5	0	0	0	0
6	3	0	0	1
7	166	5	5.3	1
8	30	0	256	275
9	102	16	38	0
10	460	685	525	465
11	163	86	1	0
12	28	13	0	15
13	60	135	85	14
14	202	345	101	27
15	116	53	0	0
16	48	78	36	1
17	45	33	1	0
18	84	64	0	0
19	130	149	77	89
20	117	40	40	56
21	30	26	1	0
22	24	24	0	0
23	24	22	2	1
24	22	19	7	5
25	560	370	236	230

kob: koloni oluşturan birim



Şekil 4.1: Water PCA besiyerinde üreyen toplam aerobik heterotrofik bakteriler

4.1.2. Yüzme Havuzlarında Kültür Yöntemine Göre Saptanan Özgür Yaşayan Amipler

İncelenen yüzme havuzlarından alınan su ve biyofilm örneklerinde kültür yöntemine göre özgür yaşayan amiplerin üreme durumu Tablo 4.4'te görülmektedir. Bu mikroorganizmalara havuz suyu örneklerinin 4'ünde (2, 13, 14, 20), biyofilm örneklerinin 2'sinde (10, 20) rastlanmıştır. NNA besiyerinde üremiş olan özgür yaşayan amiplerin ışık mikroskobundaki görüntüleri Şekil 4.2'de görülmektedir. 20 nolu havuzun biyofilm örneğinde 37°C'de üreme gösteren özgür yaşayan amiplerin 44°C'de de üreme gösterdiği saptanmıştır.

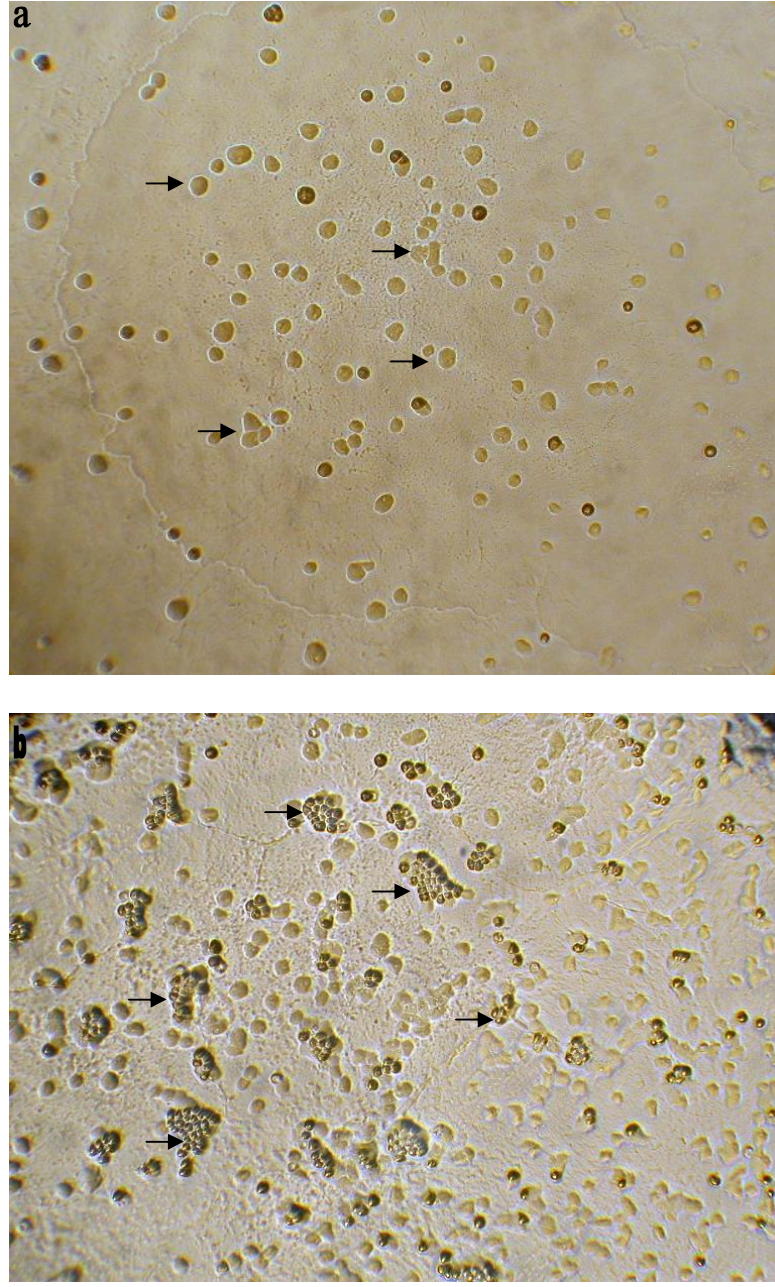
Tablo 4.4: Yüzme havuzlarında özgür yaşayan amiplerin dağılımı

Havuz No	Su	Biyofilm
1	-	-
2	+	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	+
11	-	-
12	-	-
13	+	-
14	+	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	+	+
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	-	-

* : 37°C ve 44°C de üreme görülmüştür.

+: üreme var

-: üreme yok



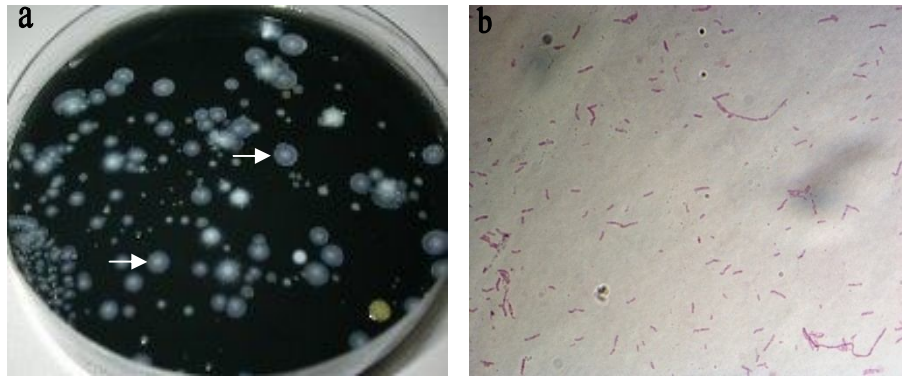
Şekil 4.2: NNA besiyerinde üremiş özgür yaşayan amiplerin ışık mikroskopundaki görüntüsü (100x) a) Trofozoit, b) Kist

4.1.3. Yüzme Havuzlarında Kültür Yöntemine Göre Saptanan *Legionella* Cinsi Bakteriler

İncelenen yüzme havuzlarından alınan su ve biyofilm örneklerinde kültür yöntemine göre saptanan *Legionella* cinsi bakteriler Tablo 4.5'te, bu bakterilerin BCYE agardaki kolonileri ve ışık mikroskobundaki görüntüleri Şekil 4.3'te görülmektedir. *Legionella* cinsi bakterilere havuz suyu örneklerinde rastlanmadığı halde biyofilm örneklerinin 1'inde (1 nolu havuz) rastlanmıştır.

Tablo 4.5: Yüzme havuzlarında *Legionella* cinsi bakterilerin dağılımı

Havuz No	Su (kob/ml)	Biyofilm (kob/cm ²)
1	0	200
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	0	0
23	0	0
24	0	0
25	0	0



Şekil 4.3: *Legionella* cinsi bakteriler a) BCYE agar Petrisinde b) Gram boyama (1000x)

4.2. FISH YÖNTEMİNE GÖRE SONUÇLAR

4.2.1. Yüzme Havuzlarında FISH Yöntemine Göre Saptanan Özgür Yaşayan Amipler

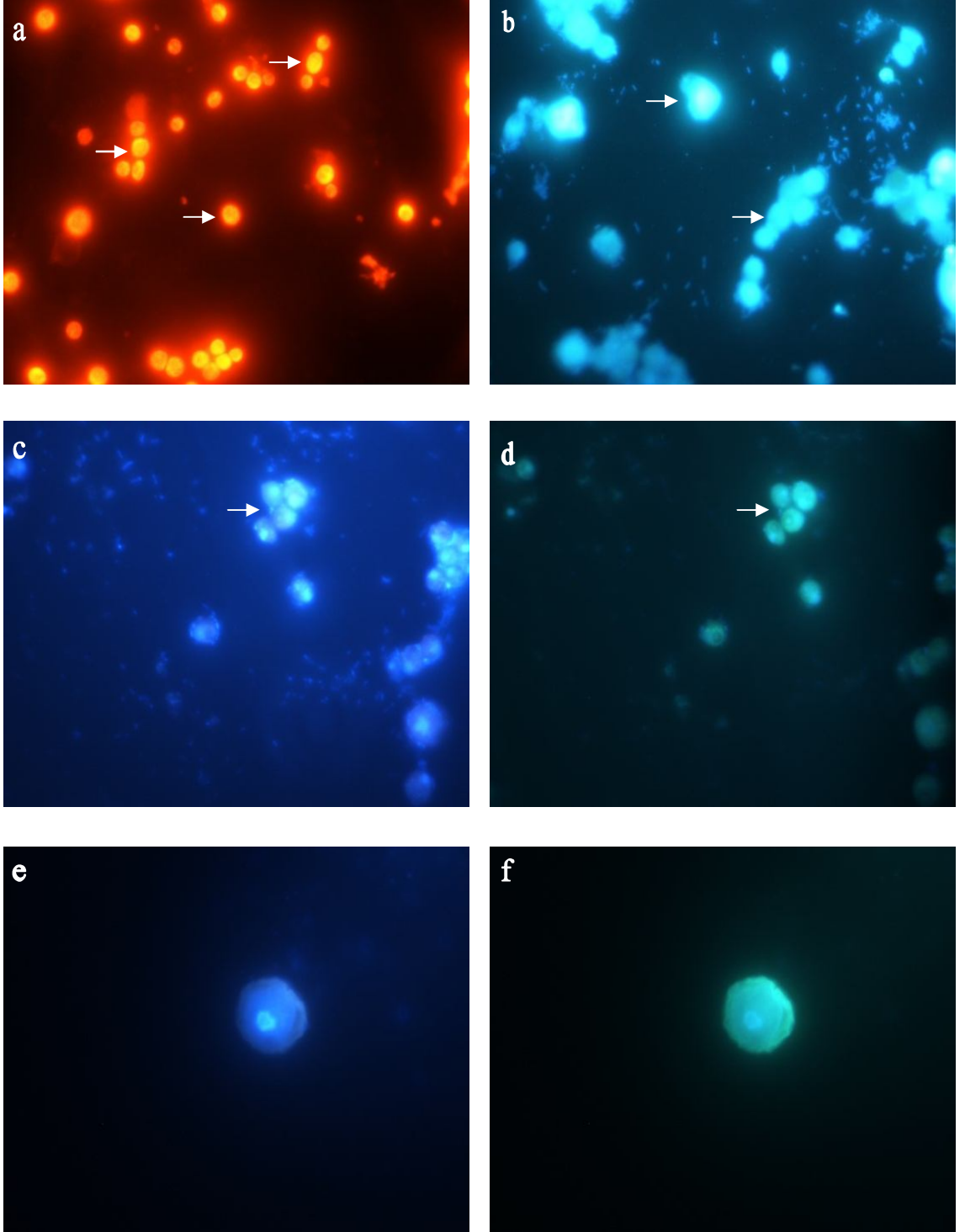
Yüzme havuzlarından alınan su ve biyofilm örneklerinde FISH yöntemine göre saptanan özgür yaşayan amipler Tablo 4.6, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te görülmektedir. Bu yöntemle incelenen su örneklerinin 7'sinde, biyofilm örneklerinin 6'sında özgür yaşayan amipler bulunmuştur. Su örneklerinin 7'sinde (1, 2, 4, 10, 13, 14, 20) *Acanthamoeba* cinsi amiplere rastlanmıştır, *Hartmanella* cinsi amiplere rastlanmamıştır. İncelenen biyofilm örneklerinin 5'inde (1, 10, 13, 14, 20) *Acanthamoeba* cinsi amipler, 1'inde (2 nolu havuz) *Hartmanella* cinsi amipler görülmüştür.

Tablo 4.6: FISH yöntemine göre saptanan özgür yaşayan amipler

Havuz No	Su (hücre/ml)		Biyofilm (hücre/cm ²)	
	AC.	HART.	AC.	HART.
1	32.1 x10 ²	0	0.36 x10 ⁵	0
2	3.56 x10 ²	0	0	0.36 x10 ⁵
3	0	0	0	0
4	14.3 x10 ²	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	14.3 x10 ²	0	0.36 x10 ⁵	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	7.13 x10 ²	0	0.36 x10 ⁵	0
14	10.7 x10 ²	0	0.71 x10 ⁵	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	32.1 x10 ²	0	0.71 x10 ⁵	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0

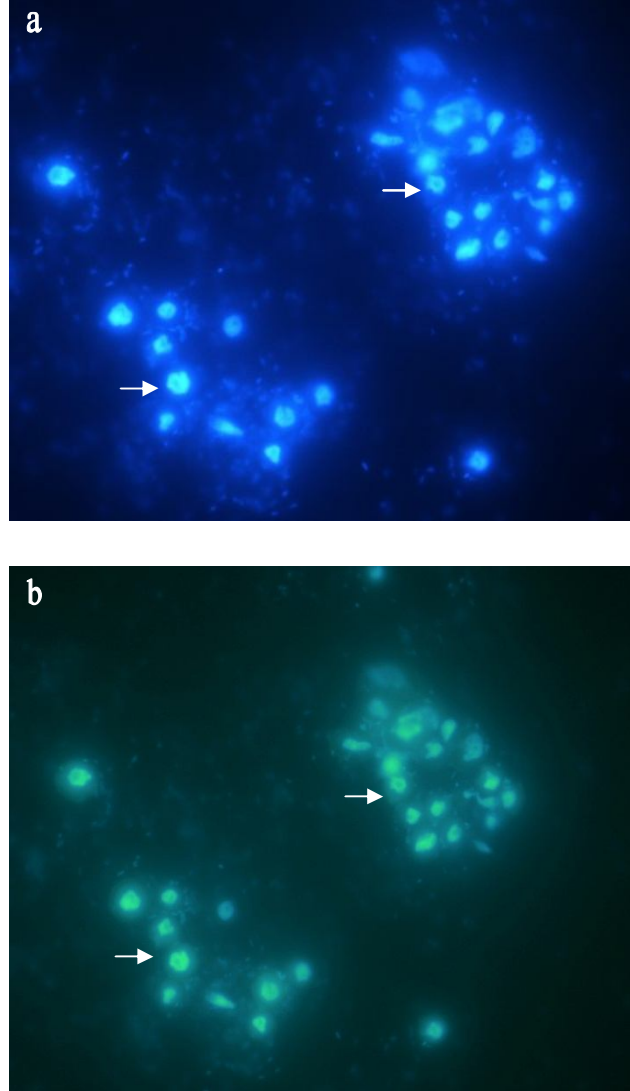
AC: *Acanthamoeba*
HART: *Hartmanella*

Yüzme havuzlarında FISH yöntemine göre saptanan *Acanthamoeba* cinsi amiplerin epifloresan mikroskoptaki görüntüsü Şekil 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.4: *Acanthamoeba*'nın epifloresan mikroskoptaki görüntüleri a) EUK516-CY3 (500x) b) ACANTHA-FAM (500x) c) ACANTHA-DAPI (500x) d) ACANTHA-FAM (500x) e) ACANTHA-DAPI (1000x) f) ACANTHA-FAM (1000x)

Yüzme havuzlarında FISH yöntemine göre saptanan *Hartmanella* cinsi amiplerin epifloresan mikroskoptaki görüntüsü Şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5: *Hartmanella*'nın epifloresan mikroskoptaki görüntüleri
a) HART 498-DAPI (500x) b) HART 498-FAM (500x)

4.2.2. Yüzme Havuzlarında FISH Yöntemine Göre Saptanan *Legionella* Cinsi Bakteriler

Yüzme havuzlarından alınan su ve biyofilm örneklerinin gerek Leg PNE 1 gerek Leg 705 problemleri kullanılarak FISH yöntemine göre incelenmesi sonucunda su örneklerinin 6'sında (%24), biyofilm örneklerinin 7'sinde (%28) *Legionella* cinsi bakterilere rastlanmıştır (Tablo 4.7). Leg PNE1 probunun kullanımı sonucu su örneklerinin 1'inde (14 nolu havuz), biyofilm örneklerinin 4'ünde (12, 14, 21, 22) *L. pneumophila* serogrup 1 saptanmıştır.

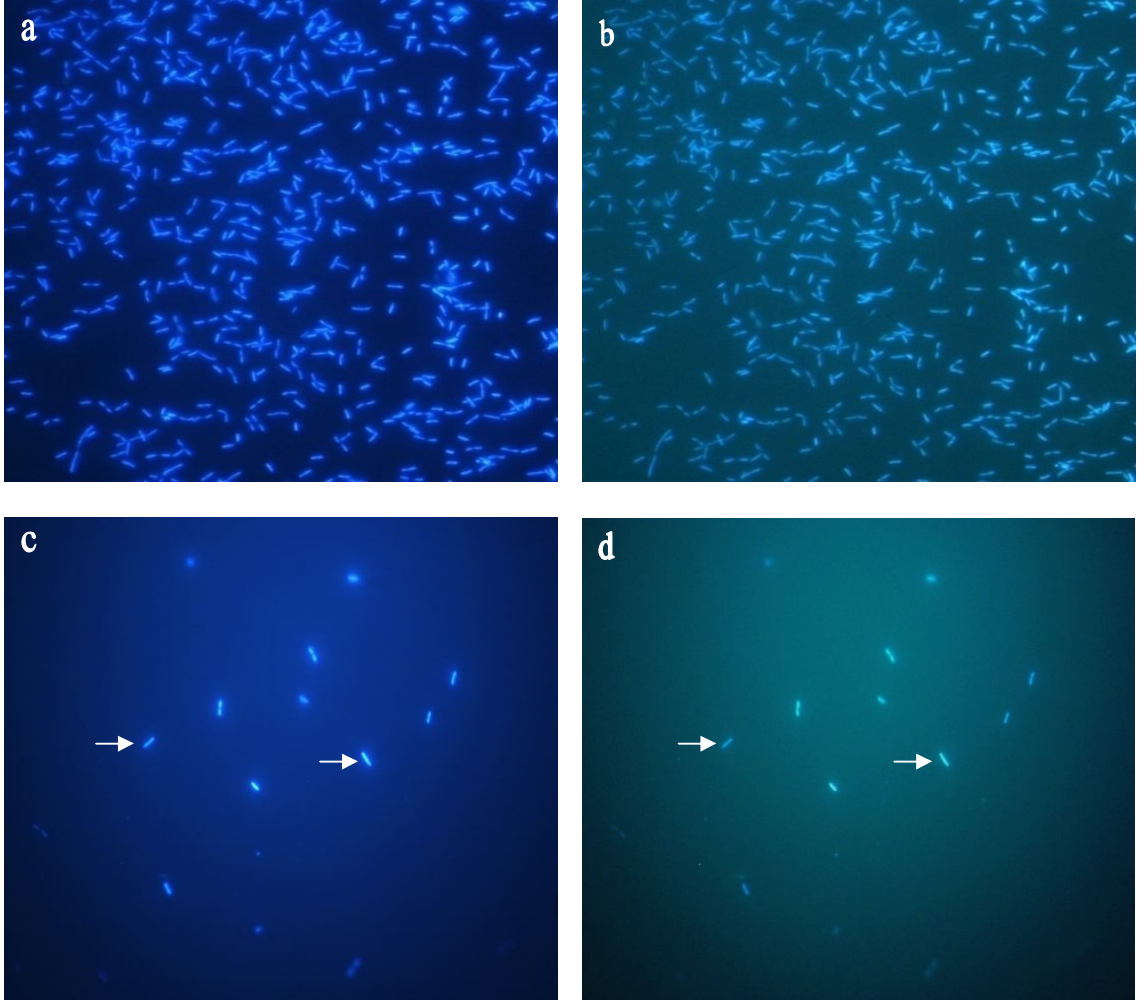
Tablo 4.7: FISH yöntemine göre saptanan *Legionella* cinsi bakteriler

Havuz No	Su (hücre/ml)		Biyofilm (hücre/cm ²)	
	LPS1	LEG.	LPS1	LEG.
1	0	0	0	0.36 x10 ⁵
2	0	17.8x10 ²	0	11 x10 ⁵
3	0	0.36 x10 ²	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0.59x10 ²	0	0.36 x10 ⁵
11	0	0	0	0
12	0	0	0.36 x10 ⁵	0.36 x10 ⁵
13	0	0.48 x10 ²	0	0
14	3.65x10 ²	8.32 x10 ²	4.6 x10 ⁵	8.9 x10 ⁵
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0.12 x10 ²	0.36 x10 ⁵	0
22	0	0	0.71 x10 ⁵	1.8 x10 ⁵
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0

LPS1: *Legionella pneumophila* serogrup 1

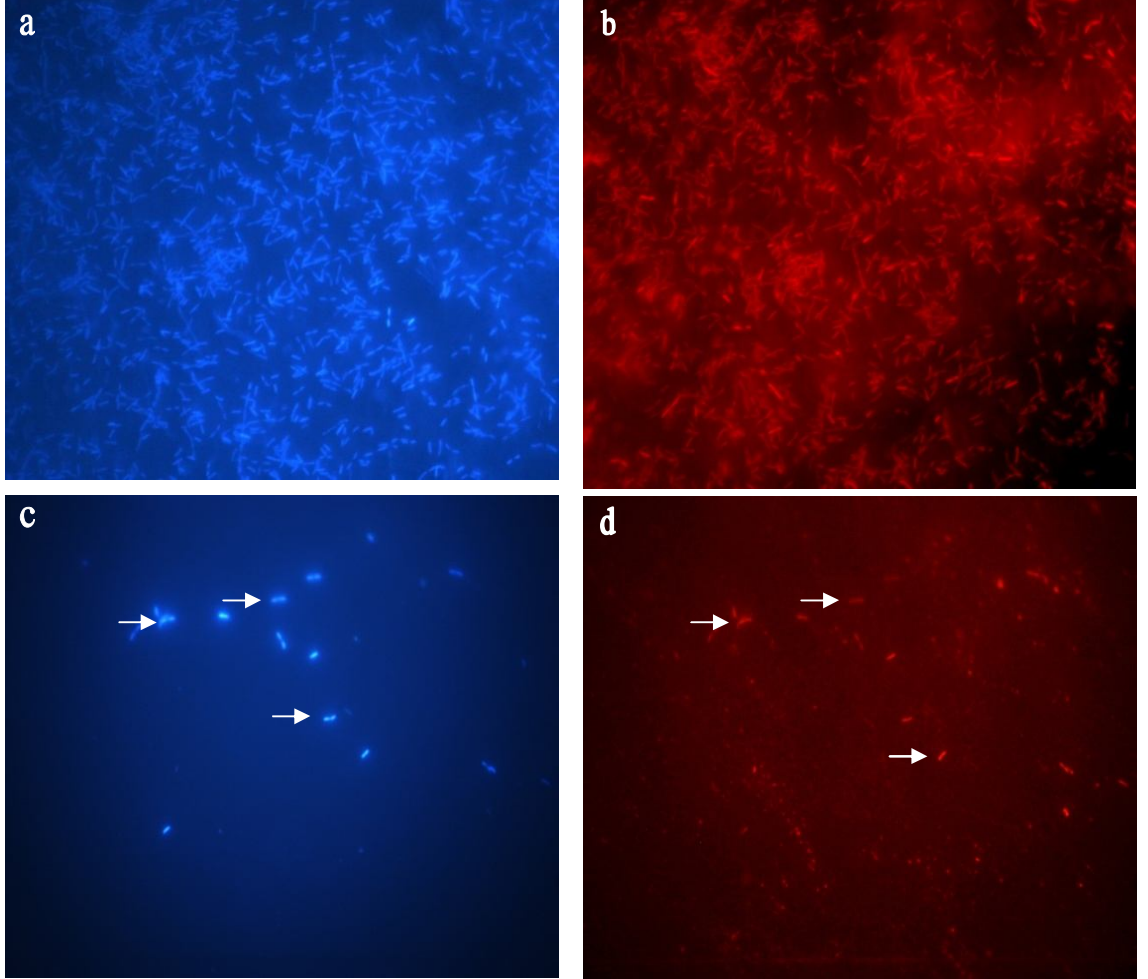
LEG: Legionellaceae

Yüzme havuzlarında FISH yöntemine göre saptanan *Legionella* cinsi bakterilerin mikroskopik görüntüsü Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6: *Legionella* cinsi bakterilerin epifloresan mikroskoptaki görüntüleri
a,c) Leg 705-DAPI (500x) b, d) Leg 705-FAM (500x)

Yüzme havuzlarında FISH yöntemine göre saptanan *Legionella pneumophila* serogrup 1'in mikroskopik görünümü Şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.7: *Legionella pneumophila* serogrup 1'in epifloresan mikroskoptaki görüntüsü
a, c) Leg PNE 1- DAPI (1000x) b, d) Leg PNE1-CY3 (1000x)

4.3. ANKET SONUÇLARINA GÖRE YÜZME HAVUZLARININ ÖZELLİKLERİ

Yapılan anket sonuçlarına göre yüzme havuzlarının 6'sının (%24) açık, 19'unun (%76) kapalı olarak faaliyet gösterdiği, kapalı havuzlardan 1'inin termal havuz olarak işletildiği görülmüştür. Havuzların 21'inin 10 yıldan az, 4'ünün 10 yıldan fazla süredir faaliyet gösterdiği öğrenilmiştir. İncelenen yüzme havuzlarının 17'sinde (%68) yalnızca klorla dezenfeksiyon yönteminin kullanıldığı, 3 havuzda (%12) klorla dezenfeksiyona ek olarak iyonizasyon ve ozonlama, 3 havuzda (%12) yalnız bromla dezenfeksiyon, 1 havuzda (%4) yalnız ozonlama, 1 havuzda (%4) yalnız iyonizasyon yönteminin

kullanıldığı öğrenilmiştir. Havuzları kullanan günlük kişi sayısının 21 havuzda 10-60, 5 havuzda 120-300 arasında olduğu, havuz içi malzemesinin 18 havuzda fayans, 4 havuzda betebe, 3 havuzda pable olduğu öğrenilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Anket sonuçlarına göre yüzme havuzlarının özellikleri

HAVUZ ÖZELLİKLERİ					
Havuz No	Havuz Yaşı	Havuz İç Malzemesi	Kullanım Özelliği	Kullanım sıklığı (kişi/gün)	Dezenfeksiyon Yöntemi
1	4	Fayans	Açık	50	Klor
2	4	Fayans	Açık	10	Klor
3	6	Fayans	Kapalı	30	Klor, iyonizasyon
4	2	Fayans	Kapalı	150	Klor
5	6	Pable	Kapalı	300	Klor, iyonizasyon,ozon
6	2	Pable	Kapalı	30	Klor
7	2	Fayans	Kapalı	150	Klor, ozon
8	3	Fayans	Kapalı	200	Klor
9	12	Fayans	Kapalı	60	Klor
10	10	Fayans	Kapalı	60	Klor
11	5	Betebe	Açık	30	Klor
12	5	Betebe	Açık	10	Klor
13	6	Betebe	Kapalı	10	Brom
14	6	Betebe	Açık	20	Brom
15	4	Fayans	Kapalı	30	Klor
16	6	Fayans	Kapalı	20	Klor
17	15	Fayans	Açık	10	Klor
18	7	Fayans	Kapalı	30	Klor
19	3	Fayans	Kapalı	15	Klor
20	2	Pable	Kapalı(termal)	10	Brom
21	3	Fayans	Kapalı	55	Klor
22	2	Fayans	Kapalı	10	Ozon
23	18	Fayans	Kapalı	30	Klor
24	8	Fayans	Kapalı	25	Klor
25	3	Fayans	Kapalı	120	İyonizasyon

4.4. YÜZME HAVUZLARININ FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Örnek alınan yüzme havuzlarının mikrobiyolojik özelliklerinin yanında araştırılan EPS, serbest klor, pH, sıcaklık, alkalinite, TÇM, iletkenlik gibi fiziksel ve kimyasal değerleri Tablo 4.9’da görülmektedir. Serbest klor değeri, klorla dezenfekte edilen 5 açık havuzdan 2’sinde (%40) 1-3 mg/L aralığında, 15 kapalı havuzdan 6’sında (%40) 1-1.5 mg/L aralığında bulunmuştur. İncelenen tüm yüzme havuz sularının pH değerlerinin 6.5-7.8 arasında olduğu saptanmıştır. 6 açık havuzun tümünün su sıcaklığı 8-18°C, 19 kapalı havuzun 10’unun (%53) sıcaklığı 26-28°C olarak ölçülmüştür. Havuzların tümünün alkalinitesinin 30-180 mg/L arasında olduğu, TÇM değerlerinin <2500 mg/L olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.9: İncelenen yüzme havuzlarına ait fiziksel ve kimyasal değerler

Havuz No	Serbest Klor (mg/L)	pH	Sıcaklık (°C)	Alkalinite (mg/L)	TÇM
1*	0.15	6.8	8	70	768
2*	0.15	6.8	8	75	796
3	4	7.2	30	70	885
4	3	6.8	28	75	1109
5	4	6.8	28	80	480
6	3	6.8	27	50	626
7	4	7.4	29	70	760
8	1.5	6.8	28	85	732
9	1.5	6.8	28	45	1163
10	0.6	6.8	24	110	680
11*	3	6.8	18	100	600
12*	4	7.4	9	60	1535
13	1.5	6.8	30	75	405
14*	1	7.2	8	82	1030
15	0.30	7.4	27	90	1988
16	1	7.4	29	105	655
17*	1	6.8	8	70	1300
18	1	7.2	28	95	1250
19	0.40	7.4	28	100	690
20	0.15	7.4	38	75	755
21	1.5	7.4	28	75	528
22	1.5	7.2	33	80	897
23	3	6.8	20	75	775
24	1.5	7.2	27	90	445
25	0.60	6.5	29	110	1923

*: Açık yüzme havuzları

İncelenen havuzlara ait biyofilm tabakasında saptanan toplam aerobik heterotrofik bakteri sayıları ile EPS'den elde edilen glukoz konsantrasyonları Tablo 4.10'da görülmektedir. Yapılan Spearman's korelasyon testine göre bu bakterilerin sayıları ile glukoz konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Tablo 4.10: Biyofilm örneklerindeki toplam aerobik heterotrofik bakteriler ve EPS glukoz konsantrasyonları

Havuz No	TAHB sayıları		Glukoz konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$)
	22°C	37°C	
1	128	80	2
2	218	157	0.9
3	1.3	0	0.5
4	15	59	3.7
5	0	0	4.4
6	0	1	2.6
7	5.3	1	1.1
8	256	275	7.1
9	38	0	3.1
10	525	465	0.9
11	1	0	4.5
12	0	15	1.9
13	85	14	0.6
14	101	27	1.3
15	0	0	5.2
16	36	1	0.9
17	1	0	0.5
18	0	0	1.8
19	77	89	7.5
20	40	56	5.6
21	1	0	1.2
22	0	0	1.5
23	2	1	0.7
24	7	5	1.4
25	236	230	7.9

Çalışmamızda araştırılan mikroorganizmalar ile havuz sularının fiziksel ve kimyasal özellikleri arasındaki ilişkiler Tablo 4.11, 4.12, 4.13' te gösterilmiştir. Buna göre serbest klor değeri normal bulunan 9 yüzme havuzunun 8'inde (8, 9, 11, 16, 17, 18, 21, 24) TAHB sayısının <200 kob/ml olduğu bulunmuştur. Serbest klor değeri düşük bulunan 6 yüzme havuz suyundan 3'ünde (1, 2, 10), serbest klor değeri yüksek bulunan 10 havuzun 1'inde (14) TAHB sayısı yüksek (>200 kob/ml) bulunmuştur. Yapılan Spearman's korelasyon analizine göre 22°C ve 37°C'deki TAHB ile havuz sularına uygulanan serbest klor değerleri arasında negatif yönde güçlü bir ilişki saptanmıştır ($p<0.01$). İncelenen yüzme havuz sularının tümünün pH, alkalinite ve TÇM değerlerinin normal sınırlar içinde olduğu saptanmıştır. Su sıcaklığı normal aralıkta bulunan 10 havuzun TAHB sayıları da normal değerlerde görülmüştür. Su sıcaklığının düşük olduğu 8 havuzun 4'ünde (1, 2, 10, 14), yüksek olduğu 7 havuzun 1'inde (25) TAHB sayısı >200 kob/ml bulunmuştur.

Tablo 4.11: Havuzlara ait toplam aerobik heterotrofik bakteriler (TAHB) ile fiziksel ve kimyasal değerler

Havuz No	Su(kob/ml)		Biyofilm(kob/cm ²)		Serbest klor (mg/L)	pH	Sıcaklık (°C)	Alkalinite (mg/L)	TÇM
	22°C	37°C	22°C	37°C					
1*	345	280	128	80	0.15	6.8	8	70	768
2*	240	397	218	157	0.15	6.8	8	75	796
3	57	66	1.3	0	4	7.2	30	70	885
4	0	0	15	59	3	6.8	28	75	1109
5	0	0	0	0	4	6.8	28	80	480
6	3	0	0	1	3	6.8	27	50	626
7	166	5	5.3	1	4	7.4	29	70	760
8	30	0	256	275	1.5	6.8	28	85	732
9	102	16	38	0	1.5	6.8	28	45	1163
10	460	685	525	465	0.6	6.8	24	110	680
11*	163	86	1	0	3	6.8	18	100	600
12*	28	13	0	15	4	7.4	9	60	1535
13	60	135	85	14	1.5	6.8	30	75	405
14*	202	345	101	27	1	7.2	8	82	1030
15	116	53	0	0	0.30	7.4	27	90	1988
16	48	78	36	1	1	7.4	29	105	655
17*	45	33	1	0	1	6.8	8	70	1300
18	84	64	0	0	1	7.2	28	95	1250
19	130	149	77	89	0.40	7.4	28	100	690
20	117	40	40	56	0.15	7.4	38	75	755
21	30	26	1	0	1.5	7.4	28	75	528
22	24	24	0	0	1.5	7.2	33	80	897
23	24	22	2	1	3	6.8	20	75	775
24	22	19	7	5	1.5	7.2	27	90	445
25	560	370	236	230	0.60	6.5	29	110	1923

*: Açık yüzme havuzları

Serbest klor değeri normal bulunan 9 havuzda (8, 9, 11, 16, 17, 18, 21, 24, 25) özgür yaşayan amiplere rastlanmamıştır. Serbest klor değeri düşük bulunan 6 havuzun 4'ünde (1, 2, 10, 20), serbest klor değeri yüksek bulunan 10 havuzun 3'ünde (4, 13, 14) özgür yaşayan amiplere rastlanmıştır. Yapılan Spearman's korelasyon analizine göre özgür yaşayan amipler ve serbest klor miktarları arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$). Yüzme havuzlarının tümünün pH, alkalinite ve TÇM değerlerinin normal sınırlar içinde olduğu saptanmıştır. Özgür yaşayan amiplere su sıcaklığının normal görüldüğü havuzların 1'inde (4), düşük görüldüğü havuzların 4'ünde (1, 2, 10, 14) ve yüksek görüldüğü havuzların 2'sinde (13, 20) rastlanmıştır.

Tablo 4.12: Havuzlara ait özgür yaşayan amipler ile fiziksel ve kimyasal değerler

Havuz No	Su(hücre/ml)	Biyofilm(hücre/cm ²)		Serbest Klor (mg/L)	pH	Sıcaklık (°C)	Alkalinite (mg/L)	TÇM
	AC.	AC.	HART.					
1*	32.1 x10 ²	0.36x10 ⁵	0	0.15	6.8	8	70	768
2*	3.56 x10 ²	0	0.36x10 ⁵	0.15	6.8	8	75	796
3	0	0	0	4	7.2	30	70	885
4	14.3 x10 ²	0	0	3	6.8	28	75	1109
5	0	0	0	4	6.8	28	80	480
6	0	0	0	3	6.8	27	50	626
7	0	0	0	4	7.4	29	70	760
8	0	0	0	5	6.8	28	85	732
9	0	0	0	1.5	6.8	28	45	1163
10	14.3 x10 ²	0.36x10 ⁵	0	0.6	6.8	24	110	680
11*	0	0	0	3	6.8	18	100	600
12*	0	0	0	4	7.4	9	60	1535
13	7.13 x10 ²	0.36x10 ⁵	0	1.5	6.8	30	75	405
14*	10.7 x10 ²	0.71x10 ⁵	0	1	7.2	8	82	1030
15	0	0	0	0.30	7.4	27	90	1988
16	0	0	0	1	7.4	29	105	655
17*	0	0	0	1	6.8	8	70	1300
18	0	0	0	1	7.2	28	95	1250
19	0	0	0	0.40	7.4	28	100	690
20	32.1 x10 ²	0.71x10 ⁵	0	0.15	7.4	38	75	755
21	0	0	0	1.5	7.4	28	75	528
22	0	0	0	1.5	7.2	33	80	897
23	0	0	0	3	6.8	20	75	775
24	0	0	0	1.5	7.2	27	90	445
25	0	0	0	0.60	6.5	29	110	1923

*: Açık yüzme havuzları

AC: *Acanthamoeba*

HART: *Hartmanella*

Serbest klor değeri normal bulunan 9 havuzun (8, 9, 11, 16, 17, 18, 21, 24, 25) 1'inde (21) *Legionella* cinsi bakteriler saptanmıştır. Serbest klor değeri düşük bulunan 6 havuzun 3'ünde (1, 2, 10), serbest klor değeri yüksek bulunan 10 havuzun 5'inde (3, 12, 13, 14, 22) *Legionella* cinsi bakterilere rastlanmıştır. Yüzme havuzlarının tümünün pH, alkalinite ve TÇM değerlerinin normal sınırlar içinde olduğu saptanmıştır. *Legionella* cinsi bakterilere su sıcaklığının normal olduğu havuzların 1'inde (21), düşük olduğu havuzların 5'inde (1, 2, 10, 12, 14), yüksek olduğu havuzların 3'ünde (3, 13, 22) rastlanmıştır.

Tablo 4.13: Havuzlara ait *Legionella* cinsi bakteriler ile fiziksel ve kimyasal değerler

Havuz No	Su (hücre/ml)		Biyofilm(hücre/cm ²)		Serbest (mg/L)	pH	Sıcaklık (°C)	Alkalinite (mg/L)	TÇM
	LPS1	LEG	LPS1	LEG					
1*	0	0	0	0.36x10 ⁵	0.15	6.8	8	70	768
2*	0	17.8x10 ²	0	11 x10 ⁵	0.15	6.8	8	75	796
3	0	0.36x10 ²	0	0	4	7.2	30	70	885
4	0	0	0	0	3	6.8	28	75	1109
5	0	0	0	0	4	6.8	28	80	480
6	0	0	0	0	3	6.8	27	50	626
7	0	0	0	0	4	7.4	29	70	760
8	0	0	0	0	1.5	6.8	28	85	732
9	0	0	0	0	1.5	6.8	28	45	1163
10	0	0.59x10 ²	0	0.36x10 ⁵	0.6	6.8	24	110	680
11*	0	0	0	0	3	6.8	18	100	600
12*	0	0	0.36 x10 ⁵	0.36x10 ⁵	4	7.4	9	60	1535
13	0	0.48x10 ²	0	0	1.5	6.8	30	75	405
14*	3.65x10 ²	8.32x10 ²	4.6 x10 ⁵	8.9x10 ⁵	1	7.2	8	82	1030
15	0	0	0	0	0.30	7.4	27	90	1988
16	0	0	0	0	1	7.4	29	105	655
17*	0	0	0	0	1	6.8	8	70	1300
18	0	0	0	0	1	7.2	28	95	1250
19	0	0	0	0	0.40	7.4	28	100	690
20	0	0	0	0	0.15	7.4	38	75	755
21	0	0.12x10 ²	0.36 x10 ⁵	0	1.5	7.4	28	75	528
22	0	0	0.71 x10 ⁵	1.8 x10 ⁵	1.5	7.2	33	80	897
23	0	0	0	0	3	6.8	20	75	775
24	0	0	0	0	1.5	7.2	27	90	445
25	0	0	0	0	0.60	6.5	29	110	1923

*: Açık yüzme havuzları

LPS1: *Legionella pneumophila* serogrup 1

LEG: Legionellaceae

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli ülkelerde yüzme havuzlarının mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri için kabul edilen standart değerler arasında farklılıklar bulunmaktadır. 22°C'de kültüre edilen toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı Almanya standartlarına göre ≤ 100 kob/ml, 37°C'de kültüre edilen toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı İtalya standartlarına göre ≤ 200 kob/ml, Almanya standartlarına göre ≤ 100 kob/ml, İngiltere standartlarına göre < 10 kob/ml ve Avustralya standartlarına göre ≤ 100 kob/ml olarak belirlenmiştir [71]. Ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2008 ve 2010 yıllarında yayınlanan yönetmeliklere göre yüzme havuzlarında olması gereken toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı 22°C'de 72 saatte ≤ 100 kob/ml ve 37 °C'de 48 saatte ≤ 100 kob/ml olarak belirtilmiştir [47]. Çalışmamızın ortalarında 2011'de yayınlanan son genelgede ise 37°C'de 24 saat inkübasyon sonucu toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının ≤ 200 kob/ml olması gerektiği belirtilmiştir [7].

Çalışmamızda 22°C'de kültüre edilen havuz suyu örneklerinin 5'inde (%20), 37°C'de inkübe edilen örneklerin 5'inde (%20) ml'de üreyen toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının 200'ü aştığı saptanmıştır. Biyofilm örneklerine ait standart değerler konusunda herhangi bir yönetmelik olmamasına rağmen, çalışmamızda aynı havuzlardan alınan biyofilm örneklerinin incelenmesinden elde edilen sonuçlara göre 22°C'de inkübe edilen örneklerin 4'ünün (%16), 37°C'de inkübe edilen örneklerin 3'ünün (% 12) 200 kob/ml sınırını aştığı bulunmuştur. Çalışmamıza benzer olarak Esterman ve diğ. [72] Güney Avustralya'da inceledikleri 100 havuzun 13'ünde 20°C'deki toplam bakteri sayısının, 11'inde 35°C'deki toplam bakteri sayısının Avustralya standartlarıncı belirlenen 100 kob/ml limitini aştığını belirtmiştir. Leoni ve diğ. [71] tarafından yapılan çalışmada ise İtalya'nın Bologna şehrindeki 12 yüzme havuzu incelenmiş ve su örneklerinin %21.1'inde 36°C'de üreyen toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının mililitrede 200'den fazla olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda 9 yüzme havuzuna ait örneklerin alınmasına (15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) Bakırköy Belediyesi Çevre Koruma ve Kontrol Birimi görevlileri ile birlikte gidilmiştir. Bu havuzlar toplam aerobik heterotrofik bakteriler açısından T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından belirtilen standartlara uygun bulunmuştur. Bu da belediye kontrollerinin toplam aerobik heterotrofik bakteriler açısından başarılı olduğunu göstermektedir. Buna karşın Keswick ve diğ. [73] yaptıkları çalışmada inceledikleri belediye havuzlarına ait örneklerin %36'sında toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısını yüksek (≥ 200) görmüşlerdir.

Yüzme havuzlarının toplam aerobik heterotrofik bakteriler açısından kirliliği konusunda yapılan literatür araştırmasında bu havuzlardan sadece su örneklerinin alınıp incelendiği görülmüştür. Oysa çalışmamızda kirliliği araştırılan yüzme havuzlarının hem su örnekleri hem biyofilm örnekleri alınarak incelenmiştir. 200 kob/ml sınırını aşan 3 havuza ait biyofilm örneklerinde de bu bakteriler yoğun olarak üretilmiştir. Ayrıca 1 havuzun su örneğinde toplam aerobik heterotrofik bakteriler üremediği halde, biyofilm örneklerinde üreme görülmüştür (Tablo 4.3). Havuzlarda oluşmuş biyofilm tabakasından kopan mikroorganizmaların zamanla suya geçtiği bilindiğinden [1], biyofilm temizliği yapılmadığı takdirde bu havuzların sularındaki kirliliğinin artması kaçınılmaz olacaktır. Çalışmamızda yapılan Spearman's korelasyon analizine göre su ve biyofilm örneklerindeki toplam aerobik heterotrofik bakteri sayıları arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki saptanmıştır ($p < 0.01$). Buna göre biyofilm örneklerindeki toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı arttıkça suda bulunan toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı da artmaktadır. Bu nedenle havuz sularının kirliliğinin araştırılması amacıyla yapılan tüm çalışmalarda hem su hem biyofilm örneklerinin alınması ve incelenmesinin gerektiğini düşünmekteyiz.

Özgür yaşayan amipler pek çok su ortamında yaşayabildiği gibi yüzme havuzlarında da yaşayıp çoğalarak sağlık için tehlike oluşturabilirler. Yüzme aktivitesi sırasında yüzücülerle karşılaşan ve ağız, burun gibi yollarla vücuda girebilen bu amipler merkezi sinir sistemi ve korneada olumsuz etkilere neden olabilirler. Ayrıca özgür yaşayan amipler, *Legionella* cinsi bakteriler gibi fırsatçı patojen mikroorganizmalara ev sahipliği yaparak bu organizmaların uygun olmayan çevresel koşullardan korunmasına ve ortamda yayılmasına destek olurlar [22]. Esterman ve diğ. [72] Güney Avustralya'daki

100 yüzme havuzunun 34'ünde özgür yaşayan amipleri izole etmişler; 14'ünü *Naegleria* spp., 4'ünü *Acanthamoeba* spp. olarak tanımlamışlardır. Çalışmamızda kültür yöntemine göre havuz suyu örneklerinin 4'ünde (%16), biyofilm örneklerinin 2'sinde (%8) özgür yaşayan amipler görülmüştür. Ancak bu mikroorganizmaların sadece morfolojik özelliklerine bakılarak isimlendirmeleri yapılmamıştır. Bu çalışmada izole edilen bu özgür yaşayan amiplerin patojen olup olmadıkları, yani sağlık riski oluşturup oluşturmadıkları bilinmemektedir. Özgür yaşayan amiplerin potansiyel patojenliğinin belirlenmesinde kullanılan kriterler arasında yüksek sıcaklıkta çoğalma (termotolerant özellik), PCR ile spesifik gen bölgesinin araştırılması, farelerde enfeksiyon oluşturma gibi yöntemler bulunmaktadır [50, 74]. Çalışmamızda izole edilen özgür yaşayan amiplerin termotolerant aktivitelerinin belirlenmesi için 44°C'de üreme özellikleri incelenmiş, bunun sonucunda yalnız 1 havuzun biyofilm örneğinde termotolerant özellik gösteren amiplere rastlanmıştır (Tablo 4.4). Nitekim bu havuz termal özellikte faaliyet göstermekte olup, örnekleme sırasında diğer havuz sularında su sıcaklığı 20-33°C arasında ölçülürken, bu havuzda 38°C olarak ölçülmüştür. Gornik ve Kuzna-Grygiel [75] Polonya'nın Szczecin şehrindeki açık ve kapalı yüzme havuzlarında virulent özellikteki amiplerin varlığını araştırmayı amaçladığı çalışmalarında termofil özellik gösteren amiplere %37.2 oranında rastlamışlardır. Ayrıca hayvan deneyleri ile bu amiplerin %31.25'inin virulent özellikte olduğunu saptamışlardır. Wannasan ve diğ. [50] Tayland'ın Chiang Mai şehrindeki doğal su kaynaklarıyla ilgili yaptıkları çalışmada %28.6 oranında termotolerant özellik gösteren özgür yaşayan amiplere rastlamışlardır. Bunların %37.5'inin *Naegleria* spp., %18.8'inin *Acanthamoeba* spp. olduğu ve incelenen su kaynaklarının yerel halk için tehlike oluşturduğu belirtilmiştir. Edagawa ve diğ. [76] Japonya'nın Osaka şehrindeki su arıtma tesisleri ve göllerdeki özgür yaşayan amiplerin dağılımını amaçladıkları çalışmalarında örneklerin %68.7'sinden özgür yaşayan amipleri izole etmişler, bu örneklerin %86.9'unun 42°C'de üreme gösterdiği ve PCR yöntemiyle inceleme sonucu %33.9'unun Vahlkampfiidae ailesinden, %7.2'sinin Acanthamoebidae ailesinden olduğunu saptamışlardır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda havuz suyundan izole ettiğimiz termotolerant suşun patojenitesini tam olarak ortaya çıkarabilmek amacıyla hayvan deneylerinin ve PCR yönteminin kullanılacağı çalışmaların yapılması planlanmaktadır. Ayrıca izole edilen her bir amibin PCR yöntemiyle tanımlanmalarının yapılması ileriki çalışmalarla mümkün olacaktır.

25 havuza ait örnekler kültür yöntemine göre incelendiğinde özgür yaşayan amipler 4 su (%16), 2 biyofilm (%8) örneğinde saptanmıştır (Tablo 4.4). Kültür yönteminde gözlenen morfolojinin idendifikasyon konusunda yeterli olmaması nedeniyle özgür yaşayan amiplerin cins düzeyinde idendifikasyonlarının ve sayılarının gerçekleştirilmesi için FISH yöntemi kullanılmıştır. Aynı su ve biyofilm örneklerinin FISH yöntemine göre incelenmesi sonucu 7 su (%28), 6 biyofilm (%24) örneğinde farklı cinslere ait özgür yaşayan amipler tespit edilmiştir (Tablo 4.6). Bu sonuçlara bakıldığında FISH yönteminin gerek sayı gerekse idendifikasyon kolaylığı açısından kültür yöntemine göre daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kültür yöntemine göre daha kısa sürede sonuç vermesi ve organizmaların doğal ortamlarında incelenmesinin sağlanması bu yöntemi daha da üstün kılmaktadır. Ancak bu mikroorganizmaların elde edilmesi, patojenitesinin ve PCR yöntemiyle ileri idendifikasyonlarının yapılabilmesi için mutlaka kültür yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır.

Legionella cinsi bakteriler su sıcaklığı, pH değeri, besleyici madde miktarı gibi faktörlerin uygun olması durumunda yüzme havuzlarında bulunması mümkün olan bakterilerdir. Aynı ortamda özgür yaşayan amiplerin bulunması *Legionella* türlerinin bu ortamda kolonize olmasını uygun kılmaktadır. Bu sistemde aerosoller yoluyla yayılan bu bakteri, havuzları kullanan kişilerde çeşitli hastalıklara neden olmaktadır [1, 17]. Çalışmamızda yüzme havuzlarının *Legionella* cinsi bakteriler açısından kültür yöntemine göre incelenmesi sonucunda su örneklerinin hiç birinde bu mikroorganizmaya rastlanmazken aynı havuzlara ait biyofilm örneklerinin 1'inde (%4) rastlanmıştır (Tablo 4.5). Buna benzer olarak Fields ve diğ. [77] tarafından yapılan bir çalışmada *Legionella* türleri havuz suyu örneklerinde saptanmadığı halde havuz filtresinde (150 kob/ml) saptanmıştır. Çalışmamızda aynı havuzlardan alınan örneklerin FISH yöntemine göre incelenmesi sonucunda su örneklerinin 6'sında (%24), biyofilm örneklerinin 7'sinde (%28) *Legionella* cinsi bakterilere rastlanmıştır. Su örneklerinin 1'inden (%4), biyofilm örneklerinin 4'ünden (%16) izole edilen bu bakterilerin *L.pneumophila* serogrup 1 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Benin ve diğ. (2002) ABD'de otellerin yüzme havuzlarıyla ilgili yaptıkları çalışmada 1 spa havuzunun biyofilm örneğinde *L. pneumophila* serogrup 6'ya rastlamışlardır. Leoni ve diğ. [55] İtalya'nın Bologna şehrindeki yüzme havuz ve duş sularında *Legionella* cinsi

bakterilerin varlığını araştırmayı amaçladıkları çalışmalarında sırasıyla %4.2, %56 oranında *Legionella* türlerini (*L. micdadei* 15 kob/L, *L. bozemanii* 10 kob/L) izole etmişler ve duş kullanıcılarının yüzücülerden daha fazla risk altında bulduklarını belirtmişlerdir. Buna benzer bir sonuç Kalker ve Hentschel [78] tarafından yapılan bir çalışmada görülmüş, *Legionella* türlerine duş sularında havuz sularına göre daha fazla sayıda rastlanmıştır. Ayrıca Fields ve diğ. [77] yaptıkları bir çalışmada *Legionella* türlerine rastladıkları havuzlarda toplam heterotrofik bakteri sayısını da yüksek bulmuşlardır. Nitekim alışmamızda da sudaki toplam aerobik heterotrofik bakteri sayıları ile *Legionella* cinsi bakteriler arasında yapılan istatiksels analize göre güçlü bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$).

Çalışmamızda *Legionella* türlerine kültür yöntemine göre 1 havuzda (200 kob/ml), FISH yöntemine göre 9 havuzda rastlanmıştır. Bu sonuçlara bakıldığında FISH yönteminin *Legionella* cinsi bakterileri saptama konusunda gerek sayı gerekse identifikasyon açısından kültür yönteminden daha üstün olduğu söylenebilir. Ayrıca bu bakteriler düşük miktarda besin, pH, tuzluluk gibi çeşitli faktörler nedeniyle canlı fakat kültüre edilemeyen (VBNC) faza girebilmektedir. Bu fazda canlıdırlar, metabolik aktivitelerini devam ettirirler fakat normalde üretildikleri besiyerlerinde retilemezler. FISH metodu *Legionella* cinsi bakterilerin bu fazda da görülmesini sağlamaktadır. Nitekim Steinert ve diğ. [79] *L. pneumophila* Philadelphia I JR 32 suşunu steril musluk suyuna ekerek bakteri sayısındaki azalmayı kültür ve FISH metoduyla Leg 705 probu kullanarak inceledikleri çalışmalarında durgun su içinde, oda sıcaklığında, karanlık ortamda 125 gün inkübasyondan sonra kültür metoduyla bu bakteriyi üretemedikleri halde, FISH yöntemiyle inceleme sonucunda saptamışlardır. Öte yandan tıpkı zgr yaşayan amiplerde olduğu gibi *Legionella* cinsi bakterilerin de elde edilmesi ve ileriki çalışmalarda kullanılabilmesi için kültür yönteminin kullanılması şarttır.

Özgür yaşayan amipler ve *Legionella* cinsi bakterilerin aynı su ortamında birlikte bulunması insan sağlığı için tehlike oluşturmaktadır. Çünkü *Legionella* cinsi bakteriler zgr yaşayan amip kistleri içerisinde yerleşerek suyun yüksek sıcaklığı, pH dalgalanmaları, suya uygulanan dezenfeksiyon işlemleri gibi olumsuz koşullardan korunabilirler. Özgür yaşayan amipleri replikasyon aracı olarak kullanan *Legionella* türleri olumsuz şartların ortadan kalkması sonucu sistemde yeniden çoğalabilmektedir.

Hatta *Legionella* cinsi bakteriler amipler içerisindeki replikasyonları sonucu farklılaşır; kısa kalın çomak şeklini alır, solunum sayısı ve metabolik aktivitesini azaltarak daha dayanıklı hale gelir [80, 81, 82]. Nitekim çalışmamızda 3 su, 2 biyofilm örneğinde *Legionella* cinsi bakteriler görülmezken özgür yaşayan amipler saptanmıştır (Tablo 4.6; 4.7). Bu nedenle bu örneklerde *Legionella* cinsi bakterilerin özgür yaşayan amipler içerisinde saklı olma ihtimali düşünülmektedir. Benzer bir sonuç Rose ve diğ. [83] tarafından yapılan çalışmada görülmüş, *Legionella* cinsi amiplere rastlanmazken, küçük Hartmanellid kistleri saptanmıştır. Öte yandan Sanden ve diğ., [84] *Legionella* cinsi bakterilere daha çok özgür yaşayan amiplerin bulunduğu örneklerde rastlamıştır. Bu nedenle özgür yaşayan amiplerin içlerinde muhtemelen saklı halde bulunan bu bakterilerin varlığının gösterilmesi ve bu amipler içerisinde çıkarılıp üretilmesi yeni çalışmalar ile mümkün olacak ve konunun aydınlığa kavuşması sağlanacaktır. Bu bağlamda, havuz suyu ve biyofilm örneklerinde *Legionella* cinsi bakterilerin varlığı araştırılırken, aynı zamanda özgür yaşayan amiplerinde araştırılması o ortamdaki *Legionella* cinsi bakterilerinin gerçek sayısını vermesi açısından anlamlı bir çalışma olacaktır.

Bilindiği gibi havuz sularının dezenfeksiyonu için uygulanmakta olan birçok dezenfeksiyon yöntemi vardır. Bunlardan en yaygın kullanılanı klorla yapılan dezenfeksiyondur. Bunun nedeni, ekonomik olması, uygulamasının kolay olması, toksik olmaması ve mikrop öldürücülüğünün güçlü olmasıdır [85]. Ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yüzme havuzlarının denetimi konusunda yayınlanan son yönetmeliğine göre serbest klor değeri kapalı havuzlarda 1-1,5 mg/L, açık havuzlarda 1-3 mg/L, ozon, UV gibi diğer dezenfeksiyon yöntemlerinin de kullanıldığı havuzlarda 0.3-0.6 mg/L aralığında olmalıdır. Çalışmamızda serbest klor değeri, klorla dezenfekte edilen 5 açık havuzdan 2'sinde (%40), 15 kapalı havuzdan 6'sında (%40) ve diğer dezenfeksiyon yöntemlerinin de kullanıldığı 5 havuzdan 1'inde (%20) istenen aralıkta bulunmuştur (Tablo 4.8; 4.9). Buna ek olarak 10 havuzda (%40) serbest klor değeri yüksek, 6 havuzda (%24) ise düşük bulunmuştur (Tablo 4.9). Çalışmamıza benzer olarak yapılan araştırmalarda Esterman ve diğ. [72] Güney Avustralya'da inceledikleri havuzların %41'inde, Leoni ve diğ. [71] İtalya'da inceledikleri havuzların %44.7'sinde serbest klor değerinin standart değerlerden düşük olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda serbest klor değeri normal aralıkta bulunan havuzlardaki toplam aerobik heterotrofik bakteri miktarının genellikle T.C. Sağlık Bakanlığı'nın belirlediği miktarlarda olduğu görülmüştür (Tablo 4.11). Bu durum T.C. Sağlık Bakanlığı'nca belirlenen serbest klor miktarının şehrimizdeki havuzlarda toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının kontrolünde yeterli olduğunu göstermektedir. Nitekim serbest klor değerinin normalden düşük olduğu havuzlarda toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının standart değer olan 200 kob/ml'den yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.11). Çalışmamız kapsamında yapılan Spearman's korelasyon analizine göre toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı ve serbest klor miktarları arasında negatif yönde güçlü bir ilişki saptanmıştır ($p < 0.01$). Buna göre sulara uygulanan serbest klor miktarı arttıkça havuz sularındaki toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısı azalmaktadır. Buna benzer olarak Leoni ve diğ. [71] ve Black ve diğ. [86] yaptıkları çalışmalarda, kirliliğin yüksek olduğu havuzlarda klor miktarını düşük miktarlarda saptamışlardır. Buna karşın Fields ve diğ. [77] havuzlarda yüksek dezenfektan düzeyine rağmen fazla sayıda toplam aerobik heterotrofik bakterilere rastlamışlardır.

Çalışmamızda özgür yaşayan amiplere serbest klor değerinin normal olduğu havuzlarda rastlanmamıştır (Tablo 4.12). Bu da şehrimizde havuzlara uygulanan dezenfektan miktarının özgür yaşayan amiplerin kontrolü açısından yeterli olduğu fikrini akla getirmektedir. Öte yandan daha yüksek serbest klor (3 mg/L) saptanan havuz suyu örneklerinde *Acanthamoeba* cinsi amiplere rastlanması ilgi çekicidir. Çalışmamız kapsamında yapılan Spearman's korelasyon analizine göre özgür yaşayan amipler ve serbest klor miktarları arasında negatif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ($p < 0.05$). Nitekim Rivera ve diğ. [87] Meksika'daki yüzme havuzlarında yaptıkları çalışmada havuzlardaki serbest klor değerlerinin 0.50-1.5 mg/L arasında olduğunu ve bu miktarların havuzlardaki özgür yaşayan amiplerin uzaklaştırılması için yeterli olmadığını belirtmişlerdir. Esterman ve diğ. [72] ise 1 mg/L serbest klorun özgür yaşayan amip türlerini kontrol altına alabileceğini belirtmişlerdir. Jonckheere ve Voorde [88] *Acanthamoeba*'nın serbest klorla yüksek direnç gösterdiğini 4 mg/L serbest klorun *Acanthamoeba* türlerini 3 saat muamele sonucu yok etmediğini belirtmişlerdir. Dawson ve Brown [85] *Acanthamoeba* cinsi amiplerin *Naegleria* cinsine göre klor ve klor dioksite karşı daha dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda *Legionella* cinsi bakteriler serbest klor değerinin normal olduğu havuzlarda %11, düşük olduğu havuzlarda ise %50 oranında görülmüştür (Tablo 4.13). Nitekim Leoni diğ. [55] *Legionella* cinsi bakterilerin bulunduğu havuzlarda serbest klor miktarını İtalya standartlarına göre düşük bulmuşlardır.

Çalışmamızda incelenen havuzlarda yaygın olarak klorla dezenfeksiyon yönteminin kullanıldığı ve genellikle kirliliğin kontrolünde yeterli olduğu görülmüştür. Klorla dezenfeksiyon ile birlikte iyonizasyon ve ozonlama yöntemlerinin de kullanıldığı 5 numaralı havuzda hiçbir mikroorganizmaya rastlanmamıştır. Bu durum birden fazla dezenfeksiyon yönteminin birlikte kullanımının kirlilik kontrolünde oldukça etkili olduğunu düşündürmektedir. Yalnız ozonlama ile dezenfekte edilen 1 havuzda özgür yaşayan amiplere rastlanmamış fakat biyofilm örneğinde *L. pneumophila* serogrup 1'e rastlanmıştır. Çalışmamızda bromla dezenfeksiyon yapılan havuzlarda özgür yaşayan amiplere rastlanmaması (Tablo 4.8, 4.12), iyonizasyon uygulanan havuzda özgür yaşayan amipler ve *Legionella* cinsi bakterilerin olmayıp toplam aerobik heterotrofik bakterilerin saptanması dezenfeksiyon yöntemleri ile bu çalışmada araştırılan mikroorganizmaların eliminasyonu arasında bir ilişkinin olduğu fikrini akla getirmektedir. Bu konunun açıklığa kavuşturulması için örnek sayısının artırılarak yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir. Nitekim Thomas ve diğ. [81] tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli dezenfeksiyon yöntemlerinin mikroorganizmalar üzerine etkisi araştırılmış, klor ve klor dioksit en etkili dezenfektan olarak saptanmıştır. Toplam aerobik heterotrofik bakteri sayısının klor ve elektro-klorlama ile tamamen yok edildiği, klor dioksit ve ozonlama ile de önemli derecede azaldığı görülmüştür. Monokloramin ve bakır-gümüş iyonizasyon tekniğinin toplam aerobik heterotrofik bakteriler üzerinde etkisi görülmemiştir. Ozon, klor, elektro-klor, klor dioksit suda bulunan amipleri azaltırken bu yöntemlerden hiçbirinin tamamen yok edemediği belirtilmiştir. Biyofilm içindeki amiplerin ise hiçbir dezenfeksiyon yönteminden etkilenmediği görülmüş, amiplerin bu yönüyle *L.pneumophila*'nın dezenfektanlardan korunmasında görev alabileceği bir kez daha belirtilmiştir. *L.pneumophila* içeren mikrobiyal floranın azaltılmasında ise klor dioksit ve klor etkili görülmüş, bakır-gümüş iyonizasyonu boyunca, *Legionella*'nın azaldıktan sonra tekrar çoğaldığı gözlenmiştir. Ayrıca Kilvington ve Price [89] tarafından *Acanthamoeba polyphaga*'nın 0-100 mg/L

arasındaki serbest klorla muamelesi boyunca *L. pneumophila*'nın kist içindeki canlılığını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmaya göre *L. pneumophila*'nın *Acanthamoeba polyphaga* kistleri içerisinde 50 mg/L serbest klorla kadar canlılığını koruduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda incelenen 25 yüzme havuzunun tümünün pH değerinin T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından belirlenen 6.5-7.8 arasında olduğu saptanmıştır. Oysa Esterman ve diğ. [72] Güney Avustralya'da inceledikleri yüzme havuzlarının %37'sinde pH değerinin ideal olarak belirtilen 7.0-7.6 aralığının dışında olduğunu, Black ve diğ. [86] inceledikleri yüzme havuzlarının %51'inin belirlenen pH aralığı olan 7.2-8.2 dışında olduğunu, Leoni ve diğ. (1999) İtalya'da inceledikleri havuzların %7.9'unda pH değerinin standart değerler olan 6.5-8.5'tan daha düşük olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda incelenen 19 kapalı havuzun 10'unun su sıcaklığının T.C. Sağlık Bakanlığı'nca belirlenen değer olan 26-28°C arasında olduğu, 2'sinin bu değer altında, 7'sinin ise üzerinde olduğu saptanmıştır (Tablo 4.9). İncelenen açık havuzların tümünün su sıcaklığı T.C. Sağlık Bakanlığı'nca belirlenen değer olan 26-38°C'nin altında görülmüştür. Açık havuzların örnekleme Şubat-Nisan ayları arasında yapılmış olmasının buna etken olacağı düşünülmektedir. Leoni ve diğ. [71] inceledikleri havuzların %47.4'ünde su sıcaklıklarının beklenen değer (22-28°C) dışında bulmuştur. Örneklerin %13.6'sının 30°C'yi aştığı ve bu sıcaklığın özgür yaşayan amiplerin üremelerini destekleyebileceğini belirtmişlerdir. Gornik ve Kuzna-Grygiel [75] Polonya'da yaptıkları çalışmada 10 kapalı ve 3 açık havuzu inceledikleri çalışmalarında, su sıcaklığını kapalı havuzlarda 27-33°C, açık havuzlarda 27-30°C arasında ölçmüşlerdir.

Çalışmamızda incelenen havuzlara ait su örneklerindeki alkalinite ve TÇM değerleri T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından belirtilen kriterlere uygun bulunmuştur. Aynı havuzlara ait biyofilm örneklerinde saptanan EPS miktarları ile toplam aerobik heterotrofik bakteri sayıları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Nitekim Hoca [70] ve İlhan-Sungur [90] yaptıkları çalışmalarda su sıcaklığı ve zamana bağlı olarak biyofilmdeki karbonhidrat miktarının anlamlı şekilde

azaldığı belirtmiş, bakterinin bu şartlarda kendi ürettikleri EPS'yi kullanma ihtimali üzerinde durmuşlardır.

Çalışmamıza göre elde edilen sonuçlar şöyledir;

- Bir havuz suyunun yüzücülerin sağlığı açısından tehlikeli olup olmadığını anlamak için su örneklerinin yanı sıra biyofilm örneklerinin de incelenmesi gerekmektedir.
- Yüzme havuzlarını kullanan kişilerin sağlığı T.C. Sağlık Bakanlığı yönetmeliğinde belirtilen toplam aerobik heterotrofik bakterilerin yanı sıra bu yönetmelikte yer almayan özgür yaşayan amipler ve *Legionella* cinsi bakteriler açısından da tehdit altında bulunmaktadır.
- Yukarıda adı geçen mikroorganizmaların araştırılması için kültür yönteminin yanı sıra FISH yönteminin de kullanılması gerekmektedir.
- İstanbul'daki özellikle belediyelerin kontrolü altında bulunan yüzme havuzlarının sağlık kriterlerine uygun olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO), 2007, *Legionella* and The Prevention of Legionellosis. ISBN 92 4 156297 8. World Health Organization, Geneva.
2. Ulusal Havuz Enstitüsü (UHE), 2009, Havuz Operatör El Kitabı, UHE Teknik Komisyonu, Teknik Yayın, No:3.
3. Health and Safety Executive. Legionnaires' Disease: Controlling the risks associated with using spa baths, *HSE Information sheet*, HSE Infoline 08701 545500.
4. GÜLLÜOĞLU, S., 2010, Havuz, Çocuk ve Dezenfeksiyon, Disinfection of Swimming Pool Water, ISBN: 978-605-61249. www.havuz.info.tr.
5. World Health Organization (WHO), 2006, *Guidelines for Safe Recreational Water Environments*, vol. 2, *Swimming Pools, Spas and Similar Recreational Water Environments*. World Health Organization, Geneva.
6. South Australian Health Commission, *Standart for The Operation of Swimming Pools and Spa Pools in South Australia*, Department of Human Services, ISBN 0-7243-4062-9.
7. http://www.uhe.org.tr/yayinlar/saglik-bakanligi-yonetmeligi_1302179407.pdf [Ziyaret tarihi: 20 Haziran 2011]
8. Health Protection Agency (2005). The microbiological examination of water samples. National Standard Method QSOP 57 Issue 2. http://www.hpa.standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
9. World Health Organization (WHO), 2003. *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. London, UK. ISBN: 1 84339 025 6.
10. <http://havuz.info.tr/tr/blog/saglik-bakanligi-genelgeleri-ve-yoenetmelik/saglik-bakanliginca-kontrol-edilmesi-istenilen-bakteriler> [Ziyaret tarihi: 03 Şubat 2011]
11. ZEYBEK, Z., 2000, *İstanbul'da Binaların Su Sistemlerinde Legionella Cinsi Bakterilerin Araştırılması*, Doktora, Fen Bilimleri Enstitüsü.
12. TÜRETGEN, İ., 1998, *Soğutma Kuleleri Suyunda Legionella Cinsi Bakterilerin Araştırılması*, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.

13. KAYABEK, Y., Lejyoner Hastalığı, Çevresel Önlemler ve Korunma Yöntemleri, Tesisat Mühendisliği / Eylül-Ekim 2002. 28-38.
14. Health and Safety Executive. Legionnaires' disease The control of *Legionella* bacteria in water systems Approved Code of Practice and guidance, ISBN 978 0 7176 1772 2, HSE Books; 2000, 1-68.
15. KWAİK, Y. A., YONG GAO, L., 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.
16. World Health Organization (WHO), 2007, *Legionella* and The Prevention of Legionellosis. ISBN 92 4 156297 8. World Health Organization, Geneva.
17. Health and Safety Executive. Management of Spa Pools Controlling the Risks of Infection. ISBN: 0 901144 80 0, London: Health Protection Agency, HSE Books; 2006.
18. GUN, I., EKINCI, F. Y., 2009, Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam, *Gıda*, 34(3), 165-173.
19. SCHAECHTER, M., 2004, The Desk Encyclopedia of Microbiology, Elsevier Academic Press, 84 Theobald's Road, London WC1X 8RR, UK, ISBN 0-12-621361-5.
20. DONLAN, R. M., 2002, Biofilms: Microbial Life on Surfaces, *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
21. COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., 1997, The Biofilm Lifestyle, *Advances in Dental Research*, 11(2), 192-195.
22. HARB, O. S., YONG GAO, L., KWAİK, T. A., 2000, From Protozoa to Mammalian Cells: A New Paradigm in the Life Cycle of Intracellular Bacterial Pathogens, *Environmental Microbiology*, 2(3), 251-265.
23. MOLMERET, M., HORN, M., WAGNER, M., SANTIC, M., ABU KWAİK, Y., 2005, Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens, *Appl Environ Microbiol.*, 71(1), 20-28.
24. SCHUSTER, F. L., 2002, Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas, *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 342-354.
25. BİNAY, A. R., 2010, *Gram Negatif Bakterilerin Özgür Yaşayan Amipler İçerisinde Üreme Yetenekleri*, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.
26. BARKER, J., BROWN, M. R. W., 1994, Trojan Horses of the Microbial World: Protozoa and the Survival of Bacterial Pathogens in the Environment, *Microbiology*, 140, 1253-1259.

27. Health Protection Agency (2004). *Isolation and identification of Acanthamoeba species*. National Standard Method W 17 Issue 2.
http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
28. ZEYBEK, Z., USTUNTURK, M., BINAY, A. R., 2010, Morphological Characteristics and Growth Abilities of Free Living Amoeba Isolated From Domestic Tap Water Samples in İstanbul, *IUFS Journal of Biology*, 69(1), 17-23.
29. SAYGI, G., POLAT, Z., 2003, Özgür Yaşayan Amipler ve Neden Oldukları Parazitler (Primer Amibik Meningoensefalit - Granülomatöz Amibik Ensefalit – Keratit), *Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25 (3), 140 - 149, 2003.
30. PAGE, F. C., 1988, A New Key to Freshwater And Soil Gymnamoebae With Instructions for Culture, *Freshwater Biological Association*, ISBN 1 871105 02 1.
31. <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/hartmannella.htm> [Ziyaret tarihi: 09 Ocak 2012]
32. http://www.mkhavuz.com/havuz_dezenfeksiyonu.html [Ziyaret tarihi: 13 Ekim 2011]
33. OĞUZ, Z., EVÇİ, D., ÖZDEMİR, M., ŞENTÜRK, Ş., AYCAN, S., 2001, Turizm Sağlığı Eğitimi Kitabı, T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Mart 2001, Ankara.
34. Türk Standardı, TS 5489 EN ISO 7393-1, 2002, Su Kalitesi- Serbest Klor ve Toplam Klor Tayini- Bölüm 1: N, N Dietil-1,4-Fenilendiamin Yanında Titrimetrik Metot, ICS 13.060.01; 13.060.50.
35. OĞUR, R., TEKBAŞ, Ö. F., HASDE, M., 2004, Klorlama Rehberi (İçme ve Kullanma Sularının Klorlanması), *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı*, Ankara.
36. http://cevre.erciyes.edu.tr/dosyalar/dokumanlar/1.D%C3%B6nem%20deney%200f%C3%B6yleri/%C4%B0letkenlik%20%C3%B6l%C3%A7%C3%BCm%C3%BC_.pdf [Ziyaret tarihi: 30 Eylül 2011]
37. İNCE, O., İNCE, B. K., 2007, Biyoteknolojide floresanlı yerinde hibritleme (FISH) uygulamaları eğitim semineri, Haziran 2007, BÜ_İTÜ_Moleküler Ekoloji Grubu.
38. MOTER, A., GOBEL, U. B., 2000, Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Direct Visualization of Microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 41, 85–112.

39. http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/molhem_03.pdf [Ziyaret tarihi: 11 Temmuz 2011]
40. DUFOUR, A. P., EVANS, O., BEHYEMER, T. D., CANTU, R., 2006, Water Ingestion During Swimming Activities In A Pool: A Pilot Study, *Journal of Water and Health*, 04(4), 425-430.
41. SEYFRIED, P. L., TOBIN, R. S., BROWN, N. E., NESS, P. F., 1985, A prospective study of swimming-related illness. II. Morbidity and the microbiological quality of water, *Am J Public Health*, 75, 1071-1075.
42. WALKER, J. T., BRADSHAW, D. J., BENNETT, A. M., FULFORD, M. R., MARTIN, M. V., MARSH, P. D., 2000, Microbial Biofilm Formation and Contamination of Dental Unit Water Systems in General Dental Practice, *Applied and Enviromental Microbiology*, 66(8), 3363-3367.
43. KUSNETSOV, J., IIVANAINEN, E., ELOMAA, N., ZACHEUS, O., MARTIKAINEN, P. J., 2001, Copper and Silver Ions More Effective Against Legionellae than Against Mycobacteria in a Hospital Warm Water System, *Water Research*, 35(17), 4217-4225.
44. Health Protection Agency (2007), *Enumeration of viable micro-organisms: Aerobic colony count by membrane filtration method*. National Standard Method W 22 Issue 1. http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
45. Health Protection Agency (2008), *Aerobic Colony count by the pour plate method*. National Standard Method W 4 Issue 4.2. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
46. Türk Standardı, TS EN ISO 6222, 2002, Su Kalitesi- Kültürü Yapılabilen Mikroorganizmaların Sayımı- Agar Besiyerinde Aşılama İle Koloni Sayımı, ICS 07.100.20; 13.060.70.
47. <http://havuz.info.tr/tr/blog/saglik-bakanligi-genelgeleri-ve-yoenetmelik> [Ziyaret tarihi: 29 Haziran 2011]
48. LEONI, E., LEGNANI, P., MUCCI, M. T., PIRANI, R., 1999, Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment, *J Appl Microbiol.* 87(5), 683-688.
49. Health Protection Agency (2004), *Isolation and identification of Acanthamoeba species*. National Standard Method W 17 Issue 2. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
50. WANNASAN, A., CHAIWONG, P., BUNCHOO, M., MORAKOTE, N., 2009, Occurrence Of Thermotolerant *Naegleria* And *Acanthamoeba* In Some Natural Water Sources In Chiang Mai, *Chiang Mai Med J*, 48(3), 117-124.

51. LEIVA, B., CLASDOTTER, E., LINDER, E., WINIECKA-KRUSNELL, J., 2008, Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of León, Nicaragua, *Rev. Biol. Trop.*, ISSN-0034-7744, 56 (2), 439-446.
52. Health Protection Agency. National Standard Method: Identification of *Legionella* species BSOP ID 18. London: Health Protection Agency; 2007.
53. Health Protection Agency (2006). *Detection and enumeration of Legionella species by positive pressure membrane filtration*. National Standard Method W 14 Issue 1. http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
54. International Standard Organization (ISO) (2004), Water quality - Detection and enumeration of *Legionella*- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts, ISO 11731-2.
55. LEONI E., LEGNANI, P. P., BUCCI SABATTINI, M. A., RIGHI, F., 2001, Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment, *Wat. Res.*, 35 (15), 3749–3753.
56. Health Protection Agency (2006). *Detection and enumeration of Legionella species by filtration and centrifugation*. National Standard Method W 12 Issue 1. http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
57. International Standard Organization (ISO) (1998). Water quality-Detection and enumeration of *Legionella*, ISO 11731.
58. LEONI, E., LEGNANI, P. P., 2001, Comparison of Selective Procedures for Isolation and Enumeration of *Legionella* Species from Hot Water Systems, *Journal of Applied Microbiology*, 90, 27-33.
59. GOERES, D. M., PALYSB, T., SANDELB, B. B., GEIGER, J., 2004, Evaluation of Disinfectant Efficacy Against Biofilm and Suspended Bacteria in A Laboratory Swimming Pool Model, *Water Research*, 38, 3103–3109.
60. Health Protection Agency (2006). *Detection and enumeration of Legionella species by centrifugation*. National Standard Method W 13 Issue 1. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
61. Health Protection Agency (2006). *Detection and enumeration of Legionella species in biofilms and sediments*. National Standard Method W 15 Issue 1. http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
62. STOTHARD, D. R., HAY, J., SCHROEDER-DIEDRICH, J. M., SEAL, D. V., BYERS1, T. J., 1999, Fluorescent Oligonucleotide Probes for Clinical and Environmental Detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA Gene Sequence Type, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), 2687-2693.
63. DECLERCK, P., BEHETS, J., DELAEDT, Y., MARGINEANU, A., LAMMERTYN, E., OLLEVIER, F., 2005, Impact of Non-*Legionella* Bacteria

on the Uptake and Intracellular Replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*, *Springer Science+Business Media*, 50, 536–549.

64. BUCHBINDER, S., LEITRITZ, L., TREBESIUS, K., BANAS, B., HEESEMAN, J., 2004, Mixed lung infection by *Legionella pneumophila* and *Legionella gormanii* detected by fluorescent in situ hybridization, *Infection* 32, 4, 242-245.
65. DUTIL, S., TESSIER, S., VEILLETTE, M., LAFLAMME, C., MERIAUX, A., LEDUC, A., BARBEAU, J., DUCHAÎNE, C., 2006, Detection of *Legionella* spp. by Fluorescent In Situ Hybridization in Dental Unit Waterlines, The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology*, 955–963.
66. GRIMM, D., MERKERT, H., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K., HACKER, J., BRAND, B. C., 1998, Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2686–2690.
67. DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F., 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
68. ZHANG, X., BISHOP, P. L., KINKLE, B. K., 1999, Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms, *Water Science and Technology*, 39(7), 211-218.
69. BOYD, C. E., TUCKER, C. S., 1992, Water quality and pond soil analyses for aquaculture, *Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama*, 9780817307219.
70. HOCA, S., 2010, *Model Şebeke Su Boru Sisteminde Oluşan Biyofilmdeki Bakteriler Üzerine Kısa Süreli Kurumanın Etkisi*, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.
71. LEONI, E., LEGNANI, P., GUBERTI, E., MASOTTI, A., 1999, Risk of infection associated with microbiological quality of public swimming pools in Bologna, Italy, *Public Health*, 113 (5), 227–232.
72. ESTERMAN, A., RODER, D. M., CAMERON, A. S., ROBINSON, B. S., WALTERS, R. P., LAKE, J. A., CHRISTY, P. E., 1984, Determinants of the Microbiological Characteristics of South Australian Swimming Pools, *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 325-328.
73. KESWICK, B. H., GERBA, C. P., GOYAL, S. M., 1981, Occurrence of Enteroviruses in Community Swimming Pools, *American Journal of Public Health*, 71(9), 1026-1030.

74. LORENZO-MORALES, J., ORTEGA-RIVAS, A., FORONDA, P., 2005, Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources, *Parasitol Res*, 95, 273–277.
75. GORNIK, K., KUZNA-GRYGIEL, W., 2004, Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of szczecin, *Ann Agric Environ Med*, 11, 233-236.
76. EDAGAWA, A., KIMURA, A., KAWABUCHI-KURATA, T., KUSUHARA, Y., KARANIS, P., 2009, Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan, *Parasitology Research*, 105 (4), 1109-1117.
77. FIELDS, B. S., HAUPT, T., DAVIS, J. P., ARDUINO, M. J., MILLER, P. H., BUTLER, J. C., 2001, Pontiac Fever Due to *Legionella micdadei* from a Whirlpool Spa: Possible Role of Bacterial Endotoxin, *Journal of Infectious Diseases*, 184(10), 1289-1292.
78. KALKER, U., HENTSCHEL, W., 1992, *Legionella* contamination in warm water systems of a large German city., *Gesundheitswesen*, 54, 597–604.
79. 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(5), 2047–2053.
80. STEINERT, M., HENTSCHEL, U., HACKER, J., 2002, *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray, *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 149-162.
81. THOMAS, V., BOUCHEZ, T., NICOLAS, V., ROBERT, S., LORET, J.F., LEVI, Y., 2004, Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 950-963.
82. HEINZ, E., KOLAROV, I., KASTNER, C., TOENSHOFF, E. R., WAGNER, M., HORN, M., 2007, An *Acanthamoeba* sp. Containing Two Phylogenetically Different Bacterial Endosymbionts, *Environmental Microbiology*, 9(6), 1604-1609.
83. ROSE, C.S., MARTYNY, J. W., NEWMAN, L. S., MILTON, D. K., KING, T. E., BEEBE, J. L., MCCAMMON, J. B., HOFFMAN, R. E., KREISS, K., 1998, "Lifeguard Lung": Endemic Granulomatous Pneumonitis in an Indoor Swimming Pool. *American Journal of Public Health*, 88(12), 1795-1800.
84. SANDEN, G. N., MORRILL, M. R., FIELDS, B. S., BREIMAN, R. F., BARBAREE, J. M., 1992, Incubation of Water Samples Containing Amoebae Improves Detection of Legionellae by the Culture Method, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 2001-2004.

85. DAWSON, M. W., BROWN, T. J., 1987, The Effect of Chlorine and Chlorine Dioxide on Pathogenic Free-Living Amoebae (PFLA) in Simulated Natural Conditions: The Presence of Bacteria and Organic Matter, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21, 117-123.
86. BLACK, A. P., KEIRN, M. A., SMITH, J. J., DYKES, G. M., HARLAN, W. E., 1970, The Disinfection of Swimming Pool Waters Part II A Field Study of the Disinfection of Public Swimming Pools, *American Journal of Public Health*, 60(4), 740-750.
87. RIVERA, F., RAMIREZ, P., VILACLARA, G., ROBLES, E., MEDINA, F., 2004, A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in MexicoCity, *Environmental Research*, 32(1), 205-211.
88. JONCKHEERE, J., VOORDE, H. V., 1976, Differences in Destruction of Cysts of Pathogenic and Nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by Chlorine, *Applied and Environmental Microbiology*, 31(2), 294-297.
89. KILVINGTON, S., PRICE, J., 1990, Survival of *Legionella pneumophila* Within Cysts of *Acanthamoeba polyphaga* Following Chlorine Exposure, *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 519-525.
90. İLHAN-SUNGUR, E., 2007, *Model bir su sisteminde sülfat indirgeyen bakterilerin galvanizli çelik saclarda oluşturduğu korozyonun incelenmesi*, Doktora, Fen Bilimleri Enstitüsü.

ÖZGEÇMİŞ

3 Şubat 1988 yılında İstanbul'da doğdum. Lise eğitimimi Bahçelievler Lisesi'nde 2005 yılında tamamladım. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne kayıt oldum ve 2009 yılında mezun oldum. Aynı yıl, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programına kayıt oldum.

(aysenurturkmen88@gmail.com)