

Kısa Süreli Kuruluk ve Sıcaklık Değişiminin Şebeke Suyuyla Beslenen Model Su Borusu Sistemindeki Mikrobiyal Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Duygu BAŞ *, İrfan TÜRETGEN **

* Merck Sharp Dohme İlaçları Ltd. Şti.

** İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Akvatik mikroorganizmalar yüzeylere yapışarak biyofilm tabakası oluştururlar. Biyofilm tabakası, bakterileri kısa süreli kurumaya, dezenfektanlara, besin azlığına, pH dalgalanmalarına, anti-mikrobik ajanlara, toksinlere ve virüslere karşı koruyabilmektedir. Şebeke suyu dağıtımında farklı nedenlerle su kesintileri olabilir. Su kesintileri esnasında suyun çekilmesiyle borularının iç yüzeyi kurumaya başlar. Bu çalışmada şebeke suyu ile beslenen model boru sisteminde mikrobiyal biyofilm gelişimi üzerine sıcaklık değişimi ve kısa süreli kuruluğun etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada evsel su borusu model sistemi üzerinde sekiz ay boyunca biyofilm tabakasının oluşumuna olanak sağlanmıştır. Aylık olarak alınan boru kesitilerindeki biyofilmler üzerine 6, 24, 48, 72 saatlik kurumanın aerobik mezofilik heterotrofik bakterilerin (AMHB) üremesine etkisi izlenmiştir ve epifloresan mikroskopta ölü/canlı mikroorganizma sayıları kayıt edilmiştir. Boru yüzeylerinde oluşan biyofilm miktarı kantitatif olarak da ölçülmüştür.

Bulgular: Bu çalışmada oluşturulan 6, 24, 48, 72 saatlik kuruluğun ve sekiz aylık süreçteki (Ağustos-Mart) su sıcaklığının düşmesinin biyofilm tabakasındaki AMHB üremesini anlamlı olarak azalttığı ancak biyofilmin kantitatif ölçümünde ve epifloresan mikroskopta incelen ölü/canlı mikroorganizma sayılarında anlamlı fark oluşmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile mikroorganizmaların kısa süreli kuruluğa ve sıcaklık düşüşüne karşı biyofilm tabakası tarafından korunabildikleri ancak kültürlerinin yapılamadığı tespit edilmiştir. Klasik kültür yöntemi ile yapılan sayımlar hataya neden olabileceğinden farklı yöntemlerle canlı bakteri sayılarına bakmak doğru olacaktır.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, şebeke suyu, epifloresan mikroskopik inceleme

SUMMARY

The Effect of Short Time Drying and Temperature Change on Microbial Biofilm Formation in a Model Pipe Rig Feed with Distributed Network Water

Objective: Aquatic microorganisms can adhere to the surfaces and develop biofilm layers. Biofilm layer can protect microorganisms against short-term drying, disinfectants, pH alterations, antimicrobial agents, toxins and viruses. Water cutbacks are unavoidable in the distributed network water. The biofilm on the inner surface of water pipes starts to dry when the system is shutdown or in case of water cutbacks. Our aim was to monitor the response of the biofilm bacteria in terms of water temperature alteration and short time drying.

Materials and Methods: In this study, biofilm formation in a model polypropylene domestic pipe rig system were allowed for an eight month-period. Pipe segments were cut monthly and the effect of 6, 24, 48, 72 hours of drying on biofilms were analyzed in terms of growth of aerobic mesophilic heterotrophic bacteria (AMHB) and the numbers of live/dead microorganisms were analyzed by epifluorescence microscopy. The amount of biofilm on pipe surfaces was analyzed quantitatively.

Results: Exposure to desiccation for 6, 24, 48, 72-hours and the drop of bulk water temperature during the eight month experimental period (from August to March) significantly reduced the AMHB in biofilm layer, however, quantitative measurement of biofilm layer and live/dead bacterial counts revealed that there were no significant differences.

Conclusion: The study showed that biofilm layer can protect microorganisms from short-term drying but in some circumstances they are not culturable with classical microbiological methods. Therefore different methods should be applied to avoid counting errors.

Key words: Biofilms, network water, epifluorescence microscopy

Alındığı tarih: 18.06.2011

Kabul tarihi: 25.08.2011

Yazışma adresi: İrfan Türetgen, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34134 Vezneciler - İstanbul

e-posta: turetgen@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Arıtma tesislerinden çıkan şehir şebeke suları, iş yerlerine ve evlere uzun dallanmış borularla taşınır⁽¹⁾. Bazen bina girişindeki depolarda bekletilen suların musluklara ulaşması için daha küçük ve farklı tipte malzemelerden üretilmiş borulardan yararlanılmaktadır. Binaların içinde kullanılan malzemeler polietilen, polipropilen, polibütan, bakır ve galvanizli çelik boru gibi maddelerden üretilmektedir⁽²⁾. Son yıllarda uzun ömürlü olması, yüksek sıcaklık, korozyon ve basınca karşı dayanıklı olması, koku yapmaması, iç yüzeyinin daha pürüzsüz olması, nakliye ve montajının kolay olması, üretim maliyetinin düşük olması, kimyasal maddelere karşı dirençli olması gibi nedenlerle bu sistemlerde polipropilen maddeden üretilmiş boruların kullanımında büyük bir artış olmuştur.

Şebeke suyu dağıtım sistemlerine zaman zaman herhangi bir noktadan (ek yeri, bağlantı noktası, kırık, çatlak, vb.) mikroorganizmaların karıştığı bilinmektedir⁽¹⁾. Suda bulunan organik ve inorganik bileşikler mikroorganizmalar için besin kaynağı oluşturmakta ve böylece mikroorganizmaların çoğalmasına fırsat vermektedir⁽³⁾. Suyu karışan mikroorganizmalar sistemde taşınırken boruların iç yüzeylerine tutunarak çoğalırlar. Mikroorganizmaların boru ve depo yüzeylerine yapışıp, çoğalarak oluşturduğu bu tabakaya "biyofilm" adı verilir⁽⁴⁻⁷⁾. Biyofilm tabakası, mikroorganizmaları çeşitli etkenlerden korumakta ve onlara avantajlar sağlamaktadır^(8,9). Biyofilm tabakasında üreyen bu mikroorganizmalar zaman içinde yüzeyden koparak sudaki serbest mikroorganizma sayısında artışa ve suyun hijyenik ve estetik kalitesinin bozulmasına neden olabilir^(1,3,9,10). Ayrıca biyofilm sağlık açısından su dağıtım sistemleri ve gıda endüstrisinde de önemli sorunlara yol açmaktadır⁽¹¹⁾. Bunun yanı sıra biyofilm üyesi mikroorganizmalar metal yüzeylerde korozyonu artırabilir⁽¹²⁻¹⁴⁾. Su kalitesinin düşmesini ve patojen bakterilerin çoğalmasını teşvik eden bu biyofilm tabakasıyla mücadele edebilmek için mekanik temizlik, sistemdeki suyun sıcaklığının yüksek derecede tutulması, anti-mikrobik ajanlar gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemler uygulanmaktadır⁽⁵⁾. Fakat bu yöntemlerle de biyofilm tabakasından tamamen kurtulmak mümkün olmamaktadır⁽¹⁵⁾.

Biyofilmin dezavantajlarının yanında avantajları da bulunmaktadır. Örneğin, atık su arıtımında kullanılan

biyoreaktörlerde, maden eldesinde (microbial leaching), ağır metallerin yakalanmasında, sudaki ağır metallerin veya diğer kirleticilerin temizlenmesi gibi işlemlerde biyofilm tabakalarından yararlanılır^(5,8,11,16).

Saprofitik akuatik bakterilerin yanı sıra doğada tatlı sularda ve çeşitli su sistemlerinde varlığı saptanmış önemli patojen bakteriler arasında *Legionellaceae* ailesine ait bazı türler vardır^(17,18). Bu bakterilere nehir, göl, akarsu gibi doğal ortamların yanı sıra termal havuzlar, soğutma kuleleri, duş başlıkları, fiskiyeler, şebeke suyu dağıtım sistemleri, dış üniteleri gibi insan yapımı sistemlerde de rastlanabilmektedir. Buldukları suya ait aerosollerin solunması durumunda özellikle savunma sistemi baskılanmış insanlarda, 30 yaş üstü erkeklerde ve sigara kullananlarda pnömonilere yol açarlar^(13,17-19). Biyofilm tabakasında hızla üreyebilen bu bakteri, su sistemlerinde uygun ortam bulduğunda hızla çoğalıp tehlikeli olabilecek sayılara ulaşabilir.

Şebeke suyu dağıtımında bakım onarım çalışmaları, arıza, temizlik, dezenfeksiyon ve su tasarrufu sağlama gibi nedenlerle su kesintileri olabilir. Bu kesintiler genelde kısa süreli olmakta nadiren 72 saate kadar uzamaktadır. Su kesintisi sırasında şebeke suyu dağıtım borularının iç yüzeylerinde bulunan biyofilm tabakası kısa süreli kurumaya maruz kalabilir. Mikroorganizmalar yapısal, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde meydana getirdikleri değişiklikler ile kuruluğa karşı direnç sağlarlar^(20,21). Yapılan çalışmalarda fiziksel veya kimyasal etkiler ile strese giren bazı bakterilerin bölünme, büyüme ve koloni oluşturma yeteneklerini kaybetmelerine rağmen, metabolik olarak aktif olabildikleri gösterilmiştir. Bu hücreler canlı ama kültürü yapılamayan (viable but non-culturable, VBNC) bakteriler olarak adlandırılmaktadır⁽²²⁾. Bazı çalışmalarda bakterilerin üç ay gibi uzunca bir sürede VBNC fazda kalabildikleri gösterilmiştir^(23,24).

Bu çalışmada, binalarda sıkça kullanılan polipropilen malzemeden üretilmiş ve şebeke suyu ile beslenen model boru sisteminde mikrobiyal biyofilm gelişiminin, kısa süreli kuruluğun ve sıcaklık değişiminin mikrobik gelişim üzerine etkisinin incelenmesi planlanmıştır. Ayrıca, şebeke suyunda az sayıda bulunabilen ancak uygun şartlar bulduğunda hızla çoğalan

Legionella cinsi bakterilerin varlığı da aylık olarak biyofilm tabakasında araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma kapsamında yapılan deneylerde polipropilen malzemeden üretilmiş 4cm çapında ve 23m uzunluğunda imal edilmiş açık devre su sistemi kullanılmıştır. Su sistemi şebeke suyuna bağlanmış ve bir vana yardımı ile suyun akışı kontrol edilebilecek şekilde ayarlanmıştır. Sistemden Ağustos ayından başlamak üzere sekiz ay boyunca kontrollü olarak (15 m³/ay) şebeke suyu geçirilmiştir. Her ay su örneklerinin çözülmüş oksijen ve pH değerleri oksimetre ve pH metre cihazında (WTW, Almanya) ölçülmüş; serbest klor miktarları ise 0.2-5 ppm arası tespit edebilen kit yardımıyla (Ateks, Türkiye) saptanmıştır. On mililitre su örneği üzerine üç damla orto-toluidin ayırıcı damlatılıp çalkalandıktan sonra beş dakika beklenmiş, oluşan renk standart gösterge ile karşılaştırılmıştır. Biyofilm analizi için ise, aylık olarak boru sisteminin su çıkış ucundan 2cm genişliğinde bilezikler kesilmiştir. Kesilen bileziklerin iç yüzeyindeki biyofilm oluşumu 0. saat ve 6, 24, 48, 72 saatlik kontrollü kurumalara maruz bırakıldıktan sonra aerobik mezofilik heterotrofik bakterilerin (AMHB) sayısının tespiti, ekstrasellüler polimerik maddelere (EPS) ait karbonhidrat miktar tayini ve epifloresan mikroskopla canlı ve ölü bakterilerin incelenmesiyle izlenmiştir.

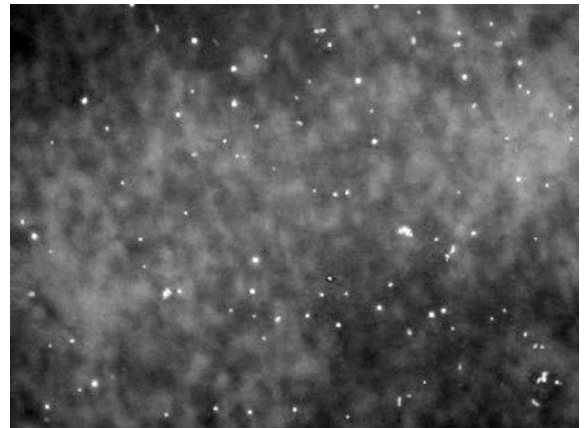
Biyofilm tabakasından AMHB izolasyonu için öncelikle steril eküvyon ile yüzeyden kazıntı alınmış, içinde 5ml fosfat tamponu bulunan santrifüj tüpünde 60sn vorteks cihazı ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. AMHB sayısının tespit edilmesi için selektif olmayan, oligotrofik ortamlardaki heterotrofik bakterilerin kültüründe sıkça tercih edilen R2A agar (Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır⁽²⁵⁾. Biyofilm süspansiyonları fosfat tamponunda sulandırılarak (10⁻¹'den 10⁻⁷'ye kadar) bu besiyerine 100µl ekilmiş ve 27°C'de 10 gün inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmıştır.

L. pneumophila cinsi bakterilerin izolasyonu ve sayılarının tespiti için aynı şekilde kazınarak alınan ve homojenize edilen biyofilm örneği hem doğrudan hem de sıcaklık (50°C'de 30 dakika) ve asit (pH=2.2 HCl-KCl) ile muamele edildikten sonra, 100µl Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) (Oxoid,

İngiltere) agar besiyerine ekilmiştir. BCYE agara ekilen örneklerin tümü 37°C'de 14 gün bekletilmiş, koloni morfolojisi ve Gram boyanma özelliği bakımından *Legionella* şüpheli koloniler lateks aglütinasyon kiti (*Legionella* Latex Test Kit-Oxoid, İngiltere) ile test edilmiştir.

Kesilen bir diğer bileziğin yüzeyinde bulunan ekstrasellüler polimerik maddelere (EPS) ait karbonhidrat miktarı fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir⁽²⁶⁾. Yüzeylerden kazınmış biyofilm tabakası 4ml fosfat tamponu içinde homojenize edilmiş, üzerine 3ml %5'lik fenol eklenerek vorteks cihazı ile karıştırılmış ve hidroliz için 60 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polisakaritlerin alt birimlerine ayrılması sağlanmıştır. Süre sonunda tüplere 10ml derişik sülfürik asit eklenmiş ve oda sıcaklığında 60 dakika bekletilerek soğutulmuştur. Meydana gelen renk değişimi spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV-160, Japonya) 487 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart eğri yardımıyla spektrofotometrede okunan absorbans değerine karşılık gelen karbonhidrat miktarı bulunmuştur.

Toplam bakteri sayısı tespiti için DAPI boyası (4',6-diamidino-2-phenylindole), aktif olarak solunum yapan bakterilerin tespiti için bir redoks boyası olan CTC (5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride) kullanılmıştır. Boyama işleminden sonra biyofilm süspansiyonları siyah polikarbonat filtrede (Millipore, ABD) fikse edilip 50 büyütmele objektifle incelenerek 10 farklı alandan fotoğraflar çekilmiştir (Şekil 1). Çekilen fotoğraflardan alınan sinyaller sayılmış ve



Şekil 1. Epifloresan mikroskopta çekilmiş bir fotoğrafta siyah polikarbonat filtre üzerinde ölü (mavi) ve canlı (kırmızı) bakterilerin görünüşü.

ortalamaları alınmıştır. Daha sonra toplam yüzeye erişmek üzere ortalamalar katsayılarla çarpılarak santimetrekare veya mililitredeki mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir⁽²²⁾.

İstatistiksel analizlerde aylar ve saatler bazında elde edilen verilerin dağılımının normal olup olmadığını tespit etmek üzere Kolmogorov-Smirnov Testi uygulanmıştır. Karbonhidrat miktarları, AMHB sayıları, toplam ve canlı bakteri sayıları bakımından beş farklı saatte alınan örneklerin dağılımları incelendiğinde Kolmogorov-Smirnov Testlerinin anlamlı olduğu, dağılımın normal olmadığı görülmüştür. Bu nedenle her bir değişken için beş farklı saatte alınan örnekler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığı parametrik olmayan Friedman Testi ile incelenmiştir. Test sonucunun saatler arasındaki farkın anlamlı olduğunu göstermesi üzerine Wilcoxon Testi ile her bir saatte alınan örneklerdeki değerler bire bir olarak karşılaştırılmıştır. Böylece değişkenler açısından hangi saatler arasında farklar olduğu incelenmiştir. Karbonhidrat miktarları, AMHB sayıları, toplam ve canlı bakteri sayıları bakımından sekiz ayda alınan örneklerin dağılımları yine Kolmogorov-Smirnov Testi ile incelendiğinde sonuçların anlamlı olduğu, dağılımın normal olmadığı görülmüştür. Bu sonuca dayalı olarak sekiz ayrı ayda alınan örnekler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis analizi ile tespit edilmiştir. Test sonuçlarının anlamlı olması üzerine Mann-Whitney U Testi ile her bir ay arasında değişkenler açısından fark karşılaştırılmış, hangi aylar arasında farklar olduğu incelenmiştir. Analizler için SPSS 10.0 programı kullanılmıştır.

Tablo 1. Aylara ve kurumaya maruz bırakma sürelerine göre AMHB sayıları. Sayılar üç farklı analizim ortalamasıdır ve santimetrekarede koloni oluşturan birim (KOB) olarak verilmiştir.

Ay	Saatlere göre AMHB sayıları (KOB/cm ²)				
	0	6	24	48	72
1	23,98	14,58	9,80	9,78	9,24
2	87,09	57,68	22,48	21,84	21,07
3	1.318,25	804,45	324,59	318,54	318,55
4	14,54	10,11	5,80	4,40	5,40
5	1.120,98	540,66	226,98	218,18	208,70
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	*	2.569,12	1.258,77	1.268,21	1.244,06

* Sayılamayacak kadar yoğun üreme

BULGULAR

Aylık olarak yapılan ölçümlerde 0. saat ve 6, 24, 48, 72 saat kurumaya bırakılan bileziklerde AMHB sayısı saptanmıştır. Bulgulara göre 6, 24, 48 ve 72 saat kurumaya bırakılan örneklerden yapılan ekimlerden elde edilen AMHB sayısında 0. saat ekimlerinden elde edilen AMHB sayısına göre anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p<0.05$). 24, 48, 72 saat kurumaya bırakılan örneklerden yapılan ekimlerden elde edilen AMHB sayısında 6 saat kurumaya bırakılan örneklerden yapılan ekimlerden elde edilen AMHB sayısına göre anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p<0.05$). Fakat 24. saatten itibaren kurumaya bırakılan örneklerden yapılan ekimlerden elde edilen AMHB sayılarında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir (Tablo 1) ($p>0.05$).

Epifloresan mikroskopla yapılan incelemede, 72 saat kurumaya bırakılan örneklerdeki canlı bakteri sayısının 0. saatte saptanan canlı bakteri sayısına göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Fakat 0. saat incelemesinde elde edilen canlı bakteri sayısı ile 6, 24, 48 saat kurumaya bırakılan örneklerden yapılan incelemede elde edilen canlı bakteri sayısı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 2) ($p>0.05$).

Aylık olarak yapılan ölçümlerde 0. saat ve 6, 24, 48, 72 saat kurumaya bırakılan bileziklerde toplam karbonhidrat miktarı saptanmış olup, saatlere göre karbonhidrat miktarları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Friedman değeri: 7.926, $0.05<p$). Yüzeylerdeki karbonhidrat miktarları ay bazında karşılaştırıldı.

Tablo 2. Aylara ve kurumaya maruz bırakma sürelerine göre canlı bakteri sayıları (CTC sayısı). Sayılar 10 sayımın ortalamasıdır ve santimetrekare başına canlı hücre olarak verilmiştir.

Ay	Saatlere göre canlı bakteri sayıları (hücre/cm ²)				
	0	6	24	48	72
1	15.848,45	14.148,88	15.247,68	14.917,34	3.024,71
2	95.499,95	92.112,33	93.158,54	90.145,90	44.985,32
3	125.892,11	120.102,64	121.450,77	120.984,54	67.451,27
4	128.451,22	127.846,57	127.099,94	126.021,66	84.984,20
5	126.958,46	123.950,50	121.035,05	122.332,33	77.882,09
6	125.569,45	125.906,01	124.951,64	122.508,61	94.123,08
7	127.980,10	125.662,54	126.992,09	125.555,66	87.452,13
8	184.684,12	180.380,87	179.685,04	178.986,03	100.112,80

rıldığında 1. aydan 5. aya (Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım, Aralık) kadar yapılan ölçümlerden elde edilen karbonhidrat miktarlarında anlamlı bir artış olduğu, 6. aydan (Ocak, Şubat, Mart) itibaren ise karbonhidrat miktarında anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$).

Bileziklerden 0. saatte alınan örneklerden yapılan ekimlerden elde edilen AMHB sayıları ay bazında karşılaştırıldığında dördüncü aydan (Kasım) itibaren sekizinci aya (Mart) kadar AMHB sayısında anlamlı derecede azalma ancak sekizinci ayda diğer aylara göre anlamlı derecede artma olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Epifloresan mikroskop ile yapılan incelemede ise toplam bakteri sayıları (DAPI+CTC) ay bazında karşılaştırıldığında genel anlamda anlamlı derecede artış olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 2).

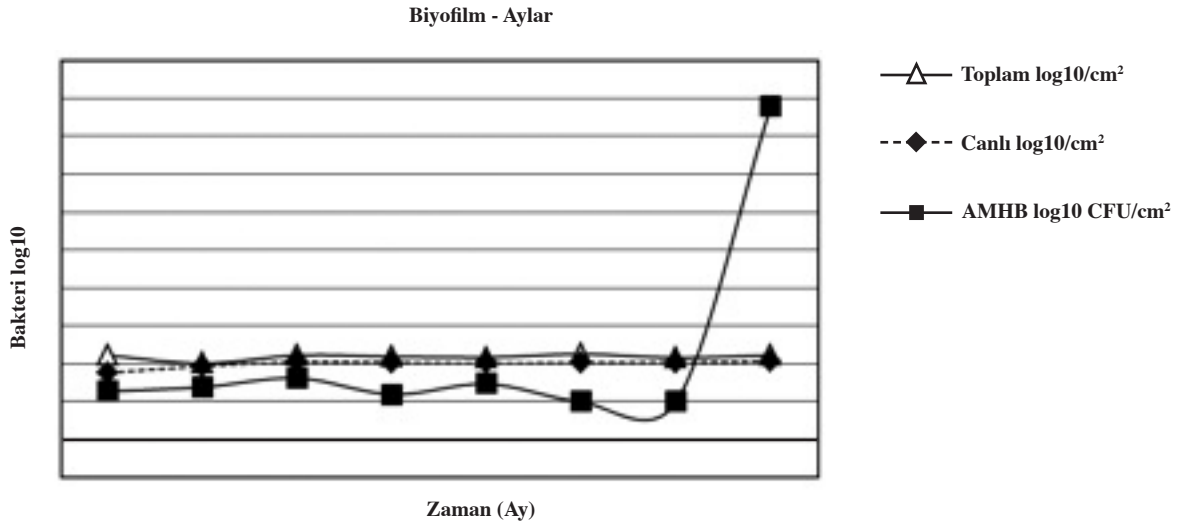
Çözünmüş oksijen, pH ve klor miktarları ile toplam bakteri, canlı bakteri ve AMHB miktarları arasında bir ilişki istatistiksel olarak saptanamamıştır. Sisteme giren sudaki klor miktarı ortalama 0.2 ppm, çözünmüş oksijen miktarı ortalama 8 mg/ml olarak ölçülmüştür. Suyun pH değeri ise 6.6 ila 7 arasında değişim göstermiştir.

Sekiz ay boyunca yapılan analizlerde *Legionella* şüpheli koloniler gözlenmiş, ancak lateks aglütinasyon kiti ile yapılan doğrulama testlerinde *Legionella* cinsi bakterilerin varlığına rastlanmamıştır.

TARTIŞMA

Biyofilmde bulunan EPS tabakasının bakterileri kuruluğa karşı korumada önemli bir rol üstlendiği bilinen bir gerçektir ^(4,6,27). Bu çalışmada da, her ne kadar kültüre edilebilir bakteri sayısı azalsa da kısa süreli kuruluğun ölü ve canlı bakteri sayıları üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum bize biyofilm tabakasının bakterileri kısa süreli kuruluğa karşı koruyabildiğini ve biyofilm tabakasında bulunan karbonhidrat miktarının da kısa süreli kuruluktan etkilenmediğini göstermiştir.

Mikroorganizmaların yaşadıkları ortamlarda karşılaştıkları olumsuz çevre koşullarından birisi de düşük sıcaklıktır. Mikroorganizmalar düşük sıcaklık stresine membran akışkanlığında ve DNA ile RNA mekanizmalarında değişiklik meydana getirerek adaptasyon sağlamaktadırlar ⁽²⁸⁾. Bu çalışmanın başlatıldığı Ağustos ayından itibaren su sıcaklığının düşmesi ile beraber klasik mikrobiyolojik kültür metotları kullanılarak yapılan ölçümlerde mikroorganizma sayısının sifira kadar (altıncı ay) düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak, sekizinci ayda bakterilerin soğuk koşullara adaptasyonu sağlamış olması nedeniyle AMHB sayısında artış olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte klasik mikrobiyolojik kültür metodu ile varlıkları tespit edilemeyen bakteriler, epifloresan mikroskop yardımıyla ölü canlı (DAPI - CTC) sayım metodu ile saptanmış ve sıcaklığın toplam bakteri sayısını fazla etkilemediği gözlemlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Aylara göre biyofilm örneğinde bulunan AMHB, toplam bakteri ve canlı bakteri sayıları. Deneye Ağustos ayında başlanmış ve birinci ay olarak kabul edilmiştir.

Şebeke suyu dağıtım sistemleri ve biyofilm üzerine yapılan araştırmaların amacı genelde farklı yüzeylerin biyofilm oluşturabilme oranlarını saptamak veya farklı model sistemleri karşılaştırmak üzerinde yoğunlaşmıştır⁽²⁹⁾. Bu çalışmada son yıllarda şebeke suyu dağıtım sistemlerinde kullanımı oldukça yaygın olan polipropilen maddeden üretilmiş ve gerçeği iyi derecede yansıttığı düşünülen bir model sistem yardımıyla biyofilm kaynaklı mikroorganizmaların varlığı ve kısa süreli kuruluğun ve sıcaklığın bu biyofilm tabakası üzerine etkisi araştırılmıştır. Biyofilm tabakasının mikroorganizmaları kısa süreli kuruluğa karşı koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma sırasında soğuk stresinin de mikroorganizmaların üremesi üzerine olumsuz etkileri olduğu görülmüş, klasik mikrobiyolojik kültür analizinde AMHB sayısı sıfıra düşmüşken epifloresan mikroskopi ile canlı bakteriler tespit edildiğinden dolayı mikroorganizmaların karşılaştıkları olumsuz koşullar karşısında VBNC faza geçerek kendilerini korudukları düşünülmüştür.

Deney süresince *Legionella* cinsi bakterilerin varlığı da incelenmiş, ancak *Legionella* cinsi bakterilere rastlanmamıştır. Zaten soğuk su sistemlerinde *Legionella* cinsi bakterilerin olası sayısı çok düşüktür ve kullanılan yöntemin hassasiyeti bu bakterilerin çok düşük sayıdaki konsantrasyonunu saptamak için uygun değildir.

Bu çalışma ile mikroorganizmaların kısa süreli kuruluğa karşı biyofilm tabakası tarafından korunabildikleri fakat sıcaklık düşüşü karşısında kültürlerinin yapılamadığı tespit edilmiştir. Su sıcaklığının düşüşü, klasik kültür yöntemi ile yapılan sayımlarda hataya yol açabilmekte ve farklı yöntemlerle canlı bakteri sayılarına bakmak gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 2793 numaralı proje ile destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yürütücü Sekreterliği'ne ve model su sistemini hazırlayan DİZAYN GRUP A.Ş. Araştırma ve Teknoloji Geliştirme Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Kooij D, Lieverloo JHM, Schellart J, Hiemstra P. Maintaining quality without a disinfectant residual. AWWA

- 1999; 91:55-64.
2. Veenendaal HR, Kooij D. Biofilm formation potential of pipe materials in plumbing systems. Kiwa NV Research and Consultancy. The Netherlands, Commissioned by the Ministry of Public Housing, Urban Planning and Environment. 1999.
3. Kooij DVD, Veenendaal HR, Baars-Lorist C, Klift DW, Drost YC. Biofilm formation on surfaces of glass and teflon exposed to treated water. *Wat Res* 1995; 29:1655-62. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00333-3](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(94)00333-3)
4. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002> PMID:11932229 PMCID:118068
5. Jiang X, Pace JL. Microbial biofilms. In: Pace JL, Rupp ME, Finch RG, eds. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. CRC Press: New York. 2006:3-20.
6. Chang WS, Mortel M, Nielsen L, Guzman N, Li X, Halverson LJ. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water limiting conditions. *J Bacteriol* 2007; 189:8290-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00727-07> PMID:17601783 PMCID:2168710
7. Assere A, Oulahal N, Carpentier B. Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. *J Appl Microbiol* 2008; 104:1-11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03711.x> PMID:18217936
8. Schwartz T, Hoffmann S, Obst U. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank filtered drinking water systems. *Wat Res* 1998; 9:2787-97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00026-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00026-8)
9. Momba MNB, Kfir R, Venter SN, Cloete TE. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA* 2000; 26:59-66.
10. Alkan U, Teksoy A, Acar Ö. İçme suyu şebekesinde bakteriyel yeniden çoğalmayı etkileyen faktörlerin belirlenmesi. *İTÜ Dergisi* 2005; 15:43-55.
11. Storey MV, Ashbolt NJ. A comparison of methods and models for the analysis of water distribution pipe biofilms. *Wat Sci Tech* 2002; 2:73-80.
12. Edstrom Industries, Biofilm, 2011 [<http://asaha.com/ebook/zNjc3NTEEx/Biofilm.pdf>].
13. Hallam NB, West JR, Forster CF, Simms J. The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Wat Res* 2001; 35:4063-71. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00248-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00248-2)
14. İlhan-Sungur E, Cansever N, Çotuk A. Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio* spp.). *Corr Sci* 2007; 49:1097-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2006.05.050>
15. Zeybek Z, Türetgen İ, Kimiran EA, Filoğlu G, Çotuk A. Profiling of environmental *Legionella pneumophila* strains by randomly amplified polymorphic DNA method isolated from geographically nearby buildings. *Environ Monit Assess* 2009; 149:323-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-008-0205-x> PMID:18283549
16. Bos R, Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* 1999; 23:179-230. PMID:10234844
17. Palmer CJ, Bonilla GF, Roll B, Paszko-Kolva C, Sangermano LR, Fujioka RS. Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the enviroamp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:407-12. PMID:7574578 PMCID:167300
18. Diederer BM. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* 2008; 56:1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2007.09.010> PMID:17980914
19. Stone BJ, Kwaik YA. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Imm* 1998; 66:1768-75.

- PMid:9529112 PMCID:108119
20. **Potts M.** Desiccation tolerance: a simple process? *Trends in Microbiol* 2001; 9:553-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02231-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02231-4)
 21. **Billi D, Potts M.** Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* 2001; 153:7-12.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01279-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01279-7)
 22. **Rodriguez GG, Phipps D, Ishiguro K, Ridgway HF.** Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:1801-8.
PMid:1622256 PMCID:195687
 23. **Signoretto C, Lleò M, Tafi, MC, Canepari, P.** Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:1953-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.5.1953-1959.2000>
PMid:10788366 PMCID:101439
 24. **Panoff JM, Thammavongs B, Guéguen M, Boutibonnes P.** Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiol* 1998; 36:75-83.
<http://dx.doi.org/10.1006/cryo.1997.2069>
PMid:9527869
 25. **Reasoner DJ, Geldreich EE.** A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 1985; 49:1-7.
PMid:3883894 PMCID:238333
 26. **Zhang X, Bishop PL, Kinkle BK.** Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Wat Sci* 1999; 39: 211-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00170-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00170-5)
 27. **Fang W, Hu JY, Ong SL.** Influence of phosphorus on biofilm formation in model drinking water distribution systems. *J Appl Microbiol* 2009; 104:1328-35.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04099.x>
PMid:19187141
 28. **Thieringer HA, Jones PG, Inouye M.** Cold shock and adaptation. *Bioessays* 1998; 20:49-57.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199801\)20:1<49::AID-BIES8>3.0.CO;2-N](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<49::AID-BIES8>3.0.CO;2-N)
 29. **Hall-Stoodley L, Rayner JC, Stoodley P, Lappin-Scott HM.** Establishment of experimental biofilms using the modified Robbins Device and flow cells. *Meth Biotechnol* 2007; 12:307-20.