

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İÇME SUYU POMPALARINDA *ESCHERICHIA*  
*COLI*'NİN OLUŞTURDUĞU BİYOFİLM  
YAPISININ İNCELENMESİ VE OLUŞMASININ  
ÖNLENMESİ**

MALHUN KUBA

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ AD  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZMİR-2012**

**TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970115**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İÇME SUYU POMPALARINDA *ESCHERICHIA*  
*COLI*'NİN OLUŞTURDUĞU BİYOFİLM  
YAPISININ İNCELENMESİ VE OLUŞMASININ  
ÖNLENMESİ**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ AD  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MALHUN KUBA**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nuran ESEN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından  
2011.KB.SAG. 057 ile desteklenmiştir.

**TEZ KODU:** DEU.HSI.MSc-2009970115

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Malhun KUBA '**İÇME SUYU POMPALARINDA *ESCHERICHIA COLI*NİN OLUŞTURDUĞU BİYOFİLM YAPISININ İNCELENMESİ VE OLUŞMASININ ÖNLENMESİ**' konulu yüksek lisans tezini 06.07.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

  
Prof. Dr. Nuran ESEN

Jüri Üyesi Başkanı

  
Prof. Dr. Gül ERGÖR

Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Arzu SAYINER

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Cem ERGON

Yedek Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Dilek ÇIMRIN

Yedek Jüri Üyesi

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR .....	vii
TEŞEKKÜR .....	viii
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	3
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>5</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>7</b>
2.1. Biyofilmin Tarihiçesi .....	7
2.2. Biyofilm Tanımı .....	8
2.3. Biyofilm Gelişiminin Beş Evresi .....	9
2.4. Yüzey Etkileri .....	11
2.5. Hücre Dışı Polimerik Maddeler ( <i>Extracellular Polymeric Substances</i> - EPS) .....	11
2.6. Gen Aktarımı .....	12
2.7. “Quorum Sensing” Mekanizması.....	13
2.8. Biyofilm Saptama Yöntemleri .....	13
2.9. Biyofilm Oluşturmanın Avantajları .....	14
2.10. Biyofilmin Halk Sağlığı Açısından Önemi .....	15
2.11. <i>Escherichia coli</i> Hakkında Genel Bilgiler .....	16
2.11.1. Yapısal, Biyokimyasal ve Üreme Özellikleri.....	16

2.11.2. Enterik Patojen <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.11.3. Barsak Dışı <i>Escherichia coli</i> Enfeksiyonları .....	18
2.11.4. Tanı ve Tedavi.....	19
2.12. <i>Escherichia coli</i> Biyofilm Yapısı .....	19
2.13. İçme Suyu Sistemleri .....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>25</b>
3.1. Çalışma Materyali.....	25
3.2. Biyofilm Yapısının İncelenmesi .....	25
3.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu Yöntemi (TEM).....	28
3.2.2. Kristal Viyole İle Boyama Yöntemi.....	28
3.3. Biyofilm Yapısının Oluşumunun Önlenmesi ve Giderimi .....	29
3.4. Etik Kurul Onayı.....	30
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>31</b>
4.1. Biyofilm Yapısının İnceleme Sonuçları.....	31
4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu Yönteminin Sonuçları.....	31
4.1.2. Kristal Viyole ile Boyama Yönteminin Sonuçları .....	45
4.2. Biyofilm Yapısının Oluşumunun Önlenmesi ve Gideriminin Sonuçları.....	47
4.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu Yönteminin Sonuçları.....	47
4.2.2. Kristal Viyole ile Boyama Yönteminin Sonuçları .....	55
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>60</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>65</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>66</b>

<b>8. EKLER .....</b>	<b>75</b>
-----------------------	-----------

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> TEM sonuçlarına göre hücre yoğunlukları.....	44
<b>Tablo 2:</b> TEM sonuçlarına göre, dezenfeksiyon uygulamadan önce ve sonra hücre yoğunluklarının skorlanması .....	54
<b>Tablo 3:</b> Dezenfeksiyon uygulanmamış ve uygulanmış örneklerin kristal viyole ile boyama yöntemiyle elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılmaları .....	59
<b>Tablo 4:</b> Farklı dezenfeksiyon yöntemi uygulanan grupların kristal viyole ile boyama yöntemiyle elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılmaları .....	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Planktonik hücreden biyofilm gelişimi aşamaları .....	9
Şekil 2: Su kanalları ile ayrılmış, mantar veya hücre kuleleri şeklindeki mikrokoloniler .....	10
Şekil 3: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın biyofilm gelişim evreleri .....	11
Şekil 4: Birinci gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	31
Şekil 5: Birinci gün 3000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	32
Şekil 6: Birinci gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	32
Şekil 7: Birinci gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	33
Şekil 8: Birinci gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	33
Şekil 9: Birinci gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	34
Şekil 10: Birinci gün 7800 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	34
Şekil 11: Birinci gün 7800 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	35
Şekil 12: Birinci gün 10000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	35
Şekil 13: Dördüncü gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	36
Şekil 14: Dördüncü gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	36
Şekil 15: Dördüncü gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	37
Şekil 16: Dördüncü gün 3000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	37
Şekil 17: Dördüncü gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	38
Şekil 18: Dördüncü gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	38
Şekil 19: Dördüncü gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	39
Şekil 20: Dördüncü gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	39
Şekil 21: Yedinci gün 1000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	40



<b>Şekil 22:</b> Yedinci gün 1500 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	40
<b>Şekil 23:</b> Yedinci gün 1500 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	41
<b>Şekil 24:</b> Yedinci gün 1500 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	41
<b>Şekil 25:</b> Yedinci gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	42
<b>Şekil 26:</b> Yedinci gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	42
<b>Şekil 27:</b> Yedinci gün 3000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	43
<b>Şekil 28:</b> Yedinci gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	43
<b>Şekil 29:</b> Birinci gün 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	47
<b>Şekil 30:</b> Birinci gün fırçalandıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 1000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	48
<b>Şekil 31:</b> Birinci gün 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	49
<b>Şekil 32:</b> Birinci gün fırçalandıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	50
<b>Şekil 33:</b> Dördüncü gün 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	51
<b>Şekil 34:</b> Dördüncü gün fırçalandıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	52
<b>Şekil 35:</b> Dördüncü gün 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü.....	53
<b>Şekil 36:</b> Dördüncü gün fırçalandıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü .....	54

## KISALTMALAR

<b><i>E.coli</i></b> .....	<i>Escherichia coli</i>
<b>TEM</b> .....	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>EPS</b> .....	Hücre Dışı Polimerik Maddeler
<b>QS</b> .....	<i>Quorum Sensing</i>
<b>LTKM</b> .....	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop
<b>UV</b> .....	Ultraviyole
<b>pH</b> .....	Potansiyel Hidrojen
<b>EMB</b> .....	Eozin Metilen Mavili Besiyeri ( <i>Eosin Methylene Blue</i> )
<b>EIEC</b> .....	Enteroinvazif <i>Escherichia coli</i>
<b>OD</b> .....	Optik Dansite

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, hoŐgörüsünü ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nuran ESEN'e, laboratuvar çalıŐmalarımda imkan sağlayan ve emek veren Uzm. Dr. Hatice YILMAZ'a, verilerin analizinde yardımcı olan Prof. Dr. Gül ERGR'e, her konuda sabırla yanımda olan eŐim Murat KUBA'ya ve aileme desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Saygılarımla  
Malhun KUBA

# İÇME SUYU POMPALARINDA *ESCHERICHIA COLI*'NİN OLUŞTURDUĞU BİYOFİLM YAPISININ İNCELENMESİ VE OLUŞMASININ ÖNLENMESİ

**Malhun Kuba, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

## ÖZET

Hücrelerin birbirlerine, canlı veya cansız yüzeylere yapışarak oluşturdukları mikroorganizma kümesine biyofilm denmektedir. Koli basili olarak bilinen *Escherichia coli*, memeli hayvanların kalın bağırsak florasını oluşturan bakteriler arasında yer almakla birlikte birçok hastalığa da sebep olmaktadır. Su arıtım tesislerinde *E.coli* su kirliliğinin "göstergeci" olarak kullanılmaktadır. Canlı ve cansız yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşturduğu biyofilm yapısıyla zorlu çevre koşullarına, antibiyotiklere ve dezenfektanlara dirençli hale gelir. Böylece hastalık oluşturma riski artmaktadır.

Çalışmamızda, toplumda içme suyu olarak sıkça kullanılan damacanalardaki pompaların yüzeyinde deneysel olarak oluşturulan *E.coli*'nin biyofilm yapısı, taramalı elektron mikroskobu (TEM) ve kristal viyole ile boyama yöntemi kullanılarak birinci, dördüncü ve yedinci günlerde incelendi. Ayrıca halk sağlığını tehdit eden biyofilm yapısının giderimi için mekanik ve kimyasal dezenfeksiyon yöntemlerinin etkileri araştırıldı. Örnekler (n: 192) iki grupta incelendi. Doksan altı adet örnek sadece kimyasal olarak sodyum hipoklorit solüsyonu (n:48, 500 ppm ve n:48, 5000 ppm) ile dezenfekte edildi. Diğer 96 adet örnek ise önce mekanik olarak fırçalanıp daha sonra kimyasal olarak sodyum hipoklorit solüsyonu (n:48, 500 ppm ve n:48, 5000 ppm) ile dezenfekte edildi. Tüm örnekler; birinci ve dördüncü gün, taramalı elektron mikroskobu ve kristal viyole ile boyama yöntemi kullanılarak incelendi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Sonuç olarak, *E.coli*'nin birinci gün biyofilm yapısını oluşturmaya başladığı, dördüncü gün en yoğun biyofilm yapısını oluşturduğu, yedinci gün yoğunluğun giderek azaldığı saptandı. Dezenfeksiyon uygulandığında ise, hem sadece kimyasal dezenfeksiyon uygulanan, hem de fiziksel ve kimyasal dezenfeksiyonun birlikte uygulandığı örneklerde bakteri saptanmadı. Ayrıca sodyum hipokloridin 500 ppm ve 5000 ppm'lik konsantrasyonları arasında da fark gözlenmedi. Bu sonuçlar ışığında, içme suyu damacanelerindeki su

pompalarının dezenfeksiyonu için sodyum hipokloridin 500 ppm (%0,05)'lik konsantrasyonunun dört günde bir 20 dakika uygulanması önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Biyofilm, *Escherichia coli*, içme suyu, taramalı elektron mikroskobu, sodyum hipoklorit

ANALYSIS AND PREVENTION OF BIOFILM STRUCTURE FORMATION  
GENERATED BY *ESCHERICHIA COLI* ON DRINKING WATER PUMPS

**Malhun Kuba, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Microbiology and  
Clinical Microbiology Department**

**ABSTRACT**

A biofilm is an aggregate of microorganisms in which cells adhere to each other and to a living or nonliving surface. *Escherichia coli*, which is known as coli bacilli, is a member of the bacterial flora of the lower intestine of mammals, can also cause serious diseases. *E.coli* is used as an “indicator” of pollution in the water treatment systems. It has the capacity of forming biofilm on surfaces in vivo and in vitro. Within the biofilm structure, it becomes resistant to tough environmental conditions, antibiotics and disinfectants. Thus, the risk of diseases that caused by *E.coli*, increases.

In this study, the structure of experimentally formed *E.coli* biofilm on the surfaces of the water pumps, have been analyzed by scanning electronic microscope and crystal violet staining on the first, fourth and seventh days. In addition, affects of mechanical and chemical disinfection methods have been studied to solve the problem created by biofilm structure that might threaten the public health. Samples (n: 192) were divided in two groups. Ninety-six samples have been disinfected only by sodium hypochlorite solution (n:48, 500 ppm and n:48, 5000 ppm), while the remaining 96 samples have been first mechanically cleaned by brushing and then disinfected by sodium hypochlorite solution (n:48, 500 ppm and n:48, 5000 ppm). All samples have been analyzed by scanning electronic microscope and crystal violet staining on the first and the forth day of the study. Findings have been compared statistically.

As a result, it has been found that *E.coli* starts forming a biofilm structure on the first day, and builds the densest structure on the fourth day but gradually loses its density on the seventh day. When methods of disinfection were applied, no bacterium was found on the surface of the material. There was no difference between the chemical and physical plus chemical disinfection. In addition, no difference has been observed between the effects of 500 ppm and 5000 ppm sodium hypochlorite solutions. In the light of the foregoing results, it is

advisable to use 500 ppm (%0.05) sodium hypochlorite solution every four days for the disinfection of drinking water pumps.

**Key Words:** Biofilm, *Escherichia coli*, drinking water, scanning electron microscope, sodium hypochlorite

## 1. GİRİŞ VE AMAC

Biyofilm, polisakkarit matriks içine gömülü olarak birbirine veya bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur (1-3). Biyofilm yapısını küfler, mayalar, algler, protozoonlar, virüsler, bakteriler oluşturabilmektedir (4). Saf kültürlerden oluşabildiği gibi karışık mikroorganizma türlerinden de oluşabilir. Biyofilm yapısındaki mikroorganizmalar hücre dışı polimerik maddeler (EPS) salgılayıp canlı veya cansız yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar (4-6). “*Quorum sensing*” (QS) sinyal molekülleri, otoindükleyiciler, EPS'nin salgılanmasına neden olan işlemler üç boyutlu biyofilm yapısının oluşumuna yol açar (7, 8). Planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında fenotipik özellikleri, üreme hızları, antimikrobiyal direnç oranları, gen transkripsiyonları ve diğer hücrelerle etkileşimleri farklıdır (4, 5, 9, 10). Biyofilmler, sadece antibiyotiklere ve antimikrobiyal ajanlara karşı değil, konağın immün sistemine karşı da direnç gösterebilirler (11-14).

Biyofilm, farklı veya aynı türdeki bakterilerin koordine bir şekilde toplanarak oluşturduğu yapıdır (4, 15). Çeşitli ekolojik ortamlarda koruyucu ve fonksiyonel olarak rol oynarlar. Örneğin, endüstriyel alanlarda, farklı bakteri türlerinin oluşturduğu biyofilmler, insan ve fabrika atıklarının biyoremediasyonunda kullanılmaktadır (4, 16). Ayrıca, insan bağırsak epiteline tutunan bakterilerin oluşturduğu biyofilmler gıda kaynaklı patojenlere karşı koruyucu bariyer görevi görmektedir. İyi yönlerinin yanı sıra önemli ekonomik problemlere de yol açmaktadırlar. Örneğin, endüstriyel metal yüzeylerde sülfür indirgeyen ve oksitleyen bakteri türlerinin oluşturduğu biyofilm yapısı korozyona sebep olmaktadır. Ayrıca bazı biyofilmler gıdaların bozulmasına, patojenik bakterilerin gıdaların yüzeyiyle etkileşip kontaminasyona neden olurlar. Bu durum, gıdaların raf ömrünün kısılmasına, gıda kaynaklı hastalıklara ve bunların sonucunda ekonomik kayıpların artmasına neden olmaktadır (4, 17).

*Escherichia coli*, gastrointestinal sistem içerisindeki fakültatif anaerobik bakteriler arasındaki en baskın türdür. Genetik materyali sık kullanıldığı için *E.coli* yüzey kolonizasyonunun öğrenilmesinde model organizma olarak gösterilmektedir (18, 19). Su sistemlerindeki boru ve pompa yüzeylerinde biyofilm oluşturup halk sağlığını olumsuz yönde etkilerler (20-22).



Biyofilm yapısının incelenmesinde, mikroskopik ve mikroskopik olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılan mikroskoplar arasında, lazer taramalı konfokal mikroskopu (LTKM), faz kontrast ışık mikroskopu, epifloresan mikroskopu, taramalı ve geçirimli elektron mikroskopları vardır (23, 24). Mikroskopik olmayan yöntemler arasında, kristal viyole, floresein diasetat, resazurin, tetrazolyum tuzları, dimetil metilen mavisi ile boyama bulunmaktadır (23). Klorlama, ozonasyon ve ultraviyole (UV) ışığına maruz bırakma gibi teknikler biyofilm yapısının gideriminde kullanılmaktadır (20, 21, 25-27).

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında;

- 1) Toplumda içme suyu olarak sıkça kullanılan plastik yapıdaki damacana pompalarının yüzeyinde *Escherichia coli* ATCC25922 suşunun biyofilm oluşturup oluşturmadığı taramalı elektron mikroskopu ve kristal viyole boyama yöntemi ile incelenmesi,
- 2) Biyofilm yapısının giderilmesi ve oluşmasının önlenmesi için evde uygulanabilecek uygun dezenfeksiyon yöntemlerinin bulunması amaçlanmaktadır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Biyofilmin Tarihçesi**

Biyofilm, mikrobiyal hücrelerin hücre dışı polimer matriksle birbirlerine ve yüzeye tutunarak toplanmasıdır. İlk olarak 17. yüzyılda Antony van Leeuwenhoek basit mikroskobu kullanarak biyofilm yapısını dış plaklarında tespit etmiştir. Daha sonra mikrobiyal biyofilmlerin keşfi ile de bu tespitin doğru olduğu kanıtlanmıştır. Heukelekian ve Heller deniz mikroorganizmalarında bakterilerin önce yüzeye tutunduklarını daha sonra bakteriyel gelişim ve aktivitelerinin meydana geldiğini saptamışlardır. Zoobel ise, su altında oluşan biyofilm yapısına katılan bakterilerin sayısının herhangi bir yüzeyde oluşanlara kıyasla daha az olduğunu gözlemlemiştir.

Işık mikroskobundan daha yüksek çözünürlüğü olan ve daha büyük görüntüleri sağlayan elektron mikroskobunun kullanılmasıyla biyofilm yapısı daha da aydınlatılmıştır. Jones ve arkadaşları taramalı ve geçirimli elektron mikroskobu ile biyofilm yapılarını incelemiştir. Atık su arıtım tesislerinde kırma taşlı filtrelerinden elektron mikroskobu ile farklı morfolojideki mikroorganizma gruplarını gözlemlemiştir. Spesifik polisakkarit boyası olan Ruthenium kırmızısı ile boyayıp, osmium tetroksitle fikse edip incelediklerinde biyofilm yapısında tutunmayı sağlayan hücre dışı matriksin polisakkarit olduğunu kanıtlamışlardır.

Characklis 1973'ün başlarında endüstriyel su sistemlerinde biyofilm yapısını araştırmıştır. Bu çalışmada güçlü biyofilm yapısının dezenfektan ve klorine dirençli olduğu öne sürülmüştür. Marshall 1976 yılında çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir. Costerton ve arkadaşlarının 1978'de dış plakları ve nehirlerdeki sesil hücre topluluklarında yaptıkları çalışmalarda yüzeylere tutunan mikroorganizmaların, ekolojik ortamlardan faydalandıkları belirtilmiştir. Yeterli besine sahip ekosistemlerde bakterilerin büyük kısmının biyofilm tabakasını oluşturan matrikste üredikleri ve bu sesil bakterilerin planktonik eşdeğerlerinden farklılık gösterdikleri belirtilmiştir. O tarihten itibaren ekolojik ortamda biyofilmler üzerine yapılan çalışmalar halk sağlığı ile ilişkili bulunduğundan paralel olarak ilerlemektedir (28). Biyofilmlerin varlığı derin yer altı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır (4).

Son 20 yılda biyofilm yapıları taramalı elektron mikroskobu ve standart mikrobiyolojik kültür yöntemleriyle incelenmektedir. Son 10 yılda yapılan iki ana çalışma biyofilmler hakkında bilinenlere büyük katkıda bulunmuştur. Bu çalışmalar; lazer taramalı konfokal mikroskobu kullanılarak biyofilmin ultrastrüktürel yapısının belirlenmesi ve biyofilm oluşumunda hücrelerin birbirlerine tutunmasında rol oynayan genlerin araştırılmasıdır (5, 18, 28, 29).

Günümüze kadar biyofilm yapılarını görüntülemek için ışık mikroskopisi, geçirimli ve taramalı elektron mikroskopisi kullanılmıştır. Elektron mikroskobunda incelemede, biyofilm preparatı hazırlanmasında dehidrasyon ve deformasyon gibi morfolojik değişiklikler ve fiksasyon esnasında hacimde %50 ye varan küçülmeler ortaya çıkabilmektedir. Biyofilm yapısının görüntülenmesinde kullanılan en yeni teknik ise lazer taramalı konfokal mikroskopisidir. Bu teknikte, geçirimli veya taramalı elektron mikroskopisinde görülen istenmeyen morfolojik değişiklikler gözlenmemektedir (29).

## **2.2. Biyofilm Tanımı**

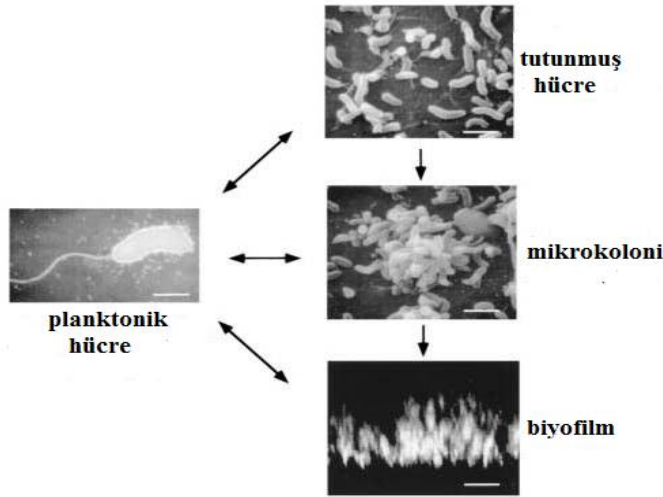
Biyofilm, bakterilerin oluşturduğu kompleks bir organizasyondur. Organize bir yapı içerisinde birlikte yaşayan bakteriler yüzeylere tutunur ve birbirleriyle uyum içindedirler. Bakteriler, polisakkaritlerden, nükleik asitlerden, lipidlerden ve hücre dışı polimerik maddelerden oluşmuş matriksin içine gömülüdürler (6, 16, 30-33). Fosil kayıtları üç milyar seneden beri prokaryotların biyofilmler halinde yaşadıklarını göstermektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* gibi birçok hastalık etkeni biyofilm oluşturabilir (33, 34).

Biyofilmin geliştiği çevreye bağlı olarak, matriksinde mineral kristalleri, korozyon parçacıkları, kan bileşenleri bulunabilir. Biyofilm yapısı oldukça çeşitli yüzeylerde meydana gelebilir. Örneğin; canlı dokularda, diş ünitelerinde, tıbbi cihazlarda, medikal aletlerde, doğal su sistemlerinde, su arıtım, depolama, işletim ve dağıtım sistemlerinde, endüstriyel veya evsel su sistemlerinde, ısıtıcılarda ve doğada oluşabilmektedir (28, 35-39).

Biyofilm oluşumu çeşitli iç ve dış faktörlere bağlıdır. Örneğin; su aktivitesi, besin ihtiyacı, antimikrobiyal madde içeriği, potansiyel hidrojen (pH) değeri, asidite, oksijen

değişkeni ve elektriksel değişkenlik gibi iç faktörler, yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, sıvının akış hızı, sınırlı besin maddesi gibi dış faktörler etkendir (5, 28, 40).

Biyofilmdeki bakteriler planktonik hücrelerle karşılaştırıldıklarında genotipik ve fenotipik farklılıklar göstermektedirler. Biyofilmi oluşturan bakteriler arasında gen transferi, genlerin çeşitlenmesini sağlamaktadır. Bu sonuçlar önemli evrimsel gelişime yol açmaktadır (33, 41).

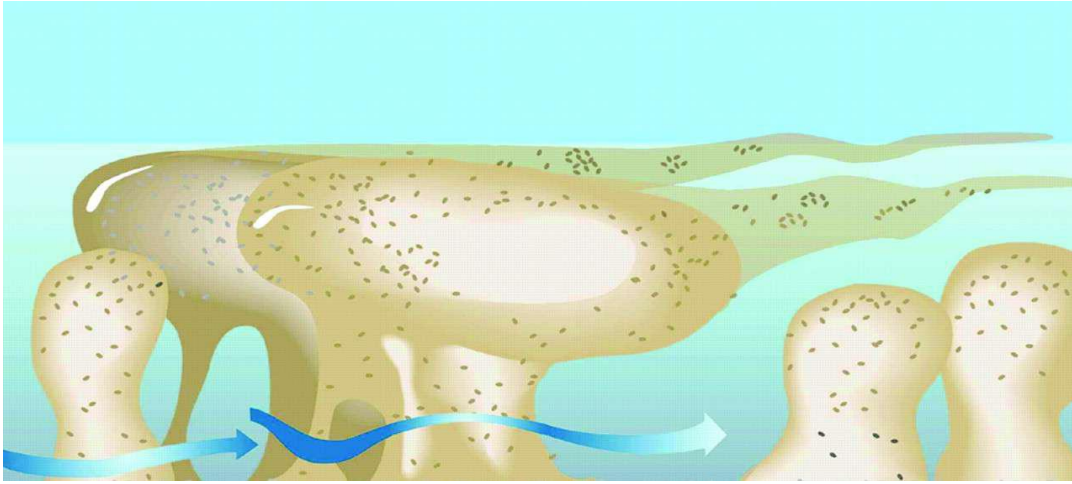


**Şekil 1:** Planktonik hücreden biyofilm gelişimi aşamaları (42)

### 2.3. Biyofilm Gelişiminin Beş Evresi

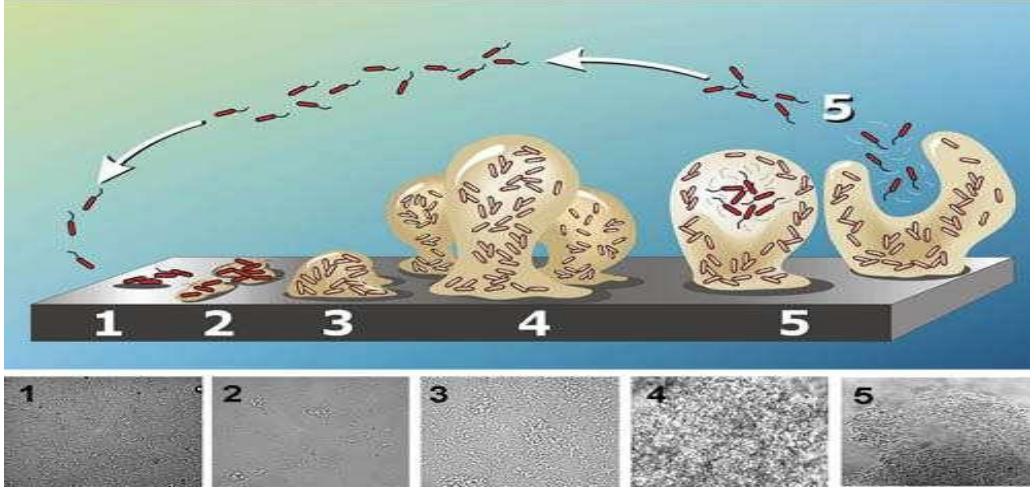
Biyofilm yapısı bakterinin yüzeye tutunmasıyla başlayan dinamik bir işlemdir. Gen kasetlerinin kademeli olarak ifadesi ile biyofilm fenotipi oluşmaya başlar. Bakterilerin yüzeye tutunması için yüzeye kesin olarak temasa geçtiklerini fark etmeleri gereklidir. Bakteriler, alıcı-verici olmak üzere iki bileşenli düzenleyici sistemleri sayesinde çevresel etkileri algılayıp fenotipik farklılık gösterirler. Tutunmadan sonraki değişiklikler ise, bakterilerin popülasyon yoğunluğunu belirlemesini sağlayan iki bileşenden oluşan “*quorum sensing*” sistemleri sayesinde gerçekleşir. “*Quorum sensing*” sisteminde, yüzeye tutunmuş her bakteri “ben buradayım” mesajı verir ve daha fazla bakterinin yüzeye tutunmasıyla bu sinyalin yoğunluğu artmaktadır. Böylece bakteriler hücreler arası düşük molekül ağırlığına sahip habercilerle haberleşip, biyofilmin gelişmesini tetiklemektedirler (33, 43).

İkinci evrede, bakterilerin yüzeye yapışması veya kuvvetli bir şekilde tutunması gerçekleşir. Üçüncü evrede ise bakterilerin mikrokoloniler halinde kümeleşmesi gerçekleşir. Dördüncü evrede, mikrokoloniler büyüyüp olgunlaşır ve mantar şeklinde yapılar haline gelirler. LTKM ile incelendiğinde, biyofilm bakterilerinin kompleks hücre dışı polisakkaritlerle kaplanmış mikrokolonilerden oluşan hücre kuleleri şeklinde yaşadıkları gözlenmiştir. Mikrokoloniler, besin maddelerinin, oksijenin iletimini ve metabolik artıkların atılmasını sağlayan su kanalları ile ayrılmıştır. Bu yapı, ilkel dolaşım sistemine benzetilmektedir (33, 44, 45).



**Şekil 2:** Su kanalları ile ayrılmış, mantar veya hücre kuleleri şeklindeki mikrokoloniler (5)

Biyofilm gelişim evrelerinin beşinci basamağı kopma/ayrılma evresidir. Tek bir bakteri veya bakteri kümesi koparak ayrılmaktadır. Bu ayrılış, EPS'nin azalması gibi dış kuvvetlerin etkisiyle, biyofilm yapısının kazınması gibi fiziksel kuvvetlerin etkisiyle veya tek bir hücre / hücre kümesinin kopmasıyla gerçekleşmektedir (33).



Şekil 3: *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm gelişim evreleri (46)

#### 2.4. Yüzey Etkileri

Tutunma işleminde katı yüzeylerin önemli karakteristik özellikleri bulunmaktadır. Mikrobiyal kolonileşmenin derecesi yüzey sertliği arttıkça artar. Bunun sebebi, katı yüzeylere daha sıkı tutunabilmeleridir. Daha sert olan yüzeylerin alanı daha fazladır. Yüzeyin fizikokimyasal özellikleri, tutunmanın oranını ve miktarını etkilemektedir. Birçok araştırmacı, mikroorganizmaların teflon ve diğer plastikler gibi hidrofobik yüzeylere, cam ve metal gibi hidrofilik yüzeylerden daha iyi ve çabuk tutunduğunu tespit etmişlerdir.

Hücre ile yüzey arasında hidrofobik etkileşim meydana gelmektedir. Bu etkileşim sırasında hücre, yüzeyin uyguladığı aktif itici gücü engeller ve geri dönüşümsüz olarak bağlanır (28).

#### 2.5. Hücre Dışı Polimerik Maddeler (*Extracellular Polymeric Substances - EPS*)

Biyofilmler esas olarak, mikrobiyal hücreler ve EPS'den oluşmaktadır. EPS, biyofilmlerin başlıca maddesidir ve biyofilmin organik karbonlarının %50-90'ını oluşturmaktadır. EPS esas olarak polisakkaritlerden oluşur. Gram negatif bakterilerde olduğu gibi bu polisakkaritlerden bazıları doğal, bazıları da polianyoniktir. D-glukuronik, D-galakturonik, veya mannuronik asit gibi uronik asitler veya ketal bağlantılı piruvatlar anyonik özellik gösterirler. Bu anyonik özellikler, kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonların

etkileşimlerini sağlar. Kalsiyum ve magnezyum iyonları, aralarında polimer iplikçiklerle çapraz bağ kurarlar ve gelişmiş olan biyofilmlerde bağlanma gücünün artmasını sağlamaktadırlar. Stafilokoklar gibi Gram pozitif bakterilerde ise EPS'nin kimyasal bileşeni oldukça farklılık göstermekte ve katyonik özelliktedir (28, 47). Hussain ve arkadaşları koagülaz negatif bakterilerin oluşturduğu biyofilm yapısındaki EPS'nin az miktarda proteinle karışmış olan teikoik asit içerdiğini öne sürmüştür (48).

EPS yüksek oranda su içermektedir. Sadece hidrofobik kısımlardan oluşabileceği gibi birçoğunda hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlar bulunmaktadır. Aynı zamanda farklı çözünürlük özellikleri de gösterebilirler.

Farklı organizmaların EPS üretim miktarı değişiklik göstermektedir. EPS'nin miktarı biyofilmlerin yaşlarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. EPS üretiminin artması, besiyerinin karbon, nitrojen, potasyum ve fosfat gibi besinlerine bağlıdır. Yavaş bakteriyel gelişim EPS üretimini arttırmaktadır. Ayrıca EPS yüksek su içerdiğinden dolayı bazı doğal biyofilmlerdeki kurumayı da önlemektedir. Aynı zamanda antibiyotiklerin biyofilm kanallarına girmesini engelleyerek biyofilmlerde antimikrobiyal direncin gelişmesine katkıda bulunmaktadır (28).

## 2.6. Gen Aktarımı

Biyofilmler, plazmidler gibi kromozom dışı DNA aktarımında ideal bir ortam oluştururlar. Konjugasyon ile gen aktarımı, biyofilm içerisindeki hücreler arasında, planktonik hücrelerin arasında olduğundan daha yüksek oranda meydana gelmektedir (49). Ghigo, bakterilerin konjugatif plazmid içeren suşlarının, biyofilm oluşturmaya daha yatkın olduğunu öne sürmüştür (50). *Escherichia coli*'nin içerdiği F konjugatif pilusu (*tra* operonu kodlayan F plazmid), hem hücre yüzeyi hem de hücre-hücre etkileşiminde yapıştırıcı faktör olarak rol oynamakta ve üç boyutlu biyofilm yapısı oluşmaktadır. Plazmid taşıyan suşlar, alıcı hücelere plazmid aktarırlar ve alıcı hücreler de biyofilm yapısı oluşturur. Plazmid taşımayan aynı organizmalar daha ileri bir gelişim göstermeden sadece mikrokoloniler oluştururlar. Artmış konjugasyonun sebeplerinden biri, biyofilm yapısındaki hücrelerin birbirine yakınlaşıp, hücre-hücre temasının artmasıdır. Plazmidler antimikrobiyal ajanlara karşı çoklu direnci kodladıklarından, biyofilmde antimikrobiyal ajanlara karşı direncin yayılmasını sağlarlar (49).

## 2.7. “*Quorum Sensing*” Mekanizması

Bakteriler, biyofilm yapılarını rastgele oluşturmazlar ve çeşitli kimyasal işaret mekanizmaları kullanmaktadırlar. Bakteriler tarafından oluşturulan kimyasal sinyalin, hücre dışı konsantrasyonunun belirli bir seviyeye ulaşması, çevrede bulunan bakteriler için o bölgede belirli yoğunlukta bir hücresel kümelenmenin başladığı anlamına gelmektedir. Kimyasal olarak populasyon yoğunluğunun algılanması işlemine “*quorum sensing*” adı verilir (49, 51). Hücreler arası haberleşme, hücrelere tutunmada ve biyofilmlerden ayrılmada rol oynamaktadır.

Davies ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilm yapısında, *lasR-lasI* ve *rhlR-rhlI*'dan oluşan iki farklı hücre arasında sinyal sistemlerinin varlığı saptanmıştır (28, 51). Kimyasal sinyaller, biyofilmi farklılaştıran genlerin aktif hale gelebilmesi için gereken konsantrasyona erişirler ve bakteriler yeterli populasyon yoğunluğuna ulaşırlar. Her iki sinyali de üretemeyen mutantlar da biyofilm oluşturabilmektedir. Fakat yabancı türlerinin aksine bunların biyofilmleri daha ince, hücreler daha yoğun kümelenmiş ve tipik biyofilm mimarisinden yoksundur. Ayrıca mutant biyofilmler yüzeylerden daha kolay ayrıştırılırlar. Mutant biyofilmleri içeren ortamlara homoserin lakton sinyallerinin eklenişi ile yapı ve kalınlık açısından yabancı türlere benzer biyofilmler oluşturmuşlardır (28). Stickler ve arkadaşları, üreter kateterlerin üzerindeki Gram negatif biyofilmlerin içerisinde açıl homoserin lakton sinyallerini belirlemiştir (52). Yung-Hua ve arkadaşları, *Streptococcus mutans* biyofilmi içerisinde transformasyon yoluyla gen aktarımının *quorum sensing* mekanizması ile indüklendiğini gözlemlemiştir (53). Transformasyonel aktarım, biyofilmler içerisindeki hücrelerde planktonik hücrelerde olduğundan 10 ila 600 kat daha fazla meydana gelmektedir (28, 53).

## 2.8. Biyofilm Saptama Yöntemleri

- Klasik bakteri sayımı (*Conventional plate counting*): Yüzeylerde oluşan bakteri biyofilmlerinin saptanmasında kullanılan indirekt yöntemdir. Bu yöntem, tutunmuş hücrelere aşındırıcı etki edebilir ve biyofilm yapısını hasara uğratabilir. Biyofilm yapısını, olduğu yerde incelemeye olanak sağlamayan yöntemlerdir.



- Direkt veya metabolik indikatörler kullanılarak canlı sayımı: Floresan boyalarla boyanan biyofilm hücreleri floresans mikroskopuyla direkt olarak görüntülenir.
- Lazer taramalı konfokal mikroskopisi: Floresan moleküler probalar ve lazer ışınları kullanılarak bakteriler biyofilm oluşturdukları yüzeyde üç boyutlu olarak görüntülenirler.
- Taramalı elektron mikroskopisi: Yüzeylerde oluşan biyofilmlerin morfolojisi bu yöntemle gözlemlenir.
- Atomik kuvvet mikroskopisi: Çok yaygın olarak kullanılmayan bu mikroskopik teknik, birkaç nanometre çözünürlük ölçeğine sahiptir. Boyama veya kaplama gerektirmeyen, biyofilmlerin olduğu yerde incelenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir (4).

## 2.9. Biyofilm Oluşturmanın Avantajları

Bakteriler, canlı veya cansız yüzeylerde biyofilm oluşturduklarında birçok avantaja sahip olurlar. Biyofilmler, nem, ısı, pH değişiklikleri ve UV ışığına maruziyet gibi çevresel değişimlere daha dayanıklıdır. Ayrıca besinleri konsantre eder ve atıkların kolayca atılımını sağlarlar. Biyofilmdeki bakterilerin kümeleşmesi, hücreler arası etkileşimleri kolaylaştırır. Biyofilm yapısı, bakteriyi konak savunma mekanizmasına karşı dirençli hale getirir. Çünkü EPS ile çevrelenmiş hücre kümelerinin oluşturduğu biyofilm yapısı büyük olduğu için fagositoz olamayacaktır ve böylece konağın bağışıklık sistemi tarafından yakalanamayacaktır (33).

Klinik açıdan sağladığı önemli avantajlardan biri, biyofilm oluşturan bakteriler antibiyotiklere karşı planktonik bakterilere kıyasla daha dirençli olmalarıdır (33, 54-57). Başlarda EPS matriksini, antimikrobikler absorbe ettiği veya sınırlı bir şekilde yayıldığı düşünülürken, artık çoğu antibiyotik biyofilm içine girebildiği kanıtlanmıştır. Biyofilmlerdeki bakterilerin sergilediği fenotipik değişiklikler de antibiyotiklere karşı dirençte rol oynamaktadır. Birçok antibiyotik hızla bölünen bakterileri hedeflemektedir. Bu nedenle, biyofilmin derin tabakalarında bulunan, azalmış metabolik ve bölünme hızları sergileyen bakterilere antibiyotikler etkili olamamaktadır. Dolayısıyla, antibiyotik uygulanmasıyla

birlikte biyofilm yapısındaki çevreye yakın olan bakteriler ölür, biyofilmin derinlerinde kalan bakteriler ise ölmezler ve tekrar gelişmeleri için ortam oluştururlar.

Antibiyotiklere ve bağışıklık sistemine karşı direnç gösteren biyofilm yapısındaki bakterilerin laboratuvar ortamında kültüre edilmesi zordur. Kültürde üretilmeyen enfeksiyon olgularında bakteriyel mRNA saptanmıştır (33).

## 2.10. Biyofilmin Halk Sağlığı Açısından Önemi

Klinik ve halk sağlığı mikrobiyologlarının tanımlamalarına göre, mikrobiyal plakların doğada her yerde bulunabilmesi çok sayıda bulaşıcı hastalığın oluşumuna neden olmaktadır (28).

Biyofilm oluşturan mikroorganizmalardan kaynaklanan hastalıkların bazıları; kistik fibrozis, doğal kapak endokarditi, orta kulak iltihabı, periodontit, kronik prostat gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunların dışında, protez kapak, santral venöz katater, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve rahim içi araç gibi yabancı cisim enfeksiyonlarına yol açmaktadırlar. Sağlık sektöründe kullanılan çok sayıda tıbbi cihazda saptanan biyofilm plakları bu cihazlardan kaynaklanan enfeksiyonlara neden olmaktadır (28, 58-64). İçme suyu dağıtım şebekelerinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ise enterik patojenler, *Legionella pneumophila*, tüberküloz dışı mikobakteriler ve *Helicobacter pylori*'dir.

Patojenik organizmaların biyofilme enfeksiyon hastalığını nasıl oluşturduğu net olarak anlaşılmamıştır. Bulaşıcı hastalıklara neden olan biyofilmin özellikleri aşağıda yer almaktadır:

- a) Hücrelerin veya biyofilm kümelerinin ayrılması, kan ve idrar yolu enfeksiyonlarına veya emboli oluşumuna yol açar.
- b) Biyofilm içerisindeki hücreler, dirençli plazmidleri birbirlerine aktarabilmektedir.
- c) Biyofilm içerisindeki hücrelerin, antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığı azalmaktadır.
- d) Gram negatif bakterilerden oluşan biyofilmler endotoksin üretebilmektedir.

e) Biyofilmler, konağın bağışıklık sistemine karşı daha dirençlidir (28).

## 2.11. *Escherichia coli* Hakkında Genel Bilgiler

*Escherichia coli*, mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen bakterilerdendir. Su ve gıdalar ile alınarak, insan ve sıcak kanlı hayvanlarda doğumu takiben 1-2 saat veya gün içinde ince barsakların son kısmı ve kalın barsak mukozasına tutunurlar. Bir *E.coli* suşu yerleştikten sonra aylar veya yıllarca normal florada kalır ve zararlı mikroorganizmaların kolonizasyonuna engel olur (65, 66). Ancak enterik enfeksiyonlar ve antibiyotik kullanımı ile ortamdan kaybolabilir. Geçici olarak yerleşen *E.coli*'ler ise birkaç gün veya hafta kalabilir. *E.coli* normal floranın temel elemanı olmakla beraber, bazı suşları barsak patojeni olarak karşımıza çıkabilir. Ayrıca barsak dışı enfeksiyonların başta gelen nedenleri arasında yer alır (65, 67, 68).

### 2.11.1. Yapısal, Biyokimyasal ve Üreme Özellikleri

*Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* ailesinin birçok temel özelliğini taşımaktadır (65). Yaklaşık olarak 2 - 6 µm boyunda ve 1.0 - 1.5 µm eninde, basil şeklinde bakterilerdir. Genellikle etraflarında bulunan kirpikleri aracılığı ile hareketli olmakla beraber hareketleri yavaş, hatta bazen hareketsiz görülebilirler. Hemagglütinasyon yapan fimbriyaları vardır. Çoğunlukla hemagglütinasyonun mannoz tarafından önlediği (Mannoza duyarlı MS) Tip 1, az bir kısmında ise hemagglütinasyonu mannoza dirençli tipte (MR) Tip 2 fimbriya bulunur.

Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve Gram negatiftirler. Organizmada barsak dışındaki yerlerden soyutlanan kökenlerin çoğunda kapsül ya da mikrokapsül bulunur (69). O, H ve K antijenleri vardır ve farklı kombinasyonları ile yüzlerce değişik serotip ortaya çıkabilir (teorik olarak 10<sup>6</sup> adettir). Ancak bunların sınırlı sayıdaki kısmı klinik öneme sahiptir (65).

*E.coli* genel besiyerlerinde kolayca ürer. Fakültatif anaerop olup ortalama pH 7.2'de iyi ürerler. Optimal üreme ısısı 37°C'dir ve özellikle 44 °C de üreyebilmeleri benzer bazı bakterilerden (*Enterobacter*, *Serratia*) ayırt edici bir özelliktir. Sıvı besiyerinde homojen bulanıklılık yaparlar. Katı besiyerinde ise hafif kabarık, yuvarlak, düzgün 1 - 2 mm çapında

parlak S tipi koloniler yaparlar. Bazı kökenleri hafif mukoid (M) koloniler, bazıları da R tipi koloniler oluşturabilirler. Jelatine kolonileri küçük, beyaz ve opaktır. Jelatini ve serum koagüleyi eritmezler ancak bazı kökenler (özellikle idrar yolu enfeksiyonlarından soyutlananlar) kanlı jelozda hemoliz yapabilirler (69). Eozin-Metilen Mavili (*Eosin Methylene Blue*, EMB) besiyerinde; küçük, koyu renkli ve metalik refle veren, Endo ve MacConkey agarlarda kırmızı parlak, *Salmonella-Shigella* besiyerinde ise pembe renkli koloniler oluşturur.

Glukozdan gaz oluşturur, laktozu fermente ederler. Metil kırmızısı testi pozitif, Voges-Proskauer testi negatiftir. İndol pozitif, sitrat negatiftir (IMVIC reaksiyonu: ++-- dir) (65, 69). Bazı kökenleri dışında üreyi parçalamazlar. Genellikle H<sub>2</sub>S için ayıraçlı besiyerlerini siyahlandıracak kadar H<sub>2</sub>S yapmazlarsa da sisteinli besiyerlerinde az miktarlarda H<sub>2</sub>S yaptıkları saptanmıştır. Hemen tümünde potasyum siyanit testi negatiftir (69).

### **2.11.2. Enterik Patojen *Escherichia coli***

Enterik patojen *E.coli*; patogenez, klinik ve epidemiyolojik özellikleri farklı olan gruplarda aşağıdaki şekilde toplanabilirler.

- Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC): Gelişmekte olan ülkelerde, infant ve turist diyarelerinin başlıca nedenleri arasındadır. Bakteri, kontamine su ve gıdalarla alınır. Enfektif dozu 10<sup>8</sup> dir. Bakteri önce kolonize olur, sonra toksinlerini salgılar. Klinik tablo; basit rahatsızlık hissi şeklinde olabileceği gibi, bol sulu, kolera benzeri diyare ile de seyredebilir (65).
- Enteropatojenik *E.coli* (EPEC): Daha çok süt çocuklarında görülür ve salgınlara yol açar. Çoğu antibiyotiklere karşı çoklu dirençli olan serotipleri yer alır (69).
- Enteroinvazif *E.coli* (EIEC): Distal ileum ve kolonda epitel hücrelerine penetre olarak *Shigella* benzeri bir patoloji ve klinik tabloya neden olur. İnvazyon yeteneği plazmid kontrolündedir. Korunma ile tedavisi şigellozdekine benzer.
- Enterohemorajik *E.coli* (EHEC): *E.coli* O157:H7 serotipi *Shigella* ve EIEC'e benzer diyareye neden olur. En önemli yönü böbreklere yaptığı toksik etki ile hemolitik üremik sendroma neden olmasıdır. İnvazyon yeteneği ve toksinleri yoktur, fakat plazmid kontrolünde olan bir virulans faktörü ve bakteriyofaj kontrolünde olan

*Shigella* toksinine benzeyen sitotoksini vardır. Bu toksinlerin vero hücrelerine olan sitotoksik etkileri nedeniyle verotoksin 1 ve 2 ismi verilmiştir. Bu toksinler hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpuraya neden olmaktadır (65).

- EnteroAggregatif *E. coli* (EAEC): Barsak epiteline bağlanıp tuğla gibi dizilmiş bakteriler şeklinde görünürler. Bu gruba has bakterilerin salgıladığı toksinler mukozaya zarar verip kronik diyareye yol açarlar.
- *Diffusely Adherent E. coli* (DAEC): Bir yaşından küçük çocuklarda diyareye yol açar. Özelleşmiş fimbrialar sayesinde epitele bağlanırlar ve hücre içi sinyal mekanizmasını etkinleştirirler. Bu grup hakkında bilgi azdır (70).

### 2.11.3. Barsak Dışı *Escherichia coli* Enfeksiyonları

Normal barsak florasında bulunan *E.coli* bakterileri, herhangi bir nedenle başka dokulara geçme olanağı bulduklarında (barsağın mekanik veya diğer biyolojik etkilerle yaralanmaları veya organizmanın savunma mekanizmasındaki bozukluklar nedeniyle) önemli yangılı enfeksiyonların oluşmasına neden olmaktadır (69). Üriner sistem enfeksiyonları ve neonatal menenjitler başlıca önemli enfeksiyonları olmakla beraber nozokomiyal enfeksiyonlar, bakteriyemi, cerrahi yara ve alt solunum yolu enfeksiyonlarına da neden olmaktadır (65).

Üropatojenik *E. coli* (UPEC), üriner sistem enfeksiyonlarının %90'ının nedenidir. Bu *E. coli* tipleri idrar yolu epitel hücrelerine özellikle bağlanabilen fimbriyalara sahiptir (70). Üriner sisteme bağlı olarak en fazla sistit olmak üzere piyelit ve piyelo-nefrit görülür. Safra ve safra yollarına yerleşmeleri ile kolesistit ve kolanjit oluşur. Barsakların kesici aletlerle yaralanmaları veya çeşitli hastalıklarla delinmeleri sonucu peritona geçen koli basilleri diğer mikroorganizmalarla birlikte akut peritonit oluştururlar. *E.coli* O:157 H:7 serotipi barsak dışında hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpuraya neden olur.

Bunların dışında *E.coli* bakterilerinin yaptığı enfeksiyonlar arasında prostatitler, çeşitli perineal abseler, daha az olmak üzere tonsillit, farinjit, sinüzit, otit, yara enfeksiyonları gibi lokalize iltihaplanmalar sayılabilir (69).

#### 2.11.4. Tanı ve Tedavi

Yangılı koli enfeksiyonlarında inceleme maddesi hastalığa göre değişmek üzere; idrar, irin, kan, beyin omurilik sıvısı, balgam ve safradır. İshallerde dışkı incelenmelidir.

Endo, EMB, Mac Conkey agar gibi ayırt edici besiyerlerine ekim yaparak kültür yöntemleri veya çeşitli şekerleri fermente etmesiyle ayırt edilebilir. Gerek kültür lizatlarından gerekse doğrudan dışkı örneklerinden enterotoksinlerin araştırılması amacıyla ELISA, koagülünasyon ve *E.coli* DNA'larının saptanması için DNA hibridizasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Ayrıca indirekt hemagglütinasyon, indirekt floresan antikör testleriyle ya da biyokimyasal özelliklerinin araştırılması için ticari testler (Api, Enterotube vb.) ve bilgisayar programlı otomatik yöntemler güvenilir sonuç vermektedir.

*E.coli* enfeksiyonlarında tedavide ampisilin, tetrasiklinler, kloramfenikol, sefalosporinler ve aminoglikozidler kullanılmaktadır (69).

#### 2.12. *Escherichia coli* Biyofilm Yapısı

Sıvı çevresel koşullarda hidrodinamik kuvvet, bakterinin yüzeye yaklaşması için önemlidir. Bakteriler, Brownian ve yerçekimi kuvveti gibi pasif hareketlerin yanı sıra, yüzeyin itici elektrostatik ve hidrodinamik güçlerine karşılık aktif hareketler yapabilmektedirler. Böylece yüzeye etkileşim şansları artmaktadır. Biyofilm oluşum aşamasında, bakterinin hareketi yüzeye tutunmasına yardımcı olur. Hareket için gerekli yapı flajeldir. Sıvı/yarı katı besiyerlerinde yüzeye tutunmada veya yüzeye yayılmada etkilidir (18, 71, 72). Hareketsiz bakteriler de biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olabilirler. Konjugatif plazmid *E.coli* suşları için güçlü bir adhezyon faktör olarak rol oynamaktadır.

Biyofilm oluşumunda ilk adım olan geri dönüşümlü tutunma; çevrenin sıcaklığından, pH'sından, iyonik gücünden ve tutunacağı yüzeyin özelliğinden etkilenmektedir. Teflon, plastik gibi hidrofobik yüzeylerde cam ve metaller gibi hidrofilik yüzeylere nazaran daha iyi kolonize olurlar.

Sonraki adım geri dönüşümsüz tutunmadır. Hücreler bir araya gelip kümeleşirler (18). Termodinamik yönlerinin yanı sıra bakterinin yüzeye yapışmasında yardımcı olan organelleri

bulunmaktadır. Bunlar; tip 1 flajel, pilus ve konjugatif pilustur. Bu yapıları sayesinde yüzeylere tutunma gerçekleşir (10, 18, 73-77). Piluslar ve konjugatif piluslar ile ayrıca hücreler arası etkileşimler de gerçekleşmektedir. Konjugatif piluslar ile yatay gen aktarımı gerçekleşir. Konjugatif plazmid, suşların olgun biyofilm yapısı oluşturmasını tetiklemektedir. Ayrıca plazmide bağlı virulans faktörleri oluşmaktadır (18, 50, 78).

Daha sonraki adım ise, olgun biyofilm yapısının oluşmasıdır. Bakteriler yüzeye tutunduktan sonra üç boyutlu gelişim göstererek olgun biyofilm yapısını oluştururlar (18, 79). Yoğunlukla bakteriler arası etkileşimlere, çevrenin heterojenik fizikokimyasal yapısı neden olmaktadır. Böylece biyofilmdeki bakteriler, planktonik eşlerinden farklı fizyolojik özellikler sergilemektedirler. Ayrıca biyofilm yapısının oluşumunda ve olgunlaşmasında yüzey adhezinleri önemli katkıda bulunmaktadır. *E.coli*'nin yüzey adhezinleri şunlardır;

- Ototransporter adhezinler: Gram negatif bakterilerde proteinlerin, hücrenin dışına doğru translokasyonunun sağlanması için sitoplazmik membran, periplazma ve dış membrandan geçmeleri gereklidir. Translokasyonun sağlanması için altı farklı salgı yolu vardır. Aralarında Tip 5 salgı yolu proteinlerin yüzeye ulaşmasını sağlamaktadır. Sınırlı sayıda salgı faktörleri salgılanır çünkü translokasyon için gerekli bilgilerin çoğunu, salgılanacak proteinin kendisi içermektedir. Bu proteinlere, dış membrandan kendilerinin taşınmasını sağlayabildikleri için ototransporter denilmektedir. Gram negatif bakterilerin ototransporter proteinleri tanımlanmış ve üç grupta toplanmıştır. Bunlar; proteazlar, esterazlar ve adhezinlerdir.
  - Tip 5 salgı yolu: Ototransporter proteinler tip 5 salgı yolu ile hücre içinden dışına salgılanır.
  - Antijen 43: Dış membran proteindir. Hücreler arası tutunmayı sağlar. Ökaryotik hücrelere veya cansız yüzeylere tutunan hücrelerin, olgun biyofilm yapısı oluşturmalarında rol oynar (18, 80).
  - AidA ve TibA proteinleri: Ökaryotik hücrelere ve cansız yüzeylere tutunmayı, otoagregasyonu ve biyofilm oluşumunu sağlayan glikozillenmiş yüzey proteinleridir. Ayrıca patojenik *E.coli* suşlarında virulans faktör olarak da rol oynarlar.
- *E.coli* adhezin potansiyeli: Genetik analizler sonucu, çeşitli *E.coli* adhezinlerinin kolonizasyon veya olgun biyofilm yapısı oluşumuna katkı sağladığı bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar sonucunda, *yfaL*, *yeeJ*, *ypjA* ve *ycgV* genlerinin *E.coli*'nin tutunmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır.

Çeşitli patojenik *E.coli* suşlarında bu adhezyon faktörlerine ek olarak flajel yapıları ve plazmidler sayesinde bakteri hücreleri diğer hücrelere veya cansız yüzeylere yapışabilmektedirler (18, 81, 82).

Son adım dağılma evresidir. Hücre kümeleri arasında kanallar oluşur ve ayrılma gerçekleşir (18).

### 2.13. İçme Suyu Sistemleri

20. yüzyıl boyunca gelişmiş ülkelerdeki halk sağlığı üzerine büyük etkisi olan en iyi teknolojik gelişmelerden birisi içme suyu kaynaklarıdır. Günümüzde gelişmiş ülkelerde, güvenli içme suyuna ulaşmak insani bir haktır. Fakat 2004'teki Dünya Sağlık Örgütü'nün istatistiklerine göre bu bölgelerde yaşayan toplam insan nüfusunun %83'ü buna ulaşabilmektedir. Diğer gelişmekte olan ülkelerin kırsal kesimlerinde ise ekonomik kısıtlılıklar sebebiyle güvenli içme suyuna ulaşmak mümkün değildir. Gelişmiş ülkelerdeki su kaynaklı patojenlerden doğan sağlık riskleri, doğal su kaynaklarının yanlış kullanımından, teknolojik yetersizlik ve uygun olmayan analizlerden kaynaklanmaktadır.

İçme suyu kaynaklarındaki patojenlerin çalışılmasında sırasıyla şu adımlar izlenmektedir:

- İçme suyunun hijyenik kalitesinin incelenmesi
- Su kaynaklı yaygın enfeksiyon örneklerinin değerlendirilmesi
- Mikrobiyal kontaminasyon kaynaklarının saptanması
- Mikrobiyal patojenlerin açığa çıkması

İçme suyunda bulunan mikroorganizmaların patojenitesini ve yaygınlığını saptayan mikrobiyolojik prensipler sınırlıdır. Nedenlerinden bazıları aşağıda sıralanmıştır:

- Sularda bulunan mikroorganizmaların kesin olarak saptanması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi oldukça zordur, klasik ve moleküler yöntemler birlikte kullanılmalıdır.



- Su kaynaklı patojenlerin virölansı, çevresel faktörler ve kaynak sularının arıtılmasına bağlı olarak değişiklik gösterir.
- Sudan kaynaklanan enfeksiyonların içme suyu ile insanlara bulaşması, patojenin türü ve miktarına, kişinin bağışıklık yanıtına ve diğer birçok faktöre bağlıdır.

İçme suyundaki mikrobiyal patojenler üç farklı gruba aittir. Bunlar, virüsler, bakteriler ve protozoonlardır. Günümüzde bakteriler, sudan kaynaklanan salgınlardan çoğunluğunu oluşturan etyolojik ajan olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda dünyanın gelişmiş diğer bölgelerinde sudan kaynaklanan salgınlardaki patojenik bakterilerin artmasının sebebi, yaşam tarzındaki değişiklikler ve yeni bakteriyel patojenlerin açığa çıkmasıdır.

İçme suyu için kaynak su, çoğunlukla nehirlerden ve göllerden, insan yapımı depolardan ve yer altı kaynaklarından elde edilir. Kaynak suları, kalitesine bağlı olarak flokülasyon ve kumlu filtrasyon gibi çeşitli işlemlerle içilebilir hale getirilir. Dezenfeksiyon basamağından (ozonasyon ve klorinasyon) sonra pompa sistemine aktarılır ve insanlara ulaşır. Su kaynaklı enfeksiyonların tehlikesinin azaltılması için çoklu bariyer sisteminin kullanılması gereklidir. Çünkü bahsedilen arıtma sistemlerinin hiç biri mikrobiyal güvenliği tam olarak sağlayamamaktadır. Bu yüzden, içme suyu mikrobiyolojisinin amaçlarından biri, patojenik bakterilerin fiziksel azaltımı ve kimyasal inaktivasyonu gibi çeşitli arıtma basamaklarıyla mikrobiyal verimliliği değerlendirmektir. Patojenik bakteriler ya su kaynağından ya da içme suyu dağıtım sisteminden kaynaklanmaktadır. Patojenik bakterilerin ana kaynağı özellikle hastane ve büyük şehirlerde yetersiz arıtma yapan kanalizasyon sistemleridir.

Ekonomik Ortaklık ve Gelişim Organizasyonu'na göre güvenli içme suyunun korunması ve yönetimi ile ilgili ileride karşılaşılabilecek sorunların en büyüğü, arıtmaya dayanıklı patojenler olacaktır. Buna ek olarak, toprağın daha yoğun bir şekilde kullanımı, iklim değişikliği ve biyoterörizm ise diğer sorunlar arasındadır. İklim değişikliği, bütün açık su kaynaklarının derecesini yükseltmektedir. Bu durum, patojenik bakterilerin hayatta kalma ve gelişim koşullarının güçlenmesine yol açmaktadır. Küresel ısınmanın diğer etkileri ise, artan sıklıkta yoğun yağmurlar, fırtınalar ve seller, kanalizasyon sularının aktarılmasında ve arıtılmasında ciddi hasarlara yol açmakta ve doğal su kaynaklarının fekal kontaminasyonuna neden olmaktadır.

İçme suyu kaynaklarında ve dağıtım sistemlerinde bulunan bakterilerin bazıları şunlardır:

- *Escherichia coli*
- *Shigella flexneri*
- *Salmonella enterica*
- *Vibrio cholerae*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Campylobacter jejuni, C.coli*
- *Helicobacter pylori*
- *Arcobacter butzleri*
- *Legionella pneumophila*
- *Mycobacterium avium* kompleks
- *M. avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)
- *Francisella tularensis* (83)

İçme suyunun, içilebilir hijyenlikte olduğunu tespit etmek için önemli mikrobiyal grupların hızlı testleri yapılarak analiz edilir. *Escherichia coli* içme sularının kirliliğinin değerlendirilmesinde indikatör mikroorganizmadır. Enterotoksijenik ve enterohemorajik formları su kaynaklı salgınların en önemli nedenleridir. Su kaynaklı salgınların oranı, dağıtım sistemlerindeki hatalarla ilişkili olarak yıllar geçtikçe artmaktadır. Ayrıca, doğru tekniklerle numune alma ve tanımlama yönteminin doğru seçimi halk sağlığının korunması açısından çok önemlidir (21).

İçme suyu dağıtım sistemlerindeki mikrobiyal üreme, borularda korozyona, suyun tat ve kokusunun kalitesinin azalmasına ve hastalıkların yayılmasına neden olur. Bu dağıtım sistemlerindeki mikroorganizmaların canlı kalması sadece biyolojik faktörlere değil, boru malzemesi, su sıcaklığı, hidrolik koşullar, besin, dezenfektan tipi ve konsantrasyonu gibi çeşitli fizikokimyasal faktörlere de bağlıdır (84).

Biyofilm yapısının giderimi veya oluşumunun önlenmesi için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler mevcuttur. Bunlardan bazıları;

- Membran filtrasyon yöntemi

- Aktif karbon filtrasyon yöntemi
- Hipoklorik asit, monokloramin ve klorin dioksit ile dezenfeksiyon
- UV ile dezenfeksiyon
- Ozon ile dezenfeksiyon (20, 85-92)

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Deneysel nitelikteki araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi-Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Mühendislik Fakültesi-Maden Mühendisliği Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

#### **3.1. Çalışma Materyali**

İçme suyu damacanelerinde kullanılan plastik yapıdaki pompalardan 264 adet 5x5 mm boyutlarında ( $0,0360\pm 5$ gr) parçalar hazırlandı. Yirmi dört kuyucuklu düz tabanlı hücre plaklarına yerleştirildi ve yeni pasajlanmış *E.coli* ATCC 25922 suşu inoküle edildi. Bu örneklerin 36 adeti taramalı elektron mikroskopu yöntemi, 36 adeti ise kristal viyole ile boyama yöntemi ile biyofilm yapısı incelendi. Daha sonra dezenfeksiyon yöntemi uygulanmış örneklerin 96 adeti taramalı elektron mikroskopu yöntemi, 96 adeti ise kristal viyole yöntemi ile incelendi.

#### **3.2. Biyofilm Yapısının İncelenmesi**

##### *Gereçler*

##### 1. McFarland No: 1,0 bulanıklık eşeli

- %1'lik baryum klorür 0.1 ml
- %1'lik sülfürik asit 9.9 ml

Karıştırılıp McFarland No:1,0 bulanıklığı elde edildi.

##### 2. Fosfat Tamponu (pH: 7,2)

- Sodyum fosfat 11.9 gr
- 1000 ml distile su ile karıştırıldı ve otoklavlandı.

### 3. Kristal Viyole Boyası

- Kristal viyole 10 gr
- Fenol kristali 20 gr

Cam havanda ezildi.

- % 96'lık etanol 100 ml

Cam havanda ezilen boya karışımına etanol yavaşça karıştırılarak ilave edildi.

- Distile su ile 1000 ml ye tamamlandı.

### 4. İçme suyu damacana pompası (plastik)

### 5. *E.coli* ATCC25922

### 6. Kanlı agar besiyeri

### 7. Yirmi dört kuyucuklu düz tabanlı hücre kültür plağı

### 8. %2,5'luk Gluteraldehit

### 9. %1'lik Osmium tetroksit

### 10. %50, %70, %90, %95 ve %100'lük etanol

### 11. Hekzametil disilazan (HMDS)

### 12. Aseton

### 13. Eküvyon

### 14. Pipet

### 15. Doksan altı kuyucuklu düz tabanlı ELISA plağı

### 16. Çift taraflı karbon bant

### 17. Şerit altın

## 18. Sodyum hipoklorit hazırlanması

- 500 ppm'lik konsantrasyonda (%0.05) sodyum hipoklorit için,

0.5 ml 50000 ppm'lik sodyum hipoklorit

49.5 ml steril distile su

Karıştırılır.

- 5000 ppm'lik konsantrasyonda (%0.5) sodyum hipoklorit için,

5 ml 50000 ppm'lik sodyum hipoklorit

45 ml steril distile su

Karıştırılır.

## 19. Scanning elektron mikroskobu (JEOL, JXA733 Super Probe)

## 20. ELISA cihazı (Thermo Multiscan FC)

## 21. Etüv (Memmert)

### *Yöntem*

1. İçme suyu damacanelerinde kullanılan plastik yapıdaki pompalardan 5x5 mm boyutlarında (0,0360±5gr) parçalar hazırlandı.
2. Hazırlanan pompa parçaları 24 kuyucuklu düz tabanlı plaklara yerleştirilip etilen oksit yöntemiyle steril edildi.
3. Stoklanmış olan *E.coli* ATCC 25922 suşunun kanlı agara pasajı yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi.
4. Üreyen koloniler eküvyon ile alınıp, tüpte fizyolojik tuzlu su ile karıştırıldı.
5. Tüpteki bakteri yoğunluğu, McFarland No:1 çözeltilisi ile çıplak gözle kıyaslanarak ayarlandı.
6. Hazırlanan süspansiyondan her kuyucuğa 2 ml aktarıldı. Etüvde 37 °C'de inkübe edildi.

### **3.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu Yöntemi (TEM)**

İncelemede uygulanan basamaklar:

1. Biyofilm oluşumu, inkübasyonun birinci (12 örnek), dördüncü (12 örnek) ve yedinci günlerinde (12 örnek), taramalı elektron mikroskobu yöntemi ile incelendi.
2. Pompa parçaları fosfat tamponu ile yıkandı.
3. Kurutulduktan sonra 1 saat 1 ml %2,5 gluteraldehit ve ardından 1 saat 1 ml %1 osmium tetroksit ile tespit edildi.
4. Pompa parçaları sırasıyla 1 ml %50, %70, %90 ve %95'lik etanol solüsyonlarında 10'ar dakika (toplam 40 dakika) dehidrate edildi.
5. 1 ml %100'lük etanolde iki kere 10 dakika dehidrate edildi.
6. 1 ml hekzametil disilazan ile iki kere 10 dakika dehidrate edildi.
7. Havada kurutulduktan sonra altın ile kaplandı.
8. Taramalı elektron mikroskobunda incelemeye alındı (84).
9. İncelenen örnekler, görülen bakteri yoğunluğuna göre 0 ile 4 arasında skorlandı.
10. İnkübasyonun birinci, dördüncü ve yedinci günlerinde incelenen örnek sonuçları karşılaştırıldı.

### **3.2.2. Kristal Viyole İle Boyama Yöntemi**

İncelemede uygulanan basamaklar:

1. Biyofilm oluşumu; inkübasyonun birinci (12 örnek), dördüncü (12 örnek) ve yedinci günlerinde (12 örnek), kristal viyole ile boyama yöntemiyle incelendi.
2. On iki adet pompa parçası fosfat tampon ile yıkandı.
3. Kurutulduktan sonra tüplere yerleştirildi. 400 µl %1'lik kristal viyole eklenerek 15 dakika boyandı.

4. Fosfat tampon ile yeniden yıkanıp kurutuldu.
5. 220 µl etanol-aseton (80:20 vol/vol) karışımında 10 dakika beklendi.
6. Tüplerdeki karışım (pompa parçaları üzerinde kalan kristal viyolenin eritildiği etanol-aseton karışımı), 96 kuyucuklu düz tabanlı ELISA plaklarına, her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde aktarıldı.
7. Negatif kontrol olarak, 200 µl etanol-aseton karışımı bir kuyucuğa aktarıldı.
8. Plaklar 620 nm’de okutularak optik yoğunlukları (OD) saptandı (92,93).
9. İnkübasyonun birinci, dördüncü ve yedinci günlerinde incelenen örneklerin sonuçları, SPSS 15.0 programı kullanılarak Friedman testi karşılaştırıldı. Gruplar ikili olarak Wilcoxon Signed Ranks testi ile karşılaştırıldı.

### **3.3. Biyofilm Yapısının Oluşumunun Önlenmesi ve Giderimi**

Biyofilm yapısının incelenmesi yöntemindeki gibi (Bkz. 3.2) hazırlanan *E.coli* ATCC 25922 ile inoküle edilen pompa parçalarına inkübasyonunun birinci ve dördüncü günü dezenfeksiyon uygulandı. Toplam 96 adet örnek taramalı elektron mikroskobu yöntemiyle, 96 adet örnek ise kristal viyole ile boyama yöntemiyle biyofilm yapısı incelendi.

Çalışma grupları:

Birinci grup: Bir günlük inkübasyon sonrası sadece 500 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)

İkinci grup: Bir günlük inkübasyon sonrası fiziksel ve 500 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)

Üçüncü grup: Bir günlük inkübasyon sonrası sadece 5000 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)

Dördüncü grup: Bir günlük inkübasyon sonrası fiziksel ve 5000 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)



Beşinci grup: Dört günlük inkübasyon sonrası sadece 500 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)

Altıncı grup: Dört günlük inkübasyon sonrası fiziksel ve 500 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)

Yedinci grup: Dört günlük inkübasyon sonrası sadece 5000 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)

Sekizinci grup: Dört günlük inkübasyon sonrası fiziksel ve 5000 ppm sodyum hipoklorit ile kimyasal dezenfeksiyon (12 adet)

### *Yöntem*

1. Her bir grup için 12 adet pompa parçası fosfat tamponu ile yıkanıp kurutuldu.
2. Sadece kimyasal dezenfeksiyon uygulanan gruplarda belirtilen konsantrasyonlarda sodyum hipoklorit içinde 20 dakika bekletildi.
3. Kimyasal ile birlikte fiziksel dezenfeksiyon uygulanan gruplarda ise önce pompa parçaları mekanik olarak fırçalandı. Fosfat tamponu ile yıkanıp kurutulduktan sonra belirtilen konsantrasyonlarda sodyum hipoklorit içinde 20 dakika bekletildi.
4. Fosfat tamponu ile yıkandı.
5. Kurutulduktan sonra taramalı elektron mikroskopuyla (Bkz. 3.2.1) ve kristal viyole ile boyama yöntemiyle (Bkz. 3.2.2) incelendi.
6. İnkübasyonun birinci ve dördüncü günlerinde dezenfeksiyon uygulanan örneklerin, TEM sonuçları bakteri yoğunluğuna göre 0-4 arası skorlandı. Boyama yöntemleriyle elde edilen sonuçlar SPSS 15.0 programı kullanılarak Wilcoxon Signed Ranks testi ile karşılaştırıldı.

### **3.4. Etik Kurul Onayı**

Etik kurul tarafından 25.02.2011 tarihinde 32-GOA protokol numaralı, 2011/05-32 karar numarası ile görüşülmüş ve onay alınmıştır (Bkz. EKLER).

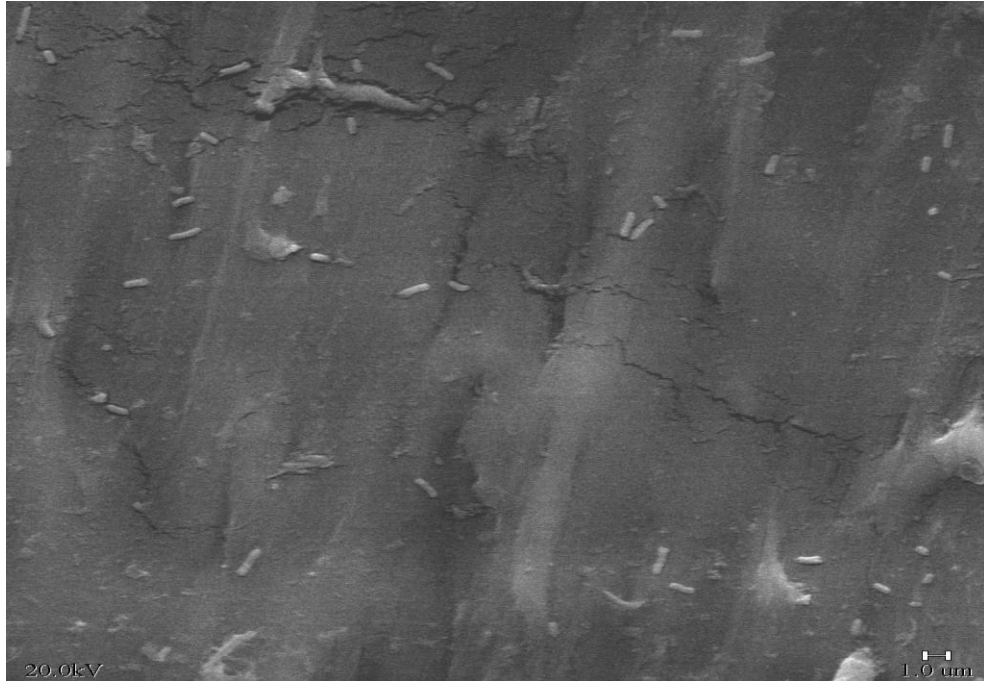
## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyofilm Yapısının İnceleme Sonuçları

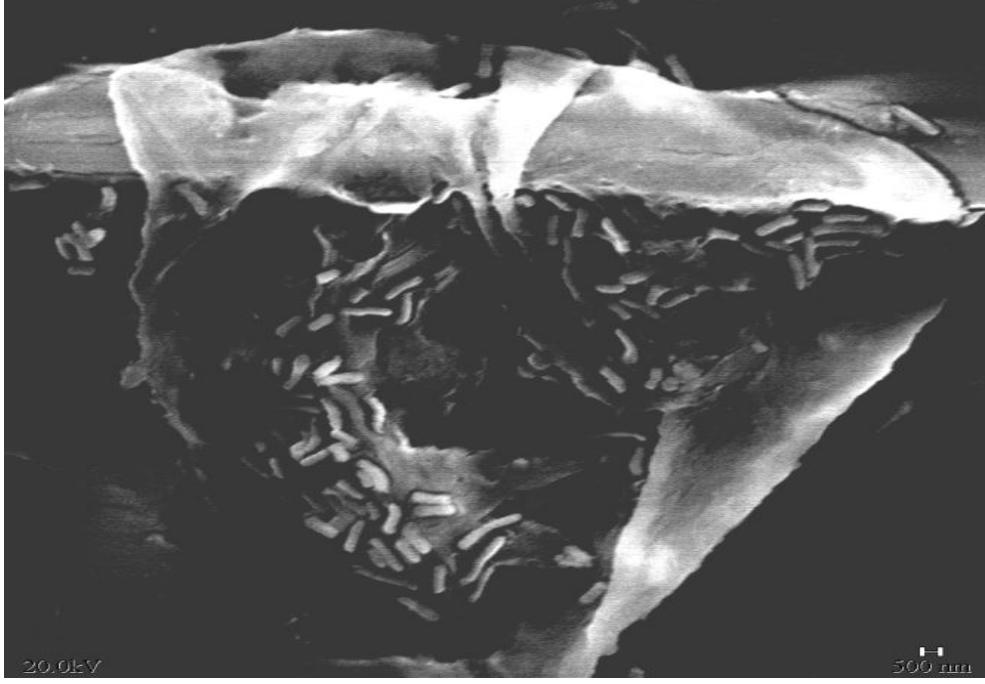
#### 4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu Yönteminin Sonuçları

Taramalı elektron mikroskobu ile birinci, dördüncü ve yedinci günlerde 12'şer adet pompa parçası incelendi. Oluşan biyofilm yapıları görüntülendi.

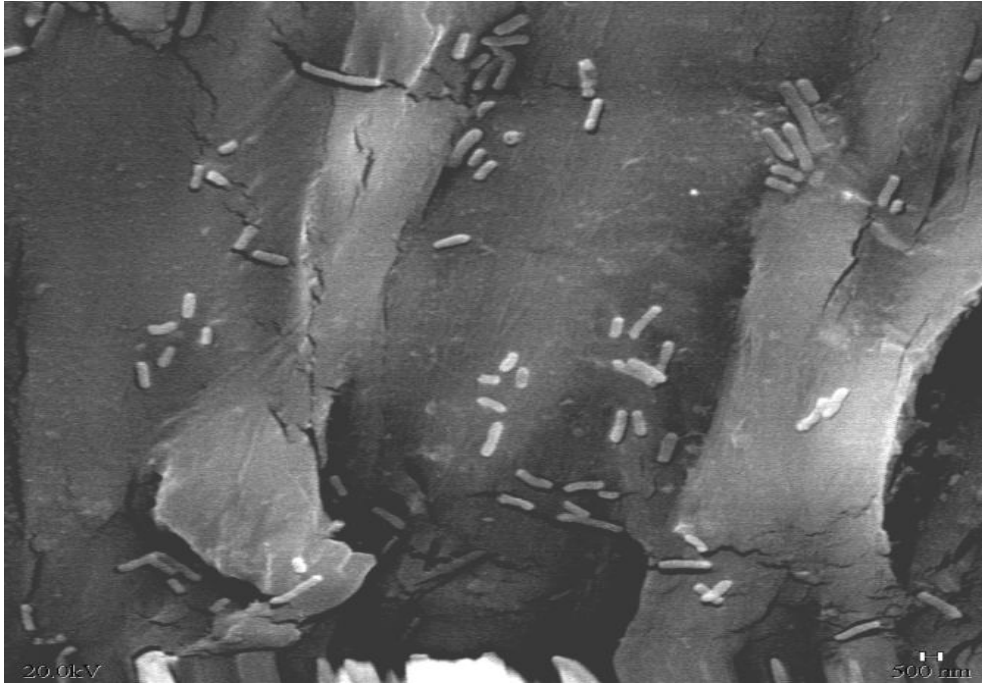
*Birinci, dördüncü ve yedinci gün elde edilen görüntüler*



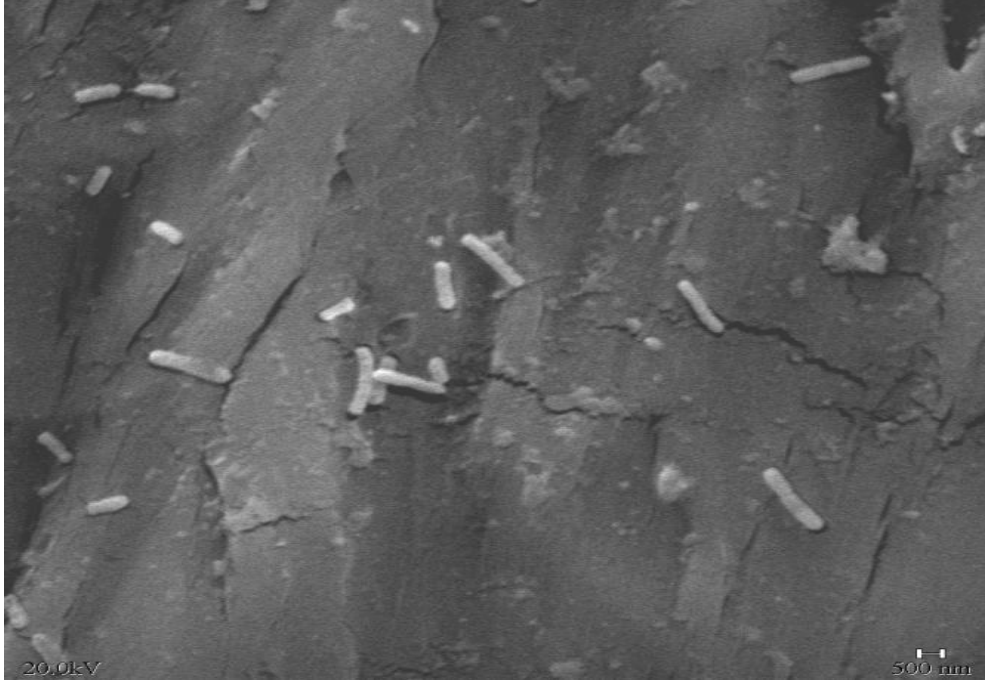
**Şekil 4:** Birinci gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



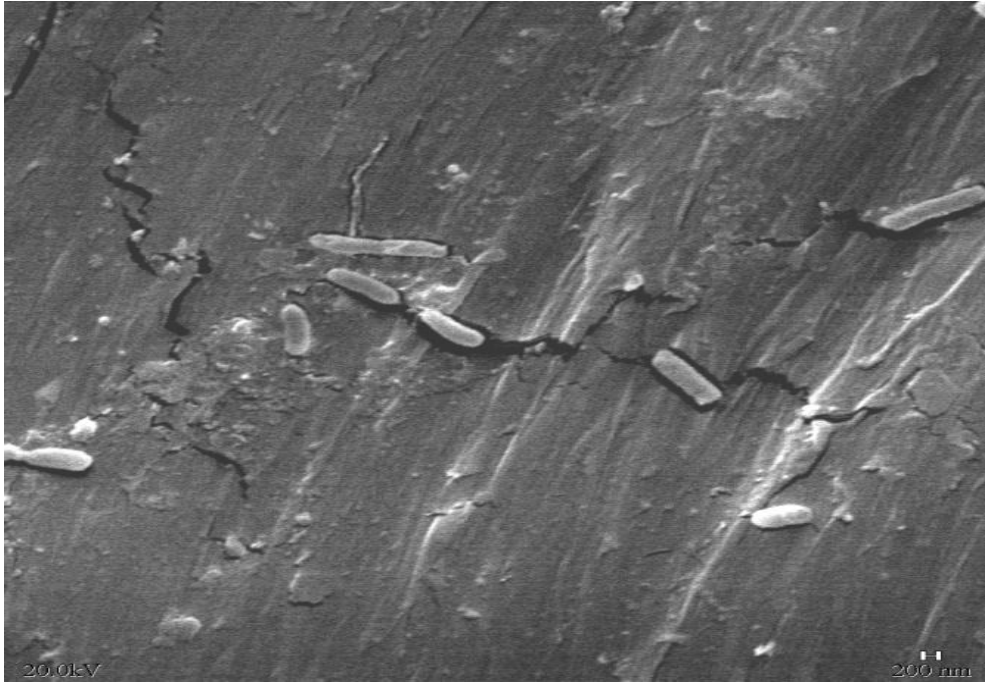
**Şekil 5:** Birinci gün 3000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 6:** Birinci gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



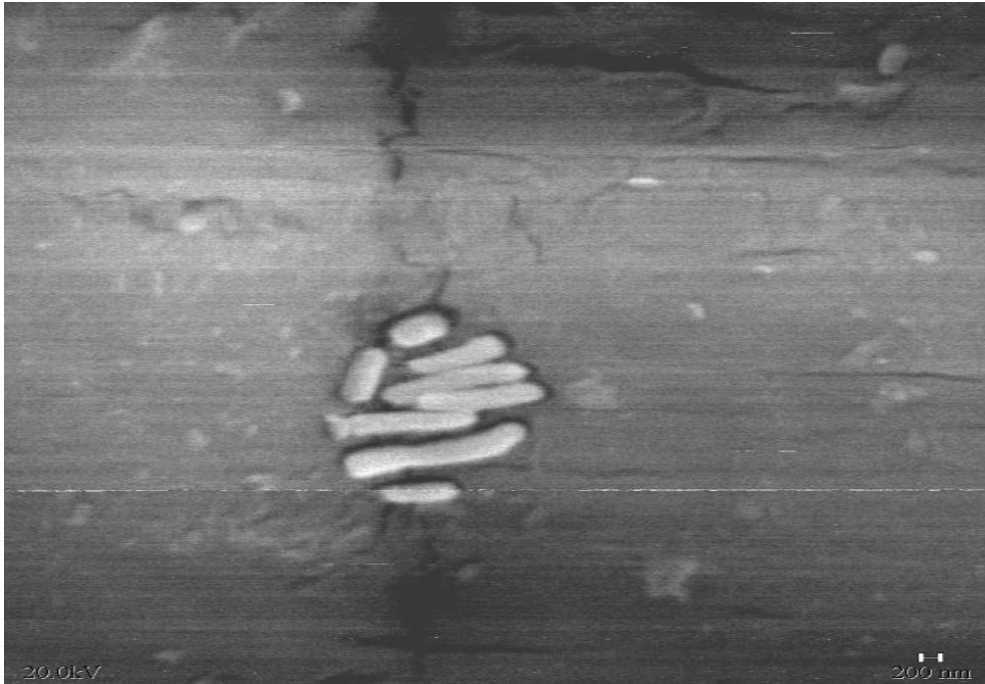
**Şekil 7:** Birinci gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



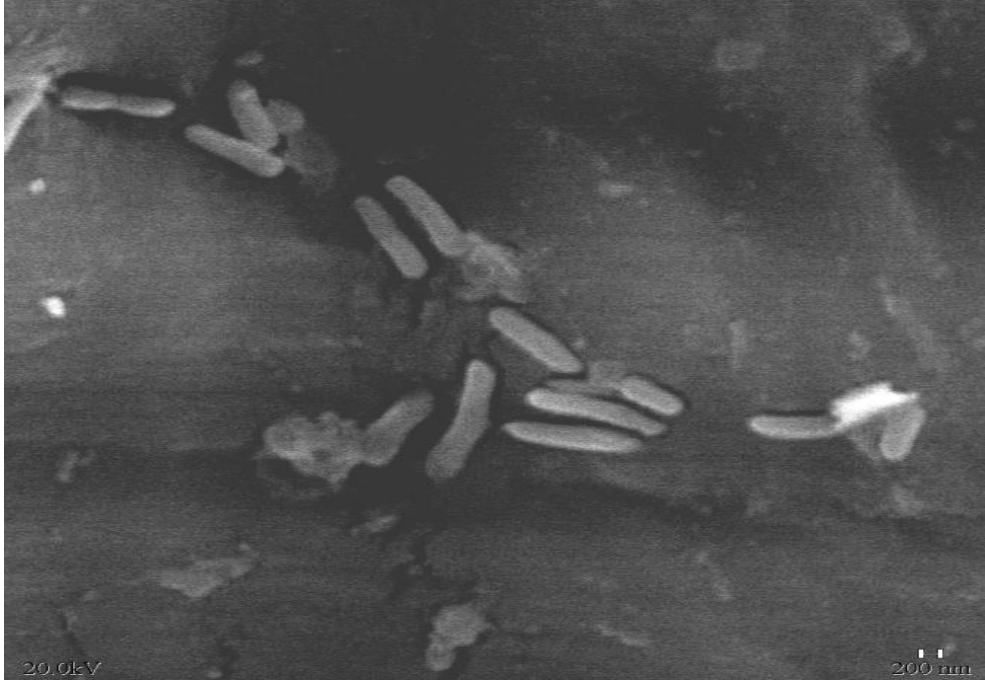
**Şekil 8:** Birinci gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



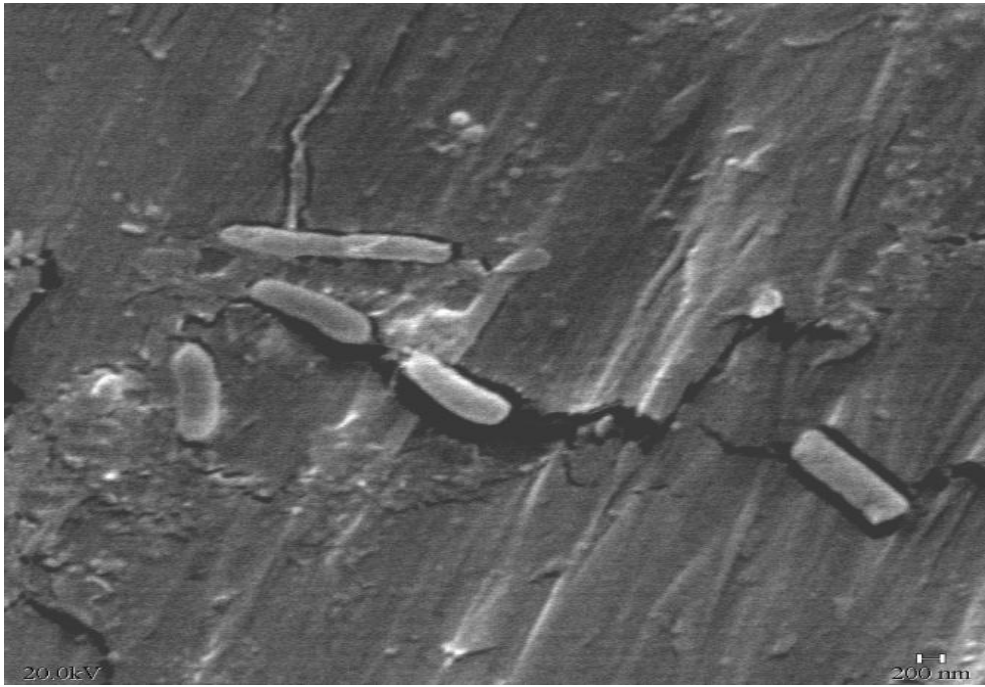
**Şekil 9:** Birinci gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



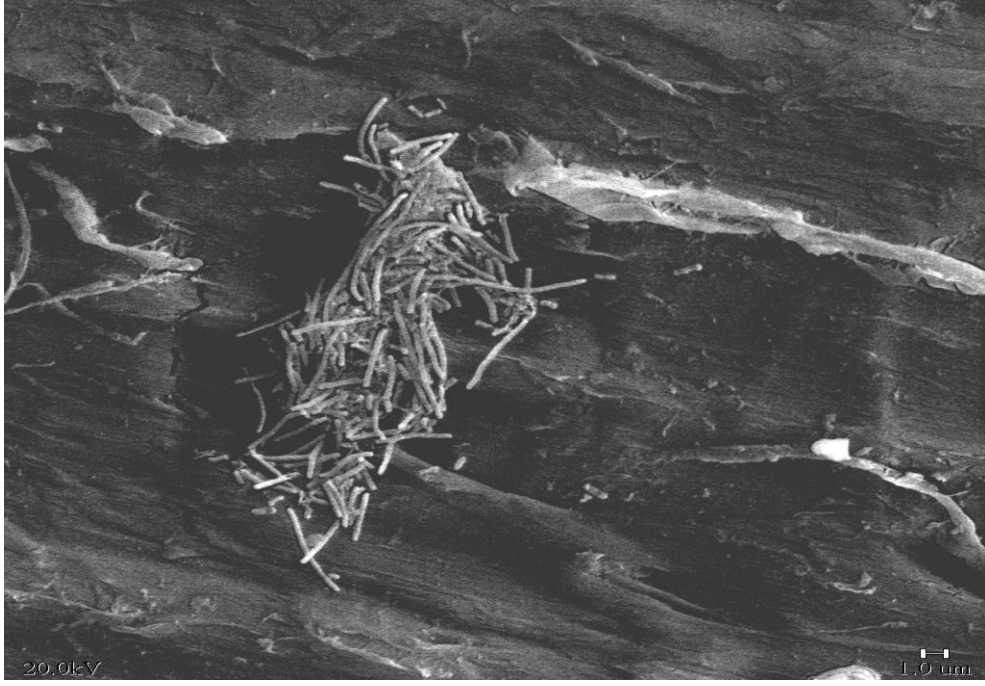
**Şekil 10:** Birinci gün 7800 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



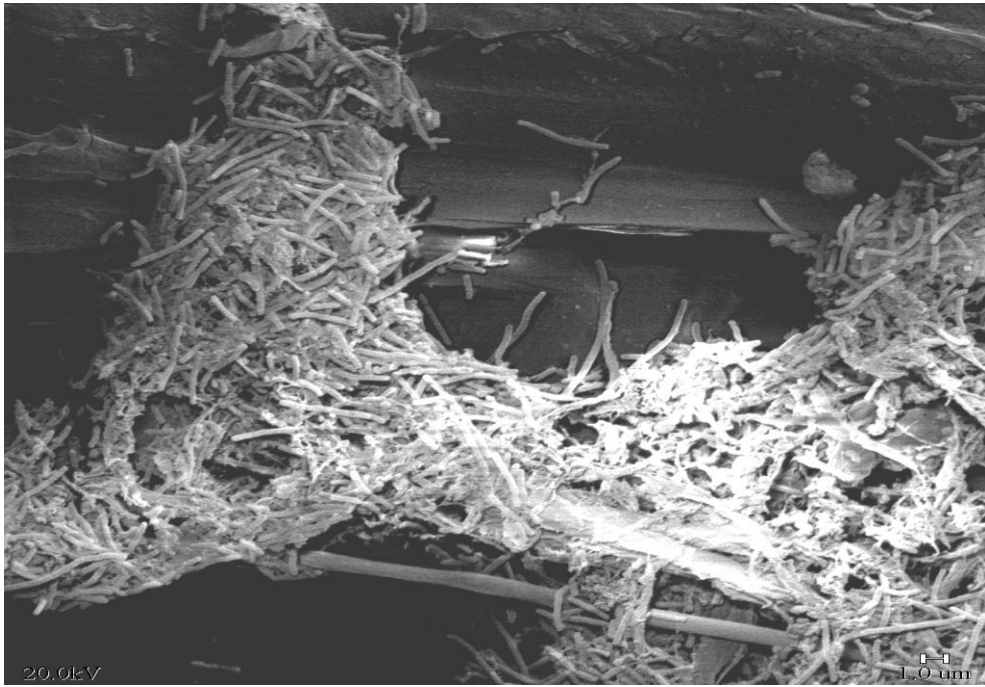
**Şekil 11:** Birinci gün 7800 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



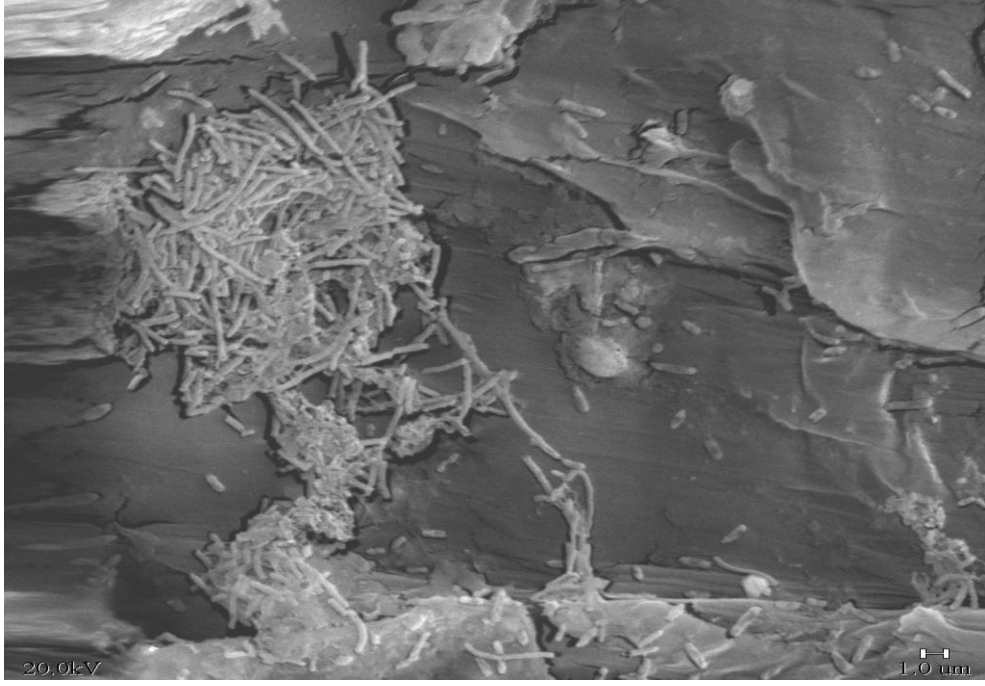
**Şekil 12:** Birinci gün 10000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



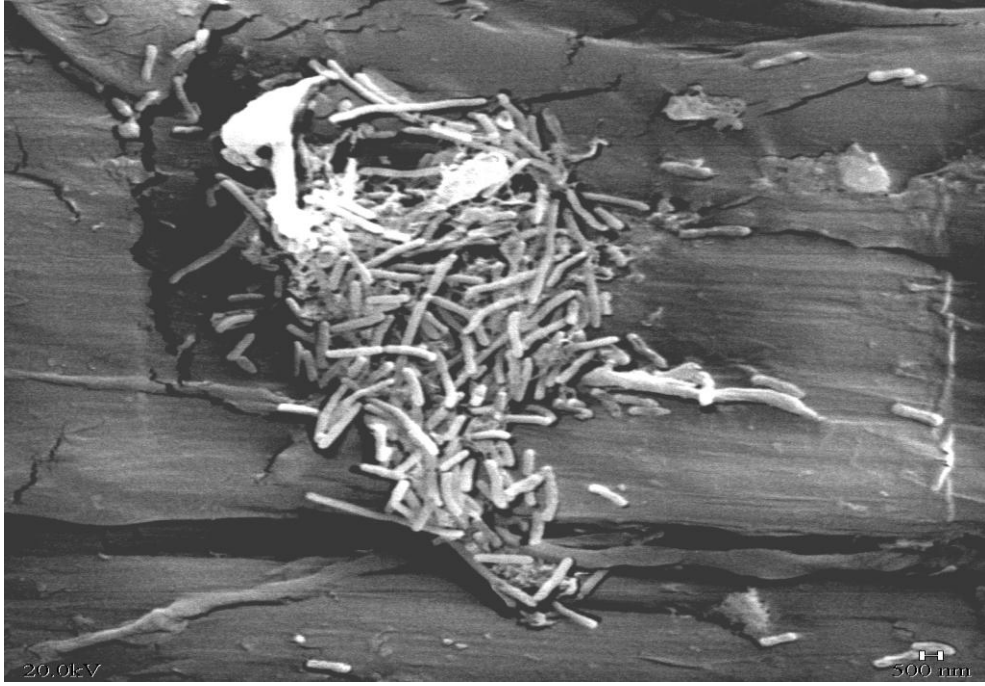
**Şekil 13:** Dördüncü gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 14:** Dördüncü gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

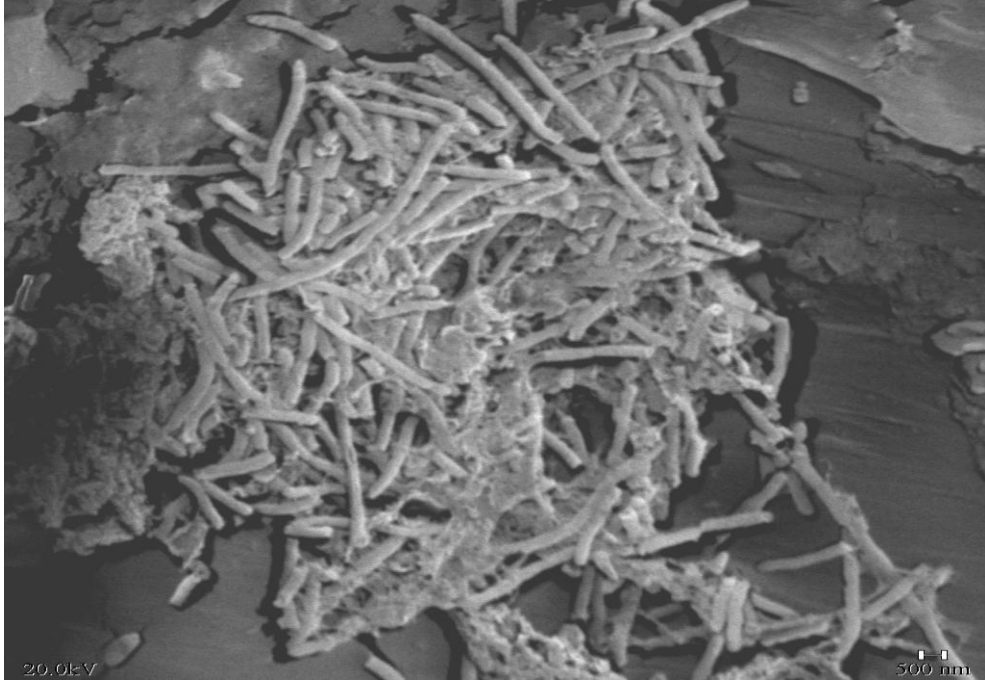


**Şekil 15:** Dördüncü gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

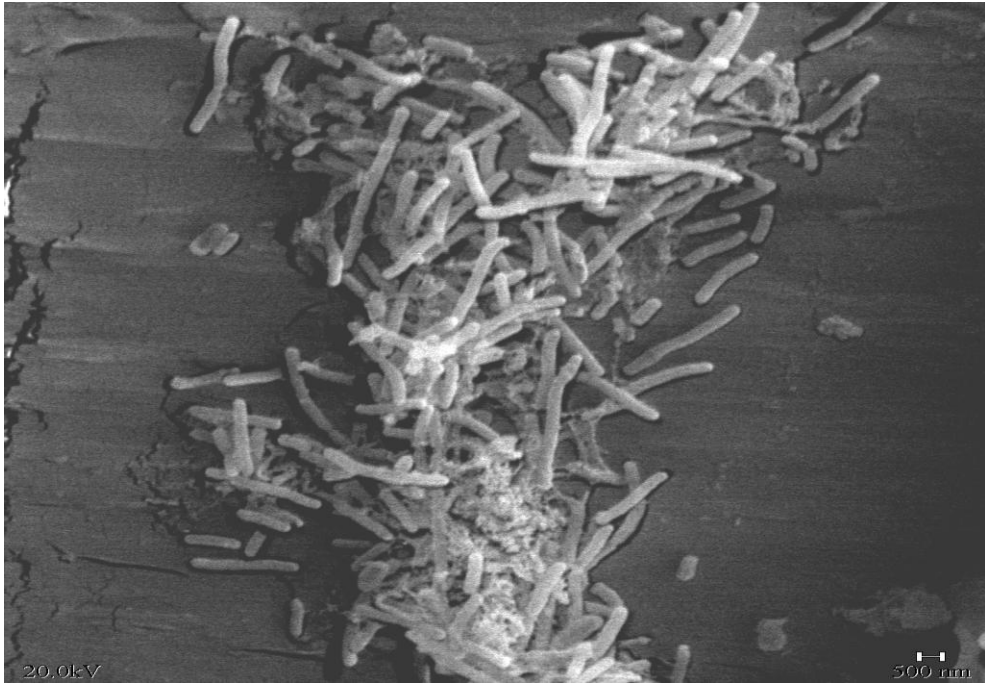


**Şekil 16:** Dördüncü gün 3000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

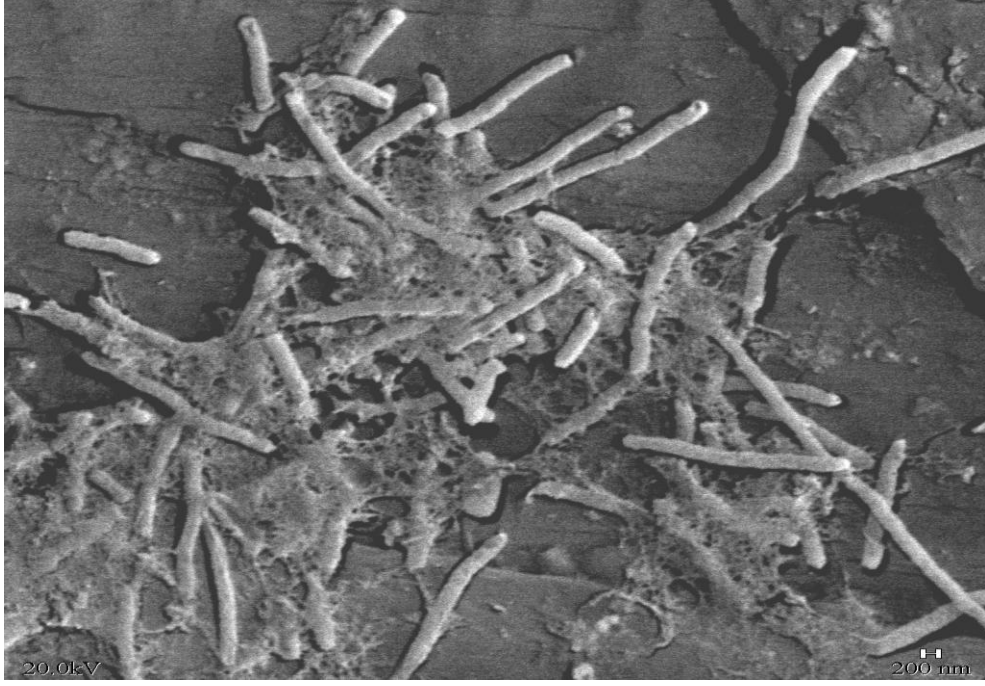




**Şekil 17:** Dördüncü gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



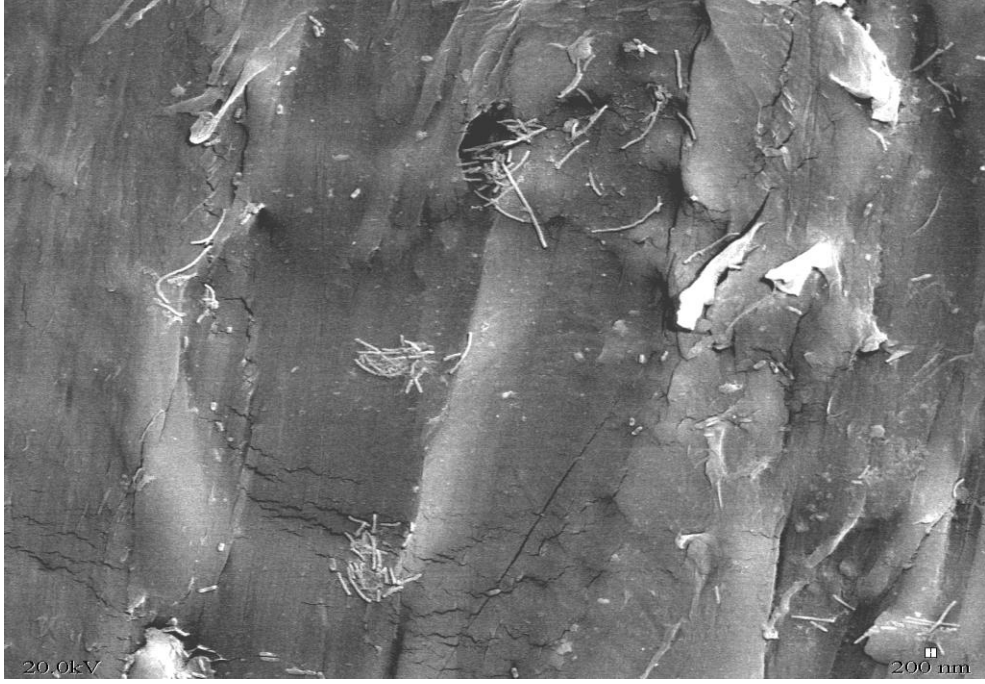
**Şekil 18:** Dördüncü gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



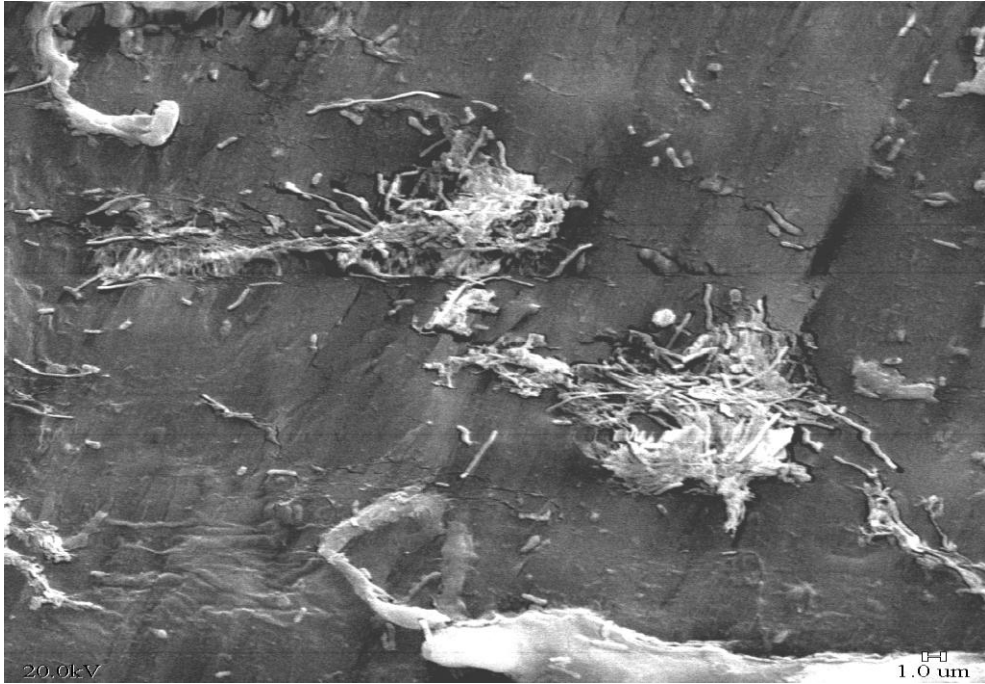
**Şekil 19:** Dördüncü gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



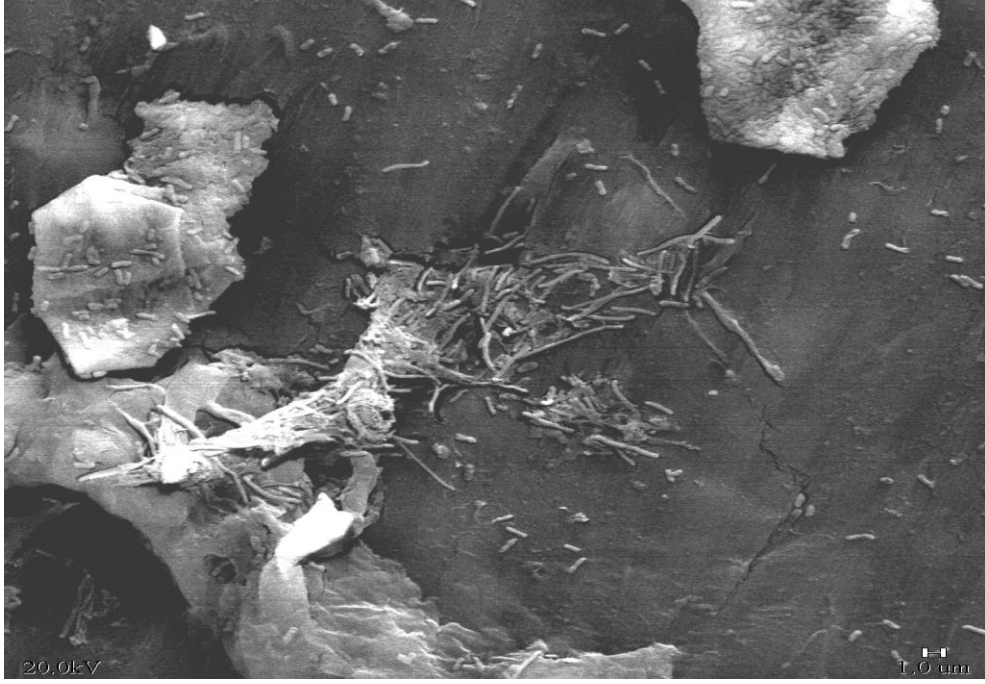
**Şekil 20:** Dördüncü gün 6000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 21:** Yedinci gün 1000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



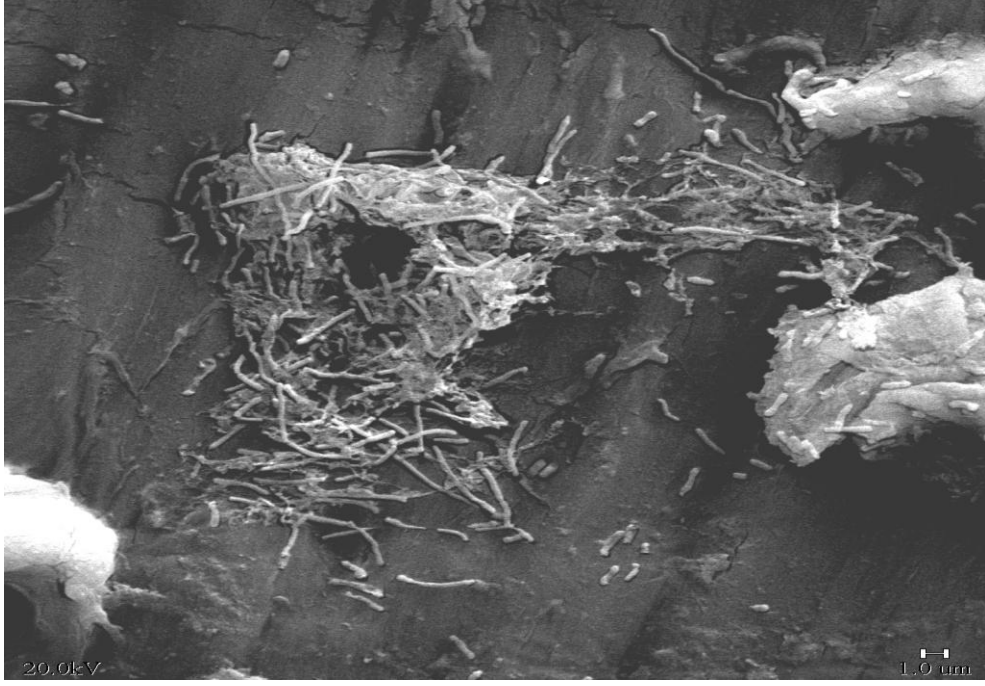
**Şekil 22:** Yedinci gün 1500 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 23:** Yedinci gün 1500 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



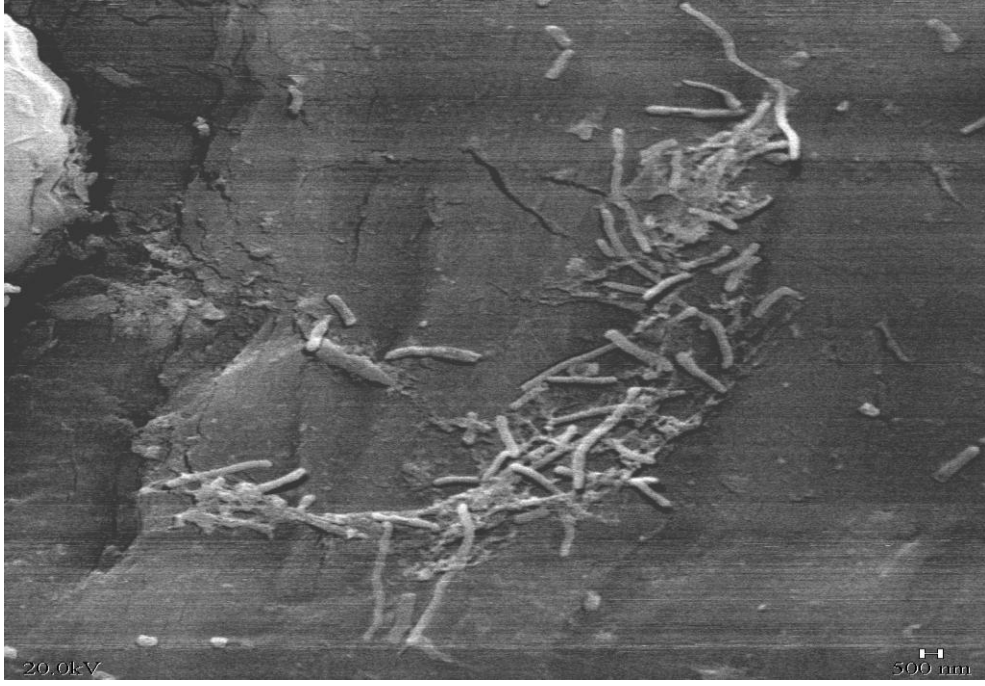
**Şekil 24:** Yedinci gün 1500 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 25:** Yedinci gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 26:** Yedinci gün 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 27:** Yedinci gün 3000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



**Şekil 28:** Yedinci gün 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

Örneklerden elde edilen görüntüler kıyaslandığında, hücre yoğunlukları Tablo 1’de skorlandı.

**Tablo 1:** TEM sonuçlarına göre hücre yoğunlukları

Örnek Sayısı	Hücre Yoğunluğu		
	1. Gün	4. Gün	7. Gün
1. örnek	1+	3+	2+
2. örnek	1+	3+	2+
3. örnek	1+	3+	2+
4. örnek	1+	3+	2+
5. örnek	1+	3+	2+
6. örnek	1+	3+	2+
7. örnek	1+	3+	2+
8. örnek	1+	3+	2+
10. örnek	1+	3+	2+
11. örnek	1+	3+	2+
12. örnek	1+	3+	2+

#### 4.1.2. Kristal Viyole ile Boyama Yönteminin Sonuçları

Kristal viyole ile boyama yöntemi ile birinci, dördüncü ve yedinci günlerde 12'şer adet pompa parçası incelendi. Negatif kontrol olarak sadece etanol-aseton (80:20) kullanıldı. Spektrofotometre ile 620 nm'de optik yoğunlukları ölçüldü.

<i>Birinci günün sonuçları</i>	Negatif kontrol	0,036
	1. örnek	0,094
	2. örnek	0,062
	3. örnek	0,065
	4. örnek	0,054
	5. örnek	0,075
	6. örnek	0,056
	7. örnek	0,071
	8. örnek	0,059
	9. örnek	0,072
	10. örnek	0,044
	11. örnek	0,058
	12. örnek	0,053
<i>Dördüncü günün sonuçları</i>	Negatif kontrol	0,037
	1. örnek	0,271
	2. örnek	0,258
	3. örnek	0,268
	4. örnek	0,271
	5. örnek	0,226
	6. örnek	0,210
	7. örnek	0,332
	8. örnek	0,229
	9. örnek	0,220
	10. örnek	0,179
	11. örnek	0,212
	12. örnek	0,259



<i>Yedinci günün sonuçları</i>	Negatif kontrol	0,038
	1. örnek	0,178
	2. örnek	0,234
	3. örnek	0,199
	4. örnek	0,168
	5. örnek	0,143
	6. örnek	0,187
	7. örnek	0,198
	8. örnek	0,170
	9. örnek	0,181
	10. örnek	0,192
	11. örnek	0,225
	12. örnek	0,185

**Tablo 2:** İnkübasyonun birinci, dördüncü ve yedinci günlerinde kristal viyole ile boyama yöntemiyle elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılması

<b>İstatiksel Analiz (Wilcoxon Signed Ranks)</b>			
<b>Karşılaştırmalar</b>	<b>1.Gün – 4. Gün</b>	<b>4. Gün – 7. Gün</b>	<b>1. Gün – 7. Gün</b>
p değerleri	0,002	0,005	0,002

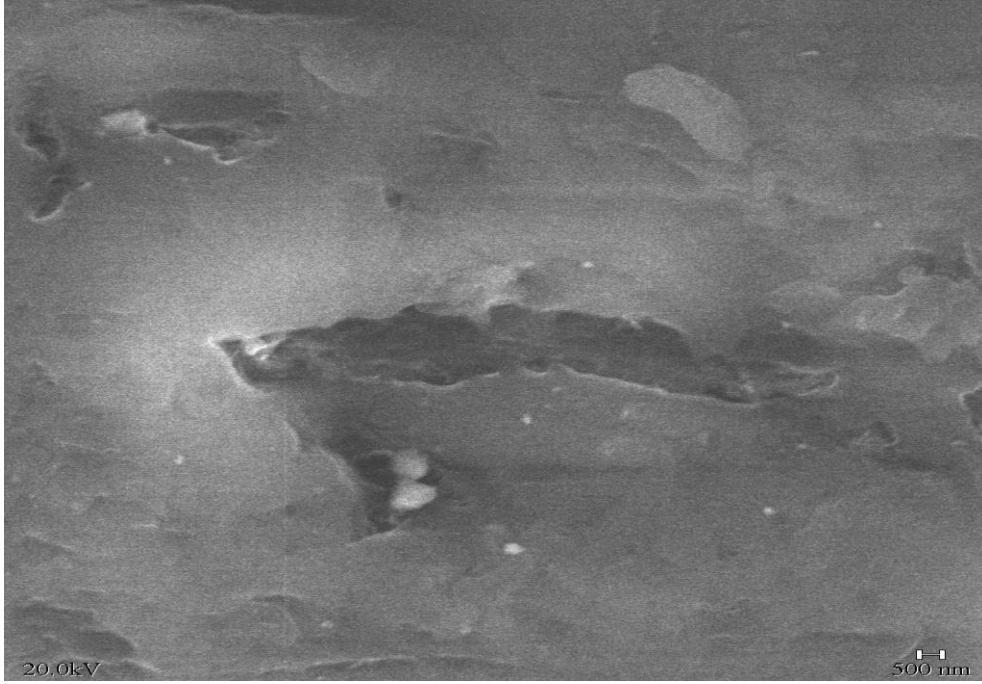
## 4.2. Biyofilm Yapısının Oluşumunun Önlenmesi ve Gideriminin Sonuçları

### 4.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu Yönteminin Sonuçları

*Birinci günün sonuçları*

*Birinci grup: 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

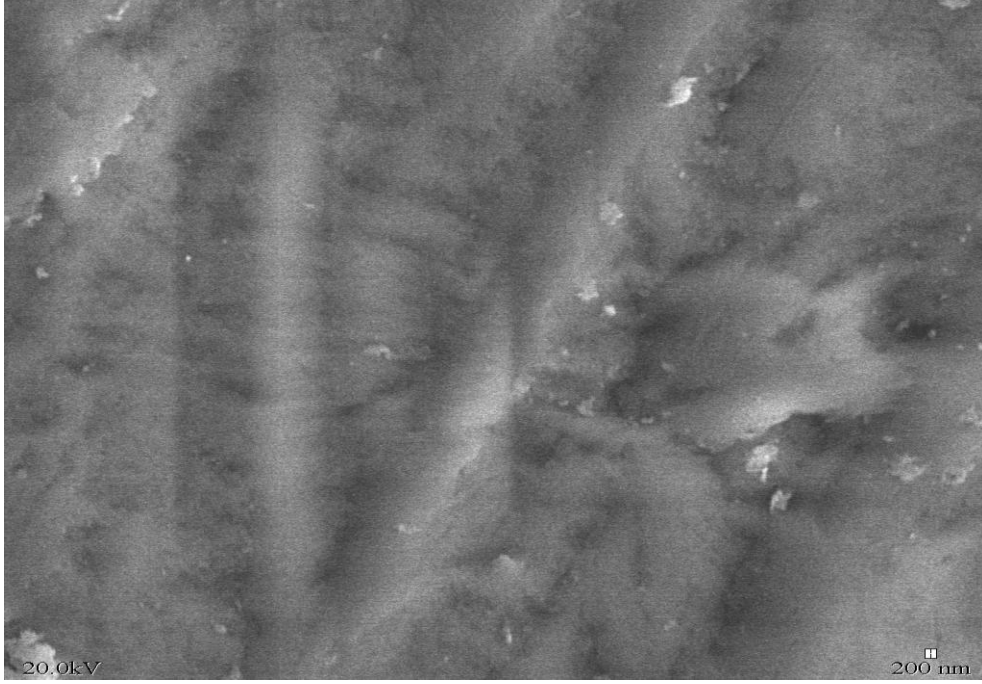
On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.



**Şekil 29:** Birinci gün 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

*İkinci grup: Fırçaladıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

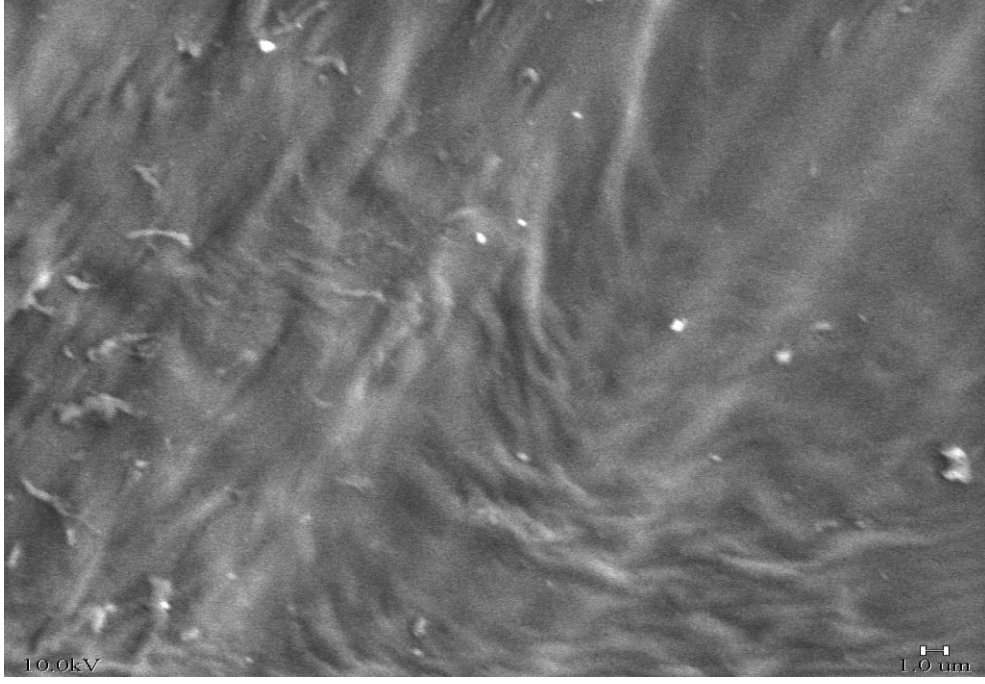
On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.



**Şekil 30:** Birinci gün fırçalandıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 1000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

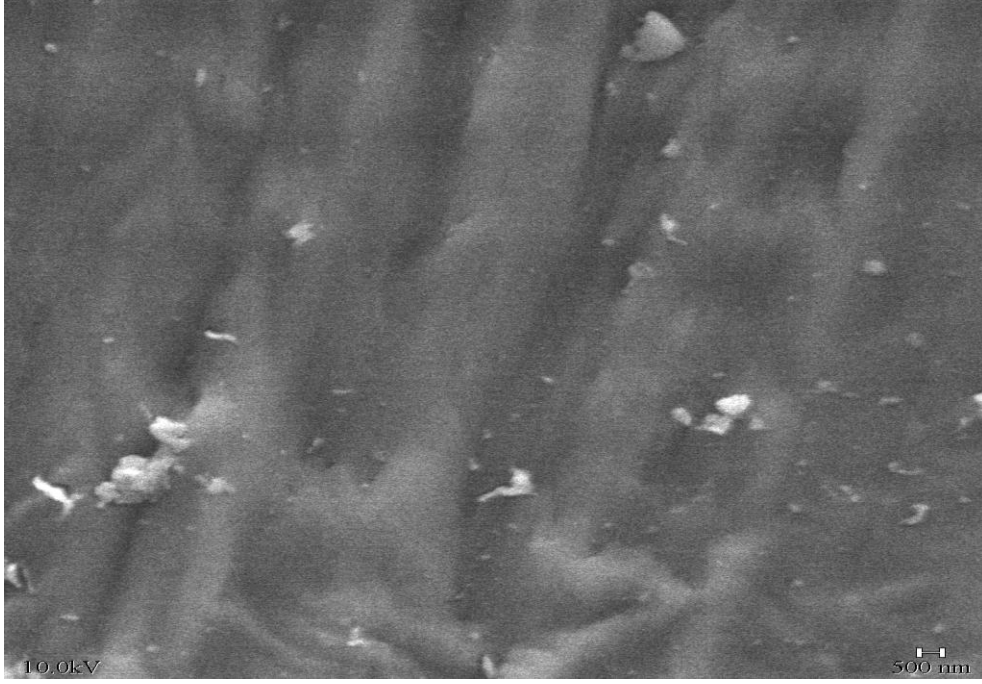
*Üçüncü grup: 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.



**Şekil 31:** Birinci gün 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

*Dördüncü grup: Fırçaladıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*  
On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.

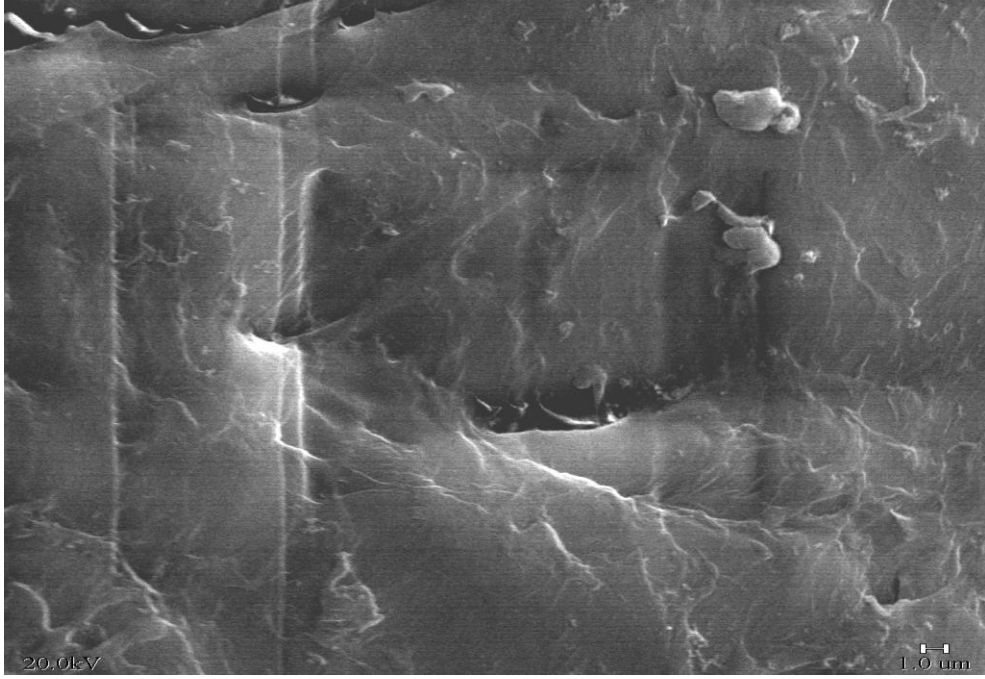


**Şekil 32:** Birinci gün fırçalandıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

*Dördüncü günün sonuçları*

*Beşinci grup: 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

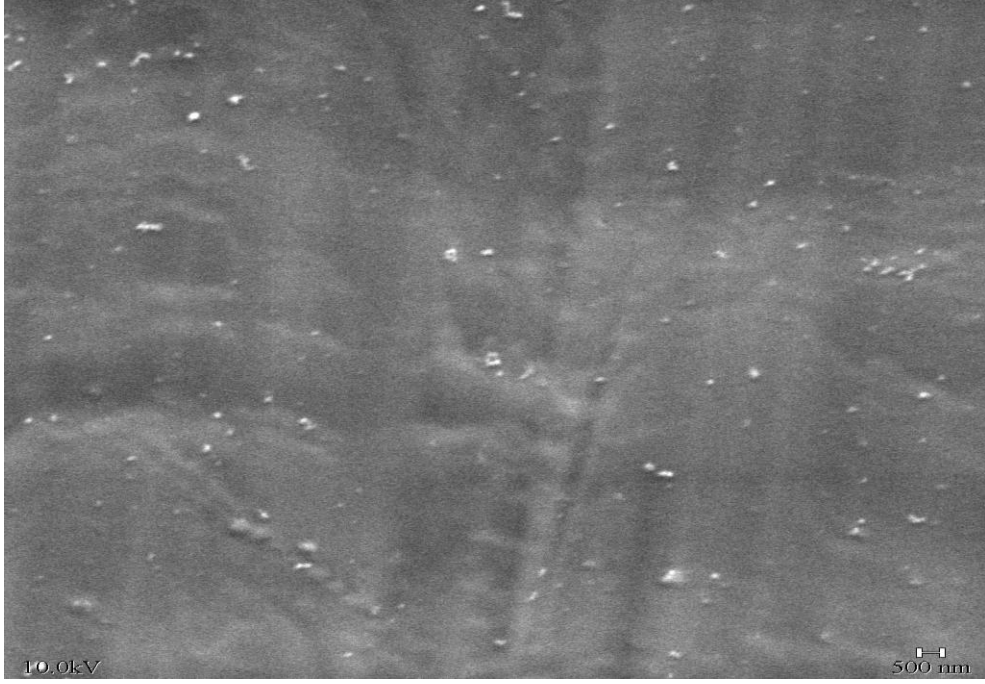
On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.



**Şekil 33:** Dördüncü gün 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

*Altıncı grup: Fırçaladıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

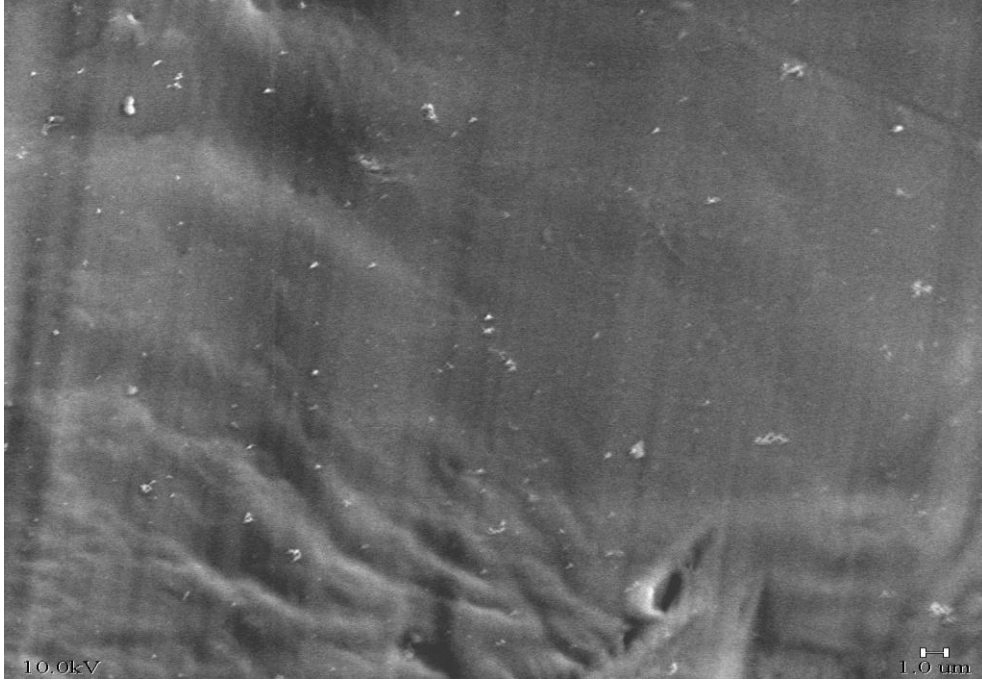
On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.



**Şekil 34:** Dördüncü gün fırçalandıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 4000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

*Yedinci grup: 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.



**Şekil 35:** Dördüncü gün 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü



*Sekizinci grup: Fırçaladıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*  
On iki adet pompa parçası incelendi ve hiçbirinde hiçbir büyütmede bakteri görülmedi.



**Şekil 36:** Dördüncü gün fırçalandıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonucu 2000 büyütmede elde edilen TEM görüntüsü

İncelenen örneklerden elde edilen görüntülere göre her bir gruba uygulanan dezenfeksiyon işleminden sonra bakteri bulunmadı (Tablo 3).

**Tablo 3:** TEM sonuçlarına göre, dezenfeksiyon uygulamadan önce ve sonra hücre yoğunluklarının skorlanması

<b>Hücre Yoğunluğu</b>		
<b>Uygulama</b>	<b>1. Gün</b>	<b>4. Gün</b>
Dezenfeksiyon uygulanmamış (n: 12)	1+	3+
500 ppm Sodyum hipoklorit (n:12)	0	0
500 ppm Sodyum hipoklorit + Fırçalama (n:12)	0	0
5000 ppm Sodyum hipoklorit (n:12)	0	0
5000 ppm Sodyum hipoklorit + Fırçalama (n:12)	0	0

#### 4.2.2. Kristal Viyole ile Boyama Yönteminin Sonuçları

*Birinci günün sonuçları*

*Birinci grup: 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,036
1. örnek	0,065
2. örnek	0,073
3. örnek	0,066
4. örnek	0,054
5. örnek	0,069
6. örnek	0,062
7. örnek	0,065
8. örnek	0,068
9. örnek	0,061
10. örnek	0,058
11. örnek	0,051
12. örnek	0,070

*İkinci grup: Fırçaladıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,037
1. örnek	0,065
2. örnek	0,074
3. örnek	0,069
4. örnek	0,084
5. örnek	0,069
6. örnek	0,072
7. örnek	0,075
8. örnek	0,066
9. örnek	0,081
10. örnek	0,081
11. örnek	0,076
12. örnek	0,064

*Üçüncü grup: 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,037
1. örnek	0,068
2. örnek	0,057
3. örnek	0,083
4. örnek	0,062
5. örnek	0,054
6. örnek	0,047
7. örnek	0,051
8. örnek	0,075
9. örnek	0,066
10. örnek	0,067
11. örnek	0,061
12. örnek	0,062

*Dördüncü grup: Fırçaladıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,036
1. örnek	0,098
2. örnek	0,088
3. örnek	0,075
4. örnek	0,084
5. örnek	0,091
6. örnek	0,090
7. örnek	0,086
8. örnek	0,082
9. örnek	0,076
10. örnek	0,086
11. örnek	0,094
12. örnek	0,103

*Dördüncü günün sonuçları*

*Beşinci grup: 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,036
1. örnek	0,092
2. örnek	0,069
3. örnek	0,064
4. örnek	0,076
5. örnek	0,083
6. örnek	0,095
7. örnek	0,072
8. örnek	0,078
9. örnek	0,060
10. örnek	0,086
11. örnek	0,061
12. örnek	0,060

*Altıncı grup: Fırçaladıktan sonra 500 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,037
1. örnek	0,079
2. örnek	0,077
3. örnek	0,083
4. örnek	0,075
5. örnek	0,102
6. örnek	0,078
7. örnek	0,100
8. örnek	0,087
9. örnek	0,094
10. örnek	0,084
11. örnek	0,095
12. örnek	0,079

*Yedinci grup: 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,036
1. örnek	0,070
2. örnek	0,060
3. örnek	0,075
4. örnek	0,054
5. örnek	0,065
6. örnek	0,061
7. örnek	0,060
8. örnek	0,053
9. örnek	0,062
10. örnek	0,072
11. örnek	0,071
12. örnek	0,090

*Sekizinci grup: Fırçaladıktan sonra 5000 ppm sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyon sonuçları*

Negatif kontrol	0,038
1. örnek	0,085
2. örnek	0,094
3. örnek	0,079
4. örnek	0,080
5. örnek	0,109
6. örnek	0,084
7. örnek	0,089
8. örnek	0,104
9. örnek	0,090
10. örnek	0,108
11. örnek	0,091
12. örnek	0,090

**Tablo 4:** Dezenfeksiyon uygulanmamış ve uygulanmış örneklerin kristal viyole ile boyama yöntemiyle elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılmaları

Uygulama	1. Gün	4. Gün
Dezenfeksiyon uygulanmamış (n: 12)	0,061	0,244
500 ppm Sodyum hipoklorit (n:12)	0,065 (p*=0,755)	0,074 (p=0,002)
Fırçalama + 500 ppm Sodyum hipoklorit (n:12)	0,073 (p=0,041)	0,084 (p=0,002)
5000 ppm Sodyum hipoklorit (n:12)	0,062 (p=0,844)	0,064 (p=0,002)
Fırçalama + 5000 ppm Sodyum hipoklorit (n:12)	0,087 (p=0,002)	0,090 (p=0,002)

\*p değerleri dezenfeksiyon uygulanmamış örneklerin OD değerleriyle, dezenfeksiyon uygulanan örneklerin OD değerlerinin farkını göstermektedir. p değerleri Wilcoxon Signed Ranks testi ile elde edildi.

**Tablo 5:** Farklı dezenfeksiyon yöntemi uygulanan grupların kristal viyole ile boyama yöntemiyle elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılmaları

Karşılaştırma	1. Gün	4. Gün
500 ppm Sodyum hipoklorit ile 5000 ppm Sodyum hipoklorit	p*=0,783	p=0,117
500 ppm Sodyum hipoklorit ile Fırçalama + 500 ppm Sodyum hipoklorit	p=0,028	p=0,049
5000 ppm Sodyum hipoklorit ile Fırçalama + 5000 ppm Sodyum hipoklorit	p=0,004	p=0,003
Fırçalama + 500 ppm Sodyum hipoklorit ile Fırçalama + 5000 ppm Sodyum hipoklorit	p=0,005	p=0,054

\*p değerleri Wilcoxon Signed Ranks testi ile elde edildi.

#### 4. TARTIŞMA

Çoğu bakteri, biyofilm yapısı oluşturabilmekte ve biyofilm içerisinde eş güdümlü olarak çalışmaktadır. Örneğin, besin alınımını kolaylaştırırlar, çevresel streslere karşı (antibiyotik, termal stres, predasyon gibi toksik bileşiklerden korunma) direnç gösterirler. Bu nedenle, biyofilm yapısı mikroorganizmalar için hayatta kalma mekanizması olabilmektedir (7, 11).

İçme suları *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.* ve *Pseudomonas spp.* gibi organizmaların oluşturduğu biyofilmleri içerir ve insan sağlığını tehdit eden potansiyel risk oluşturur. Bir biyofilm kümesi içerisindeki hücrelerin sayısı  $1.0 \times 10^9$  kadar yüksek olabilir ve patojen enfeksiyon dozunu oluşturabilir.

Biyofilm yapısının incelenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. LTKM ile olgun biyofilm yapısı, faz kontrast ışık mikroskobu ve epifloresan mikroskobu ile biyofilm gelişiminin erken evreleri (hücrelerin tutunması, mikrokoloni oluşturmak için göçü) görüntülenebilmektedir. Taramalı ve geçirimli elektron mikroskopları ile ise her evredeki biyofilm yapısı incelenmektedir. Ayrıca mikroskobik olmayan; kristal viyole, floresein diasetat, resazurin, tetrazolyum tuzları, dimetil metilen mavisi ile boyama biyofilm yapısının incelenmesinde kullanılmaktadır (7).

Çalışmamızda, biyofilm yapısı oluşturabildiği ve toplumda sıkça karşılaşıldığı için model organizma olarak *E.coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Plastik yapıdaki içme suyu damacana pompalarında birinci, dördüncü ve yedinci günlerde oluşturulan biyofilm yapısı incelendi. Uygulamada, biyofilm aşamasının her evresinin gözlemlenmesi için uygun olan taramalı elektron mikroskobu ve kristal viyole ile boyama yöntemleri kullanıldı. Her iki yöntemle de benzer sonuçlar elde edildi.

Birinci, dördüncü ve yedinci günlerde 12 adet örnek hem boyama hem de TEM yöntemiyle incelendi. Her günün sonuçları değerlendirilip diğer günlerle karşılaştırıldı. Taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendiğinde hücre yoğunlukları skorlandı. Birinci gün hücre yoğunluğu 1+, dördüncü gün 3+, yedinci gün 2+ olarak skorlandı (Bkz. Tablo 1). Kristal viyole ile boyama yöntemi uygulandığında 620 nm'de OD değerleri ölçüldü. Elde edilen üç günün sonuçları Friedman testi ile karşılaştırıldı (Bkz. Tablo 2). Hem birinci gün ile

dördüncü gün, hem birinci gün ile yedinci gün, hem de dördüncü gün ile yedinci gün arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar saptandı.

Sonuçlara göre, birinci gün TEM ile incelendiğinde bakterilerin pompa yüzeylerine tutunmaya ve mikrokoloniler oluşturmaya başladığı saptandı (Bkz. Şekil:4-12). Kristal viyole yönteminden elde edilen OD değerleri de TEM ile elde edilen sonuçlarla paralellik gösterdi. Dördüncü gün, TEM ile *E.coli*'nin yoğun biyofilm yapısı oluşturduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil:13-20). Kristal viyole ile boyama yöntemi uygulandığında OD sonuçlarının ortalaması birinci gün 0,063 iken dördüncü gün 0,242'ye yükseldi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarında anlamlı fark gözlemlendi ( $p=0,002$ ). Bu da pompa yüzeyinde daha fazla miktarda bakterinin olduğunun göstergesidir. Yedinci gün, çalışmada yer alan her iki yöntemle de biyofilm yoğunluklarının azaldığı tespit edildi. TEM ile elde edilen görüntülerde dördüncü günde gözlenen kadar yoğun biyofilm yapılarına rastlanmadı (Bkz. Şekil:21-28). Ayrıca var olan biyofilm yapılarının bakteri yoğunluklarında da azalma saptandı. Kristal viyole ile boyama yöntemiyle de değerlendirildiğinde dördüncü gün OD değerlerinin ortalaması 0,242 iken yedinci gün 0,188'e kadar düştüğü saptandı ( $p=0,005$ ). Biyofilm yoğunluğundaki azalmanın besin yetersizliği, metabolik artıkların birikimi ve yapıda yeterli oksijen iletiminin sağlanamaması gibi nedenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız, 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarında (2 cm<sup>2</sup> alanlı) Mc Farland No:1 bulanıklığında hazırlanan 2 ml *E.coli* süspansiyonu içinde gerçekleştirildi. Yedinci gün gözlenen biyofilm yapısındaki azalma, olasılıkla uygulanan hacmin küçük olmasından kaynaklanmaktadır. Besin maddelerinin tüketimi ve metabolik artıkların birikiminin küçük hacimlerde daha kısa sürede gerçekleşeceği düşünülmektedir. Daha büyük hacimlerde yapılacak çalışmalarda olgun biyofilm yapısının oluştuktan sonra, azalmanın daha geç başlayacağını öngörülmektedir.

Bakterilerin yüzeylere tutunması birkaç dakikada gerçekleşmektedir. Yüzeye tutunmayı engellemek için çeşitli uygulamalar vardır. Yüzey materyalinin antimikrobiyal ajanlardan oluşması, metal iyonları içermesi, yüzey hidrofobisitesi veya heparinle kaplanması gibi yüzeyde tutunmayı önleyici uygulamalar, özellikle *in-vivo* kullanılan tıbbi malzemelerde tercih edilen yöntemlerdendir. *In-vivo* olarak kullanılmayan malzemelerde ise sık sık yüzey temizliğinin yapılması önerilmektedir. Temizlik esnasında biyofilm yapısının giderilmesi için



mekanik temizlik, daha çok bakterinin giderilmesi için mekanik temizlikle birlikte kimyasal ajanlar da uygulanmaktadır (4).

Bu çalışmada, biyofilm yapısının oluşmasının engellenmesi ve oluşan biyofilm yapısının giderimi için fiziksel ve kimyasal etkili dezenfeksiyon uygulandı. Dezenfeksiyon uygulanmayan örneklerde, birinci gün az sayıda da olsa bakteri saptandı. Dördüncü gün ise biyofilm yoğunluğu en yüksek seviyeye ulaştı. Bu nedenle birinci ve dördüncü günlerde dezenfeksiyon işleminin denenmesi uygun görüldü. Yedinci gün dezenfeksiyon işlemi uygulanmadı, çünkü yedinci gün mikroorganizma yoğunluğunda dezenfeksiyon uygulanmadan bile istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p=0,005$ ). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında, biyofilm yapılarının en yoğun bulunduğu dördüncü günde dezenfeksiyon işleminin uygulanması önerilmektedir.

Dezenfeksiyon işleminde, kimyasal dezenfeksiyonun ve kimyasalın yanında fiziksel dezenfeksiyonun etkileri araştırıldı. Birinci ve dördüncü günlerde örneklerin inkübasyonu sonucu, bir gruba sadece kimyasal, diğer gruba hem fiziksel hem kimyasal dezenfeksiyon işlemi uygulandı. Kimyasal dezenfeksiyonda orta düzey ve yüksek düzey dezenfektanın etkisini değerlendirmek için sodyum hipokloridin 500 ppm (%0,05) ve 5000 ppm (%0,5)'lik konsantrasyonları denendi. Mekanik olarak diş fırçası ile fiziksel dezenfeksiyon gerçekleştirildi. Ardından bir gruba sodyum hipokloridin 500 ppm, diğer gruba 5000 ppm'lik konsantrasyonları uygulandı.

Dezenfeksiyon uygulanmış ve uygulanmamış örneklerin birinci gün her iki yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırıldı. Birinci gün, boyama yöntemiyle dezenfeksiyon uygulanmamış örneklerde OD değeri 0,063 iken sodyum hipokloridin 500 ppm'lik konsantrasyonu uygulandığında 0,063 ( $p=0,755$ ), 5000 ppm'lik konsantrasyon uygulandığında ise 0,062 ( $p=0,844$ ) bulundu. Sadece kimyasal dezenfeksiyon uygulanan örnekler (hem 500 ppm hem de 5000 ppm'lik konsantrasyonlar) dezenfeksiyon uygulanmamış örneklerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Sadece kimyasal dezenfeksiyonun uygulandığı gruplar (hem 500 ppm hem de 5000 ppm'lik konsantrasyonlar) TEM ile incelendiğinde ise mikroorganizma görülmedi (Bkz. Şekil:29, 31).

Birinci gün, boyama yöntemiyle fiziksel ve kimyasal (hem 500 ppm hem de 5000 ppm'lik konsantrasyonlar) dezenfeksiyonun birlikte uygulandığı örneklerin OD değerleri

dezenfeksiyon uygulanmamış örneklerle karşılaştırıldığında daha yüksek bulundu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (500 ppm için  $p=0,041$ , 5000 ppm için  $p=0,002$ ). Fiziksel ve kimyasal (hem 500 ppm hem de 5000 ppm'lik konsantrasyonlar) dezenfeksiyonun birlikte uygulandığı örnekler TEM ile incelendiğinde ise hiçbir örnekte mikroorganizma saptanmadı (Bkz. Şekil:30, 32). İki yöntem arasındaki bu çelişkili sonuç, mekanik fırçalama sırasında meydana gelen mikro hasarın yüzeyin daha fazla boya tutmasına neden olduğu şeklinde yorumlandı.

Dördüncü günün dezenfeksiyon işleminden sonra elde edilen sonuçları dezenfeksiyon uygulanmamış örneklerle karşılaştırıldı. Boyama yöntemiyle incelendiğinde, dezenfeksiyon uygulanmamış örneklerin OD değerleri ortalaması 0,242 bulundu. Sadece kimyasal dezenfeksiyon uygulandığında, sodyum hipokloridin 500 ppm'lik konsantrasyonunda OD değeri 0,074 ( $p=0,002$ ), 5000 ppm'lik konsantrasyonunda ise 0,065 ( $p=0,002$ ) bulundu. Fırçalandıktan sonra kimyasal dezenfeksiyon uygulandığında, sodyum hipokloridin 500 ppm'lik konsantrasyonunda OD değeri 0,086 ( $p=0,002$ ), 5000 ppm'lik konsantrasyonunda ise 0,092 ( $p=0,002$ ) bulundu. Fırçalandıktan sonra elde edilen OD değerleri birinci günde olduğu gibi daha yüksek sonuçlar elde edildi. Tüm dezenfeksiyon uygulamalarından sonra örnekler TEM ile incelendiğinde, hiçbirinde mikroorganizma saptanmadı (Bkz. Şekil:33-36). Hem sadece kimyasal dezenfeksiyon, hem de fiziksel ardından kimyasal dezenfeksiyon uygulamalarının mikroorganizmaların giderilmesi için etkili olduğu saptandı.

Sadece kimyasal dezenfeksiyon uygulanan örneklerin boyama yöntemi sonuçlarına göre, hem birinci hem de dördüncü günlerde sodyum hipokloridin 500 ppm ve 5000 ppm konsantrasyonlarının sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmedi (birinci gün için  $p=0,783$ , dördüncü gün için  $p=0,117$ ). Aynı gruplar TEM ile incelendiğinde hiçbirinde bakteriye rastlanmadı. Orta düzey dezenfektan olarak kullandığımız sodyum hipokloridin 500 ppm'lik konsantrasyonunun biyofilm oluşumunun engellenmesi ve oluşmuş olan biyofilm yapısının giderimi için yeterli etkide olduğu saptandı. Daha yüksek konsantrasyonların kullanılmasının gerekli olmadığı düşünülmektedir.

Boyama yöntemiyle hem birinci hem de dördüncü günlerde; fiziksel ve kimyasal dezenfeksiyonun ardışık uygulandığı örneklerin OD değerleri, sadece kimyasal dezenfeksiyon uygulanan örneklerden daha yüksek bulundu. (birinci gün 500 ppm için  $p=0,028$ , birinci gün 5000 ppm için  $p=0,004$ , dördüncü gün 500 ppm için  $p=0,049$ , dördüncü gün 5000 ppm için

p=0,003). Aynı gruplar TEM ile incelendiğinde ise hiçbir grupta mikroorganizma saptanmadı. Fırçalama işleminin pompa yüzeyinde fiziksel travma yarattığı ve boyanın tutulmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Fırçalama işleminden sonra kimyasal dezenfeksiyonun uygulandığı örneklerde TEM yöntemiyle bakteri saptanmamasına rağmen boyama yönteminde OD değerlerinin yüksek bulunması, bu işlem grubunda kristal viyole yönteminin güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmaktadır.

Boyama yöntemiyle birinci gün dezenfeksiyon uygulanmamış örneklerle dezenfekte edilmiş örneklerin birbirine çok yakın OD sonuçları elde edildi. Birinci gün dezenfeksiyon uygulanmamış örnekler TEM ile değerlendirildiğinde yüzeyde mikroorganizma ve kümeleri gözlemlendiği için hücre yoğunluğu 1+ olarak belirlendi. Dezenfeksiyon uygulandıktan sonra hiç mikroorganizma gözlenmedi. Bu nedenle kristal viyole ile boyama yönteminin 1+ hücre yoğunluğunu saptayacak kadar hassas bir yöntem olmadığına karar verildi.

Sodyum hipoklorit bazlı temizlik ürünleri toplum tarafından kolaylıkla piyasadan temin edilebilir. Temizlik ürünlerinde genellikle sodyum hipoklorit oranlarının %5'den düşük olduğu belirtilmekte, ultra yoğun olarak nitelendirilen çeşitlerde bile bu oran %4,6'dır. Çalışmamızda, evlerde yaygın olarak kullanılan su pompalarının temizliğinde kolay ulaşılabilir ve uygulanabilir dezenfeksiyon yöntemini saptamayı amaçladık. Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında, dört günde bir en az 500 ppm sodyum hipoklorit veya 1/10 oranında sulandırılmış sodyum hipoklorit bazlı temizlik ürünü içinde 20 dakika bekletilmesi kullanılan su pompalarının dezenfeksiyon için yeterli olacaktır. Evlerdeki su pompalarında, damacana değişimi sırasında meydana gelebilecek bulaşlar veya su kaynaklı kontaminasyonlar çalışmamızda uyguladığımız yoğunlukta bakteri üremesine neden olmayacağı düşünülse de bu çalışmada önerilen dezenfeksiyon yöntemi *E.coli* ile kontamine pompaların temizliğinde yeterli olacaktır. Ancak, bu çalışmada sadece *E.coli*'nin oluşturduğu biyofilm yapısı ve giderilmesi test edildi. İçme suyu sistemlerinde biyofilm oluşturabilecek diğer etkenler için de ek çalışmalar önerilmektedir.

## 5. SONUC VE ÖNERİLER

1. Çeşitli mikroorganizma grupları canlı veya cansız yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir.
2. Plastik (polivinil klorür, polietilen vb.) yapıda olan içme suyu damacana pompaları toplumda yaygın olarak kullanılmaktadır. Pompaların yüzeyleri mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaları için uygun ortamı sağlamaktadır.
3. Çalışmamızda, model olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC25922 suşu zaman içinde pompaların yüzeylerinde biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Olgun biyofilm yapısını dört günde oluşturmaktadır.
4. Pompalarda oluşan biyofilm yapısı halk sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, biyofilm yapısının giderilmesi ve oluşmasının önlenmesi için her evde uygulanabilecek uygun dezenfeksiyon yöntemi araştırıldı.
5. Kullanılan pompaların dört günde bir en az 500 ppm sodyum hipoklorit veya piyasadan sağlanacak sodyum hipoklorit bazlı temizlik ürününün 1/10 oranında sulandırılmasıyla elde edilen karışım içinde 20 dakika bekletilerek dezenfekte edilmesi önerilmektedir. Böylece, pompa yüzeylerine tutunmuş veya biyofilm oluşturmuş mikroorganizmaların giderimi sağlanmış olacaktır.
6. Toplumun ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sağlığının korunması, hayat kalitelerinin yüksek tutulması ve oluşabilecek birçok hastalığın önlenmesi sağlanacaktır.

## 6. **KAYNAKLAR**

1. Uludağ HA, Sener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Med J. 2008;39: 82-88.
2. Kolodkin-Gal I, Cao S, Chai L, Böttcher T ve ark. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. Cell. 2012;149: 684-92.
3. Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1999;181: 5993-6002.
4. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. J Hosp Infect. 2006;64: 313-25.
5. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15: 167-93.
6. Kumar MA, Anandapandian KTK, Parthiban K. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. Braz Arch Biol Technol. 2011;54: 259-65.
7. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW ve ark. Optical sectioning of microbial biofilms. J Bacteriol. 1991;173: 6558-67.
8. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 2003;50: 101-4.
9. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54: 49-79.
10. Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S ve ark. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. Microbiol Immunol. 2005;49: 875-84.
11. Sihorkar V, Vyas SP. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. Pharm Res. 2001;18: 1247-54.

12. Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW ve ark. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2002;184: 290-301.
13. Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Mol Microbiol. 2003;48: 253-67.
14. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M ve ark. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Mol Microbiol. 2006;59: 1114-28.
15. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cellular Microbiol. 2009;11: 1034-43.
16. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules. 2009;14: 2535-54.
17. De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. Appl Environ Microbiol. 1994;60: 4339-44.
18. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;322: 249-89.
19. Touchon M, Hoede C, Tenailon O, Barbe V ve ark. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. PLoS Genet. 2009;5: e1000344.
20. Williams MM, Braun-Howland EB. Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. Appl Environ Microbiol. 2003;69: 5463-71.
21. Juhna T, Birzniece D, Larsson S, Zulenkovs D ve ark. Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. Appl Environ Microbiol. 2007;73: 7456-64.
22. Park SH, Cheon HL, Park KH, Chung MS ve ark. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. Int J Food Microbiol. 2012;154: 130-4.

23. Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M ve ark. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19: 244-7.
24. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E ve ark. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen.* 2008;16: 23-9.
25. Christofi N, Misakyan MA, Matafonova GG, Barkhudarov EM ve ark. UV treatment of microorganisms on artificially-contaminated surfaces using excimer and microwave UV lamps. *Chemosphere.* 2008;73: 717-22.
26. Vaid R, Linton RH, Morgan MT. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *Food Microbiol.* 2010;27: 979-84.
27. Baig S, Liechti PA. Ozone treatment for biorefractory COD removal. *Water Sci Technol.* 2001;43: 197-204.
28. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8: 881-90.
29. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64: 847-67.
30. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8: 623-33.
31. Chai Y, Chu F, Kolter R, Losick R. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2008;67: 254-63.
32. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005;13: 20-6.
33. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12: 185-90.
34. Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest.* 2003;112: 1626-32.
35. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24: 616-26.

36. van der Kooij D. Potential for biofilm development in drinking water distribution systems. *J Appl Microbiol.* 1998;85: 39-44.
37. Neu TR, Lawrence JR. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol.* 1997;24: 11-25.
38. Martiny AC, Jørgensen TM, Albrechtsen HJ, Arvin E ve ark. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69: 6899-907.
39. Hallam NB, West JR, Forster CF, Simms J. The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Res.* 2001;35: 4063-71.
40. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003;11: 30-6.
41. Ponciano JM, La HJ, Joyce P, Forney LJ. Evolution of diversity in spatially structured *Escherichia coli* populations. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75: 6047-54.
42. Watnick P, Kolter R. Biofilm city of microbes. *J Bacteriol.* 2000;182: 2675-9.
43. Shrouf JD, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Parsek MR. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *MRS Bulletin.* 2011;36: 367-73.
44. Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* 2000;182: 3593-6.
45. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol.* 1999;34: 586-95.
46. <http://www.genomenewsnetwork.org> 15.10.2011
47. Sutherland LW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 2001;147: 3-9.
48. Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;10: 191-207.



49. Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.* 1979;43: 496-518.
50. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* 2001;412: 442-5.
51. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH ve ark. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998;280: 295-8.
52. Stickler DJ, Morris NS, McLean RJ, Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64: 3486-90.
53. Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP ve ark. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol.* 2001;183: 897-908.
54. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR ve ark. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 1771-6.
55. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9: 34-9.
56. Zijng V, Ammann T, Thurnheer T, Gmür R. Subgingival biofilm structure. *Front Oral Biol.* 2012;15: 1-16.
57. Wand ME, Bock LJ, Turton JF, Nugent PG ve ark. *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *J Med Microbiol.* 2012;61: 470-7.
58. Wilson A, Gray D, Karakiozis J, Thomas J. Advanced endotracheal tube biofilm stage, not duration of intubation, is related to pneumonia. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72: 916-23.
59. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun.* 2012;80: 228-33.

60. Koseoglu H, Aslan G, Esen N, Sen BH ve ark. Ultrastructural stages of biofilm development of *Escherichia coli* on urethral catheters and effects of antibiotics on biofilm formation. *Urology*. 2006;68: 942-6.
61. Regev-Shoshani G, Ko M, Miller C, Av-Gay Y. Slow release of nitric oxide from charged catheters and its effect on biofilm formation by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54: 273-9.
62. Fang Y, Shen Z, Li L, Cao Y ve ark. A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes. *World J Gastroenterol*. 2010;16: 1019-24.
63. Steczko J, Ash SR, Nivens DE, Brewer L ve ark. Microbial inactivation properties of a new antimicrobial/antithrombotic catheter lock solution (citrate/methylene blue/parabens). *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24: 1937-45.
64. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*. 2002;416: 740-3.
65. Kılıçturgay K, Gökırmak F, Töre O, Gedikoğlu S ve ark. Klinik mikrobiyoloji. Bursa. Onur yayıncılık. 1993; 45-52.
66. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8: 207-17.
67. Pupo GM, Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infect Immun*. 1997;65: 2685-92.
68. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis*. 1987;155: 377-89.
69. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji-Özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları. Onuncu baskı. İzmir. Barış yayınları fakülteler kitabevi. 2000; 3-17.
70. <http://tr.wikipedia.org> 02.05.2012
71. LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*. 1998;30: 285-93.

- 72.** Prüss BM, Besemann C, Denton A, Wolfe AJ. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2006;188: 3731-9.
- 73.** Wood TK, González Barrios AF, Herzberg M, Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;72: 361-7.
- 74.** Cookson AL, Cooley WA, Woodward MJ. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol.* 2002;292: 195-205.
- 75.** Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L ve ark. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol.* 2001;39: 223-35.
- 76.** Blumer C, Kleefeld A, Lehnen D, Heintz M ve ark. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2005;151: 3287-98.
- 77.** Garnett JA, Martínez-Santos VI, Saldaña Z, Pape T ve ark. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109: 3950-5.
- 78.** Barrios AF, Zuo R, Ren D, Wood TK. Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnol Bioeng.* 2006;93: 188-200.
- 79.** Reisner A, Haagensen JA, Schembri MA, Zechner EL ve ark. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol.* 2003;48: 933-46.
- 80.** Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol.* 2000;37: 424-32.
- 81.** Rodrigues DF, Elimelech M. Role of type 1 fimbriae and mannose in the development of *Escherichia coli* K12 biofilm: from initial cell adhesion to biofilm formation. *Biofouling.* 2009;25: 401-11.

- 82.** Girón JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2002;44: 361-79.
- 83.** Brettar I, Höfle MG. Molecular assessment of bacterial pathogens - a contribution to drinking water safety. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19: 274-80.
- 84.** Yu J, Kim D, Lee T. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Sci Technol.* 2010;61: 163-71.
- 85.** Schwartz T, Hoffmann S, Obst U. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *J Appl Microbiol.* 2003;95: 591-601.
- 86.** Murphy HM, Payne SJ, Gagnon GA. Sequential UV- and chlorine-based disinfection to mitigate *Escherichia coli* in drinking water biofilms. *Water Res.* 2008;42: 2083-92.
- 87.** Momba MNB, Makala N. Comparing the effect of various pipe materials on biofilm formation in chlorinated and combined chlorine-chloraminated water systems. *Water SA.* 2004;30: 175-182.
- 88.** Ndiongue S, Huck PM, Slawson RM. Effects of temperature and biodegradable organic matter on control of biofilms by free chlorine in a model drinking water distribution system. *Water Res.* 2005;39: 953-64.
- 89.** Jang A, Szabo J, Hosni AA, Coughlin M ve ark. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;72: 368-76.
- 90.** LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54: 2492-9.
- 91.** Niemira BA, Cooke PH. *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation on Romaine lettuce and spinach leaf surfaces reduces efficacy of irradiation and sodium hypochlorite washes. *J Food Sci.* 2010;75: 270-7.

**92.** J Galli, L Calò, F Ardito, M Imperiali ve ark. Biofilm formation by *Haemophilus influenzae* isolated from adeno-tonsil tissue samples, and its role in recurrent adenotonsillitis. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2007;27: 134–138.

**93.** Okajima Y, Kobayakawa S, Tsuji A, Tochikubo T. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lens material. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47: 2971-2975.

## 7. EKLER

### ETİK KURUL RAPORU

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No:2011/05-32</b>	<b>Tarih:25.02.2011</b>				
	Prof.Dr.Nuran ESEN'in sorumlusu Yük.Lis.Öğr.Malhun ŞENGELDI' nin proje yürütücüsü olduğu " İçme Suyu Pompalarında Escherichia Coli'nin Oluşturduğu Biyofilm Yapısının İncelenmesi ve Oluşmasının Önlenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>						
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
<b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>						
Unvan/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D..Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek kokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

## ÖZGEÇMİŞ

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2009
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2012

### AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Yılı
Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi	Türkiye	İzmir	Merkez Laboratuvarı	Stajyer	2007
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi	Türkiye	İzmir	Moleküler Genetik Laboratuvarı	Stajyer	2008