

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KENTSEL SU DÖNGÜSÜNDE MİKROBİYAL KONTAMİNANTLARIN SÜRVEYANI:  
FIRSATÇI PATOJENLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI



DOKTORA TEZİ

Binnur KIRATLI

Biyoloji Anabilim Dalı

AĞUSTOS 2024



T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KENTSEL SU DÖNGÜSÜNDE MİKROBİYAL KONTAMİNANTLARIN SÜRVEYANI:  
FIRSATÇI PATOJENLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Binnur KIRATLI

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin AKSOY

AĞUSTOS 2024



Binnur KIRATLI tarafından hazırlanan “Kentsel Su Döngüsünde Mikrobiyal Kontaminantların Sürveyanı: Fırsatçı Patojenlerin Moleküler Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Direnç Profilinin Araştırılması” adlı tez çalışması 02.08.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

### **Tez Jürisi**

**Jüri Başkanı :** **Prof. Dr. Kudret YILDIRIM**  
Sakarya Üniversitesi

**Jüri Üyesi :** **Prof. Dr. Hüseyin AKSOY** (Danışman)  
Sakarya Üniversitesi

**Jüri Üyesi :** **Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ**  
Sakarya Üniversitesi

**Jüri Üyesi :** **Doç. Dr. Mehmet ÖTEN**  
Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

**Jüri Üyesi :** **Dr. Öğr. Üyesi Selen ŞEN**  
Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “Kentsel Su Döngüsünde Mikrobiyal Kontaminantların Sürveyanı: Fırsatçı Patojenlerin Moleküler Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Direnç Profiline Araştırılması” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(02/08/2024)

Binnur KIRATLI







*Aileme ve minik tüylü dostlara ithafen...*



## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan ve tezin her aşamasında rehberlik eden kıymetli danışman hocam, Prof. Dr. Hüseyin AKSOY'a en içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Laboratuvarlarında çalışmamı tamamlamama izin veren, her zaman gelişmemi destekleyen ve kendisinin ekibinin bir üyesi olmamı sağlayan, bilimsel merakımı ve araştırma becerilerimi geliştirmemde büyük rol oynayan değerli hocam, Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım. Bana öğrettikleri ve sağladığı motivasyon için Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma arkadaşım Dr. Pınar AKKUŞ SÜT'e, araştırma sürecinde karşılaştığım zorlukları aşmamda ve fikir alışverişinde bulunmamda bana sağladığı büyük destek için gönülden teşekkür ederim. Bilimsel alanda yönümü belirlemede büyük rol oynayan, bana gösterdiği sevgi, destek ve sabırla bu çalışmanın başarıyla tamamlanmasında en büyük motivasyon kaynaklarımdan biri olan, bilgi ve deneyimleri ile çalışmamın metodolojik doğruluğunu sağlamamda ve bilimsel yaklaşımlarımı güçlendirmemde büyük katkısı olan, hayata ve ekosistemdeki her bir canlıya bakış açısıyla örnek olması nedeniyle, bilimsel anlamda bana öğrettikleri ve eğitim hayatım boyunca gösterdiği özen için, bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan projenin yürütücü de olan kıymetli ablam Dr. Öğretim Üyesi Nursel KIRATLI YILMAZÇOBAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doğayı ve doğadaki her canlıyı sevmeyi öğreten, bu mesleği seçmeme vesile olan ve maddi manevi desteğini her zaman hissettiren değerli annem Sabahat KIRATLI'ya ve babam Mustafa KIRATLI'ya tüm desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 120Y151 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Binnur KIRATLI



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....          | v    |
| TEŞEKKÜR .....                                             | ix   |
| İÇİNDEKİLER .....                                          | xi   |
| KISALTMALAR .....                                          | xiii |
| SİMGELER .....                                             | xv   |
| TABLO LİSTESİ .....                                        | xvii |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                        | xix  |
| ÖZET .....                                                 | xxi  |
| SUMMARY .....                                              | xxv  |
| 1. GİRİŞ .....                                             | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                    | 3    |
| 2.1. Stres Koşullarına Bakterilerin Evrimsel Yanıtı .....  | 3    |
| 2.2. Antimikrobiyal Direnç .....                           | 3    |
| 2.3. Çevresel Antibiyotik Direnç Rezervuarı .....          | 5    |
| 2.4. Horizontal Gen Transferi .....                        | 5    |
| 2.5. Bakteriyofajların Rolü .....                          | 6    |
| 2.6. Doğada Patojenlerin Davranış Şekilleri .....          | 6    |
| 2.7. Bakterilerin Fenotipik Esneklik Mekanizmaları .....   | 7    |
| 2.7.1. Persistan bakteriler .....                          | 7    |
| 2.7.2. Canlı fakat kültüre edilemeyen durum – VBNC .....   | 8    |
| 2.7.3. Biyofilm .....                                      | 10   |
| 2.7.4. L-form bakterileri .....                            | 10   |
| 2.8. Çevrede Antibiyotik Taşınımı ve Rezistom Ağı .....    | 11   |
| 2.9. İçme Suyunda Mikrobiyal Direnç .....                  | 13   |
| 2.10. Mikrobiyal Tehlikeler .....                          | 15   |
| 2.11. Kimyasal Tehlikeler .....                            | 17   |
| 2.12. Fiziksel Tehlikeler .....                            | 18   |
| 2.13. Tezin Amacı .....                                    | 18   |
| 2.14. Hipotez .....                                        | 19   |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                | 21   |
| 3.1. Suyun Örneklenmesi .....                              | 21   |
| 3.2. Numunenin Korunması ve Taşınması .....                | 21   |
| 3.3. Konsantrasyon Yöntemleri .....                        | 22   |
| 3.4. Numune Alma Noktaları .....                           | 22   |
| 3.6. Mikrobiyolojik Parametreler .....                     | 24   |
| 3.6.1. Membran filtrasyon yöntemi .....                    | 24   |
| 3.6.2. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu – qPCR ..... | 25   |
| 3.6.2.2. ATP biyolüminesans yöntemi .....                  | 26   |
| 3.6.2.3. Hücre membranı hasar tespiti .....                | 28   |

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7. Yasal İzinler.....                                                       | 29        |
| <b>4. SONUÇLAR .....</b>                                                      | <b>31</b> |
| 4.1. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları.....                    | 31        |
| 4.2. ATP Biyolüminesans Yönteminin Sonuçları .....                            | 34        |
| 4.3. İçme Suyu Temin Zincirinde Canlı/Ölü Bakteri Durum Tespit Sonuçları..... | 38        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                      | <b>51</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                         | <b>57</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                          | <b>69</b> |



## KISALTMALAR

|                 |                                                                                                                                         |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ABD</b>      | : Amerika Birleşik Devletleri                                                                                                           |
| <b>ADB</b>      | : Antibiyotik Dirençli Bakteriler                                                                                                       |
| <b>ADG</b>      | : Antimikrobiyal Direnç Genleri                                                                                                         |
| <b>AMD</b>      | : Antimikrobiyal Direnç Genleri                                                                                                         |
| <b>AOK</b>      | : Asimile edilebilir organik karbon                                                                                                     |
| <b>ARG</b>      | : Antibiyotik Dirençli Bakteriler (Antibiotic-Resistant Bacteria)                                                                       |
| <b>ARG</b>      | : Antimikrobiyal Direnç Genleri (Antimicrobial Resistance Genes)                                                                        |
| <b>AT</b>       | : Arıtma Tesisi                                                                                                                         |
| <b>ATP</b>      | : Adenozin Trifosfat                                                                                                                    |
| <b>ASTM</b>     | : Amerikan Test ve Malzemeler Topluluğu (American Society for Testing and Materials)                                                    |
| <b>BM</b>       | : Birleşmiş Milletler                                                                                                                   |
| <b>CAESAR</b>   | : Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetimi (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance) |
| <b>CDC</b>      | : Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention)                                                       |
| <b>MCoECs</b>   | : Ortaya Çıkan veya Endişe Oluşturan Mikrobiyal Kirleticiler (Microbial Contaminants of Emerging Concern)                               |
| <b>CT</b>       | : Temas Süresi (Contact Time)                                                                                                           |
| <b>DBP</b>      | : Dezenfektan yan ürünleri (Disinfection by products)                                                                                   |
| <b>DNA</b>      | : Deoksiriboz Nükleik Asit                                                                                                              |
| <b>DSÖ</b>      | : Dünya Sağlık Örgütü                                                                                                                   |
| <b>EDTA</b>     | : Etilendiamintetraasetik asit                                                                                                          |
| <b>EPS</b>      | : Hücre dışı polimerik madde (Extracellular polymeric substance)                                                                        |
| <b>ESAC-NET</b> | : Avrupa Antimikrobiyal Tüketim Gözetim Ağı (European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network)                                |
| <b>FB</b>       | : Fırsatçı Patojen                                                                                                                      |
| <b>FISH</b>     | : Floresan In Situ Hibridizasyon                                                                                                        |
| <b>HAA5</b>     | : Beş haloasetik asit                                                                                                                   |

|                 |                                                                                    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HGT</b>      | : Yatay gen transferi (Horizontal gene transfer)                                   |
| <b>ISO</b>      | : Uluslararası Standartlar Örgütü (International Organization for Standardization) |
| <b>LPS</b>      | : Lipopolisakkarit                                                                 |
| <b>MF</b>       | : Membran Filtrasyon                                                               |
| <b>MIK</b>      | : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu                                                |
| <b>MRSA</b>     | : Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>                                 |
| <b>NDMA</b>     | : N-nitrosodimetilamin                                                             |
| <b>OP</b>       | : Fırsatçı Patojen (Opportunistic Pathogen)                                        |
| <b>PI</b>       | : Propidium İyodin                                                                 |
| <b>(p)ppGpp</b> | : Guanozin Pentafosfat veya Tetrafosfat                                            |
| <b>PPC</b>      | : Farmasötik ve Kişisel Bakım Ürünleri (Personal pharmacy care)                    |
| <b>PPCP</b>     | : Kişisel Bakım Ürünleri (Pharmaceuticals and personal care products)              |
| <b>RLU</b>      | : Bağlı Işık Birimi                                                                |
| <b>qPCR</b>     | : Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative polymerase-chain-reaction)  |
| <b>PCR</b>      | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction)                          |
| <b>rRNA</b>     | : Ribozomal Ribonükleik Asit                                                       |
| <b>SASKİ</b>    | : Sakarya Su ve Kanalizasyon İdaresi Genel Müdürlüğü                               |
| <b>SAÜ</b>      | : Sakarya Üniversitesi                                                             |
| <b>STEC</b>     | : Shiga-Toksin Üreten <i>E. coli</i>                                               |
| <b>SYTO9</b>    | : Yeşil Floresan Nükleik Asit Boyası                                               |
| <b>THM</b>      | : Trihalometan                                                                     |
| <b>TOK</b>      | : Toplam Organik Karbon                                                            |
| <b>TRFLP</b>    | : Polimorfizm (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)                  |
| <b>UV</b>       | : Ultraviyole                                                                      |
| <b>VBNC</b>     | : Canlı/Ölü ve Metabolik Aktif Fakat Kültüre Edilemeyen (Viable but nonculturable) |



## SİMGELER

|                |                    |
|----------------|--------------------|
| °C             | : Derece santigrat |
| µg             | : Mikrogram        |
| µl             | : Mikrolitre       |
| µm             | : Mikrometre       |
| l              | : Litre            |
| m <sup>3</sup> | : Metreküp         |
| ml             | : Mililitre        |
| mm             | : Milimetre        |
| ng             | : Nanogram         |
| g              | : Gravite          |
| pg             | : Pikogram         |



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 3.1.</b> Numune alma noktaları .....                              | 23 |
| <b>Tablo 3.2.</b> qPCR primer, prob dizileri ve bağlanma sıcaklıkları..... | 26 |
| <b>Tablo 3.3.</b> Tipik ATP değerlendirme yönergesi.....                   | 28 |





## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Antibiyotik ve rezistom yayılımının kompleks etkileşim ağı.....                                            | 13 |
| Şekil 2.2. Su kalitesini etkileyen kimyasal ve biyolojik bileşenler. ....                                             | 17 |
| Şekil 3.1. Su temin zinciri.....                                                                                      | 24 |
| Şekil 3.2. Numune toplama.....                                                                                        | 24 |
| Şekil 3.3. Water-Glo™ teknolojisinin şematik diyagramı.....                                                           | 27 |
| Şekil 3.4. GloMax® 20/20 Luminometer ile ATP Analizi.....                                                             | 28 |
| Şekil 4.1. Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023, Aralık 2023 dönemine ait qPCR analizi ısı haritası.....             | 31 |
| Şekil 4.2. Haziran 2022, Aralık 2022, dönemine ait DNA kopya sayıları. ....                                           | 33 |
| Şekil 4.3. Mayıs 2023 ve Aralık 2023 dönemine ait DNA kopya sayıları. ....                                            | 34 |
| Şekil 4.4. 4 döneme ait ATP sonuçları. ....                                                                           | 35 |
| Şekil 4.5. 4 döneme ait ham su, içme suyu dağıtım sistemi, musluk suyu ortalama ATP konsantrasyonu sonuçları. ....    | 36 |
| Şekil 4.6. Haziran 2022 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları.....                                       | 36 |
| Şekil 4.7. Aralık 2022 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları. ....                                       | 37 |
| Şekil 4.8. Mayıs 2023 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları. ....                                        | 37 |
| Şekil 4.9. Aralık 2023 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları. ....                                       | 38 |
| Şekil 4.10. <i>E.coli</i> ATCC 10536 (kırmızı, ölü bakteri) ve <i>S. aureus</i> ATCC 6538 (yeşil, canlı bakteri)..... | 39 |
| Şekil 4.11. Konfokal mikrografların değerlendirilmesi kullanılan bağıl bolluk ifadeleri. ....                         | 40 |
| Şekil 4.12. Haziran 2022, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları. ....                              | 41 |
| Şekil 4.13. Haziran 2022, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları ....                              | 42 |
| Şekil 4.14. Aralık 2022, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları.....                                | 43 |
| Şekil 4.15. Aralık 2022, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları. ....                              | 44 |
| Şekil 4.16. Mayıs 2023, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları.....                                 | 45 |
| Şekil 4.17. Mayıs 2023, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları. ....                               | 46 |
| Şekil 4.18. Aralık 2023, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları . ....                              | 47 |
| Şekil 4.19. Aralık 2023, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları. ....                              | 48 |
| Şekil 4.20. 4 Dönem filamentli bakterilerin kalitatif değerlendirme sonuçları. ....                                   | 49 |
| Şekil 4.21. 4 Dönem serbest/biyofilm bakterilerin kalitatif değerlendirme sonuçları. ....                             | 49 |



**KENTSEL SU DÖNGÜSÜNDE MİKROBİYAL KONTAMİNANTLARIN  
SÜRVEYANI: FIRSATÇI PATOJENLERİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ÖZET**

Sucul ekosistem hizmetlerinin önemli bir unsuru olan içme suyu kaynakları, kentsel su döngüsü içinde yüzey suları, yağmur suları, atık sular ve geri dönüştürülmüş sular gibi farklı habitatların etkisine maruz kalmaktadır. Bu çeşitli habitatlardan gelen girdiler, su kalitesini ve genel ekosistem sağlığını doğrudan etkilemektedir. Çoklu arıtma bariyerlerinden geçerek dağıtım sistemi ile nihai kullanıcıya ulaştırılan suyun doğasında, bazı kimyasal ve biyolojik değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişikliklerin başında, abiyotik ve biyotik faktörlerin etkisiyle suyun kimyasal ve biyolojik kararlılığını kaybetmesi ve mikrobiyal yeniden üremenin (bacterial regrowth) oluşması gelir. Mikroorganizmalar, çevresel koşullara hızlı bir şekilde adaptasyon gösterme ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirme kabiliyetleriyle bilinir. Bu özellikleri sayesinde, su ekosistemlerinde direnç birikimine yol açarak hem doğal hem de insan yapımı habitatlarda önemli bir çevresel tehdit oluştururlar. Özellikle içme suyu kaynakları, heterojen su kütleleri ve çeşitli ekosistem unsurlarından gelen girdilerle kirlenmeye açıktır. Su döngüsündeki bu farklı girdiler, su kalitesini etkilerken, aynı zamanda su kaynaklarının biyolojik kararlılığını da bozabilir.

Suyun arıtma süreçlerinden geçirilmesine ve dağıtım sistemleri ile son kullanıcıya ulaştırılmasına rağmen, bazı biyolojik ve kimyasal değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişiklikler arasında mikrobiyal yeniden üreme, yani dağıtım sisteminde heterotrofik bakterilerin çoğalması ve suyu kolonize etmesi yer alır. Mikroorganizmaların su sistemlerinde çoğalması, suyun biyolojik denge ve kalitesini olumsuz etkiler. Bununla birlikte, bu tür mikroorganizmaların yalnızca heterotrofik bakterilerle sınırlı kalmadığı, aynı zamanda fırsatçı patojenlerin (FP) ve antibiyotik dirençli bakterilerin (ADB) de üreme olasılığını artırır. Heterotrofik bakterilerin ve antibiyotik dirençli bakterilerin su sistemlerinde yeniden üremesi, ekosistemin biyolojik dengesini bozarken, direnç birikimi yoluyla çevresel stres faktörlerine daha dayanıklı mikroorganizma topluluklarının oluşmasına neden olur. Bu durum, içme suyu kaynaklarının güvenliğini tehdit ederken, antibiyotik dirençli enfeksiyonların yayılmasını hızlandırır ve halk sağlığı açısından ciddi sonuçlar doğurur.

Oligotrofik bir habitat olan su dağıtım sistemi, aynı zamanda kalıntı dezenfektanların sürekli bulunduğu bir çevredir. Oligotrofik çevreler, genellikle mikroorganizmaların çoğalmasını daha az destekler, ancak bu ortamlarda hayatta kalmayı başaran bakteriler, düşük besin koşullarına son derece özelleşmiş ve uyum sağlamış olabilirler. Dezenfektanların varlığı, su kalitesini korumak ve mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılırken, aynı zamanda bir seçici baskı oluşturur. Bu durum, zamanla antimikrobiyal direnç genlerinin (ADG'lerin) gelişimine ve yayılmasına yol açabilir. Bu ortam, çeşitli faktörler ve kalıntı dezenfektanların varlığı nedeniyle ADG'leri için bir rezervuar olma potansiyeli taşımaktadır. Çoklu antibiyotik direncine

sahip patojenlerin küresel düzeyde artışı, ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmakta ve çevrenin mikrobiyal direnç gelişimine etkisinin araştırılmasının önemini vurgulamaktadır.

İçme suyu dağıtım sisteminde kullanılan dezenfektan türleri ve konsantrasyonları, çevresel koşullar ve mikrobiyal etkileşimler gibi çeşitli faktörler, ADG'lerin dinamiklerini etkiler. Bu karmaşık etkileşimler, su dağıtım sistemini ADG'lerin rezervuarı haline getirerek, önemli halk sağlığı riskleri oluşturabilir. İçme suyu kaynaklarıyla ilgili riskleri kapsamlı bir şekilde anlayabilmek ve bu riskleri etkili bir şekilde azaltabilmek, suyun kaynaktan nihai kullanıcıya ulaşana kadar geçtiği tüm aşamaların mikrobiyal ve kimyasal özelliklerinin detaylı incelenmesini gerektirir. İçme suyu kalitesinin korunması, yalnızca kaynağın temizliğinin sağlanmasıyla sınırlı olmayıp, suyun arıtılması, depolanması ve dağıtımı sürecinde karşılaşılabilecek risklerin de dikkate alınmasını zorunlu kılar. Bu süreçler boyunca suyun maruz kaldığı çeşitli biyolojik ve kimyasal etkiler, suyun nihai güvenliğini ve insan sağlığına olan potansiyel tehditlerini doğrudan etkiler.

Çalışmamız, suyun kaynağından musluğa olan yolculuğunda bazı fırsatçı patojenler (FP'ler), antibiyotik direnç genleri (ADG'ler) ve mikrobiyal aktivite de dahil olmak üzere mikroorganizmaların varlığının ve davranışlarının nasıl değiştiğini ve bu mikroorganizmaların habitatlar arasında yayılmasındaki rolünü incelemeyi amaçlamaktadır. Bu kapsamda, su numunelerinde qPCR, ATP analizi ve hücre membran hasar tespit analizleri yapılmıştır. Su kaynağı olarak kullanılan Sapanca Gölü (Sakarya) ve Akçay'dan gelen ham su, içme suyu arıtma tesisi ve içme suyu dağıtım sisteminden 2 yıllık bir sürede numuneler alınarak incelenmiştir. *Mycobacterium* spp. gibi su kaynaklı fırsatçı patojenlerin aerosolleşme, biyofilm oluşturma, dezenfektan ve antibiyotik direnci geliştirme kabiliyetleri nedeniyle içme suyu sistemlerinde varlıklarının tespiti büyük önem taşımaktadır. Elde edilen veriler, *Mycobacterium* spp.'nin zaman içinde değişen konsantrasyonlarını ortaya koymuş ve bu durum çevresel faktörlerle ilişkilendirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülansla ilgili ecfX geni ve olası çapraz reaksiyon sorunları incelenmiştir. Çalışmada, iki gen hedefli PCR yöntemleri kullanılmış ve bazı kaynaklarda bu genlerin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca, vanA geni gibi klinik öneme sahip antibiyotik direnç genlerinin varlığı, olası gen transferi ve su kaynaklı enfeksiyonlar açısından risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. qnrA geni gibi diğer direnç genlerinin tespit edilmesi, antibiyotik tedavisinin yönetiminde önemli bir faktör olarak vurgulanmıştır. int11 geni, yatay gen transferi göstergesi olarak içme suyu örneklerinde izlenmiş ve direnç seviyelerindeki dalgalanmalar rapor edilmiştir. Mikrobiyal ATP ölçümleri, su kalitesindeki küçük değişiklikleri hızlı bir şekilde tespit etmek için kullanılmış ve bu değerler, özellikle klor dozları ve suyun depolama süresi gibi faktörlerle ilişkilendirilmiştir. Çalışmada, içme suyu sistemlerindeki mikroorganizmaların membran hasarı analizi ile canlı ve ölü bakterilerin varlığı incelenmiştir. Dezenfeksiyona rağmen, bakterilerin içme suyu temin zincirinde hayatta kaldıkları ve hasarlı membranlarla yaşamlarını sürdürdükleri görüntüleme teknikleri ile tespit edilmiştir. Ayrıca, su dağıtım sisteminde biyofilm parçacıkları, filamentli bakteriler ve serbest bakterilerin varlığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, biyofilm oluşumunun yönetimi için entegre bir yaklaşıma ihtiyaç olduğunu ve geleneksel dezenfeksiyon yöntemleriyle ilgili zorlukları ortaya koymaktadır.



Mühendislik ürünü içme suyu dağıtım sisteminde antibiyotik direncinin şekillenmesi ile ilgili hipoteze dayalı bu çalışmada, yatay gen transferi, fırsatçı patojen varlığı, canlı ve ölü bakteri bolluğu ile mikrobiyal aktivite düzeyi gibi faktörlerin antibiyotik direncinin oluşumunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmanın bulguları, "Tek Sağlık" yaklaşımı ile entegre edilebilecek ve su yönetimi alanında standardizasyon sağlayabilecek potansiyele sahip bir ön çalışma niteliği taşımaktadır.





# **MICROBIAL CONTAMINANTS SURVEILLANCE IN THE URBAN WATER CYCLE: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OPPORTUNISTIC PATHOGENS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE**

## **SUMMARY**

Drinking water sources, which constitute a critical component of aquatic ecosystem services, are subjected to the influences of various habitats within the urban water cycle, including surface waters, stormwater, wastewater, and reclaimed waters. The inputs from these diverse habitats exert a direct impact on water quality and the overall health of the ecosystem. As water passes through multiple treatment barriers and is ultimately delivered to the end user through the distribution system, a series of chemical and biological transformations may occur. Foremost among these changes are the loss of chemical and biological stability, driven by abiotic and biotic factors, and the occurrence of microbial regrowth. Microorganisms, recognized for their rapid adaptive capabilities and resistance development, contribute to the accumulation of antimicrobial resistance within the ecosystem.

The water distribution system, as an oligotrophic habitat, represents an environment characterized by the persistent presence of residual disinfectants. Oligotrophic environments typically do not favor extensive microbial proliferation; however, bacteria that survive under such conditions are often highly specialized and adapted to thrive in low-nutrient settings. The application of disinfectants, while essential for maintaining water quality and preventing microbial contamination, simultaneously imposes selective pressure. This selective pressure can, over time, facilitate the evolution and dissemination of antimicrobial resistance genes (ARGs). The interplay of various environmental factors and the presence of residual disinfectants within this system suggests its potential to serve as a reservoir for ARGs. The emergence of multi-drug resistant pathogens, catalyzed by the overuse of antibiotics and environmental contamination, constitutes a profound public health challenge. This growing threat accentuates the necessity for rigorous research into environmental antibiotic concentrations and their critical role in fostering and propagating microbial resistance. The proliferation of microorganisms in water systems negatively impacts the biological balance and quality of the water. Moreover, these microorganisms are not limited to heterotrophic bacteria; there is also an increased likelihood of the growth of opportunistic pathogens (OPs) and antibiotic-resistant bacteria (ARBs). The regrowth of heterotrophic bacteria and antibiotic-resistant bacteria in water systems disrupts the ecosystem's biological equilibrium, leading to the formation of microbial communities that are more resilient to environmental stress factors due to the accumulation of resistance. This situation threatens the safety of drinking water sources and accelerates the spread of antibiotic-resistant infections, with severe consequences for public health. The presence of these resistant microorganisms in water systems highlights the need for effective monitoring and treatment strategies to mitigate the risks they pose.

The types and concentrations of disinfectants utilized in drinking water distribution systems, in conjunction with environmental conditions and microbial interactions, significantly influence the dynamics of antimicrobial resistance genes (ARGs). These complex interactions have the potential to transform the water distribution system into a reservoir for ARGs, thereby presenting substantial public health risks. To effectively understand and mitigate the risks associated with drinking water sources, it is imperative to conduct comprehensive analyses of the microbial and chemical properties of water sources, treatment processes, and distribution systems. To comprehensively understand the risks associated with drinking water sources and effectively mitigate these risks, it is essential to thoroughly examine the microbial and chemical properties of water at every stage, from the source to the end user. Protecting drinking water quality is not limited to ensuring the cleanliness of the source but also requires addressing potential risks encountered during water treatment, storage, and distribution. Throughout these processes, various biological and chemical factors can affect the safety of the water and pose direct threats to human health.

By monitoring the microbial and chemical dynamics at each stage, authorities can identify emerging risks and take necessary actions to maintain water quality. This comprehensive approach is crucial for safeguarding public health and ensuring the long-term sustainability of drinking water systems.

This study aims to investigate the changes in the presence and behavior of microorganisms, including opportunistic pathogens (OPs), antibiotic resistance genes (ARGs), and microbial activity, during their journey from the water source to the tap, as well as their role in spreading across different habitats. To achieve this, water samples were analyzed using qPCR, ATP assays, and cell membrane damage detection techniques. Over a two-year period, samples were collected from raw water sources, including Sapanca Lake (Sakarya) and Akçay, as well as from the drinking water treatment plant and the distribution system. The detection of opportunistic pathogens such as *Mycobacterium* spp., known for their ability to aerosolize, form biofilms, and develop resistance to disinfectants and antibiotics, is of critical importance in drinking water systems. The data reveal temporal fluctuations in the concentrations of *Mycobacterium* spp., which have been correlated with environmental factors. Moreover, the study examined the virulence-associated *ecfX* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and potential issues related to cross-reactivity. Two-gene targeted PCR methods were employed, confirming the presence of these genes in certain samples. Additionally, the presence of clinically significant antibiotic resistance genes, such as *vanA*, was evaluated as a risk factor for potential gene transfer and waterborne infections. The detection of other resistance genes, including *qnrA*, was emphasized as a critical factor in the management of antibiotic therapy. The *int1* gene, an indicator of horizontal gene transfer, was monitored in drinking water samples, with fluctuations in resistance levels observed. Microbial ATP measurements were conducted to rapidly detect subtle changes in water quality, with these values being particularly linked to factors such as chlorine dosing and water storage duration. The study also analyzed membrane damage in microorganisms within drinking water systems to assess the presence of viable and non-viable bacteria. Despite disinfection efforts, imaging techniques revealed that bacteria persisted within the drinking water supply chain, surviving with damaged membranes. Additionally, biofilm fragments, filamentous bacteria, and free-living bacteria were observed within the distribution system. These findings underscore the necessity of an integrated approach to biofilm management and highlight the challenges associated with traditional disinfection methods.

This hypothesis-driven study on the emergence of antibiotic resistance within engineered drinking water distribution systems concludes that critical factors such as horizontal gene transfer, the presence of opportunistic pathogens, the abundance of viable and non-viable bacteria, and microbial activity levels significantly contribute to the development of antibiotic resistance. The findings from this research serve as a preliminary study with the potential to be integrated into the "One Health" framework, offering insights that could inform the standardization of practices in water management systems.





## 1. GİRİŞ

Biyolojik çeşitliliğin bağımlı olduğu kaynaklar, nüfus artışı, kentleşme, kuraklık ve iklim değişikliği sebebi ile hızla tükenme noktasına gelmektedir (Cavicchioli ve ark., 2019; Sánchez-Bayo ve Wyckhuys., 2019; Cardoso ve ark., 2020). Ekosistem hizmetlerini doğrudan etkileyen bu problemlere ilave olarak savaş ve iklim kaynaklı mülteciler de eklenmektedir. Birleşmiş Milletler (BM)'in tahminlerine göre 2050 yılına kadar 25 milyon – 1 milyar arasında insanın iklim mülteci konumunda olacağı ve yaşadıkları çevreyi kaybedecekleri bildirilmektedir (UNHCR, 2020).

Küresel problemler, içme suyu kaynaklarına olan talep artışına ve alternatif su kaynaklarına olan ihtiyacın da artmasına sebep olmaktadır. Yirminci yüzyılda arıtma teknolojilerindeki ilerlemeler, fekal patojenler tarafından su kaynakların kontamine edilmesini önleyerek salgın hastalıkların oranını azaltmıştır. Ancak endişe yaratan bazı mikrobiyal kontaminantlar, su kalitesi açısından problem olmaya devam etmektedir. Su tedarik zincirinde yer alan kurumlar, kentsel su döngüsünün çeşitli bileşenlerinin birbirine çok yakından bağlı olduğunu belirtmektedir. Altyapı kullanımını optimize etmek, sürdürülebilir iyileştirme, su sektörü kurumları arasındaki koordinasyonu arttırmak ve tüketici ihtiyaçlarını karşılayacak yeni su kaynaklarını belirlemek için yeni bir bakış açısına ihtiyaç olduğu konusunda kurumlar, fikir birliğine sahiptir. Biyosferin kaotik yapısı nedeniyle ekolojik sınırlarını bilmek, mevcut ve geliştirilen teknolojilerin uzun vadede çevrede ne gibi sonuçlara sebep olabileceğini tahmin etmek zordur. Bilim Dünyası'nı zorlayan problemlerin başında çevresel stresin mikrobiyal ekoloji penceresinden ele alınmasında mevcut metotların sınırlamaları ve bilimsel boşluklardır. Bu kapsamda görmezden gelinen öncelikli konular arasında olan, içme suyu mikrobiyomun stres etkenlerine karşı yanıtların çeşitliliği, antibiyotik direnç krizinin kapsamı ve ciddiyeti göz önüne alındığında mikrobiyal direnci destekleyen mekanizmaları, faktörleri araştırmak önem arz etmektedir. Antibiyotik direncini nasıl geliştiği konusu, patojenlerin konakçı dışında hayatta kalma ve çoğalma stratejilerini de ele almayı gerektirmektedir.





## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Stres Koşullarına Bakterilerin Evrimsel Yanıtı**

Antibiyotikler, farmasötik endüstrisinin ürünü olarak yıllar boyunca hayat kurtarmaktadır. Canlı organizmaların hayatta kalma stratejisi olarak üretilen antibiyotikler, kökenlerinden bağımsız olarak, hepsi doğal seçilime tabidir. Kullanımı yaygınlaşan antibiyotikler sebebiyle son 75 yılda gezegenimiz tüm tarihi boyunca görmediği kadar antibiyotik ile tanışmış oldu. Aşırı antibiyotik kullanımı ve çeşitli organik, inorganik toksinlere maruz kalan mikroorganizmalar, uzun zamandır genomlarında kodlanmış, jeolojik çağlar boyunca biriken ve gelişen (Beta-laktam, tetrasiklin, vankomisin ve makrolid direnç genleri) direnç elemanlarını ve mevcut hayatta kalma mekanizmaları harekete geçirmektedir. Yapılan çalışmalar, çevrenin (toprak, su, hava gibi) akla gelebilecek tüm antibiyotiklere cevap verebilecek geniş bir gen rezervuarı olduğunu ve antibiyotiklerin çevrimi üzerindeki önemli rol üstlendiğini göstermektedir. Direnç genlerini taşıyan bakteriler, insan ve hayvanlarda kommensal olarak varlıklarını sürdürerek ya da patojenler yoluyla çevreyi kontamine edebilmektedir (Allen ve ark., 2010; Surette ve Wright, 2017).

### **2.2. Antimikrobiyal Direnç**

Antimikrobiyal direnç (AMD), Uluslararası Para Fonu (IMF), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Dünya Bankası ve G8 dahil olmak üzere tüm önemli düzenleyici organlar tarafından 21. yüzyılın en büyük küresel sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Bu kuruluşların tümünün AMD'e bakışı, AMD'in sadece sağlık alanını ilgilendirmediğini tüm ekosistemlerin AMD'nin ortaya çıkmasında, kazanılmasında ve yayılmasında rol oynadığını işaret etmektedir. AMD problemi ele alınırken Küresel Sağlık ve Tek Sağlık olarak iki yaklaşımla ele alınmaktadır (Hernando-Amado ve ark., 2019). Küresel sağlık, halk sağlığı ve uluslararası sağlık alanında kurulmuş disiplinlerle örtüşen alanlara sahiptir (Koplan ve ark., 2009). Tek Sağlık yaklaşımı, AMD'in ortaya çıkması ve yayılmasında birbirine bağlı (ve dolayısıyla coğrafi olarak

yakın) ekosistemlerin rolüne odaklanır (Hernando-Amado ve ark., 2019). Dolayısı ile Tek Sağlık yaklaşımı ile AMD çalışma tasarımı yapılırken şehir veya bölgesel düzeyde bütünleşmiş uygulamalara odaklanılmalıdır (Hernando-Amado ve ark., 2019). Dünyada AMD direncinin arttığına yönelik iyi bir örnek, ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) tarafından 2019'da yayımlanan raporda yer almaktadır. CDC, bu tehditle mücadele etmek için sektörler arasında iş birliğine dayalı küresel bir yaklaşım gerektiren bir halk sağlığı önceliği olarak ele alınmasını tavsiye etmektedir (CDC, 2019). ESAC–NET (Avrupa Antimikrobiyal Tüketim Gözetim Ağı) ülkeleri arasında Türkiye antibiyotik tüketimi açısından en yüksek antibiyotik tüketen ülke iken Türk Hükümeti, Akılcı İlaç Kullanımı Ulusal Eylem Planını (2013-2017) yürürlüğe koyarak gereksiz antibiyotik kullanımına sınırlandırmalar getirmiştir (Versporten ve ark., 2014). Avrupa ülkelerinde AMD hakkındaki veriler, Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetimi (CAESAR) ağının, 2019, yıllık raporunda mevcuttur. Bu rapora göre Türkiye'de *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'de üçüncü kuşak sefalosporinlere (sefotaksim/seftriakson/seftazidim) ve florokinolonlara (siprofloksasin/levofloksasin/ofloksasin) yüksek düzeyde direnç gözlenmiştir. Ayrıca *K. pneumoniae*'de karbapenemlere (imipenem/meropenem) yüksek düzeyde direnç gözlenmiştir. Hastanelerde *Acinetobacter* spp., dirençli klonların yayılması söz konusudur. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) oranı komşu ülkelerdekine benzerdir. *Staphylococcus pneumoniae*'de penisilin ve makrolidler (eritromisin/klaritromisin/azitromisin) için yüksek direnç seviyeleri bulunmuştur (WHO-CAESAR, 2019). Terapötik ve önleyici amaçlar için antibiyotik kullanımının kısıtlanması küresel direnç artışı problemini çözmemektedir. Antropojenik davranışlar sonucunda Gezegenimize önemli miktarlarda pestisit, organik mikro-kirleticiler, endokrin bozucu bileşikler, farmasötik ve kişisel bakım ürünleri (PPC'ler), metaller vb. gibi çeşitli ekosistemlerde değişiklikler yapabilen maddeler dahil olmaktadır. Bu maddelerin ekosistemde davranışlarını ve canlılar üzerindeki etkilerini tahmin etmek oldukça güçtür. Fakat bilinen bir gerçek ki tüm bu faktörlere rağmen bazı mikroorganizmalar, sağ kalım oranlarını arttırarak süper-organizma haline dönüşebilmektedir. Süper-organizmaların yükselişini durdurmak için hiçbir şey yapılmazsa, ilaca dirençli enfeksiyonlardan kaynaklanan küresel ölümler, yılda 700.000 iken 2050'de 10 milyon kişiye yükselebileceği tahmin edilmektedir (Cassini ve ark., 2018). Bakteriyel patojenler söz konusu olduğunda genellikle patojenlerin insan ile ilişkisi düşünülür. Halbuki birçok patojenin insana

bulaşma kaynağı doğrudan insan değil, çevredir. Bakteriyel patojenlerin hayatta kalma ve çoğalma stratejileri, patojenlerin insanlara geçişi ve salgınların ortaya çıkmasında önemli etkenlerdendir. Antibiyotiklere karşı direncin artması insan, hayvan sağlığını, gıda güvenliğini ve çevreyi etkilemektedir. Antimikrobiyal Direnç (AMD) küresel ve çok boyutlu bir sağlık sorunu haline gelmiştir. DSÖ, AMD'yi Sürdürülebilir Kalkınma Hedeflerine ulaşmayı tehlikeye atan ve halk sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olarak görmektedir.

### **2.3. Çevresel Antibiyotik Direnç Rezervuarı**

Çeşitli habitatlardaki bakteriler, besin yoksunluğu, sıcak ve soğuk stresi, UV radyasyonu, oksidatif stres, kuruma, asit stresi, nitrozatif stres, ağır metal maruziyeti, ozmotik stres vb. gibi, sürekli değişen çevre koşullarına maruz kalmaktadır. Olumsuz koşullarda bakteriler, hayatta kalabilmek için gen ekspresyonlarında sert değişiklikler yaparak fizyolojilerini uyarmaktadır. Olumsuz koşullara uyumda, morfolojik plastisite mikroorganizmaların cevaplarındandır. Bakteriler, küçük koloni varyantları, L-form bakteriler, biyofilmler, vejetatif hücreler veya sporlar, filament yapıları, Canlı Fakat Kültüre Edilemeyen (VBNC) hücreler oluşturarak çeşitli tehlikelerden korunabilmektedir (Mattman, 2000; Spoering ve Lewis, 2001; Lennon ve Jones, 2011; Pruden, 2014; Jonas, 2014).

### **2.4. Horizontal Gen Transferi**

Yatay gen transferi birbirine uzak akraba olan bakteriler arasında dahi yaygındır. Bu süreç, antibiyotik direncinin başlıca nedeni olarak sayılmaktadır; bir bakteri direnç edinince, direnç genini kısa sürede başka türlere de aktarabilmektedir. Ölü bakterinin antibiyotik direnç geni varsa, “Tıpkı bir iğne deliğine ipliği geçirmek gibi” pilusu aracılığı ile DNA'yı yakalayan canlı bakteri, direncini geliştirir ve onu kendi kolonisine aktarmış olur. Böylece antibiyotik direnci gelişmeye ve yayılmaya devam eder (Ellison ve ark., 2018). Bu açıdan ele alındığında mikrobiyal kontrol için kullandığımız proseslerin (çeşitli arıtma teknolojileri, dezenfeksiyon prosesleri vb.) mikrobiyal direnci arttırmak ve yaymak gibi önemli soruları da beraberinde getirme olasılığı yüksektir.

## 2.5. Bakteriyofajların Rolü

Biyosferdeki en bol ve çeşitli varlıkları temsil eden bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir (Keen ve Dantas., 2018). Yeni teknolojilerin farklı ekosistemlere uygulanması ile elde edilen sonuçlar, bakteriyofajların bakteri popülasyonu kontrolü, biyojeokimyasal döngüler, bakteriyel evrimdeki yaygınlıklarını ve önemlerini vurgulamaktadır. Toplam bakteri genomlarının yaklaşık %20'sinin faj benzeri elementler tarafından elde edildiği belirtilmektedir (Brüssow ve ark., 2004). Artan kanıtlar, bakteriyofajların küresel önemlerini belirtmesine rağmen, fajların ekosistemde işlevsel görevlerinin ne olduğu henüz tam olarak tanımlanmamıştır (Keen ve Dantas, 2018). Konakçı genlerin fajlar veya faj benzeri partiküller tarafından paketlenmesi ve sonrasında bunların yatay gen transferi (HGT) yoluyla bir bakteriyel konakçıya iletilmesi yönlendiren çeşitli mekanizmalar mevcuttur (Beumer ve Robinson, 2005; Fineran ve ark., 2009; McDaniel ve ark., 2010; Lang ve ark., 2012).

## 2.6. Doğada Patojenlerin Davranış Şekilleri

Bakteriyel patojenlerin çevresel uyaranlara uyum sağlayabilmesi, konakçı ile etkileşimlerini de etkilemektedir. Doğada patojenlerin davranış şeklini ve konakçı enfekte etme kabiliyetlerini, diğer mikroorganizmalar, invertebratlar ve bitkiler ile etkileşimleri tarafından şekillendirilmektedir. İnsan patojenlerinin evriminin sadece insan enfeksiyonlarından kaynaklanmamaktadır. Örneğin *Yersinia pestis*, bazı genlerini kaybederek, konakçıya geçebilme kabiliyetini arttıran insektisitleri, vektör olarak kullanmaktadır (Martinez, 2014). Doğa, aynı zamanda bakteriyel patojenlerin yeni konakçıları enfekte edebilecek konsantrasyonlara ulaşmalarını sağlamaktadır. Örneğin, doğal habitatlar ile salgın oluşumu arasındaki karmaşık ilişki *Clostridium botulinum* örneği ile çok iyi açıklanmıştır. Araştırmacılar, *C. botulinum* sporlarının ve toksinlerin canlılığını yitirmiş canlılarda, alg matlarında ve biyokütlede biyoakümüülasyonun hastalıklara neden olmada merkezi rolü olduğunu öne sürmektedir (Espelund ve Klaveness, 2014). Bakterilerin hayatta kalma stratejisine başka bir örnek de *Legionella pneumophila* gibi benzer mikroorganizmaların “hücre içinde büyüme” stratejisidir. Araştırmacılar, su sistemlerinden amip aracılığı ile insan konakçıya geçme potansiyelini arttırdığı bilinen *L. pneumophila*'nın, olgun bulaşıcı biçimlerin düşünüldüğünden çok daha karmaşık bir gelişim döngüsüne sahip olduğuna işaret etmektedir (Robertson ve ark., 2014). Bakteri ile beslenen bazı protozoa türlerinin

veziküller ürettiği ve bu vezikülleri kendinden uzaklaştırdığı bilinmektedir. Bazen pelet olarak adlandırılan bu veziküller, canlı bakteri içerebileceği ve bakterilerin, biyositlere ve diğer çevresel streslere karşı dirençlerini artırarak bakteriyel patojenlerin bulaşıcılığını arttırabileceği belirtilmektedir (Denoncourt ve ark., 2014). Yine başka bir çalışmada Alum ve Isaacs (2016) kapalı (built) çevrelerde *Legionella*'nın, funguslarla sinerjistik bir ilişki kurabileceği ve fungusların mikroorganizmanın iç mekânda aerosolizasyonuna yardımcı olarak UV dezenfeksiyonundan az etkilenmesine sebep olabileceğini bildirilmektedir.

## **2.7. Bakterilerin Fenotipik Esneklik Mekanizmaları**

### **2.7.1. Persistan bakteriler**

Çevre ile genom ve gen ekspresyonu arasında karmaşık etkileşimlerden oluşan dinamik bir yapı mevcuttur. Biyoloji bakış açısı ile bu yapının aydınlatılması ve resmin bütününe görebilmek, çok sayıda yap-bozu tamamlamak gibidir. Bazı mikroorganizmalar, gen ekspresyonlarında hızlı değişiklikler yapar. Bu değişikliklerin sebebi, bakterin bölünme ya da bölünmeme kararına göre değişir. Neredeyse tüm hücrelerin, özellikle de şiddetli çevresel değişikliklere maruz kalan bakterilerin karar vermek zorunda olduğu önemli bir karardır. Olumsuz koşullar altında, proliferasyon ve büyüme hücresel bütünlüğü tehlikeye atabilir ve bu nedenle aşağı regüle edilmelidir. Bu amaçla bakteriler, çevresel bilgileri hücre döngüsü motoruna iletmek için karmaşık mekanizmalar geliştirmiştir. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Caulobacter crescentus*'ta yapılan son çalışmalar, bu mekanizmaların genellikle küçük molekül bazlı sinyalleşme, regüle edilmiş proteolizin yanı sıra protein-protein etkileşimlerini içerdiğini göstermektedir. Bunların çoğu, sırasıyla ana düzenleyiciler, DnaA veya FtsZ'yi hedefleyerek replikasyon başlangıcını veya septum oluşumunu geciktirmektir. Dikkat çekici bir şekilde, hedefler korunurken, kesin mekanizmalar farklı türler arasında önemli derecede çeşitlilik göstermektedir (Jonas, 2014). Bakteriyel persistanlar, antibiyotiklere karşı olağanüstü toleransları olan fenotipik varyantlardır. Bu hücreler, genetik değişikliğe uğramadan antibiyotik etkisinden kaçabilirler. Persistanlar, eksponansiyel çoğalma fazında olan az miktardaki alt popülasyondur. Fakat durgun fazın veya biyofilmin (%1) önemli bir bölümünü oluştururlar (Wood ve ark., 2013). Persistanların yaşamını sürdürmesi, antibiyotik stresi sırasında temel hücre fonksiyonlarının inhibisyonuna, ardından işlemin tersine çevrilmesine ve antibiyotik ortamda bulunmadığında üremenin yeniden başlatılmasına

bağlıdır. Ayrıca, bu hayatta kalan hücreler, kültüre edildiğinde orijinal kültür ile aynı antibiyotik duyarlılıkları olan popülasyonlar üretirler. Metabolizma bu süreçte kritik bir rol oynar (Amato ve ark., 2014). Persistanlar, biyofilmlerde zenginleşmektedir ve biyofilm enfeksiyonlarının antibiyotik tedavisinin sona ermesinin ardından nüks etme eğilimi gösterir. İnsan sağlığı açısından kritik önemi olan bu hücreler, major kronik enfeksiyona sebep olma potansiyeline sahiptir (Wood ve ark., 2013). Ayrıca nutrient-sınırlı durgun fazda da persistanların miktarı artar (Spoering ve Lewis, 2001; Keren ve ark., 2004; Lechner ve ark., 2012; Bernier ve ark., 2013). Bu fenotiplerin ortaya çıkmasında quorum sinyalizasyonu da önemli olduğu belirtilmektedir (Möker ve ark., 2010; Vega ve ark., 2012). Birlikte ele alındığında, bu çalışmalar beslenme ortamının persistanları doğrudan etkilediğini, kalıcılık fenotipinde metabolizmanın merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Yaygın bir kontrol mekanizması da amino asit veya karbon açlığına tepki olarak üretilen guanozin pentafofat veya tetrafofat ((p)ppGpp) küçük sinyal moleküllerini içerir, ki bu sinyaller genel gen ekspresiyonunu tamamen değiştirir. Bakterilerin hücre döngüsü süreçleri değişir, genel protein sentezi ve çoğalma oranı üzerinde etkilidir. PpGpp'in bakterilerin zorlu koşullara uyum sağlamasına izin vermesinde oynadığı kilit rol, yıllardır Biyokimyacıların incelenmesine konu olmuştur (Traxler ve ark., 2006; Dalebroux ve Swanson, 2012; Zuo ve ark., 2013).

### **2.7.2. Canlı fakat kültüre edilemeyen durum – VBNC**

Dormant (uyuşuk) hal; spor oluşturan mikropların milyonlarca yıl hayatta kalma stratejisidir. Ancak, değişken ve tahmin edilemeyen doğal habitatlarda yaşayan bakteriler, mikrobiyal çeşitliliğin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bu koşullarda yaşayan sporlaşmayan türler uygun olmayan şartlarda hayatta kalmak için ne yaparlar? Stres koşullarında farklılaşma özelliği olmayan (spor ya da kist oluşturamayan) bakteriler, adaptif yanıt olarak “dormansi” durumu geliştirirler. Dormansi fazında bakteriler, canlılığını korumaktadır ancak standart laboratuvar besiyerlerinde koloni oluşturmazlar (Li ve ark., 2014). Bakterilerin VBNC cevabı, farklılaşan bakterilerin (spor oluşturan) stres cevaplarına analogtur. Bulundukları habitat veya konakta uygun koşullar meydana geldiğinde spor oluşturmamayan dormant hücrelerde stokastik germinasyon gözlemlenir ve bu bakteriler bu programı geriye dönüştürebilirler. VBNC hücreleri, kültüre edilebilir hücrelere kıyasla fiziksel ve kimyasal streslere karşı daha dirençlidir. VBNC durumunun indüklenmesi ve bu fazdaki hücrelerin yeniden

canlandırılması ile ilgili birçok genetik faktör mevcuttur. Yeniden üreme durumunu kontrol eden ana faktör, stresin şiddetidir. Stres, zayıf, orta ve şiddetli olmak üzere sınıflandırılabilir. Zayıf stres altında bakteri sayılarında azalma olmadan üremeleri azalabilir veya durabilir. Mikroorganizmanın orta şiddetli (moderate) bir stres ile karşılaştığında mikrobiyal gelişimin durmasının yanında, bakterilerin yaşama kabiliyetlerinde azalma da meydana gelmektedir. Şiddetli (extreme veya severe) stres olarak adlandırılan stres koşulları ise bakteri hücreleri için ölümcül durum oluşturmaktadır ve bakteri popülasyonunun çoğunluğunun ölümü ile sonuçlanmaktadır (McDougald ve ark, 1998; Dikici, 2009). Joux ve ark. (1997) bakteriyel hücrelerin 6 farklı faza sahip olduğu ileri sürülmektedir. Bu fazlar: 1. fazda hücreler, kültüre edilebilir durumdadır, 2. fazdaki hücreler, gerçek solunumu olan, fakat kültüre edilemeyen hücrelerdir, 3. fazda gerçek solunumu olmayan potansiyel solunumu olan hücrelerdir, 4. fazda hücrelerin solunumu yok fakat membran permeabilitesi var olan hücreler, 5. fazda membran permeabilitesi yok olan hücreler, bu hücrelerde DNA'da herhangi bir değişim yoktur ve hücreler bütündür, 6. fazda DNA bütünlüğü bozulmuş ve lisis söz konusudur ve nükleoid içermeyen hücre varlığı içeren hücrelerdir. VBNC fazındaki mikroorganizmalar, su, gıda ve enfekte olmuş dokulardaki bakteriyel patojenlerin tespitini zorlaştırabilir ve halk sağlığı riskine sebep olabilir. Floresan *in situ* hibridizasyon – FISH veya 5-siyano-2,3-ditolil tetrazolium klorid- CTC boyama, ribozomal RNA–ribozomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) ile yapılan çalışmalar, doğal ekosistemlerde dormansi durumuna en uygun ortamların toprak ve tatlı-su habitatları olduğunu göstermektedir (Lennon ve Jones, 2011). Gıda güvenliğini sorgulamaya açık hale getiren bir çalışmada da marul gibi taze ürünlerin patojen kontrolünde kullanılan klorun toplam popülasyonlarını öldürmede etkisiz olduğu ve çevresel streslere cevaben *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, VBNC durumunu indüklediğidir. VBNC formundaki patojeni yutan *Caenorhabditis elegans*, bu mikroorganizma tarafından enfekte edilmiştir. Elde edilen bulgular, VBNC gıda kaynaklı patojenlerin hem üreyebileceğini hem de potansiyel olarak hastalığa neden olma kabiliyetini koruyarak endüstriyel uygulamalarda tespit edilemeden gözden kaçabileceğini göstermektedir (Highmore ve ark, 2018). Faucher ve Charette, 2015'te yayınlanan editöriyel makalelerinde, bakteriyel patojenlerin virölansı ve epidemiyolojisinin tam olarak anlayabilmek ve etkili karşı önlemlerin geliştirilmek için bakterilerin doğadaki yaşamları dahil tüm yaşam döngüleri dikkate alındığında başarılı olacağı

özetlemektedir. Yeterince tespit edilip, karşı tedbir almanın yollarını geliştirmekten çok uzakta olduğumuz VBNC durumundaki hücreler ile ilgili güncel sorunlar; hücre canlı mıdır, değil midir sorusunun cevabı net değildir. Ayrıca hücrenin çeşitli fazlar arasında geçişinde virülans kaybı var mıdır? Bakteriler konağa aktarıldıklarında üremelerini indükleyici faktörler nelerdir? kullanılan tüm metotlar çevresel bakteriler de dahil her bakteri için doğru ve güvenilir metotlardan mıdır? gibi soruların cevaplarını aramak dormansi mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu sebeple dormansi durumu tespit etmek için metotları karşılaştırmalı olarak kullanmak ve değerlendirmek kritik öneme sahiptir (Yu ve McFeters, 1994; Li ve ark., 2014).

### 2.7.3. Biyofilm

Mikrobiyal biyofilmler, genellikle üç boyutlu bir yapıda kurulan sesil mikrobiyal konsorsiyumlar olarak tanımlanır ve mikrobiyal topluluk tarafından sentezlenen materyalden oluşan bir matrise gömülü prokaryotik ve/veya ökaryotik hücrelerden oluşan çok hücreli topluluklardan oluşur (Costerton ve ark.,1999). Biyofilm oluşumu, hücre dışı-ekstraselüler bir matrisin (EPS) üretimi ve birikimi ile başlayan çeşitli yüzeylere mikrobiyal yapışma ile sonuçlanan çok aşamalı bir süreçtir. Biyofilm yapısına, proteinler, polisakkaritler, hümitik maddeler, hücre dışı DNA, hücre-hücre iletişimi de kapsayan moleküllerden oluşan bir veya daha fazla polimerik maddeden oluşmaktadır (Flemming ve Wingender, 2010). Biyofilm, doğal habitatlarda bakteriyel hücrelerin kalıcılığı için önemlidir, çünkü biofilm içindeki bakteriyel hücreler, planktonik hücrelere kıyasla biyositlere ve stresli koşullara daha dirençlidir. Örneğin, biyofilm yapabilen Shiga-toksin üreten *E. coli*'nin (STEC) toprak, su sistemleri, et işleme tesisleri ve taze ürünler de dahil olmak üzere doğada kalıcılığı yüksektir ve insan sağlığı için tehdit oluşturan STEC biyofilmi, gıda sektöründe nihai ürünlerin kontaminasyonuna sebep olan başlıca kaynaklardandır (Vogeleer ve ark., 2014).

### 2.7.4. L-form bakterileri

İlk olarak 1935'te Emmy Klieneberger-Nobel tarafından tanımlanan L-form bakterileri, belirli koşullar altında kendiliğinden veya indüksiyonla, hücre duvarının bir kısmını veya tamamını kaybeden pleomorfik hücrelerdir (Dienes, 1947; Dienes ve Weinberger, 1951; Joseleau-Petit ve ark., 2007; Glover ve ark., 2009). Bu bakteriler, hücre duvarı eksik veya kusurlu bakteri olarak bilinen ozmo-duyarlı hücrelere neden olabilir. Muhtemelen hayatta kalma stratejisi olan bu yapı, *in vitro* ve *in vivo* olarak gram-pozitif ve gram-negatif, birçok bakteri türü tarafından üretilir. Çünkü bu



durum bakterilere, hücre duvarı hedefli antibiyotiklere ( $\beta$ -laktamlar ve glikopeptidler) karşı dirençli olmak veya immün sistem reseptörleri tarafından algılanacak hücre duvarı komponenti olmadığı için kaçabilme kabiliyeti gibi avantajlar sağlar. Muhtemelen bu bakteriler, birçok kronik hastalıkla ilişkilidir (Domingue ve Woody, 1997; Schmidtke ve Carson 1999; Glover ve ark., 2009; Errington ve ark., 2016). Yavaş büyüme kabiliyetleri, kültüre edilmelerini zorlaştırır. Katı besiyerinde “sahanda yumurta” şeklinde çoğalan bu bakterilere L-form bakteriler denir. Bu özellik *Mycoplasma*lar için karakteristik bir özelliktir (Clasener, 1972; Allan, 2009; Glover ve ark., 2009). *Mycoplasma* gibi parazitik türlerde hücre duvarı yoktur ve bu tipteki bakteriler, hücre duvarına sahip olan bakterilerden türetilmediklerinde L-form olarak kabul edilemezler (Domingue ve Woody, 1997; Razin, 1998). L- bakterilerinin bir nevi tomurcuklanma şeklinde çoğaldıkları tespit edilmiştir. Bu yeni anlaşılmaya çalışılan çoğalma şekli, hücresel yaşam formlarının erken yaşta nasıl çoğaldığına dair fikir vermektedir (Leaver ve ark. 2009; Mercier ve ark., 2013). L-formundaki bakteriler ortalama 0,01 mikron çapındaki en ince filtrelerden bile geçebilecek kadar küçük formdadır (Mattman, 2000). Bu büyüklüğe sahip mikroorganizmaları düşündüğümüzde birçok alanda kullanılan mevcut filtrelerin etkinliği sorgulanmaya açıktır.

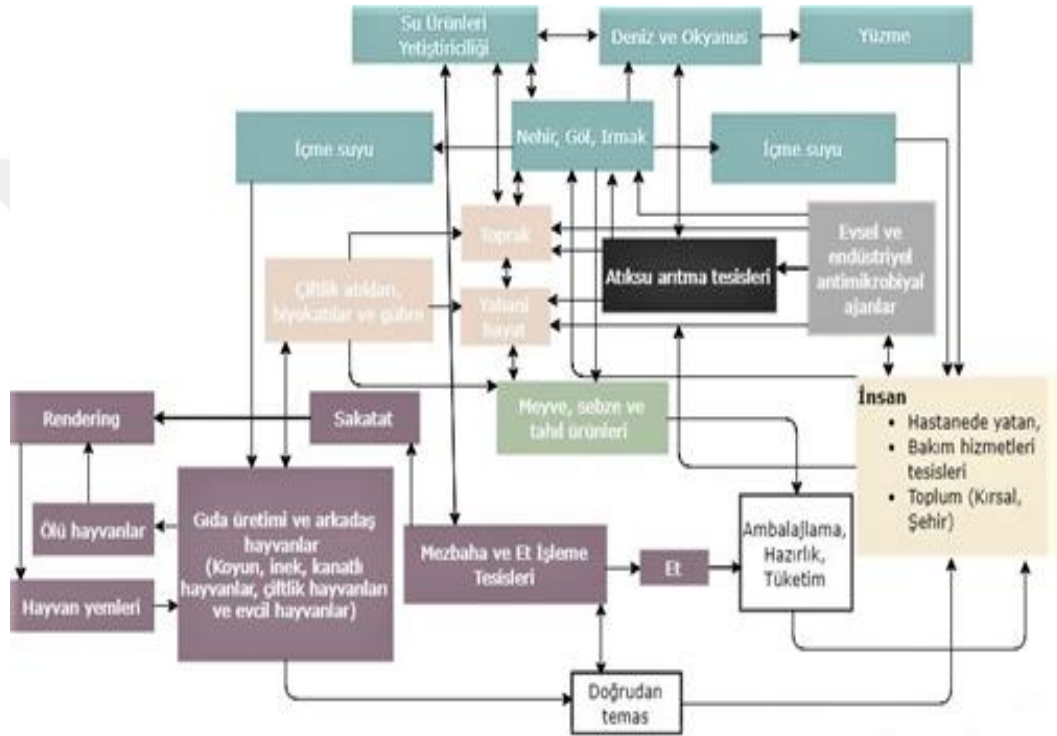
## **2.8. Çevrede Antibiyotik Taşınımı ve Rezistom Ağı**

Antimikrobiyal direncin (AMD) yayılmasında ve antibiyotiklerin seçici baskı oluşturmada çevre, rezervuardır. Çevrede AMD yayılma yollarını su, toprak, gıda, hava olarak sınıflandırırsak, su yolu ile taşınım başta yer almaktadır. Güvenli içme suyu temini için su, çoklu arıtma bariyerlerinden geçirilerek arıtma tesislerinde arıtılmaktadır. 20. Yüzyılda güvenli içme suyu sadece filtrasyon ve klorlama ile elde edilirken 21. yüzyılda su altyapı sistemleri artan sayıda ve çeşitlilikte kontaminantlara maruz kalarak suyun arıtma teknolojileri ile kontaminantlarından arındırılmasında yetersiz kalmaktadır (Pruden, 2014). Su kaynaklarında kontaminant varlığı halk ve çevre sağlığı için potansiyel risk oluşturmaktadır (Richardson ve Ternes, 2014). Ülkelerde, çeşitli sektörlerden açığa çıkan kirleticiler için düzenlemeler mevcut iken bazı petrol katkı maddeler, sürfaktanlar, endokrin bozucular ve farmasötikler, kişisel bakım ürünleri (PPCP) regüle edilmemiş kirleticiler arasındadır (Pico ve Barcelo 2015). Son yıllarda çeşitli çevrelerde hızla artan farmasötikler ve kalıntıları, özel kontaminantlar arasında sınıflandırılmaktadır. Birçok farmasötik ürün, arıtma

tesislerinde tam olarak arıtılmadan çeşitli su kolonlarına deşarj edilmektedir. İz miktardaki bu ilaçlara ve/veya bunların birçoğunun karışımından oluşan kirleticilere sürekli maruz kalmanın aquatik canlılar, insan ve çevre sağlığı üzerine oluşturduğu risk hakkında günümüzde neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir. Kişisel bakım ürünleri, antibiyotik vb. gibi kirleticiler, belirli bir zaman dilimi içinde fark edilmemektedir. Birçoğunun birlikte kümülatif etki oluşturabilme ihtimali bu kirleticilerden kaynaklanan etkinin tespitini güçleştirmektedir (Cizmas ve ark., 2015; de Jesus Gaffney ve ark., 2015; Li, 2015). Farmasötikler arasında, en önemli grubu oluşturan anitibiyotikler; sulfonamidler, makrolidler,  $\beta$ -laktamlar, penisilinler, arsenikaller ve aminoglikozidler gibi kategorilerden oluşmaktadır (Fatta-Kassinis ve ark., 2011). Tarım ve ziraatta kullanılan antibiyotikler, veterinerlik tıbbında, meyve ve tahıllarda biyosit olarak çiftlik hayvanlarında yaygın gıda ek ürünü olarak kullanılmaktadır (Silbergeld ve ark., 2008). Tarım ve ziraatın rezistom yayılım ağında nasıl etkili olabileceğine dair iyi bir örnek teşkil eden, Amerikan Mikrobiyoloji Derneği (ASM Microbe, 2019)'nin yıllık toplantısında sunulan çalışmada Marlene Maeusli, “marul-fare modeli” deneyi ile bitki besinlerinin bağırsak mikrobiyomuna antibiyotik direnci iletmek için nasıl araç olarak hizmet ettiklerini göstermiştir. Araştırmacı, gıda zinciri perspektifinden antibiyotik direnci ele alındığında dirençli süper-organizmalar için özellikle sindirim sisteminde kolonizasyon riskini ifade etmektedir. Antibiyotiğe dirençli süper-organizmaların bitkilerden insana yayılması, kontamine sebzeler yedikten hemen sonra ortaya çıkan ishal salgınlarından farklı olduğunu, süper-organizmaların bağırsaklarda aylarca, hatta yıllarca aseptik (veya "kolonize olabilir") olarak gizlenebileceğini, daha sonra bağırsaktan kaçtıklarında idrar yolu enfeksiyonu gibi bir enfeksiyona neden olduklarında ancak tespit edilebildiğini bildiriyor. AMD kontrolünde tüm gıdalar için “güvenli gıda” pratiklerinin iyileştirilmesi önemli bir basamaktır ve bu basamağın başlangıç noktası da ekosistem sağlığına bütüncül bir bakıştır. Araştırmacı, çalışmalarda tek sağlık bakış açısının önemini "Çevre ve insan sağlığı -tarım ve mikrobiyomlar aracılığıyla- ayrılmaz bir şekilde birbirine bağlıdır." belirtmektedir (ASM Microbe, 2019).

İnsan ve hayvan atıklarında çoğunlukla metabolize olmadan çevreye deşarj edilen antibiyotiklerin kaderi, biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır. Antibiyotikler, çevrede varlıklarını sürdürerek su kaynaklarında tanımlanabilirler. Yüzey sularında antibiyotiklerin artışı mikroorganizmaların evrimine sebep olarak

antibiyotik dirençli bakterilerin ve direnç genlerinin artışı ile hem ekoloji hem de insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Klinik önemi olan Antibiyotik Dirençli Bakterilere (ADB) örnek olarak *Enterococcus*lar, *Klebsiella pneumonia* ve *Pseudomonas* spp. örnek verilebilir (WHO-CAESAR, 2019). Antibiyotik Direnç Genleri (ADG) bakteriler arasında yayılarak, doğal çevreden ve içme suyu kaynaklarından insan ve hayvanlara yayılma kapasitesine sahiptir. ADG, sedimentler, göller, nehirler, topraklar, atıksu arıtma çıkış suyu gibi çok geniş çevresel matrislerde (Şekil 2.1) bulunabilir (Davies ve Davies, 2010).



**Şekil 2.1.** Antibiyotik ve rezistom yayılımının kompleks etkileşim ağı (Davies ve Davies, 2010 ten uyarlanmıştır).

## 2.9. İçme Suyunda Mikrobiyal Direnç

İçme suyu, nihai tüketiciye ulaşana kadar mikrobiyal kararlılığını koruma amaçlı kalıntı dezenfektan (serbest klor, klor dioksit, monokloramin) uygulaması birçok ülkede yapılmaktadır. Su endüstrisinde yaygın kullanım alanı olan klor ile dezenfeksiyon, etkili ve kolay sonuç alınabilecek biyosidaller arasındadır. Sucul sistemlerde, serbest bulunan klor, öncelikle HOCl ve konjugat bazı OCl<sup>-</sup> olarak bulunur (pKa = 7,5; 25°C). Bu haliyle, [HOCl]'ün [OCl<sup>-</sup>]'ye oranı pH ile düzenlenmektedir. HOCl, OCl<sup>-</sup> ile kıyaslandığında tipik olarak çok daha iyi bir oksitleyici ajan ve dezenfektandır. Organik kimyasallarla reaksiyona yönelik yollar

oksidasyon, ekleme ve elektrofilik süstitüsyon ile gerçekleşir. İnorganik kimyasalların klorlanması tipik olarak HOCl'in elektrofilik saldırısı ile gerçekleşir. Biyolojik moleküller içeren bir çözelti klorlandığında, HOCl, nükleobazlar, amin, organosülfür veya amino asitlerin aromatik kısımları ve glutatyonun sülfhidril kısmı dahil olmak üzere seçilmiş fonksiyonel gruplarla hızla reaksiyona girer. HOCl, peptidlere bağlı amino asitlerin amid grupları ile ihmal edilebilir reaktivite gösterir, bu nedenle sadece peptitoglikan veya proteinlerdeki N-terminal amino asitler veya serbest organosülfür, tirozin, triptofan, histidin, sistein, metionin aromatik veya amin yan zincirleri veya proteinlerdeki lizin gruplarının HOCl ile reaksiyona girmesi muhtemeldir (Dodd, 2012; Sharma, 2013). HOCl, serbest TMP, dGMP ve UMP ile çok reaktiftir, ancak çift sarmallı DNA ile daha az reaktiftir (Prütz, 1996, 1996; Dodd, 2012). HOCl hücre duvarı bileşenleri ile reaksiyona girer fakat aynı zamanda sitoplazmaya geçer ve DNA ile reaksiyona girer. Hücrelerin içindeki ADG'nin deaktivasyonun, genellikle su arıtımı için kullanılan Temas Süresi (Contact Time, CT)'nin üst sınırında klora ihtiyaç duyması muhtemeldir. Dezenfeksiyon sırasında bakterilerin inaktivasyonu, hücre içi ADG'nin deaktivasyonunu garanti etmeyebilir (Dodd, 2012). Birçok çalışma, bakterilerin 4-log veya daha fazla inaktivasyona maruz kalmasından sonra bile, DNA'nın dönüştürücü aktivitesinin en azından bir kısmının kaldığını tespit etmiştir (Shih ve Lederberg, 1976; Roller ve ark., 1980; Dodd, 2012). Hücrelerin içindeki ADG'yi devre dışı bırakmak için, dezenfektan, diğer hücre bileşenlerine kapsamlı bir şekilde bağlanmadan hücre membranından DNA'ya taşınmalıdır, bu nedenle ADG içeren DNA ile reaksiyona girmesi için hücre içinde yeterli miktarda bulunmalıdır (Dodd, 2012).

Su Güvenliği Planı Manuel Kitabı (Bartram ve ark., 2009) ve DSÖ İçme Suyu Kalitesi Kılavuzlarına (WHO, 2011) göre tehlike tanımları, tehlikeli olaylar ve risk aşağıdaki gibi tanımlamaktadır:

İçme suyu dağıtım sisteminde su kalitesini etkileyen faktörler (Şekil 2.2) ve potansiyel tehlikeleri aşağıda özetlenmiştir.

Tehlike, zarar verme potansiyeline sahip biyolojik, kimyasal, fiziksel veya radyolojik bir ajandır.

Tehlikeli bir olay, tehlikenin varlığına neden olabilecek bir olay veya durumdur (ne olabilir ve nasıl olabilir).

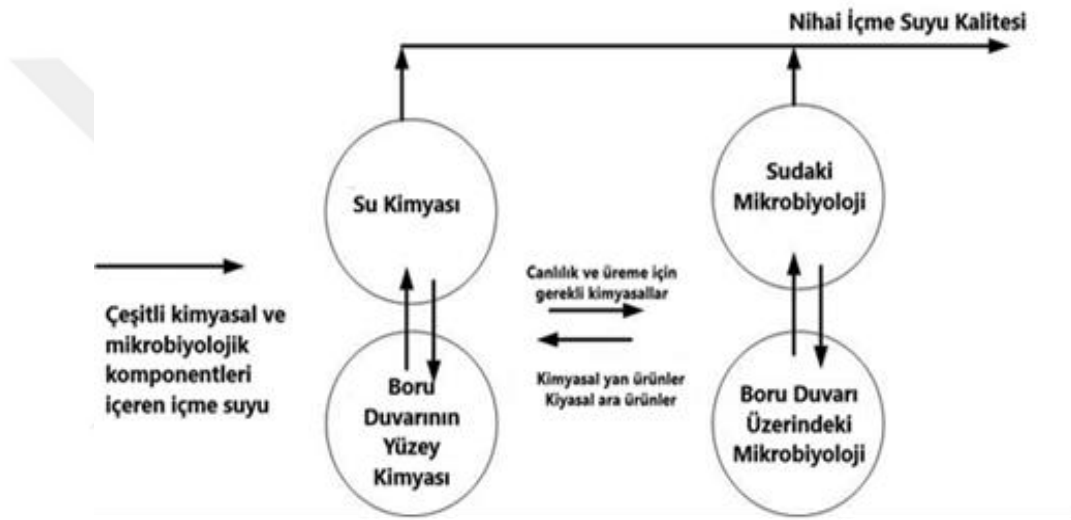
Risk, belirli bir zaman diliminde maruz kalan popülasyonlarda zarara neden olan, bu zararın büyüklüğü ve/veya sonuçları da dahil olmak üzere belirlenmiş tehlikelerin olasılığıdır.

## **2.10. Mikrobiyal Tehlikeler**

İçme suyu dağıtım sistemlerinde bulunan mikroorganizmaların çoğu zararsızdır. Dağıtım sistemlerinde biyo-bozunur organik madde konsantrasyonu, su sıcaklığı, boruların yapısı, kalıntı dezenfektan konsantrasyonu, dağıtım sistemi içinde mikroorganizmaların bulunma süresi gibi faktörler, yeniden çoğalmalarına sebep olarak çeşitli problemlere neden olabilmektedir. Mikrobiyal üreme ve aktivite suda estetik problemlere (tat ve koku gibi) sebebiyet verebilir ve halk sağlığını tehdit edecek risk oluşturabilir (Skjevrak ve ark., 2004; Wingender ve Flemming, 2011). Tesisat borularında biyofilm oluşumu işletme problemlerine (basınç düşmesi ve boru korozyonu gibi) sebep olabilir (Liu ve ark., 2016). Bu sebeple “biyolojik olarak kararlı (stabil)” içme suyu üretmek önemlidir (Rittman ve Snoeyink, 1984; van der Kooij, 2000). DSÖ’nün iyi kalitede içme suyu tanımı, “Dağıtım sistemine giren su, mikrobiyolojik olarak güvenli ve ideal olanı da biyolojik olarak kararlı olma durumu” olarak ifade edilmektedir (WHO, 2006). Bu bağlamda “biyolojik kararlılık” terimi, içme suyu üretimi noktasından tüketim noktasına kadar mikrobiyal su kalitesinin korunmasını ifade etmektedir. Biyolojik kararlılık, teorik kavramdır ve arıtma tesislerinde işletme hedefidir. Dağıtım sisteminde biyo-kararlılık, genellikle sisteme dezenfektan eklenmesi ve dezenfektan kalıntılarının sürekliliğinin sağlanması ile canlı bakterilerin varlığını ortadan kaldırmak şeklinde uygulanır (Power ve ark., 1997; Zhang ve DiGiano, 2002). Fakat klor gibi dezenfektanlar, sadece geçici bir etkiye sahiptir. Klor varlığı nekrotrofik ve heterotrofik büyüme sırasında biyolojik olarak kararsız bir sisteme neden olabilecek ölü organik maddenin mevcudiyeti ile sonuçlanabilir. Klorlama, başlangıçta toplam bakteri sayısını azaltabilir fakat uzun vadede bakterilerin sağkalım oranının arttırarak antibiyotiğe dirençli bakteri oranını önemli ölçüde arttırmış olabilir (Murray ve ark., 1984). Biyo-kararlılık bozulduğunda, patojen mikroorganizmalar dağıtım sistemine girerek yaşamlarını sürdürebilir ve bazı durumlarda çoğalarak su kaynaklı salgınların potansiyelini arttırabilir. Fekal kontaminasyon, bulaşıcı mikroorganizmaların ortak kaynağıdır. Bu mikroorganizmalar, insan ve diğer sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarında doğal olarak bulunan bakteri, virüs ve parazitlerden oluşmaktadır. Dağıtım sistemi suyunun

fekal kontaminasyonu, fekal kirletici maddelerin sisteme çeşitli yollardan -kesik şebeke, izinsiz giriş, çapraz bağlantılar veya depolama tanklarındaki açıklıklar- girişi ile gerçekleşir (USEPA, 2006). Ek olarak, inşaat, kanalizasyon hatlarına yakın yeni boru tesisatı ve onarımları dağıtım sistemine kirlenmeye neden olabilir. Fekal patojenlerin varlığı, sistemde indikatör bakterilerin izlenmesi ile tespit edilebilmektedir. DSÖ İçme Suyu Kalitesi Rehberi (WHO, 2011), *E. coli* 'yi indikatör olarak kabul etse de termotolerant koliformların da alternatif olarak izlenebileceğini belirtmektedir. Sisteme giren çevresel mikroorganizmalar, özellikle de su debisinin düşük olabileceği durumlarda dağıtım sistemlerinin nihai noktalarında biyofilmler oluşturarak, içme suyu borularına ve diğer yüzeylere bağlanabilir ve çoğalabilir (Power ve Nagy, 1999; National Research Council, 2006; USEPA, 2006). Biyofilmler, organik ve inorganik kirletici maddelerin yanı sıra partikül ve kolloidal maddeyi bağlayabilen ve biriktiren birçok sorpsiyon bölgesini içermektedir. Hücre dışı polimerik maddeler (LPS) olarak da bilinen bu maddeler, mikroorganizmaları, predasyon, kuruma, akı değişimleri ve dezenfektanlar dahil olmak üzere biyolojik, fiziksel, kimyasal ve çevresel strese karşı korur (USEPA, 2006; Wingender ve Flemming, 2011). Örneğin, virüsler ve protozoan kistleri veya oositler çoğalmak için uygun sıcak kanlı konakçılara ihtiyaç duysalar da biyofilmlere dahil olmaları hayatta kalma sürelerini uzatabilir. Biyofilmler oluştuktan sonra sistemin tüm parçalarından çıkarılmaları oldukça zordur. Biyofilmler, dezenfektanlara karşı dirençli olabilirler. Mikrobiyal biyofilm üremesini kontrol eden faktörler: sıcaklık, su sertliği, pH, redoks potansiyeli, çözünmüş karbon, kalıntı dezenfektanlardır. Biyofilm organizmaların büyük çoğunluğu patojenik değildir, ancak bunlar serbest yaşayan ve fırsatçı patojenleri içerebilmektedir (National Research Council, 2006; WHO, 2011). Biyofilmlerdeki serbest yaşayan heterotrofik bakterilerin, mantarların, protozoaların, nematodların ve kabuklu hayvanların çoğunun içme suyu tüketicileri için riskli olmamalarına rağmen, etkinlikleri tat ve koku sorunları üretebilir, dezenfektan talebini artırabilir ve korozyona katkıda bulunabilir (National Research Council, 2006). Su ile ilişkili hastalıklarla bağlantılı patojenler arasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Aspergillus fumigatus* vb. gibi mikroorganizmalar bulunmaktadır (Fraser ve ark., 1989; Horsburgh, 1991; National Research Council, 2005; Peleg ve ark., 2008; WHO, 2011; Wingender ve Flemming, 2011; CDC, 2014). Bunlardan *Legionella* sp. giderek

artan bir endişe kaynağıdır (CDC, 2011). Bina sıhhi tesisat sistemlerindeki *Legionella* konsantrasyonlarının artması, riskin artmasına büyük katkı sağlar, ancak dağıtım sistemleri, orijinal inokulumun kaynağını temsil etmektedir (WHO, 2011). Avustralya, Pakistan ve ABD'de ölümlere neden olan serbest yaşayan patojen *Naegleria fowleri*, biyofilmlerde, özellikle ısınmaya duyarlı dağıtım sistemlerinde de hayatta kalabilir ve çoğalabilir (Dorsch ve ark., 1983; Shakoor ve ark., 2011; CDC, 2014). Biyofilmlerde büyüyen mikroorganizmalar daha sonra akış hızındaki dalgalanmalar vb. gibi çeşitli koşullar altında bulundukları boru duvarlarından ayrılarak suya karışmaktadır ve potansiyel su kirliliği kaynağını temsil etmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Su kalitesini etkileyen kimyasal ve biyolojik bileşenler.

## 2.11. Kimyasal Tehlikeler

Dağıtım sistemlerinde suyu kontamine edebilecek birçok kimyasal tehlike bulunmaktadır. Bu kimyasal maddelerin başlıcaları, dezenfeksiyon yan ürünleri (DBP), trihalometanlar (THM) ve beş haloasetik asit (HAA5)'tir. Bununla birlikte, bromat, klorat veya N-nitrosodimetilamin (NDMA) gibi diğer DBP'ler, ozon, klor dioksit ve kloraminler gibi diğer dezenfektan türleri de kullanıldığında dikkate alınmaları gerekmektedir (WHO, 2011). Yeni DBP tehlikeleri ve iyi bir şekilde endekslenmemiş THM'ler veya HAA'ların etkisi önemli olabilir. İyotlu DBP'ler yeni ortaya çıkmakta olan bir konudur (Krasner, 2009; Du ve ark., 2013). Bu sebeple dezenfeksiyon yan ürünleri ile ilgili literatürde yayınlanan yeni araştırma bulguları için güncel kalınmalıdır. İçme suyu dağıtım sistemlerinde içme suyuyla temasta olan materyaller, suya halk sağlığına zarar veren ajanları sızdırabilir (Flournoy ve ark.

1999). Birçok ülkede eski tesisat problemi olarak kurşun, borulardan, kurşun servis hatlarında, boru bağlantı bileşiklerinden ve lehimli bağlantılardan, pirinç ve bronz tesisat tesisatlarındaki kurşun ve kazalarda, vana parçalarında veya su arıtma tesislerinde kullanılan contalarda içme suyuna sızarak problem olmaya devam edebilmektedir (Lytle ve Schock, 1996; Morran ve ark., 2009, 2011). Son 90 yılda boru malzemeleri geliştirilmeye devam ederek tesisat malzemeleri ile ilgili çeşitli standartlar yürürlüğe konmaktadır. Su arıtma kimyasalları, içme suyu kalitesini arttırmak için kullanılır; fakat çok yüksek bir konsantrasyonda kullanılırsa tehlikeli de olabilirler. Ayrıca bu kimyasalları eser miktarda tehlikeli kirletici madde içerebilir. Bunlar içinde çeşitli ülkelerde bazı standart ve düzenlemeler mevcuttur.

## **2.12. Fiziksel Tehlikeler**

Fiziksel tehlikeler, renk, koku ve bulanıklık gibi suyun organoleptik özelliklerini etkileyen kontaminasyonu ifade eder. Sedimentler, dağıtım sistemlerinde tortu, renk ile ilişkili problemlerin kaynağı olabilir. Tortular, zararsız kum parçalarından ağır metal içeren tortulara kadar değişkenlik gösterebilir; bazı durumlarda tortu, su ana hattında ciddi mikrobiyal veya kimyasal kirlenmeye neden olabilecek bir kırılmaya işaret edebilir. Kükürt, çürük yumurta, küf, balık veya toprağa benzer koku veya kokular içme suyunda ortaya çıktığında, bakteriyel kontaminasyon veya bakteri üremesi belirtisi olabilmektedir (Schock ve ark.,1995; Benjamin ve ark., 1996).

Yukarıda geniş bir perspektifle değinilen konularda da belirtildiği gibi bakteriler bulundukları habitatlarda ortam koşullarına göre farklı yaşam formlarında bulunurlar. Küçük koloni oluşturma, biyofilm formu, L-form, toleran türler ve persistanlar literatürde yer alan tanımlamalardır. Bu yapıda bulunmaları klinik ve çevresel örneklerden izolasyonu zorlaştırmakta, tanımlama problemlerine sebep olmaktadır. L-form bakterilerin boyutu, ultrafiltrasyon dahi geçebilecek küçük yapıdadır. İleri arıtma teknolojileri ile suyun arıtılması da dahil mevcut arıtma teknolojileri, suyu mikrobiyolojik açıdan ne kadar güvenli yapar? sorusuna cevap aramak erken uyarı sistemi oluşturmak açısından önem arz etmektedir.

## **2.13. Tezin Amacı**

Bu araştırmanın amacı, su yönetiminde bütüncül bir "Tek Su" perspektifi kullanarak ortaya çıkan veya endişe oluşturan mikrobiyal kirleticilerin (CoECs: Fırsatçı



patojenler -FP- ve Antimikrobiyal direnç genleri -ADG-) yayılmasına katkıda bulunan belirli yayılma yollarını ve faktörlerini belirlemektir. Spesifik hedefler şunlardır:

1. ADG'lerinin taşınmasında ve yayılmasında içme suyu tedarik zincirinin rezervuar rolünün değerlendirilmesi,
2. İçme suyu dağıtım sisteminde suyun biyolojik kararlılık durumu, mikrobiyal toplulukların mekânsal ve zamansal dinamiğinin değerlendirilmesi,
3. İçme suyunun FP'lerin büyümesini destekleme kapasitesini karakterize etmek.

#### **2.14. Hipotez**

Belirli bir ortamdaki akuatik toplulukların kompozisyonunu ve çeşitliliğini, metabolik aktifliğini, direnç gelişimi, yeniden üreme yeteneklerini, fizyolojik statülerini (biyofilm, VBNC, planktonik yapı) çevresel değişkenler ve stres (abiyotik, biyotik) koşulları yönlendirir.



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Suyun Örneklenmesi**

Dağıtım sistemi ve sıhhi tesisat suyunu örneklemek için genellikle üç ardışık adım kullanılır: bir musluğu veya valfi açmak, akış hızını ayarlamak ve sterilize edilmiş numune kabı kullanarak öngörülen miktarda su toplamaktır. Sodyum tiyosülfat, genellikle kaynak su dezenfektan içerdiğinde kalıntı klor ve diğer halojenleri nötralize etmek için kullanılmaktadır (CDC, 2005). Temsili bakteriyel numune için örnek hacmi, hedef organizmaların beklenen konsantrasyonlarına ve uygulanan yöntemlerin tespit sınırına bağlı olarak 50 mL ve 1L arasında değişebilmektedir (Ferroni ve ark., 1998; Halabi ve ark., 2001; Lavenir ve ark., 2008; van der Wielen ve van der Kooij, 2013). Tez kapsamında da her kaynaktan 50 mL ve 1L arasında numune toplanmıştır. Düşük biyokütle seviyesi söz konusu olduğunda büyük hacimlerde (yani 5-10 L) numune toplanmıştır. (Barbaree ve ark., 1987; U.K. Department of Health, 2005).

#### **3.2. Numunenin Korunması ve Taşınması**

Önerilen koruma prosedürleri, depolama sıcaklığı ve bekletme süresi açısından farklı belgelerde önemli ölçüde değişiklik gösterir. Örneğin, Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) 24 saat içinde işlenemeyen numunelerin soğutulmasını gerektirdiğini bildirirken (ISO, 2004); CDC ve Amerikan Test ve Malzemeler Topluluğu (ASTM) sadece örnekler 72 saat içinde işlenemezse (CDC, 2005) soğutma önermektedir, ancak aşırı sıcak veya soğuktan koruma (yani  $<3^{\circ}\text{C}$  ve/veya  $>30^{\circ}\text{C}$ ) her zaman gereklidir (ASTM, 2008). İngiltere Çevre Ajansı, hücrelerin nakliye sırasında VBNC duruma girmesini önlemek ve 48 saat içinde konsantrasyon ve inkübasyon prosedürlerine başlamak için 6 ila  $20^{\circ}\text{C}$  arasında numunelerin korunmasını önerir (U.K. Environmental Agency, 2005). Koruma gereksinimlerindeki değişiklik muhtemelen sıcaklığın ve bekleme sürelerinin hücre ekilebilirliği ve yeniden üreme potansiyeline yönelik belirsizlik olmasından kaynaklanmaktadır. Çalışma kapsamında toplanan numuneler,

laboratuvara soğuk zincir ile transferi sağlanarak soğuk odada (4°C) bekletilip maksimum 48 saat içinde işleme alınmıştır.

### **3.3. Konsantrasyon Yöntemleri**

İçme suyu otokton florası, mikroorganizmalar için spesifik olmayan yaklaşımlar ile (süzme ve santrifüjleme) genellikle 50 ila 1000 mL arasında değişen miktarlarda su numunesi ile konsantre edilmektedir. Filtrasyon yöntemi, düşük bulanıklığa sahip su numuneleri için uygun bir konsantrasyon yöntemidir. Genellikle su, daha sonra kültüre edilmek üzere veya DNA ekstraksiyonu için 0,22 veya 0,45 µm'lik bir membrandan (Bartie ve ark., 2001; CDC, 2005) süzülür veya hücreler, sonikasyonla veya filtrenin az miktarda su içinde vortekslenmesi ile resüspanse edilir (Bartie ve ark., 2001; CDC, 2005; Thomas ve ark., 2008). Tez kapsamında moleküler analiz için numuneler 0,45 µm karışık selüloz esterler içeren membran filtreler (Millipore, Billerica, MA) üzerinde konsantre edilmiştir.

### **3.4. Konsantre Numunelerin Korunma Yöntemleri**

Numuneler moleküler analiz için kullanılacaksa DNA/RNA ekstraksiyonuna kadar doğrudan -20°C veya daha düşük sıcaklıkta tutulması önerilmektedir (Eichler ve ark. 2006). Çalışma kapsamında konsantre edilmiş numuneler -20°C'de depolanmıştır. Daha sonra FastDNA SPIN Kiti (MP Biomedicals, Solon, OH) kullanılarak DNA ekstrakte edilmiştir.

### **3.5. Numune Alma Noktaları**

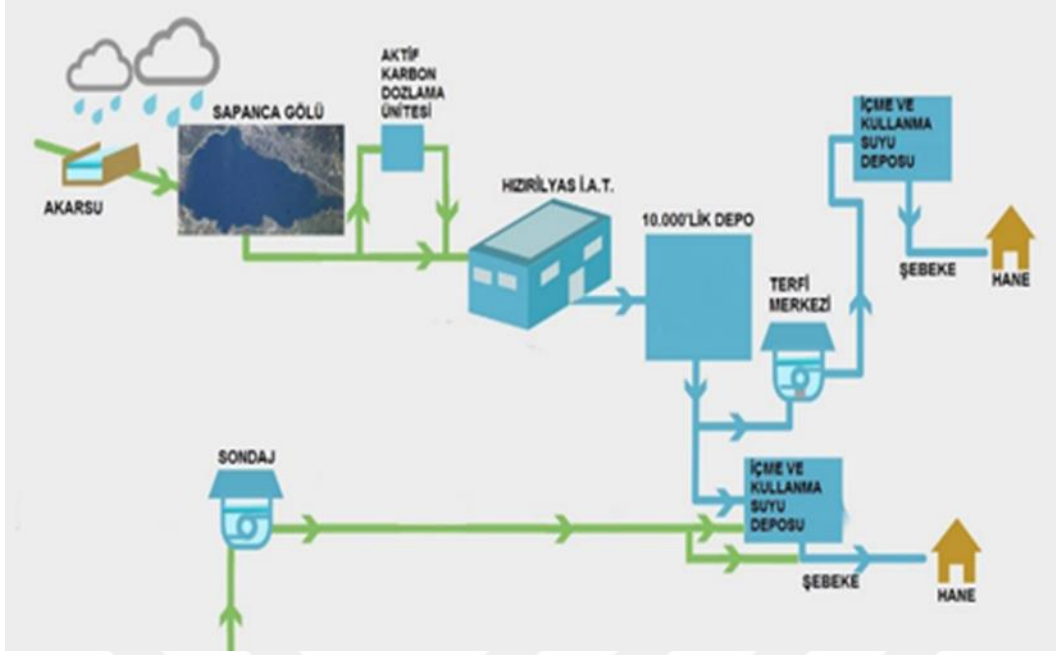
Numune sayıları, numune alma sahaları ve sıklığı, numune hacmi, bekletme süresi gibi faktörler oldukça ampiriktir. Literatürde çalışmaların çeşitliliği, metodolojik tutarsızlıklar, örnekleme sonuçlarında değişikliklere yol açarak grup arası karşılaştırma yapmayı güvenilirmez kılar. Fakat bazı FP için çeşitli örnekleme stratejileri mevcuttur. Tezde numune alma stratejisi FP de dikkate alınarak sıhhi tesisat mikrobiyel ekolojisinin daha iyi anlaşılması, örnekleme protokollerinin iyileştirilmesine yardımcı olması açısından bazı modifikasyonları da kapsamaktadır. Bu kapsamda planlanan numune alma noktaları aşağıda belirtildiği gibidir.

2 yıl süresince, Sapanca Gölü, Hızırilyas İçmesuyu Arıtma Tesisi ve İçme Suyu Dağıtım Sistemi (Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023 ve Aralık 2023) olmak üzere

4 dönemde numuneler alınmıştır. Örnekleme noktaları; Sapanca Gölü 5. istasyondan-iki farklı derinlikten, Göl suyunun depolandığı keson, arıtma tesisi giriş-çıkışından, arıtma tesisine yakın, orta ve uzak noktaları temsil edecek şebekeden, Sakarya Üniversitesi Merkezi depo giriş-çıkışı ve 3 farklı bina yaşına sahip musluk sularından olmak üzere toplam 15 farklı kaynaktan alınmıştır (Tablo 3.1.). Hızır İlyas Arıtma Tesisine gelen içme suyunun kaynağı, Sapanca Gölü 15 metre derinlikten çekilen su ve Akçay'dan gelen ham su olarak iki farklı kaynaktan temin edilmektedir. Ham suyun bulanıklığına bağlı olarak AT girişinde koagülant (Poli Alüminyum Hidroksit Sülfat), Polielektrolit ve sıcak yaz aylarında toz aktif karbon dozlanmaktadır. Arıtma Tesisinde fiziksel ve kimyasal proseslerle arıtılan su, klorlama yapılarak içme suyu dağıtım sistemi ile nihai kullanıcıya ulaştırılır (Şekil 3.1).

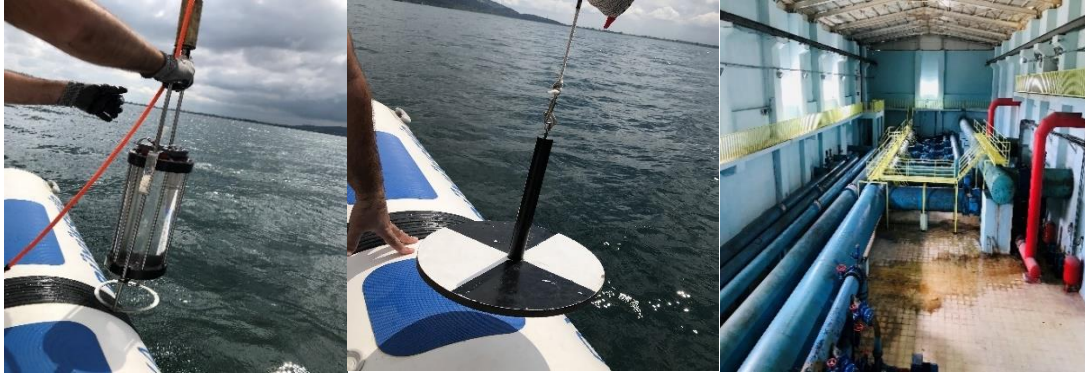
**Tablo 3.1.** Numune alma noktaları

| Kod No | Kaynaklar                                                                                       |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Sapanca Gölü - Keson (SG-Keson)                                                                 |
| 2      | Sapanca Gölü - 5. İstasyon (25m) (SG-25)                                                        |
| 3      | Sapanca Gölü 5. İstasyon (15m) - Suyun çekildiği derinlik (SG-15)                               |
| 4      | Arıtma Tesis Giriş (AT-Sapanca Giriş)                                                           |
| 5      | Arıtma Tesis Çıkış (AT-Akçay Giriş)                                                             |
| 6      | Arıtma Tesis Depo Çıkış (AT- Karışım)                                                           |
| 7      | Serdivan 4000 m <sup>3</sup> Depo Giriş - AT'ne yakın nokta (AT-Depo -Çıkış)                    |
| 8      | Serdivan 4000 m <sup>3</sup> Depo Çıkış - AT'ne yakın nokta (Serdivan Depo Çıkışı)              |
| 9      | Karaman 2000 m <sup>3</sup> Depo Çıkış Terfi Merkezi - AT'ne orta uzaklık (Karaman Depo Çıkışı) |
| 10     | Kaynarca 800 m <sup>3</sup> Depo Çıkış Takviyeli - AT'ne uzak nokta (Kaynarca Depo Çıkışı)      |
| 11     | SAÜ Depo Çıkışı                                                                                 |
| 12     | SAÜ Bilişim Fakültesi Çok Kullanılan Bayan WC - Yeni Bina (YB-ÇK)                               |
| 13     | SAÜ Bilişim Fakültesi Az Kullanılan Bayan WC - Yeni Bina (YB-AK)                                |
| 14     | SAÜ M8 Su ve Atıksu Laboratuvar Az Kullanılan Acil Duş - Eski Bina (EB-AK)                      |
| 15     | SAÜ M8 Su ve Atıksu Laboratuvar Çok Kullanılan Lavabo - Eski Bina (EB-ÇK)                       |



Şekil 3.1. Su temin zinciri.

Grap numuneler, lokasyon bazında her noktadan (göl, dağıtım sistemi, bina sıhhi tesisatı vb. gibi) 292 mg etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve 48 mg sodyum tiyosülfat/litre içeren 1/L polipropilen steril numune kaplarında 10 tekrarlı (10x1L) toplanmıştır (Garner ve ark., 2018) (Şekil 3.1) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Numune toplama.

### 3.6. Mikrobiyolojik Parametreler

#### 3.6.1. Membran filtrasyon yöntemi

Oligotrofik çevre olan içme suyu ortamı, nispeten az sayıda bakteri konsantrasyonuna sahip olduğu varsayılmaktadır. Bu sebeple sudan yüksek bakteri geri kazanım oranı elde edilebilmesi için numunelerin konsantre edilmeleri gerekmektedir. MF (Membran filtrasyon) yönteminde numune hacmi, mikroorganizma konsantrasyonuna ve su kalitesine bağlı olarak, 1,0 mL – 10 L arasında değişmektedir. Su numunesi genellikle

vakum pompa ile 0,45 µm'lik steril filtreden süzülerek uygun besiyerinde inkübe edilmektedir. Bu teknik, bakteri seviyesi düşük (10 KOB/mL'den daha düşük HPC'ler) ve bulanıklığı az olan yüksek hacimli sular için idealdir (Allen ve ark., 2004; Reasoner, 2004; APHA, 2005). MF yöntemi için literatüre ve standartlara uygun şekilde 0,45 µm por çapına sahip filtreler kullanılmıştır.

### **3.6.2. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu – qPCR**

#### **3.6.2.1. Numune hazırlığı ve DNA ekstraksiyonu**

Aseptik koşullarda 1000 mL steril plastik numune kaplarına toplanan numuneler, 47 mm çapında, 0,45 µm (GSWG047S6 Millipore S-Pak) karışık selüloz ester filtre ile konsantre edilmiştir. Mikrobiyal DNA, FastDNA™ SPIN Kit (MP Biomedicals, US) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Filtreler, üreticinin talimatlarına göre aseptik koşullarda kesilip kitin boncuklu tüpüne aktararak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen DNA'ların miktar tayini, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) ile yapılmıştır.

Tüm qPCR deneyleri daha önce yayınlanmış primerler ve PCR koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2). PCR inhibisyonunun etkisini en aza indirmek için PCR optimizasyonu yapılmıştır. Tablo 3.2'de yer alan gen bölgeleri, *Mycobacterium* spp için 179 16S rRNA geninin oldukça spesifik bir bölgesi (Radomski ve ark., 2010) ve *Pseudomonas aeruginosa* için *ecfX* ve *gyrB* genleri tespit amacıyla seçilmiştir (Anuj ve ark., 2009).

Antimikrobiyal direnç genleri (ADG) için kinolon direnç geni *qnrA* (Colomer-Lluch ve ark., 2014) ve vankomisin direnç geni *vanA* (Dutka-Malen ve ark., 1995), sınıf 1 integron integraz geni *intI1* (Hardwick ve ark., 2008) ile birlikte evrensel bakteri geni analiz edilmiştir (Suzuki ve ark., 2000). Tüm prob içermeyen deneyler (16S rRNA genleri, *vanA*, *intI1*), üç tekrarlı 5 µL SsoFast EvaGreen SuperMix (Bio-Rad, Hercules, CA) içeren 10 µL reaksiyonlarda gerçekleştirilmiştir. 5 µM de 0,8 µL ileri ve geri primerler, 2,4 µL moleküler kalitede su ve 1 µL numune ile reaksiyon tamamlanmıştır. Tüm prob içeren deneyler (*Mycobacterium* spp., *P. aeruginosa*, *qnrA*), üç tekrarlı 5 µL SsoFast EvaGreen SuperMix (Bio-Rad, Hercules, CA) içeren 10 µL reaksiyonlarda gerçekleştirilmiştir. 5 µM 0,5 µL ileri ve geri primerler, 10 µL de 0,19 µL her bir prob ve 1 µL numune ile moleküler kalitede su ile reaksiyon tamamlanmıştır. qPCR analizi, kantitatif standart eğri metodu uygulanarak

gerçekleştirilmiştir. CT değerlerine göre lineer eğilim denklemi kullanılarak genlerin logaritmik miktarları hesaplanmıştır. Analizde  $10^1$ - $10^6$  aralığında kopya sayısından oluşan DNA miktarı on kat seri seyreltmeler yapılarak standart eğri oluşturulmuştur.

**Tablo 3.2.** qPCR primer, prob dizileri ve bağlanma sıcaklıkları.

| Gen                                       | Primer/Prob Dizisi (5'-3')                                                                       | Bağlanma Sıcaklıkları | Referans                      |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 16S rRNA<br>(universal)                   | F: CGGTGAATACGTTTCYCGG<br>R: GGTACCTTGTACGACTT                                                   | 55.0                  | (Suzuki ve ark., 2000)        |
| 16S rRNA<br>( <i>Mycobacterium</i> spp.)  | F: CCTGGGAACTGGGTCTAAT<br>R: CGCAGCTCACAGTTA<br>Prob: FAM-TTTCACGAACAACGCGACAACT-BHQ             | 55.0                  | (Radomski ve ark., 2010)      |
| ecfX<br>( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) | F: CGCATGCCTATCAGGCGTT<br>R: GAACTGCCCAGGTGCTTGC<br>Prob: HEX-ATGGCGAGTTGCTGCGCTTCCT-BHQ         | 60.0                  | (Anuj ve ark., 2009)          |
| gyrB<br>( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) | F: CCTGACCATCCGTCGCCACAAC<br>R: CGCAGCAGGATGCCGACGCC<br>Prob: FAM-CCGTGGTGGTAGACCTGTTCCAGACC-BHQ | 60.0                  | (Colomer-Lluch ve ark., 2014) |
| qnrA                                      | F: AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC<br>R: TGAAGTCTATGCCAAAGCAGTTG<br>Prob: FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-BHQ      | 60.0                  | (Colomer-Lluch ve ark., 2014) |
| vanA                                      | F: GGGAAAACGACAATTGC<br>R: GTACAATGCGGCCGTTA                                                     | 54.0                  | (Dutka-Malen ve ark., 1995)   |
| intI1                                     | F: CTGGATTTCGATCACGGCACG<br>R: ACATGCGTGTAATCATCGTCG                                             | 66.0                  | (Hardwick ve ark., 2008)      |

### 3.6.2.2. ATP biyoluminesans yöntemi

İçme suyunda çok sayıda canlı bakteri, VBNC (Canlı/Ölü ve Metabolik Aktif Fakat Kültüre Edilemeyen) formundadır (Kaeberlein ve ark., 2002; Oliver 2005; D'Onofrio ve ark., 2010; Hammes ve ark., 2011; Epstein 2013). Dezenfeksiyon uygulandığında VBNC bakterilerin canlılığının/aktivitesinin belirlenmesi özellikle önemlidir. ATP sadece yaşayan hücrelerde mevcut olduğu için, su kitlesindeki biyolojik aktivitenin ölçümü için kullanışlı metottur (Karl, 1980). Tipik olarak, içme suyunda toplam ATP konsantrasyonları 0,8 ila 12 ng ATP/L aralığında bulunur (Lautenschlager ve ark., 2010; Van der Wielen ve Van der Kooij, 2010). İçme suyunda biyo-kararlılığın



değerlendirilmesi için çeşitli çalışmalarda ATP ölçümleri başarı ile uygulanmıştır (van der Wielen ve van der Kooij, 2010; Vital ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014; Nescerecka ve ark., 2014).

Tez kapsamında su temin zincirinde VBNC formuna girme potansiyeli yüksek olan mikroorganizmaları belirlemek için ATP analizi ve hücre hasar tespit yöntemleri uygulanmıştır. Termotabil lüsisferaz sistemi, ATP ile reaksiyona girerek ışık üretilmesine neden olur (Şekil 3.3). Bu amaçla su numunelerinde ATP ölçümünde Water-Glo™ Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) ve GloMax® 20/20 Luminometer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kullanılmıştır (Şekil 3.4). Lüminesan sinyal, numunedeki aktif biyokütle miktarı ile ilişkili hücresel ATP miktarı ile doğru orantılıdır. Bu basit iş akışı, numune hazırlamada esneklik sağlamaktadır. Hassas reaktifler, çevresel faktörlere (örneğin saklama sıcaklığı, kimyasal inhibitörler) karşı dirençlidir. Mikrobiyal Su Test Kitinin içme suyunda dedeksiyon limiti 0,2 pg/mL ATP dir.



**Şekil 3.3.** Water-Glo™ teknolojisinin şematik diyagramı

Ortaya çıkan ışık, numunede bulunan ATP miktarıyla orantılıdır ve lüminometre ile bağlı ışık birimi (RLU) olarak ölçülebilmektedir (hassasiyet 1 pg/L ATP'ye kadar düşebilir). 1 pg ATP, üstel büyüme fazlarında 1.000 *E. coli* boyutundaki bakteride bulunan ATP miktarına eşdeğerdir. Diğer bir ifade ile bir *E. coli* yaklaşık 1 femtogram ATP içerir (Hattori ve ark., 2003). Water-Glo™ protokolüne uygun olarak Pozitif Kontrol için ATP Standardı (1.000 pg/mL), Negatif Kontrol için Lizis Reaktifi kullanılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır.

Numunelerin ATP değeri aşağıdaki denklem (3.1) ile hesaplanmıştır:

$$ATP \left( \frac{pg}{L} \right) = \frac{RLU_{numune} - RLU_{lisis\ reaktifi}}{RLU_{ATP\ standardı} - RLU_{lisis\ reaktifi}} \times \frac{V_{lisis\ reaktifi}}{V_{numune}} \times 1,000,000 \quad (3.1)$$

$$V_{lisis\ reaktifi} = 2\ mL$$

$$V_{örnek} = 1,000\ mL$$

Su sisteminde bir temel oluşturmak için ATP konsantrasyonunu düzenli olarak izlemek gereklidir. Yüksek ATP konsantrasyonu bulgusu, işletilen proseslerde eylemlere ihtiyaç olduğunu gösterebilir. Burada, ek izleme veya düzeltici eylemi garanti edebilecek çeşitli su numunesi türlerinin ATP konsantrasyonları için önerilen yönergeleri sunulmuştur (Tablo 3.3). Ancak, bireysel sistemler için ticari kitlerde kendi kriterlerinizin oluşturması önerilmektedir (Promega, Water-Glo™ System).



**Şekil 3.4.** GloMax® 20/20 Luminometer ile ATP Analizi.

**Tablo 3.3.** Tipik ATP değerlendirme yönergesi

| Su Tipi                                               | Kon<br>troll<br>ü<br>Pros<br>es<br>(pg/<br>mL<br>AT<br>P) | İlav<br>e<br>İzle<br>me<br>(pg/<br>mL<br>AT<br>P) | Düz<br>eltic<br>i<br>Aksi<br>yon<br>(pg/<br>mL<br>AT<br>P) | Giri<br>ş<br>Hac<br>mi/<br>Test<br>(mL<br>) |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| İçme suyu                                             | <0.5                                                      | 0.5 -<br>10                                       | >10                                                        | 2-20                                        |
| Ham su (tatlı, acı, tuzlu)                            | <10                                                       | 10 -<br>100                                       | >10<br>0                                                   | 2-20                                        |
| Soğutma suları (okside edici biyosidal kullanımı var) | <10                                                       | 10 -<br>100                                       | >10<br>0                                                   | 2-20                                        |
| Soğutma suları (okside edici biyosidal kullanımı yok) | <10<br>0                                                  | 100<br>-<br>1.00<br>0                             | >1.0<br>00                                                 | 2-20                                        |
| Yüksek saflıkta su                                    | <0.1                                                      | 0.1 -<br>1.0                                      | >1.0                                                       | 100                                         |

### 3.6.2.3. Hücre membranı hasar tespiti

İçme suyunda dezenfektana maruz kalan mikroorganizmaların hücre membranlarında muhtemel hasar olması beklenen bir sonuçtur. Mikroorganizmaların ölü/canlı mı olduklarını belirlemek için membran hasarını tespit etmek önemlidir. Bu kapsamda

floresan boyalarla boyanan bakteriler, floresans mikroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. Bakteriyel Canlılık Kiti (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA) protokolüne göre analiz edilen bakteriler, SYTO®9 boyası ve Propidyum İyodür (PI) nükleik asit boyası ile boyanarak inkübe edilmiştir. SYTO®9 floresan boya, sağlam veya hasarlı plazma membranından geçerken PI sadece hasarlı ve bozulmuş plazma membranından geçebildiği için nükleik asit bağlanma bölgeleri için SYTO®9 ve PI rekabet ederler. Böylece, sağlam membrana sahip hücreler, yeşil floresan verirken hasarlı hücreler kırmızı floresan verir. Hasarlı hücre membranına sahip hücreler ölü kabul edilir. Robben ve ark., (2019)'nın protokolüne göre yapılan çalışmada, 1ml bakteri örneği 5 dakika boyunca 8000 x g'de santrifüj edilerek, PBS ile iki kez yıkanıp 1:1 oranında seyreltilmiştir. Daha sonra, numuneye 1,5 µL SYTO®9 boyası ve 1,5 µL PI ilave edildikten sonra 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler, 0,2 µm polikarbonat membran filtre (Merck Millipore) ile yakalanmıştır. Pozitif kontrol için *E.coli* ATCC 10536 ve *S. aureus* ATCC 6538 suşları kullanılmıştır. Örnekler, Zeiss LSM 700 mikroskop ile görüntülenip ZEN yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.7. Yasal İzinler

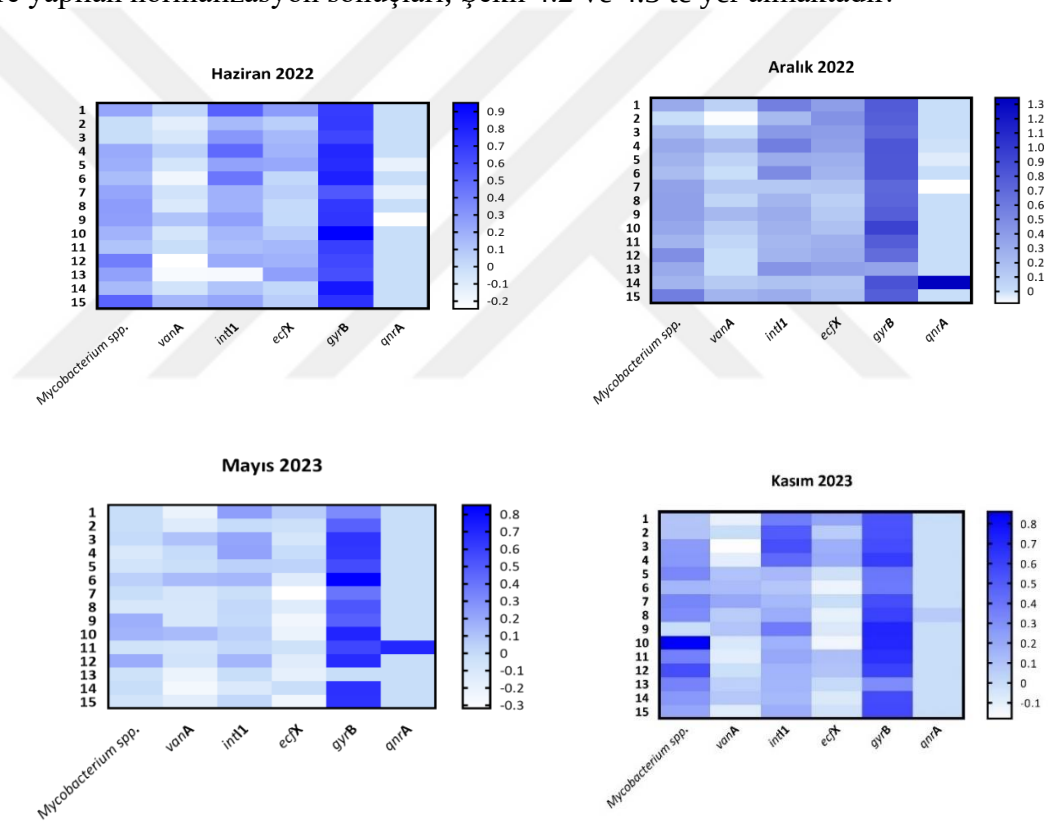
Sakarya'nın içme suyu kaynağı olan Sapanca Gölü'nden alınan numuneler için gerekli Biyoçeşitlilik Araştırma izni, Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Parklar Genel Müdürlüğü'nden alınmıştır. Ayrıca kayanağından musluğa kadar olan süreçte alınan numuneler için Sakarya Büyükşehir Belediyesi Sakarya Su ve Kanalizasyon İdaresi Genel Müdürlüğü'nden (SASKİ) gerekli izinler alınmıştır.



## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

Şekil 4.1 deki ısı haritasında (GraphPad Prism 9) renk kodları ile ilgili ifade panelin sağ tarafında yer almaktadır. Koyu renk tonu, yüksek gen ekspresyonunu ifade ederken, düşük gen ekspresyon seviyesi açık renk tonu ile belirtilmiştir. 16S rRNA'ya göre yapılan normalizasyon sonuçları, Şekil 4.2 ve 4.3 te yer almaktadır.



**Şekil 4.1.** Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023, Aralık 2023 dönemine ait qPCR analizi ısı haritası.

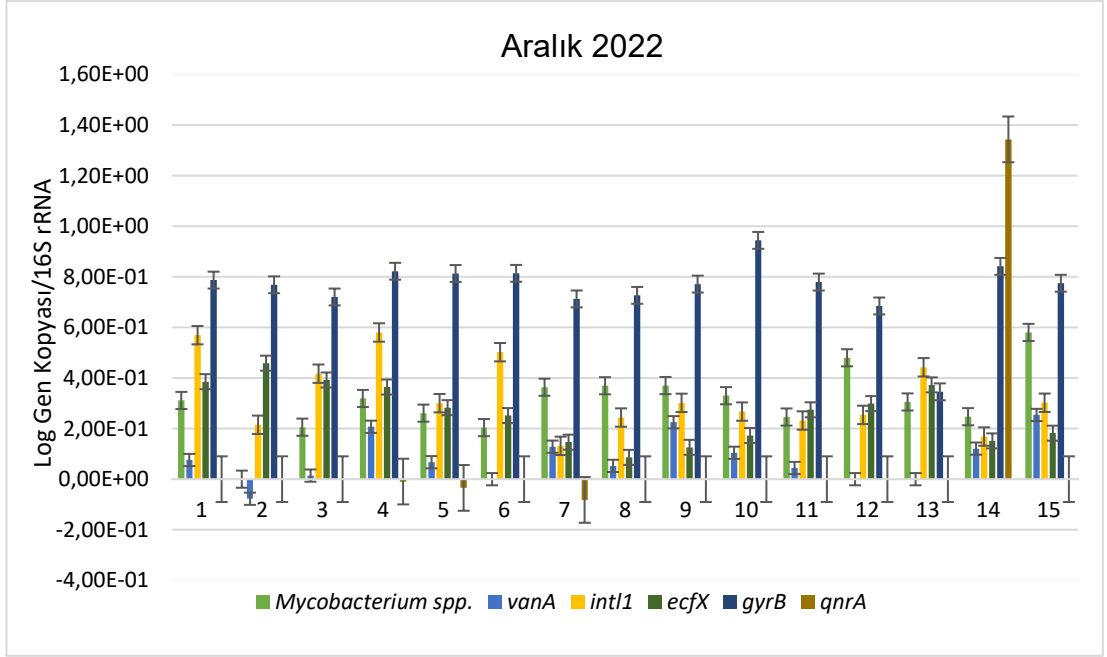
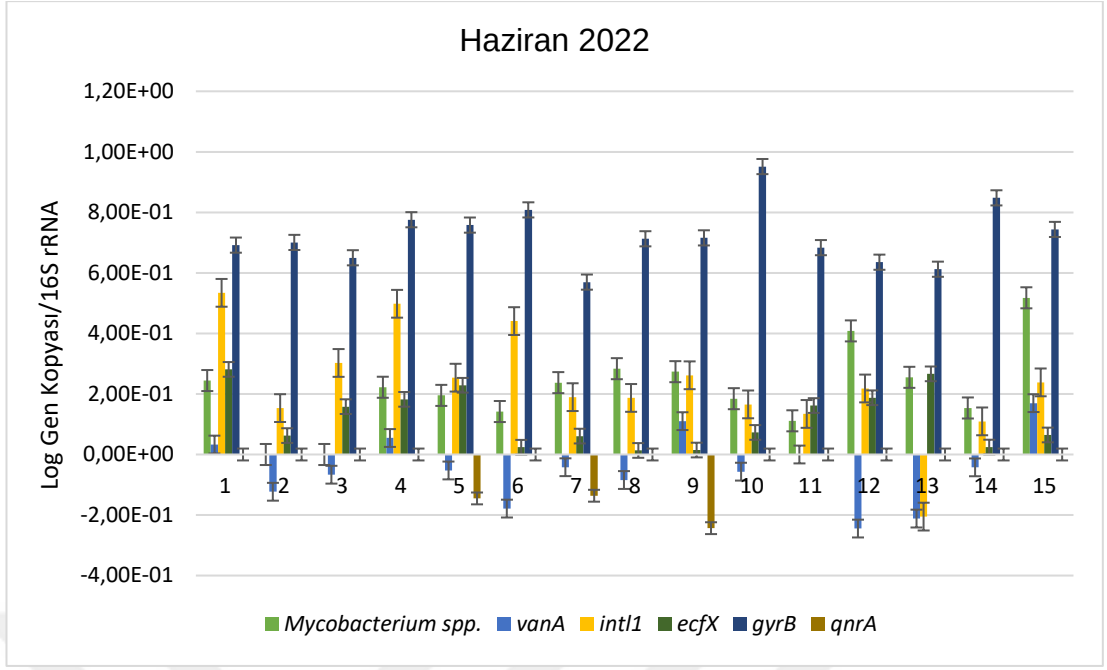
4 dönem de elde edilen *Mycobacterium* spp. konsantrasyon sonuçları genellikle  $10^2$  kopya  $L^{-1}$  olarak analiz edilmiştir. AT'ne en uzak noktayı temsil eden Kaynarca 800  $m^3$  depo çıkış (Kaynak 10) suyunda *Mycobacterium* spp. konsantrasyonu, Aralık 2023'te belirgin bir artışla  $8,6 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  ulaşmıştır. Bu önemli artış, özellikle dikkat çekici olup, çevrede meydana gelen bir değişiklik nedeniyle *Mycobacterium*

spp. yoğunluğunda bir artışa işaret edebilir. Eski bina, sık kullanılan musluğu temsilen seçilen (Kaynak 15) örnekte *Mycobacterium* spp. konsantrasyonu, Haziran 2022'deki yüksek bir başlangıç değeri ( $5,8 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$ ) ile Aralık 2022'de benzer bir değerde kalırken ( $5,2 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$ ), Mayıs 2023'te negatif bir değer elde edilmiştir ve ardından Aralık 2023'te tekrar  $2,2 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  atış meydana gelmiştir.

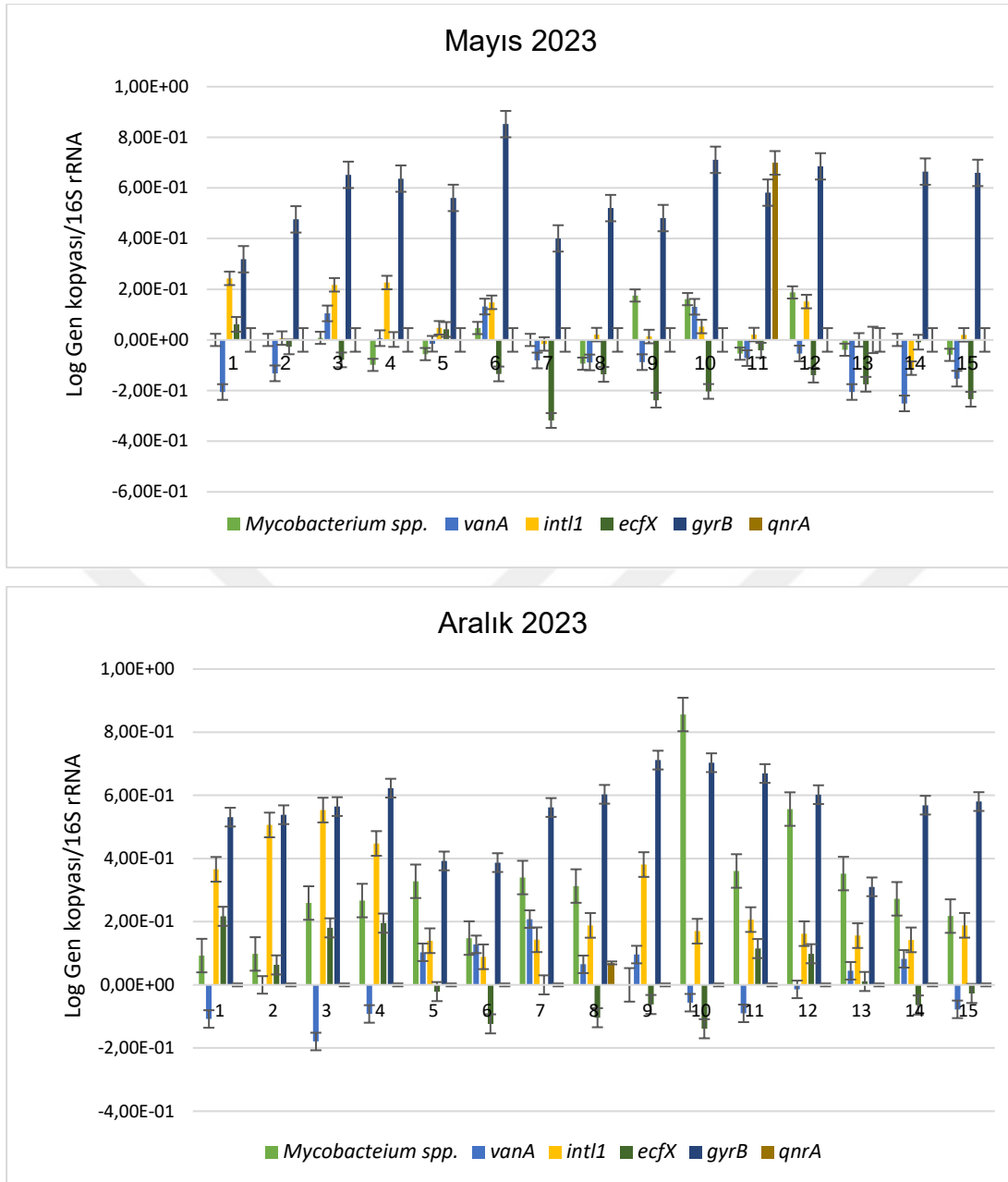
Haziran 2022 döneminde tüm kaynaklarda *ecfX* geni,  $8 \times 10^1$  -  $4,6 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  arasında iken Aralık 2022 döneminde  $1 \times 10^1$  -  $2,8 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  tespit edilmiştir. Mayıs 2023 dönemine *ecfX* geni, Kaynak 1, 4 ve 5'de  $1 - 6 \times 10^1$  kopya  $L^{-1}$  arasında iken diğer kaynaklarda tespit edilememiştir. Aralık 2023 döneminde *ecfX* geni, Kaynak 1, 2, 3, 4, 11, 12, 13'te  $6,3 \times 10^1$  -  $1,3 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  olarak tespit edilmiştir. Haziran 2022 döneminde tüm kaynaklarda *gyrB* geni,  $7,1 \times 10^2$  -  $9,4 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  arasında iken Aralık 2022 döneminde  $5,7 \times 10^2$  -  $9,5 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  tespit edilmiştir. Mayıs 2023 dönemine tüm kaynaklarda *gyrB* geni,  $0 - 6,6 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  arasında iken Aralık 2023 döneminde *gyrB* geni,  $3,1 \times 10^2$  -  $7,1 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  miktar olarak daha fazla tespit edilmiştir.

*vanA* geni, Haziran 2022 en yüksek musluk suyunda (Kaynak 15)  $2,5 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  tespit edilken, Aralık 2022 döneminde Kaynak 15'te  $1,6 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  olarak analiz edilmiştir. Mayıs 2023 döneminde Kaynarca 800 m<sup>3</sup> Depo Çıkış (Kaynak 10) suyunda en yüksek  $1,3 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  değerde tespit edilmiştir. Aralık 2023 döneminde ise en yüksek Serdivan 4000 m<sup>3</sup> Depo Giriş (Kaynak 7)  $2 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  suyunda tespit edilmiştir.

*qnrA* geni, Haziran 2022 döneminde SAÜ M8 Su ve Atıksu Laboratuvarı, az kullanılan muslukta,  $1,3 \times 10^3$  kopya  $L^{-1}$ , Mayıs 2023 döneminde en yüksek SAÜ depo çıkışında  $6,9 \times 10^2$  kopya  $L^{-1}$  tespit edilmiştir. Aralık 2023 döneminde ise en yüksek Serdivan 4000 m<sup>3</sup> depo çıkış (Kaynak 8) suyunda  $6 \times 10^1$  kopya  $L^{-1}$  tespit edilmiştir.



**Şekil 4.2.** Haziran 2022, Aralık 2022, dönemine ait DNA kopya sayıları.



**Şekil 4.3.** Mayıs 2023 ve Aralık 2023 dönemine ait DNA kopya sayıları.

#### 4.2. ATP Biyölüminesans Yönteminin Sonuçları

15 farklı noktadan alınan numuneler, laboratuvara soğuk zincir ile getirilmiş ve ATP analizi bekletilmeden gerçekleştirilmiştir. Dört döneme ait ATP sonuçları, Şekil 4.4-4.9’da sunulmuştur.

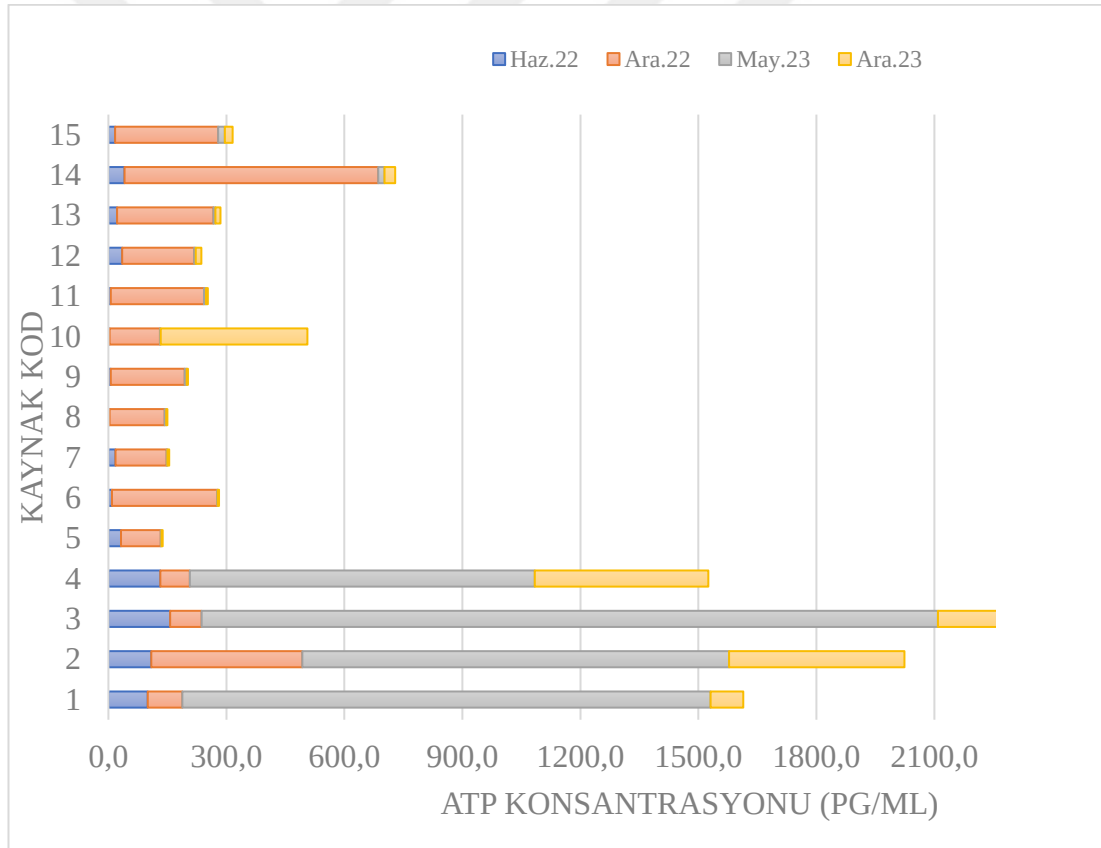
Klorsuz içme (ham) suyu kaynağındaki numunelerinde (Sapanca Gölü; 15 m ve 25 m, Keson, Arıtma Tesisi Girişi; Sapanca Gölünden gelen su ve Akçay’dan gelen su) ortalama ATP konsantrasyonları (Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023, Aralık 2023) sırasıyla, 93, 157, 1295 ve 354 pg ATP/mL arasında iken Arıtma Tesisinden



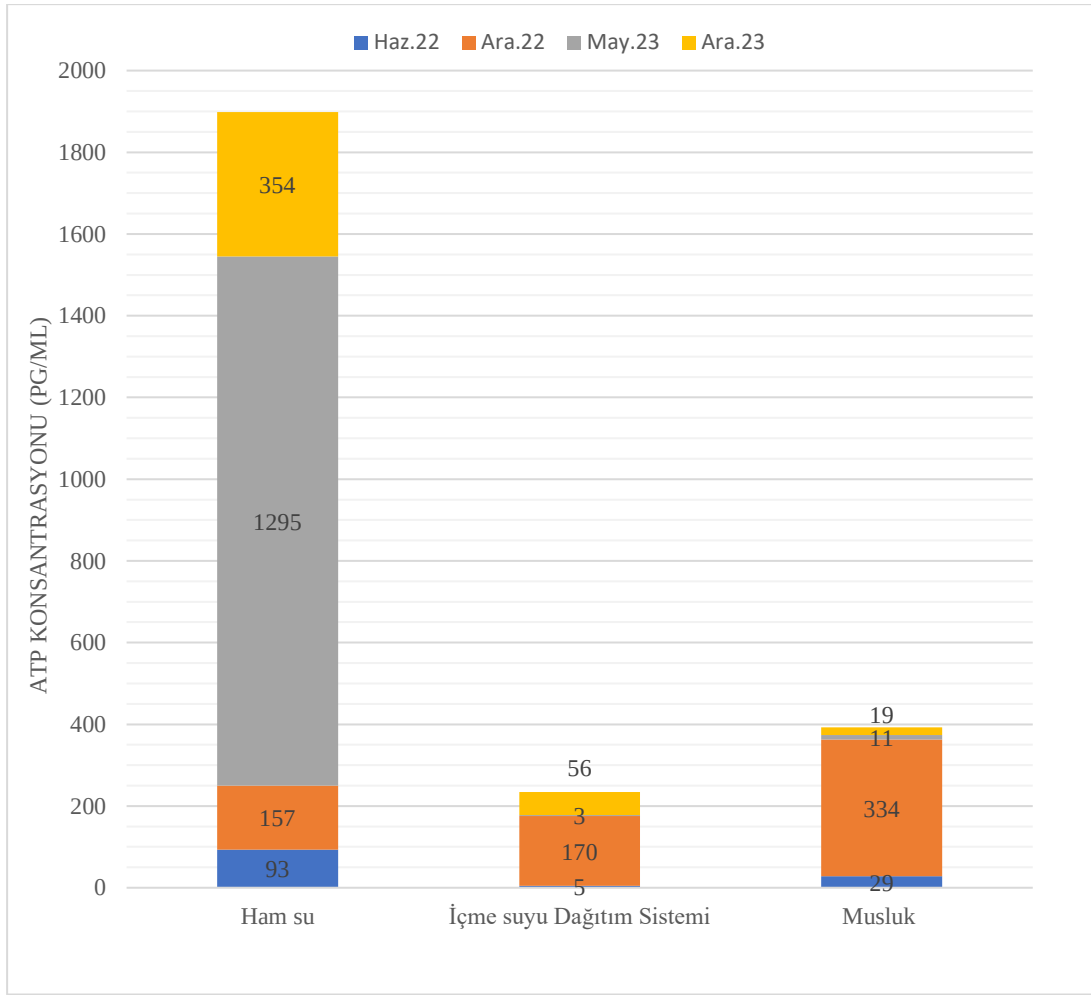
ıkan ve dağıtım sisteminde klorlanmış suyun ortalama ATP konsantrasyonları, 5, 170, 3, 56 pg ATP/mL arasında değişmektedir. Musluk suyu ortalama ATP konsantrasyonları, 29, 334, 11, 19 pg ATP/mL arasında değişmektedir (şekil 4.5).

Arıtma Tesisi Giriş ham su numunelerin ATP değerleri (Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023, Aralık 2023) sırasıyla 19, 75, 878 ve 441 pg ATP/ml olarak llmřtř (şekil 4.6- 4.9).

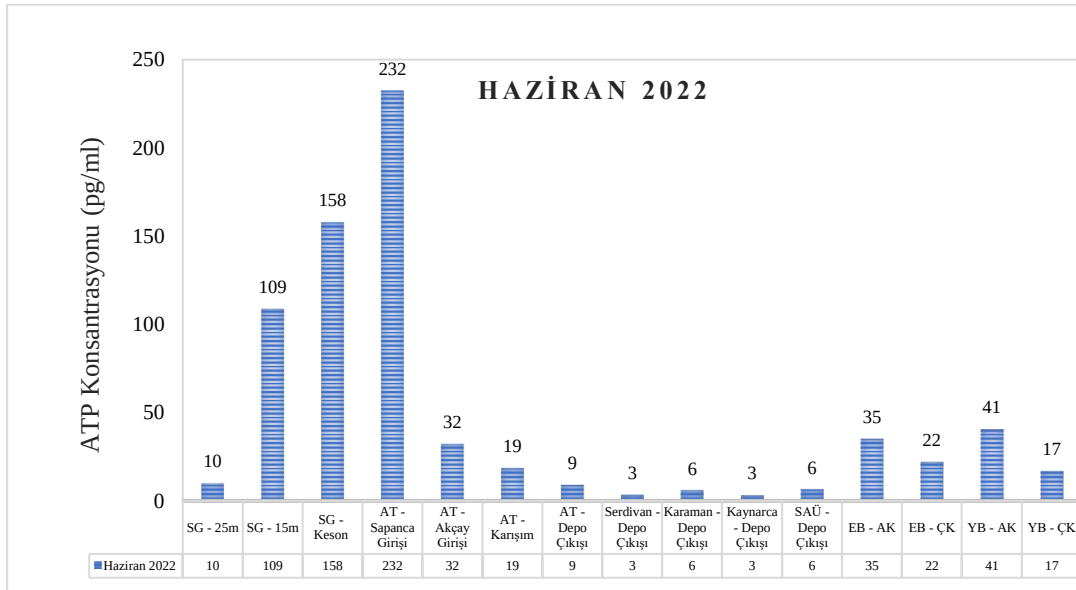
Eski Bina (EB-AK, EB-K), Yeni Bina (YB-AK, YB-K) ve Durgun suyu temsilen Az Kullanılan musluk suyu (AK) ve çok Kullanılan musluk suyu (K) rneklemelerinden elde edilen suyun dört döneme ait (Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023, Aralık 2023) ATP sonuçları sırasıyla EB-AK; 35, 183, 4, 14, EB-K; 22, 245, 5, 13, YB-AK; 41, 645, 16, 27, YB-K; 17, 262, 17, 20 pg ATP/ml olarak analiz edilmiştir.



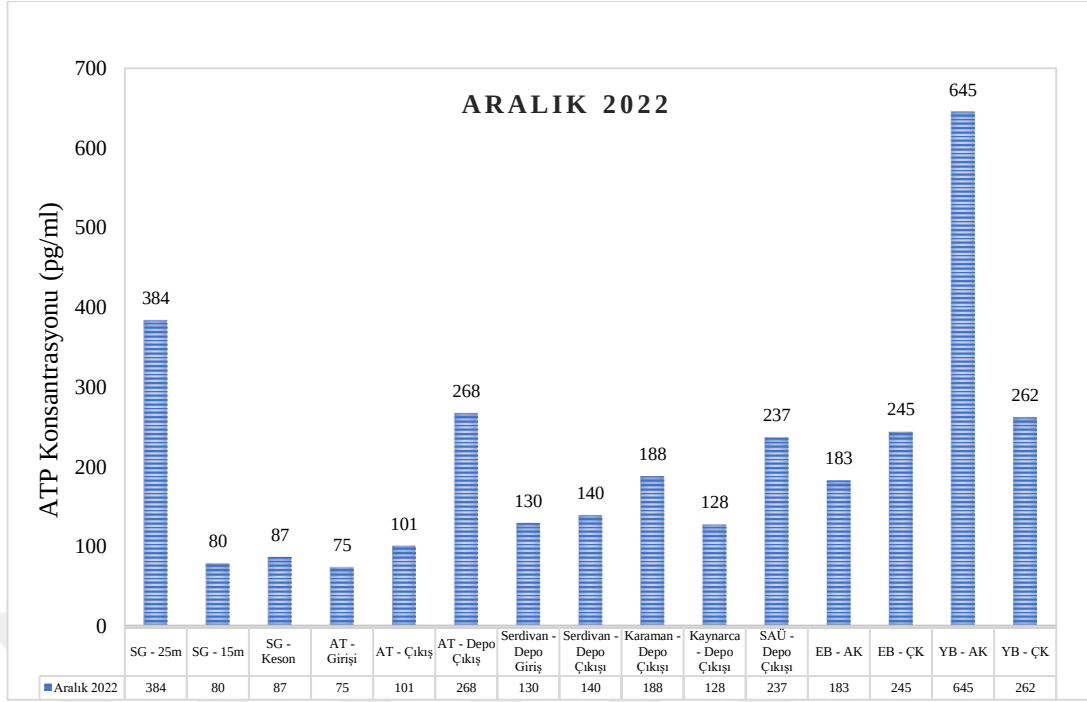
şekil 4.4. 4 döneme ait ATP sonuçları.



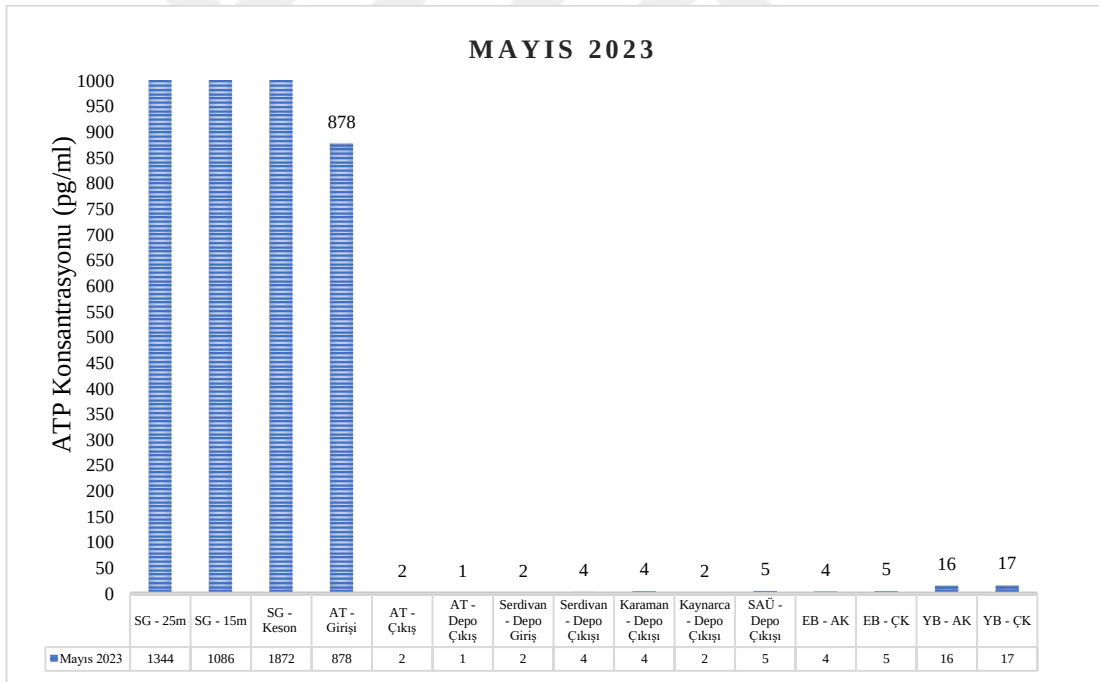
**Şekil 4.5.** 4 döneme ait ham su, içme suyu dağıtım sistemi, musluk suyu ortalama ATP konsantrasyonu sonuçları.



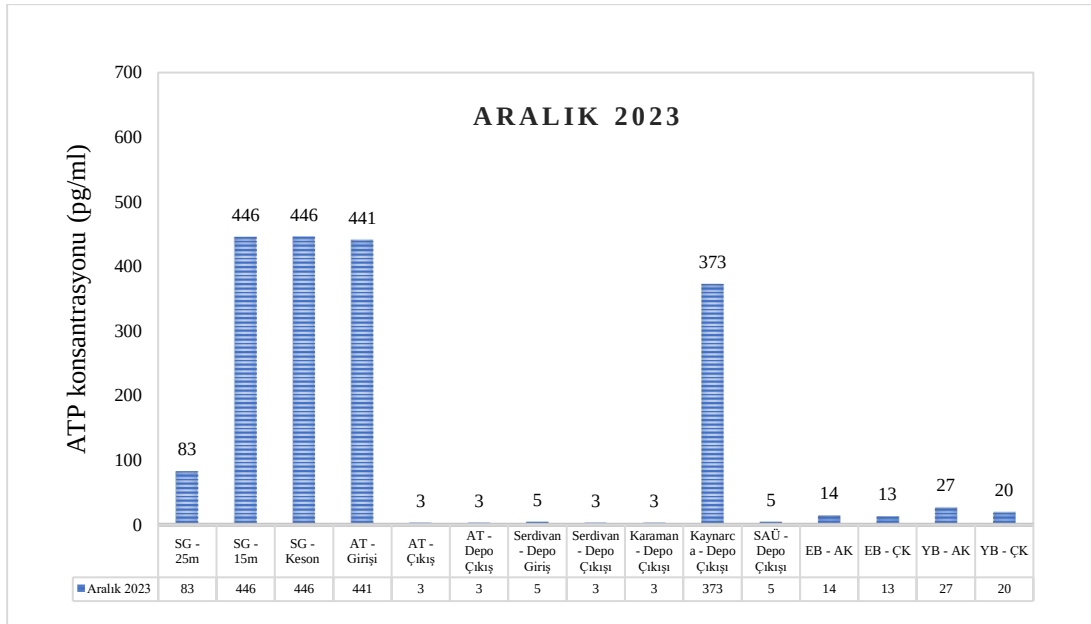
**Şekil 4.6.** Haziran 2022 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları.



**Şekil 4.7.** Aralık 2022 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları.



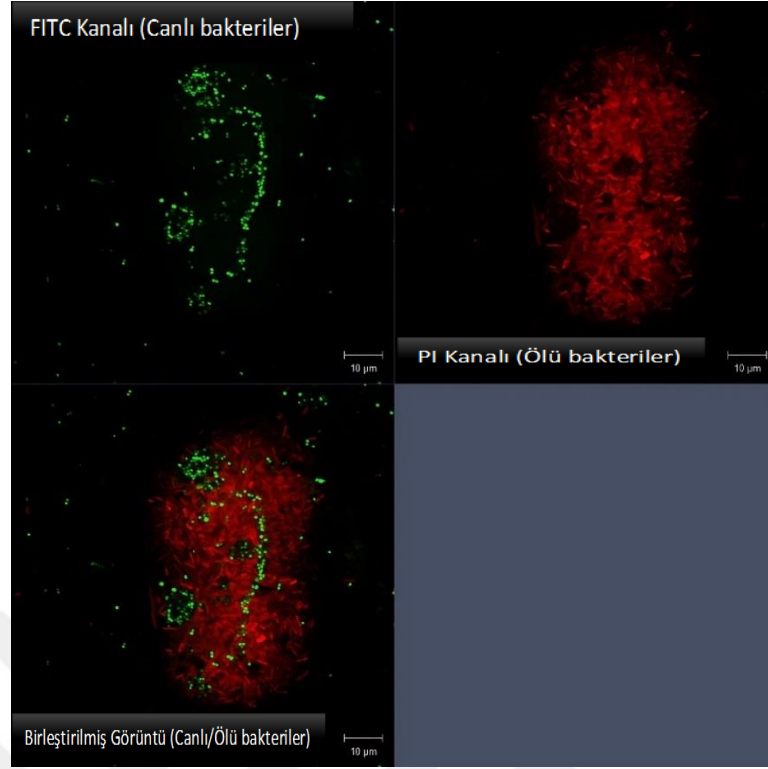
**Şekil 4.8.** Mayıs 2023 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları.



**Şekil 4.9.** Aralık 2023 dönemi 15 farklı kaynağa ait ATP konsantrasyonları.

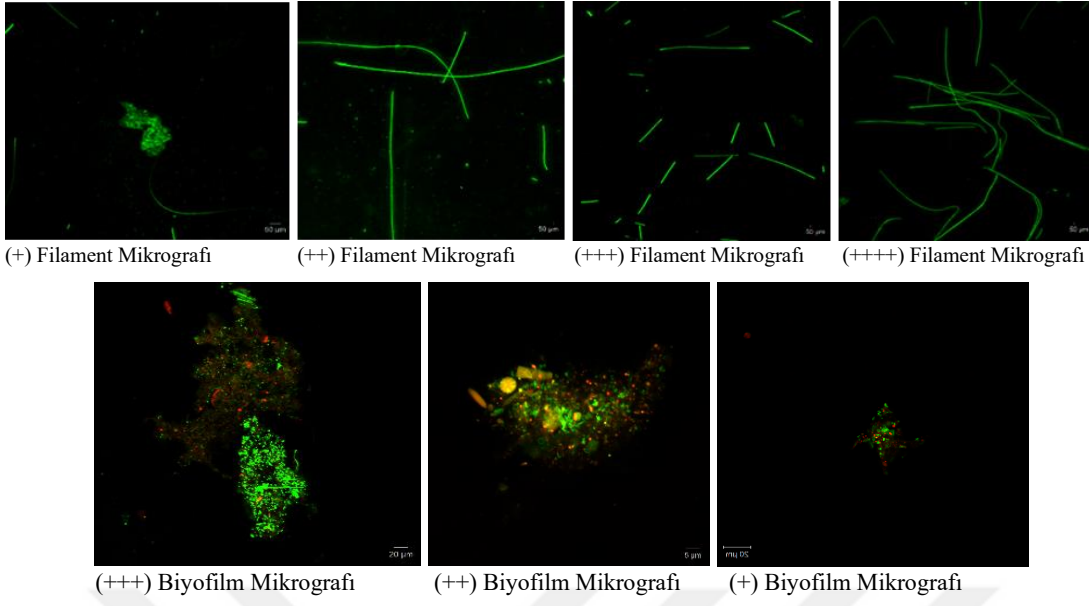
#### 4.3. İçme Suyu Temin Zincirinde Canlı/Ölü Bakteri Durum Tespit Sonuçları

Bakteri görüntüleri, konfokal mikroskop (Zeiss Lsm 700, Almanya) ile 10x, 20x, 40x ve 63x büyütmede objektifler kullanılarak çekilmiştir. Mikroorganizmalar, LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen) protokolüne uygun olarak boyanmıştır. SYTO 9 ve PI boya için mikroskopta FITC ve PI kanalları kullanılmıştır. Boyaların spektral özellikleri sağlıklı ve hasar görmüş hücrelere nüfuz etmeye yöneliktir. SYTO 9 ile boyanan hücreler, sağlıklı ve yeşil renkte iken, PI ile boyanan hücreler, ölmüş ve kırmızı renkte boyanmaktadır. Yeşil ve kırmızı boyanan hücrelerin görüntüleri birleştirildiğinde en fazla ışık yayan görüntünün rengi baskın olmaktadır. Birleştirilmiş görüntülerde eğer hücre tamamen ölü ise kırmızı, hasarlı ise turuncu, canlı ise yeşil görüntü elde edilir. LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit optimizasyonu protokole uygun olarak yapılmış ve pozitif kontrol için *E.coli* ATCC 10536 ve *S. aureus* ATCC 6538 suşları kullanılmıştır (Şekil 4.10).

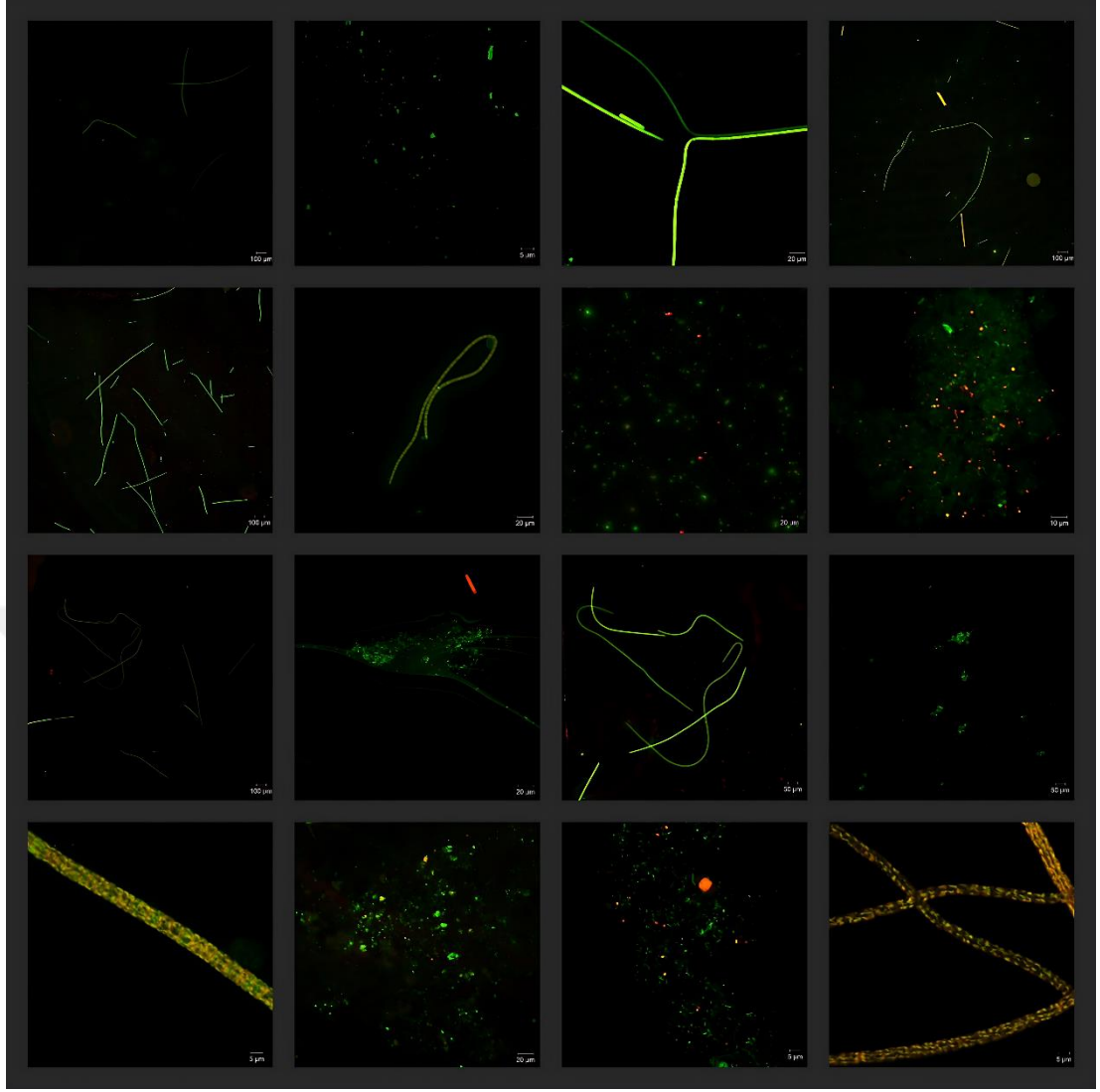


**Şekil 4.10.** *E.coli* ATCC 10536 (kırmızı, ölü bakteri) ve *S. aureus* ATCC 6538 (yeşil, canlı bakteri).

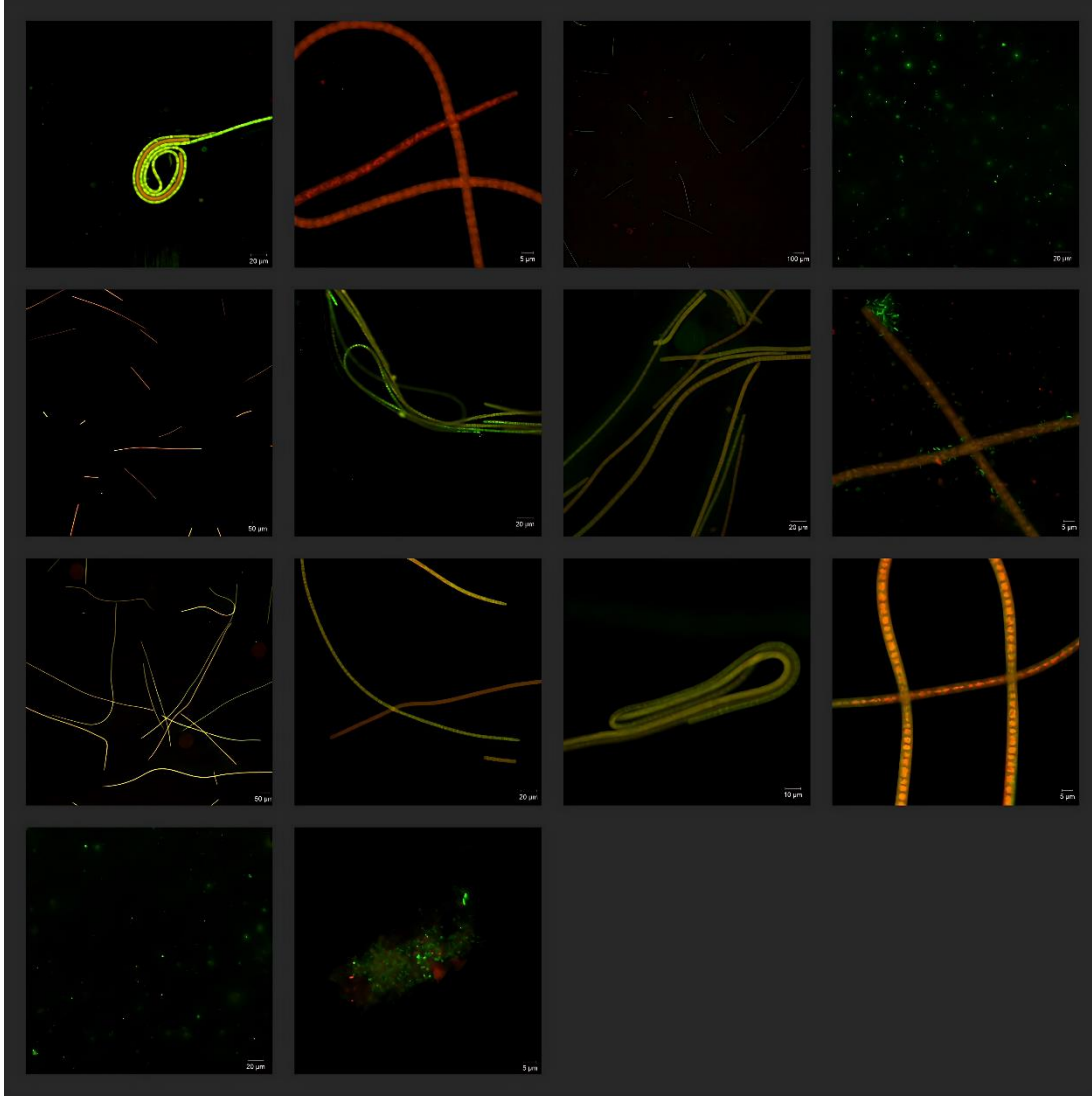
Üç tekrarlı olarak konfokal mikroskopla elde edilen görüntülere göre miktar değerlendirmesi yapılmış ve bağıl bolluk ifadeleri Şekil 4.11’de sunulmuştur. Farklı dönemlerde alınan numulardan elde edilen konfokal mikrografları Şekil 4.12-4.19’da gösterilmiştir. Filamentli bakteriler ile serbest/biyofilm oluşturan bakterilerin farklı zaman dilimlerinde ve numune noktalarında nasıl değişiklik gösterdiğini genel olarak karşılaştırdığımızda hem filamentli bakteriler hem de serbest/biyofilm bakteriler, Haziran 2022’de genel olarak yüksek yoğunluklara sahip olduğu gözlenmiştir. Bu, bakterilerin Haziran 2022 döneminde çevresel koşullardan olumlu etkilendiğini gösterebilir. Ancak, Mayıs 2023’te hem filamentli bakterilerde hem de serbest/biyofilm bakterilerde bir azalma gözlemleniyor. Aralık 2023’te ise bazı numune noktalarında yeniden bir artış söz konusudur (Şekil 4.11- Şekil 4.21).



**Şekil 4.11.** Konfokal mikrografların değerlendirilmesi kullanılan bağlı bolluk ifadeleri.

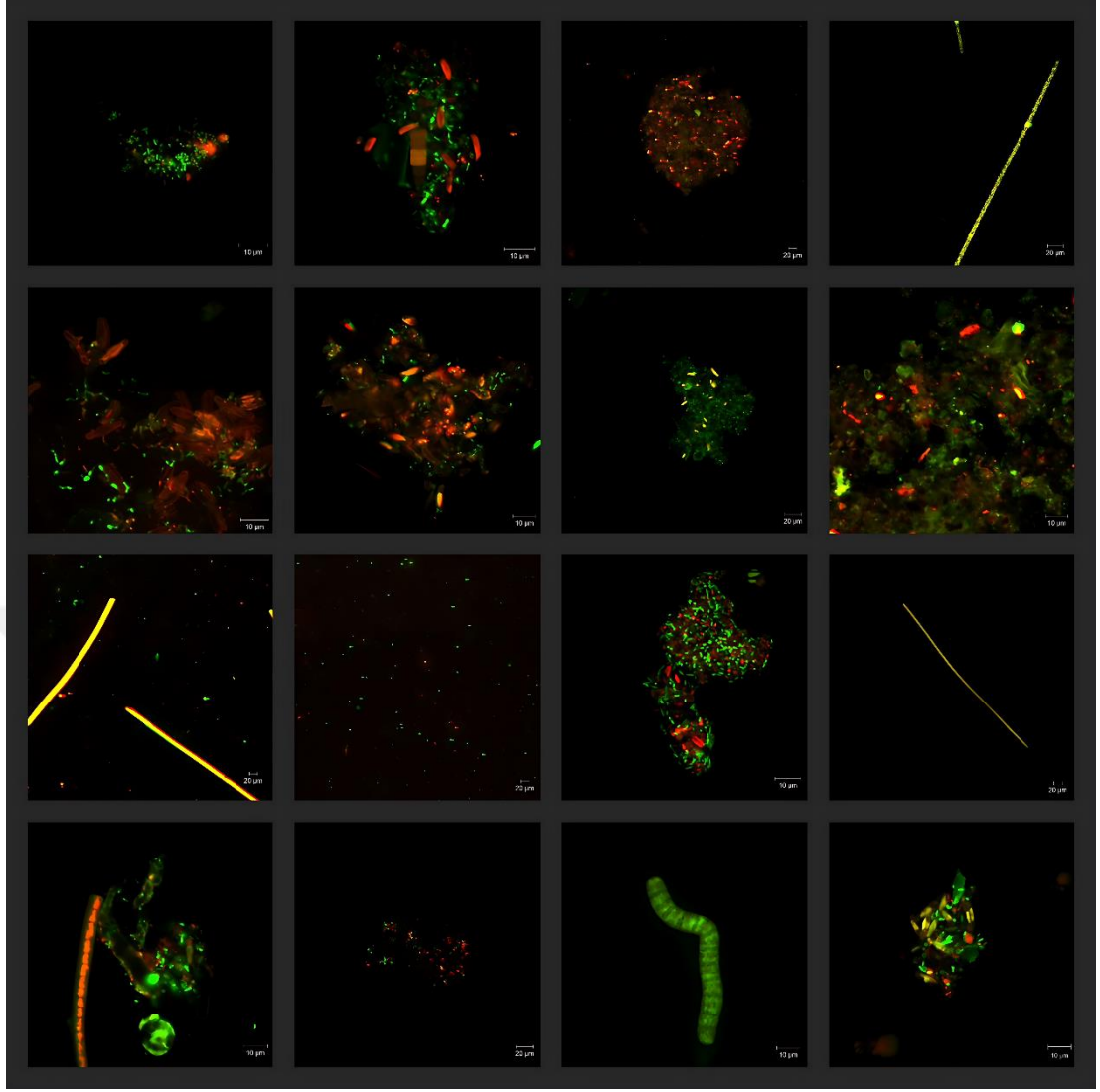


**Şekil 4.12.** Haziran 2022, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).

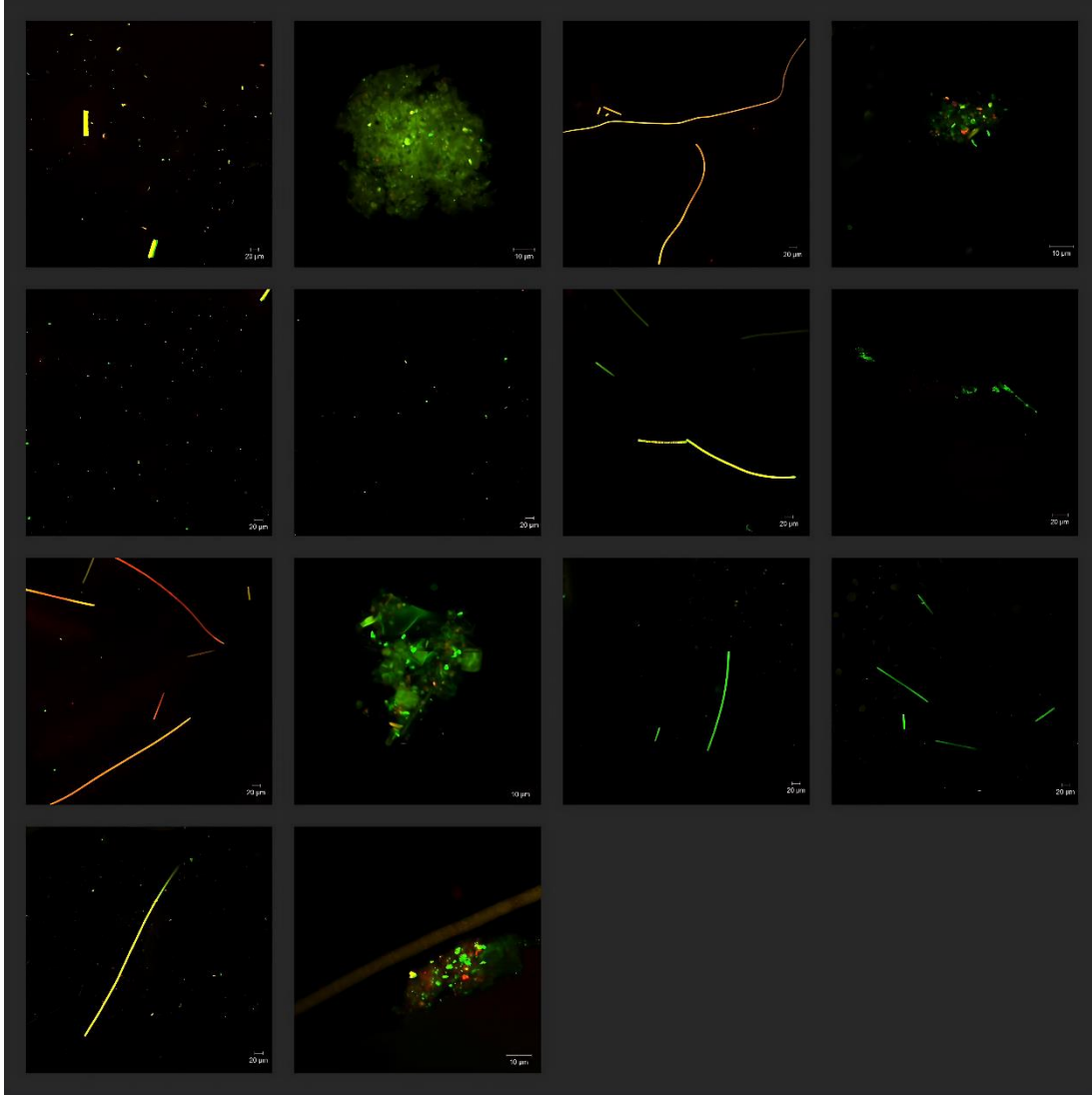


**Şekil 4.13.** Haziran 2022, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).

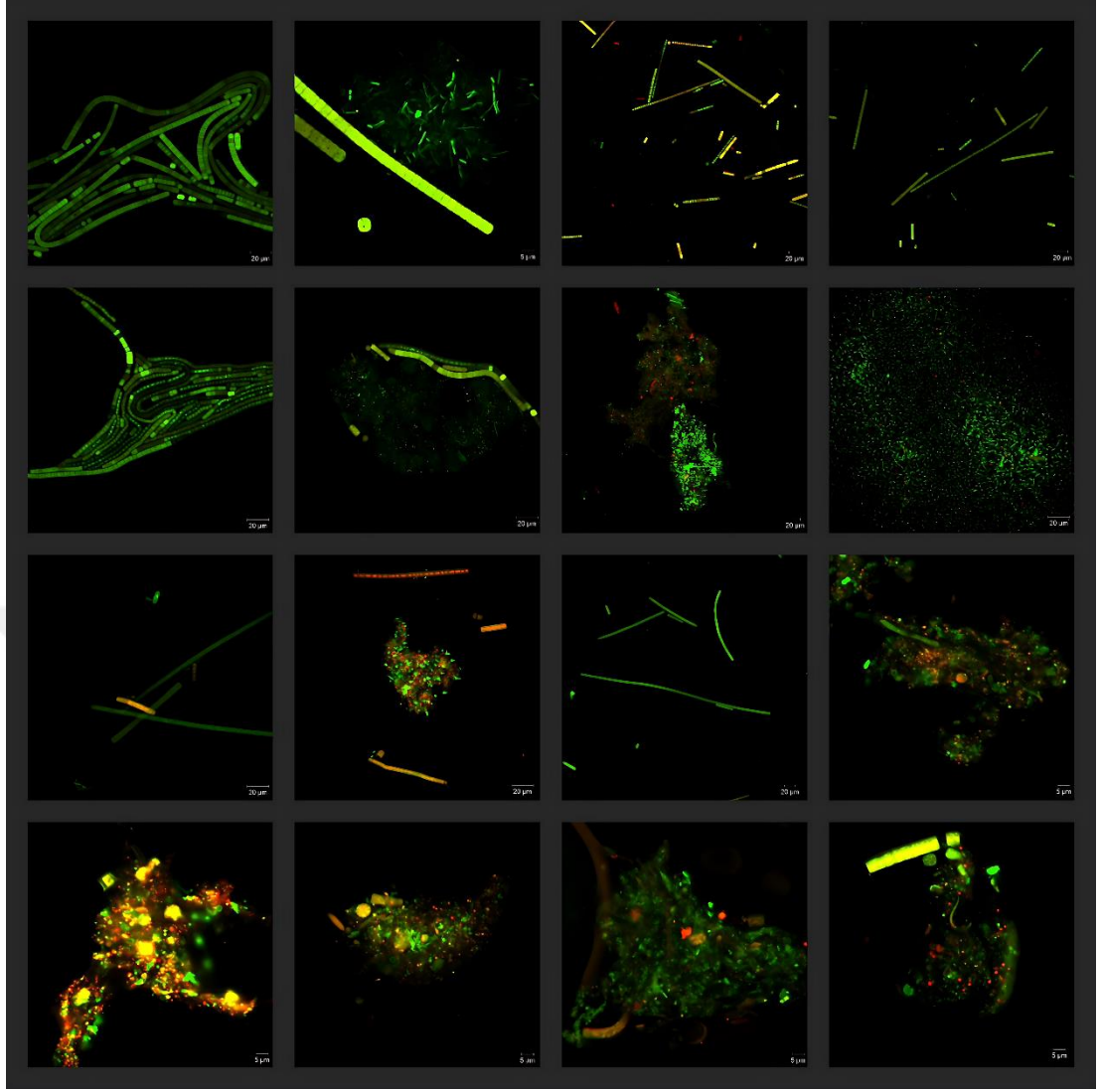




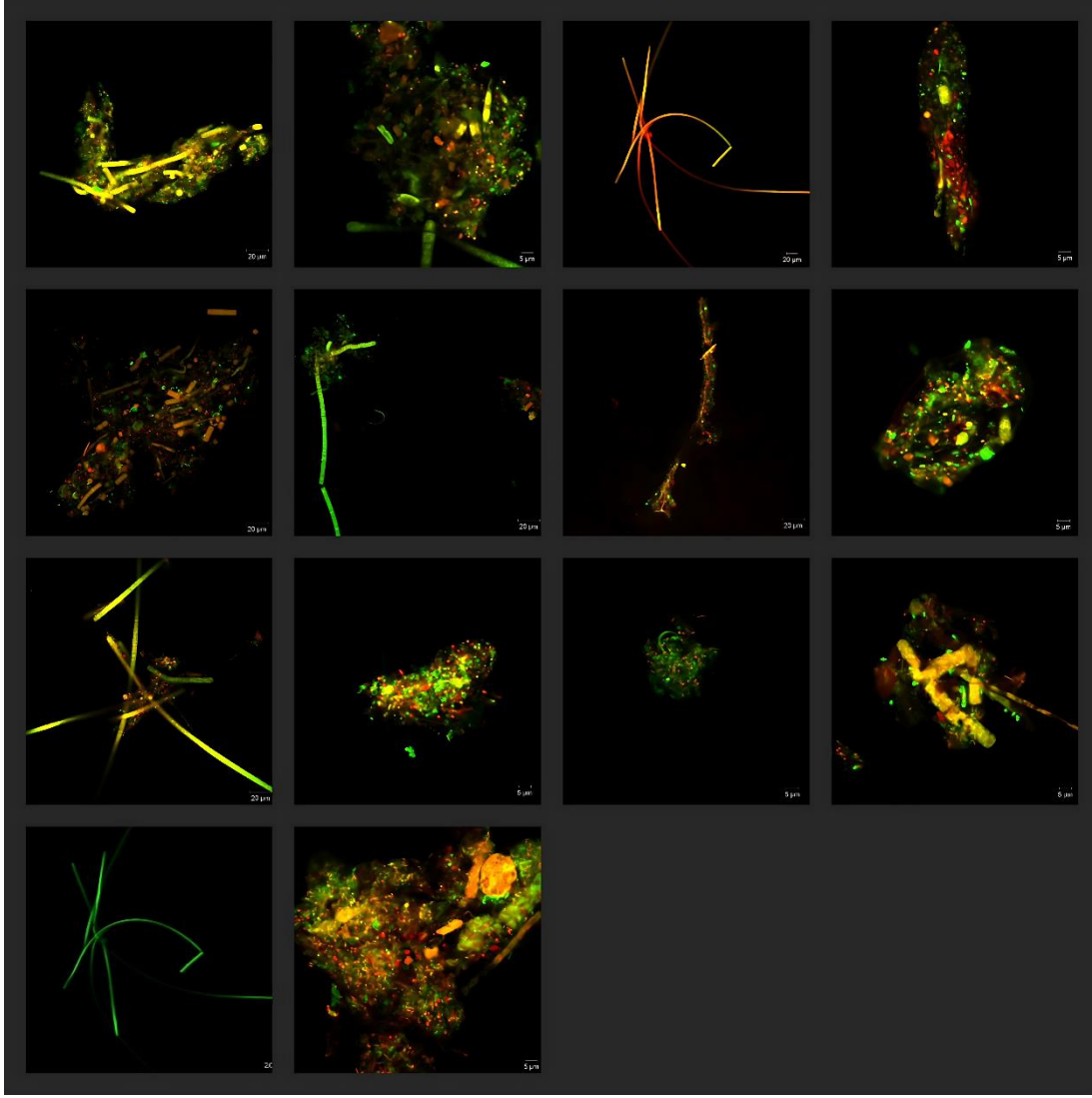
**Şekil 4.14.** Aralık 2022, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).



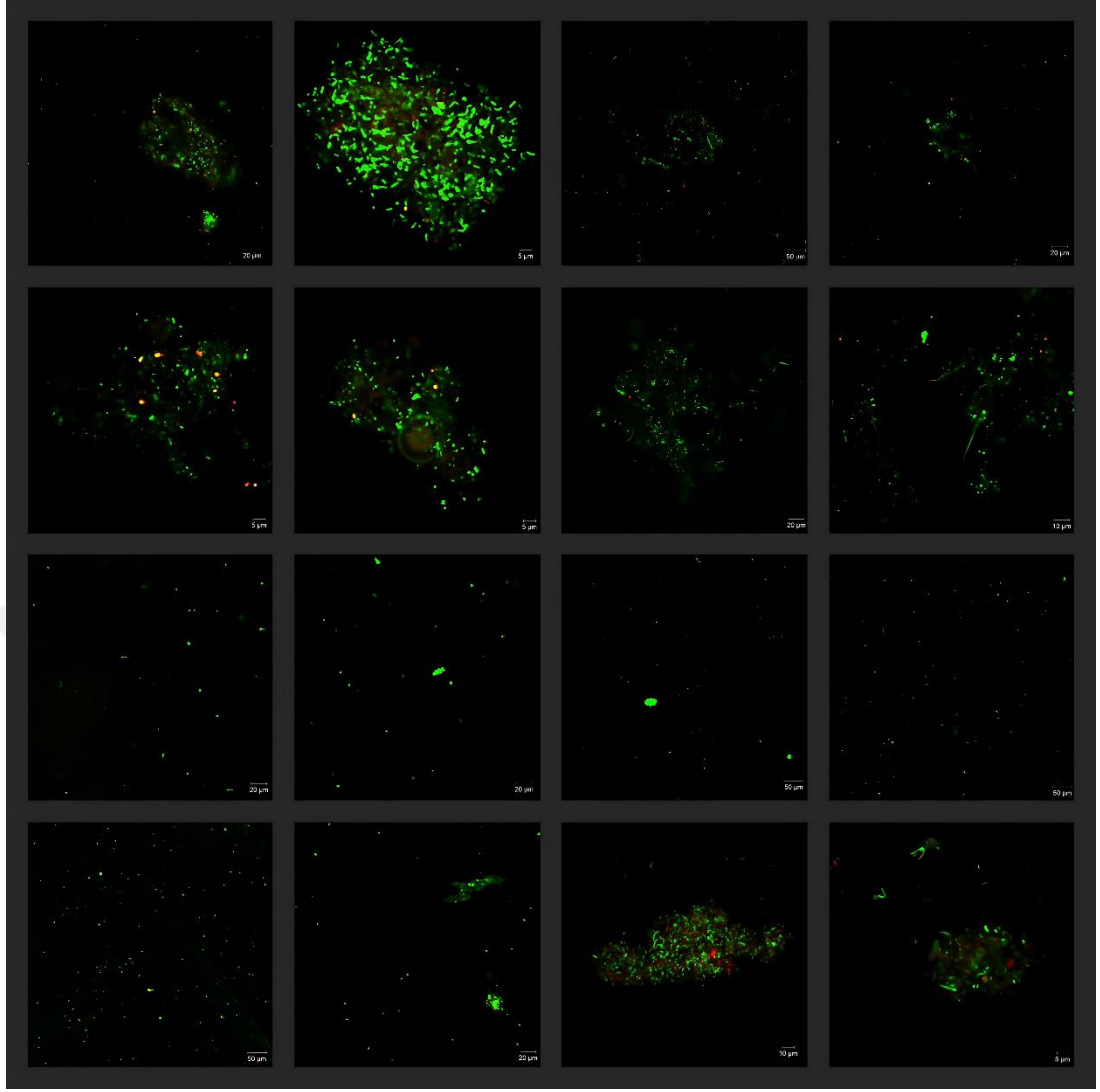
**Şekil 4.15.** Aralık 2022, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).



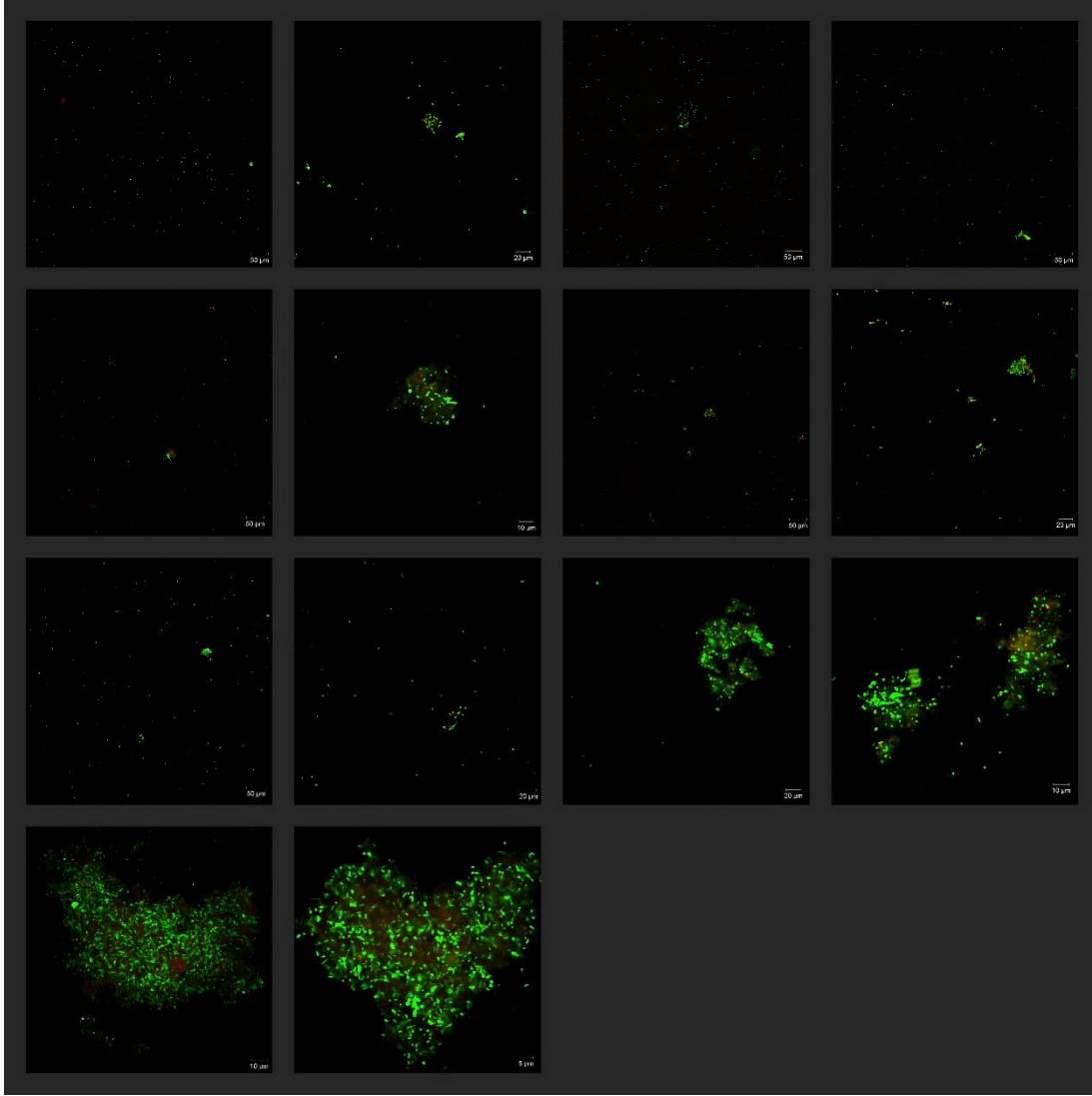
**Şekil 4.16.** Mayıs 2023, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).



**Şekil 4.17.** Mayıs 2023, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).



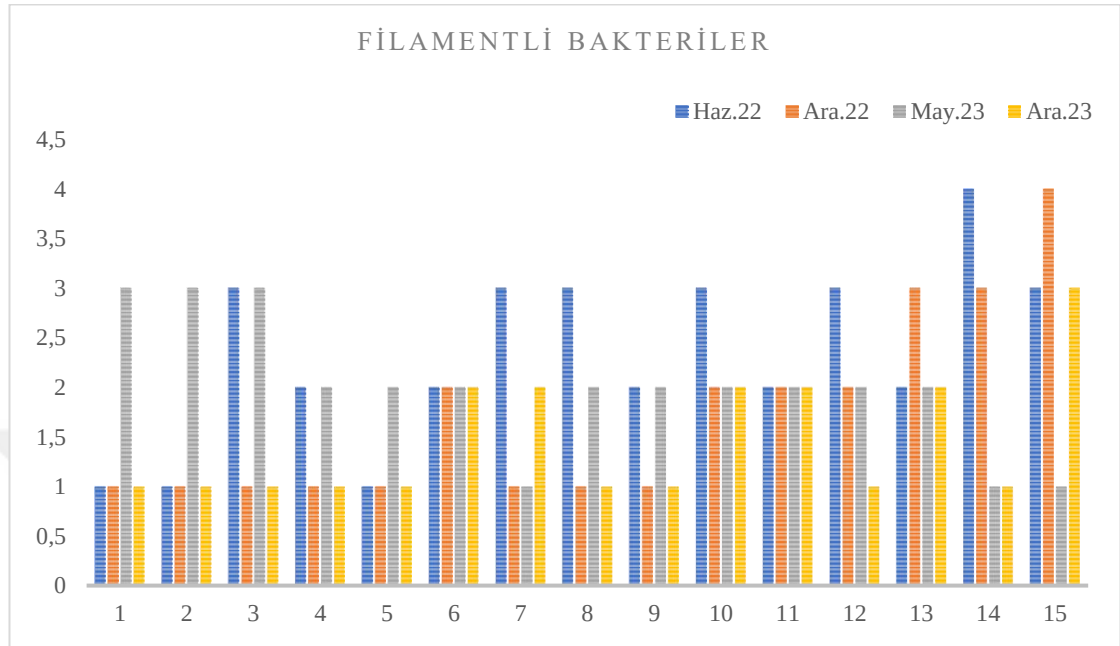
**Şekil 4.18.** Aralık 2023, 1 – 8 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).



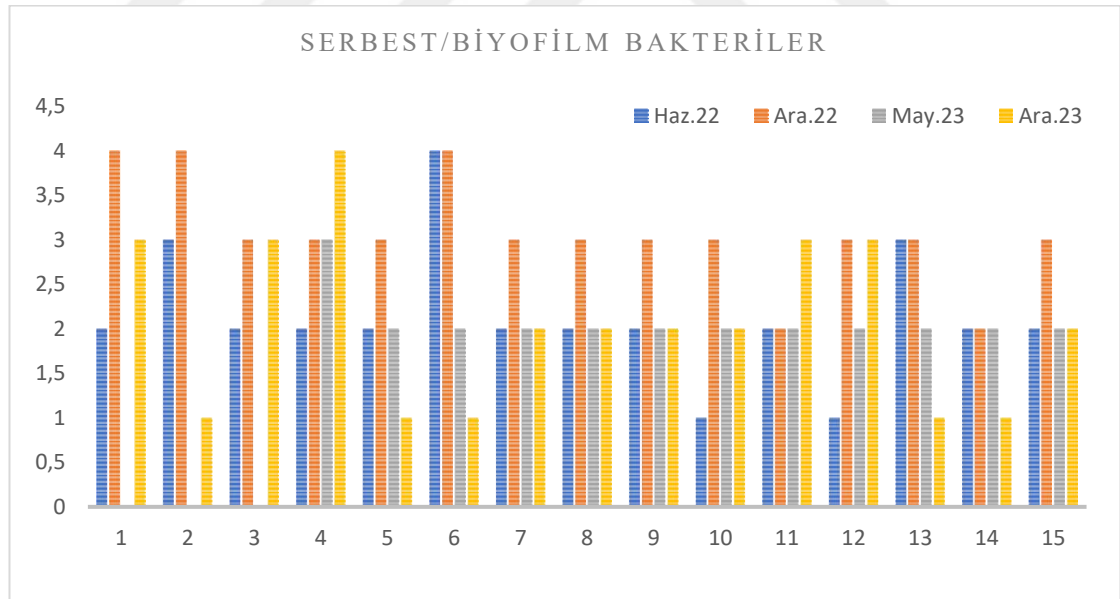
**Şekil 4.19.** Aralık 2023, 9 – 15 kaynak noktalarında seçilen konfokal mikrografları (Kaynak başına 2 mikrograf seçilmiştir).

Çalışma sonucunda filamentli ve serbest/biyofilm bakterilerine ait kantitatif değerlendirme sonuçları Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de sunulmuştur. Numunelerin alındığı farklı kaynak lokasyonları karşılaştırıldığında Arıtma Tesisi Çıkışı (Kaynak 5), her iki grafikte de en dikkat çekici olanıdır. Hem filamentli bakterilerde hem de serbest/biyofilm bakterilerde yüksek yoğunluklar gözlemlenmektedir. Bu durum, su numunelerinde Arıtma Tesisinin bakteriyel büyüme için elverişli olduğunu gösterebilir. Arıtma Tesisi Depo Çıkış (Kaynak 6) ve SAÜ M8 Su ve Atıksu Laboratuvar Az Kullanılan Acil Duş - Eski Bina (Kaynak 14) kaynak lokasyonları karşılaştırıldığında Kaynak 6, serbest/biyofilm bakterilerde Haziran 2022’de yüksek yoğunluk gösterirken, filamentli bakterilerde de Haziran 2022’de belirgin bir yoğunluk tespit edilmiştir. Ancak her iki yapıdaki mikroorganizmalarda sonraki dönemlerde azalma

gözlemlenmektedir. Kaynak 15' in ise hem filamentli bakteriler hem de serbest/biyofilm bakteriler açısından belirli dönemlerde (özellikle Aralık 2022) yüksek yoğunluklara sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21).



**Şekil 4.20.** 4 Dönem filamentli bakterilerin kalitatif değerlendirme sonuçları.



**Şekil 4.21.** 4 Dönem serbest/biyofilm bakterilerin kalitatif değerlendirme sonuçları.





## 5. TARTIŞMA

Aerosolleşme, yüzeylere yapışma, biyofilm oluşturma, dezenfektan ve antibiyotik direnci geliştirme yetenekleri nedeniyle su kaynaklı fırsatçı patojenlerden biri olan *Mycobacterium* türlerinin içme suyu dağıtım sistemlerinde bulunması büyük önem taşır. Düşük karbon seviyelerine (50 µg/L AOC) sahip ortamlarda çoğalabilen oligotrofik bakteri *Mycobacterium* türleri, amiplerle olan ilişkili yaşam biçimi ve kloro karşı direnç göstermesi gibi özellikleri sayesinde su dağıtım sistemlerinde hayatta kalabilir, kolonize olabilir ve uzun süre varlığını sürdürebilir. Hem sucul hem de karasal ortamlar gibi doğal rezervuarlarda bulunan *Mycobacterium* türleri, diğer mikroorganizmalara karşı güçlü bir rekabet avantajına sahip olabilir (Vaerewijck ve ark., 2005; Falkinham, 2009; Loret ve Dumoutier, 2019).

Çalışmamızda elde edilen bulgular, biyofilm örneklerine kıyasla daha çok su örneklerinden elde edilmiştir. *Mycobacterium* türlerinin konsantrasyonu genellikle  $10^2$  kopya/L düzeyinde analiz edilmiştir. Literatürde tüberküloz dışı mikobakterilerle yapılan çalışmalarda, *Mycobacterium* konsantrasyonu su örneklerinde  $10^4$  kopya/L olarak rapor edilirken, biyofilm örneklerinde bu değer  $10^6$  kopya/L'ye kadar çıkmaktadır (Waak ve ark., 2019). Elde edilen bulgular, zamana bağlı olarak *Mycobacterium* spp. konsantrasyonunun dalgalı bir eğilim sergilediğini göstermektedir. *Mycobacterium* spp. normalizasyon değerlerinin Haziran 2022 ile Aralık 2023 arasındaki değişimi incelendiğinde, bazı örneklerde belirgin artışlar veya azalmalar gözlenmiştir. Özellikle Mayıs 2023'te 0 veya negatif değerler elde edilmiştir. PCR analizinde negatif değerlerin, test edilen genetik materyalin saptanamayacak kadar düşük seviyede olmasıyla ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Örneğin, Kaynak Kodu 10'a ait bazı numunelerde Aralık 2023'te gözlemlenen keskin artışlar, çevresel faktörlerin (örneğin su deposunun kirlenmesi) etkisini işaret edebilir. Genel olarak, veriler *Mycobacterium* spp. yoğunluğunun zaman içerisinde dalgalandığını ve çeşitli örneklerde farklı eğilimler sergilediğini ortaya koymaktadır.

Çevresel Mycobacterium türlerinin içme suyunda varlığının ve yoğunluğunun tespit edilmesi, su kaynaklı nozokomiyal ve psödo enfeksiyonların oluşturduğu risklerin azaltılması ve mikrobiyal kontrol stratejilerinin etkinliği açısından kritik öneme sahiptir.

Diğer bir önemli fırsatçı patojen olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın *ecfX* geni, virülans mekanizmasında yer aldığı bilinen bir ekstra sitoplazmik fonksiyon sigma faktörünü kodlamaktadır. Ancak, tek gen hedeflerini kullanan moleküler tanımlama teknikleri, diğer Gram-negatif organizmalarla çapraz reaksiyon sorunları da dahil olmak üzere hata yapmaya eğilimlidir. Literatürde, iki hedef gen formatının (yani *ecfX* ve *gyrB* genleri) PCR reaksiyonlarında pozitif sonuç vermesi durumunda, *Pseudomonas aeruginosa* kimliğinin eş zamanlı olarak doğrulanabileceği ve primer veya prob hedeflerindeki dizi varyasyonlarının neden olduğu yanlış negatif sonuç potansiyelinin azaltılabileceği belirtilmektedir (Anuj ve ark., 2009). Çalışmamızda da iki gen ayrı ayrı analiz edilmiş olup, Haziran 2022 ve Aralık 2022 dönemlerinde her iki gen de pozitif olarak saptanmıştır. Ancak, Mayıs 2023 döneminde Kaynak 1, 4 ve 5 dışında *ecfX* geni tespit edilememiştir. Wang ve ark., 2012'de yaptığı bir çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa*'nın iki kloraminli içme suyu dağıtım sisteminde nadiren (%13,3'ten daha azında) tespit edildiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, mevsimsel değişimlerin (sıcaklık, su kimyası gibi) bakteri üremesi üzerindeki etkisinin tam olarak bilinmediği, ancak tesisat işletiminin önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir.

Klinik öneme sahip *vanA* geninin enterokok bulunmamasına rağmen içme suyu dağıtım sistemindeki biyofilmde tespit edilmesi, içme suyu bakterileri arasında olası bir gen transferini işaret etmektedir. (Dutka-Malen ve ark., 1995). *vanA* genini taşıdığı bilinen Enterobacteriaceae üyeleri biyofilm örneklerinde tespit edilemediğinde, biyofilm yapısında çoğalan *vanA* genlerinin, canlı fakat kültüre edilemeyen su bakterilerinin genomunun bir parçası olduğu düşünülmektedir (Schwartz ve ark., 2003). *vanA* gen kopyası, Haziran 2022 ve Aralık 2022 dönemlerinde en yüksek seviyede musluk suyunda (Kaynak 15), Mayıs 2023 döneminde ise en yüksek seviyede Kaynarca 800 m<sup>3</sup> Depo Çıkışı (Kaynak 10) suyunda tespit edilmiştir. Aralık 2023 döneminde en yüksek *vanA* gen kopyası Serdivan 4000 m<sup>3</sup> Depo Girişi (Kaynak 7) suyunda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ADG'lerin potansiyel yayılım riskini ortaya koymaktadır. (Zhong ve ark., 2022).

qnrA geni, plazmid aracılığıyla taşınan ve bakterilere yatay gen transferi yoluyla aktarılan bir gen olarak bilinmektedir. Bu genin kodladığı protein, kinolonların hedefi olan DNA giraz ve topoizomeras IV enzimlerine bağlanarak, kinolonların bu enzimleri inhibe etmesini engeller. Sonuç olarak, antibiyotikler bu enzimleri etkili bir şekilde hedef alamaz ve bakteriler çoğalmaya devam edebilir (Oliphant ve Green, 2002; Colomer-Lluch ve ark., 2014). qnrA geni, Haziran 2022 döneminde en yüksek seviyede Serdivan 4000 m<sup>3</sup> Depo Girişinde, Aralık 2022 döneminde ise en yüksek seviyede SAÜ M8 Su ve Atıksu Laboratuvarında, az kullanılan bir duş noktasında tespit edilmiştir. Mayıs 2023 döneminde en yüksek qnrA geni SAÜ Depo Çıkışında saptanırken, Aralık 2023 döneminde en yüksek düzeyde Serdivan 4000 m<sup>3</sup> Depo Çıkışı (Kaynak 8) suyunda tespit edilmiştir. qnrA direncinin yayılması, özellikle hastane ortamlarında ciddi bir halk sağlığı sorunu teşkil etmektedir, çünkü kinolonlar geniş spektrumlu antibiyotiklerdir ve birçok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. qnrA geninin tespit edilmesi, antibiyotik tedavisinin yönetiminde kritik bir faktördür. Bu nedenle, çevre örneklerinde kinolon direnç profillemesi büyük önem taşımaktadır.

Direnç genleri için yatay gen transferi göstergesi olarak bilinen int1 (Hardwick ve ark., 2008), birçok kaynak noktasında Haziran 2022 ve Aralık 2022 dönemlerinde nispeten yüksek seviyelerde tespit edilmiştir. Ancak, bu değerler Mayıs 2023'te düşüş göstermiş ve Aralık 2023'te yeniden yükselmiştir. Özellikle 3, 4 ve 6 numaralı kaynak kodlarında bu dönemde belirgin bir artış gözlenmiştir. Buna karşılık, 7, 10 ve 14 numaralı kaynak kodlarında dalgalanmalar meydana gelmiştir. int1 geni, yatay gen transferini ifade ettiğinden, içme sularında varlığının tespit edilmesi, antibiyotik direncinin yayılma potansiyeli hakkında önemli bilgiler sağlayabilir (Duarte ve ark., 2022). Direnç genleri için yatay gen transferi göstergesi olarak bilinen int1 (Hardwick ve ark., 2008), birçok kaynak noktasında Haziran 2022 ve Aralık 2022 dönemlerinde nispeten yüksek seviyelerde tespit edilmiştir. Ancak, bu değerler Mayıs 2023'te düşüş göstermiş ve Aralık 2023'te yeniden yükselmiştir. Özellikle 3, 4 ve 6 numaralı kaynak kodlarında bu dönemde belirgin bir artış gözlenmiştir. Buna karşılık, 7, 10 ve 14 numaralı kaynak kodlarında dalgalanmalar meydana gelmiştir. int1 geni, yatay gen transferini ifade ettiğinden, içme sularında varlığının tespit edilmesi, antibiyotik direncinin yayılma potansiyeli hakkında önemli bilgiler sağlayabilir (Liguori ve ark., 2022). Bu açıdan bakıldığında, int1 geninin çevresel su örneklerinde izlenmesi,

antimikrobiyal direnç açısından önemli ipuçları sunmaktadır. intI1 geninin varlığı ve miktarı, özellikle direnç seviyelerinin nasıl dalgalandığını ve belirli dönemlerde nasıl arttığını göstererek, su ortamlarındaki antimikrobiyal direnç izlemelerinin önemini ortaya koymaktadır.

Mikrobiyal ATP'nin ölçülmesi, içme suyunda oldukça düşük ve stabil mikrobiyal ATP konsantrasyonları ile karakterize edilen küçük değişiklikleri hızlı ve etkin bir şekilde tespit etmeyi sağlamaktadır. Klorlu ve klorsuz (ham) içme suyunda serbest ATP'nin ölçümüne ilişkin şu sonuca varılmıştır: Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023 ve Aralık 2023 dönemlerinde ham suyun ATP değerleri 2023 yılında daha yüksek seviyelerde saptanmıştır. Ancak, arıtma çıkışı ve dağıtım sistemindeki ATP değerlerinin genellikle 2023 yılında  $>3$  pg/mL olduğu göz önüne alındığında, bu durum "ilave izleme" gerektirmiştir. 2022 yılında ise ATP değerlerinin  $>10$  pg/mL olduğu tespit edilerek "düzeltici aksiyon" kapsamında değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (Tablo 3.3). Musluk suyu ATP sonuçlarının Haziran 2022, Aralık 2022, Mayıs 2023 ve Aralık 2023 dönemlerinde  $>10$  pg/mL seviyesinin üzerinde olması nedeniyle bu durumun "düzeltici aksiyon" kapsamında değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Nescerecka ve arkadaşlarının (2016) yayınladığı çalışmada, klor konsantrasyonlarına bağlı olarak hücresel ve ekstrasellüler ATP konsantrasyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Sonuçlar, klor konsantrasyonlarının artmasıyla hücresel ATP seviyesinin azaldığını, ancak ekstrasellüler ATP konsantrasyonlarının yalnızca klor dozunun  $0,35$  mg/L'yi aştığında arttığını göstermiştir. Klor artışının hasarlı bakterilerden ATP salınımına yol açtığı belirtilmiştir. Yapılan büyüme potansiyeli testleri, ekstrasellüler ATP moleküllerinin bakteri çoğalmasında bir fosfor kaynağı olarak kullanıldığını ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, yüksek klor dozlarına maruz kalan bakterilerden salınan ATP'nin, bakteri yeniden çoğalmasını teşvik edebileceği ve içme suyu dağıtım sistemlerinde biyolojik istikrarsızlığa katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır. İçme suyunda meydana gelen ATP dalgalanmalarının mevsimsel su döngüsü ve iklimle ilişkili olduğu, dağıtım sistemi ve musluklardaki değişimlerin ise depoların temizlik takvimi, klor dozu ve suyun depoda bekleme süresiyle bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır. Yaz aylarında klor dozu  $0,5-0,7$  mg/L arasında değişmektedir. Yüksek klor konsantrasyonları, dezenfeksiyon sırasında bakterilerden ATP salınmasına neden olur ve hücre dışı ATP, steril ortamlarda stabil kalır. Büyüyen bakteriler hücre dışı ATP'yi

fosfat kaynağı olarak kullanabilir. Dezenfeksiyondan kaynaklanan hücre dışı ATP, suyun biyolojik dengesizliğine katkıda bulunabilir. Mikrobiyal ATP'nin ölçülmesi, oldukça düşük ve stabil mikrobiyal ATP konsantrasyonları ile karakterize edilen içme suyundaki küçük değişiklikleri hızlı ve etkin bir şekilde tespit etmeyi sağlamaktadır.

Mikrobiyal hücrelerin yaşamsal özelliklerini anlamak, bu hücrelerin topluluklarının ekolojisini doğru bir şekilde değerlendirebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, doğal ortamlardaki mikroorganizmaların fizyolojik durumu bugüne kadar sınırlı düzeyde incelenmiştir. Çeşitli habitatların karmaşık koşullarını laboratuvar ortamında yeniden oluşturmanın zorlukları ve çevresel mikroorganizmaların kültüre edilmesindeki güçlükler, su temin zincirinde planktonik, flok ve biyofilm formlarında bulunabilen mikroorganizmaların, bulundukları ortamlardan ayrılmadan incelenmesini gerektirmektedir. Çalışmamızda elde edilen görüntüleme sonuçları, klorlu ve ham su kaynaklarında yalnızca serbest bakterilerin değil, aynı zamanda filamentli bakterilerin de bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, yaz dönemi numuneleri ile karşılaştırıldığında, filamentli bakterilerin yanı sıra biyofilm parçalarının kopması sonucu olduğu düşünülen flok benzeri bakteriyel toplulukların varlığı da tespit edilmiştir.

Yüksek enerjili mikroskopla elde edilen kalitatif görüntüleme sonuçları, filamentli bakteriler ile serbest/biyofilm oluşturan bakterilerin yoğunluklarının zaman içinde ve farklı numune kaynakları arasında önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Filamentli bakteriler genellikle orta yoğunlukta bulunurken, serbest/biyofilm oluşturan bakteriler bazı dönemlerde daha belirgin yoğunluk artışları göstermektedir. Bu durum, farklı fizyolojik yapıya sahip bakterilerin çevresel koşullara verdikleri tepkilerin çeşitlilik gösterdiğini ve su dağıtım sistemlerindeki mikrobiyal dinamiklerin oldukça karmaşık olduğunu işaret etmektedir. Özellikle belirli kaynak lokasyonları (örneğin, 5 ve 14 numaralı kaynaklar), hem filamentli hem de serbest/biyofilm bakteriler açısından kritik öneme sahip noktalar olarak öne çıkmaktadır.

Literatürde, sıcaklık dalgalanmalarının biyofilm büyüme oranlarını önemli ölçüde etkilediği vurgulanmaktadır. Örneğin, amonyak oksitleyici bakteriler yaz aylarında 22°C'de, sonbaharda ise 12°C'de daha gelişmiş biyofilmler oluşturabilmektedir. Yüksek türbülanslı su akış rejimlerinde daha ince ve yoğun biyofilmler gözlemlenirken, düşük akış hızlarında daha gözenekli ve gevşek yapıda biyofilmler olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, korozyona yatkın metal borular üzerinde biyofilm

oluşumuna eğilimin yüksek olduğu, polimer bazlı boruların ise biyofilm büyümesini teşvik eden organik bileşiklerin sızmasına neden olabileceği belirtilmektedir. Bu bağlamda, su dağıtım sistemlerindeki biyofilm büyümesinin yönetimi, suyun ağlara girmeden önce arıtılmasıyla başlayan ve "biyofilm sınırlayıcı" işletme koşullarının uygulanmasından, biyofilm izleme ve kontrolü için uygun teknolojilerin dikkatli bir şekilde seçilmesine kadar entegre bir yaklaşımı gerektirmektedir. Geleneksel uygulamalar arasında klor-kloramin dezenfeksiyonu ve besin maddelerinin uzaklaştırılması gibi yöntemler yer almakta olup, bu uygulamalara ilişkin zorluklar literatürde geniş çapta tartışılmaktadır (Liu ve ark., 2016). Filamentli bakteriler, genellikle nötr pH aralığında (pH=7) ve orta sıcaklık koşullarında (20-30°C) en iyi şekilde gelişir. Bu koşullar, içme suyu arıtma tesislerinde yaygın olarak görülen su kimyasıyla uyumlu olup, filamentli bakterilerin varlığını destekleyebilir (Madigan ve Martinko, 2006).

Mikrobiyal kontaminasyonun ana kaynaklarının tespit edilmesi, bu mikroorganizmaların kontrollü ortamlarda nasıl çoğaldığını ve insanlardan yüzeylere, yüzeylerden insanlara nasıl bulaştığını anlamamız açısından büyük önem taşımaktadır. Antimikrobiyal direncin kontrol altına alınması ve etkili yönetimi, günümüzün en kritik küresel sağlık sorunlarından biri olup, bu amaç doğrultusunda küresel ölçekte çevresel bir çerçevenin oluşturulması zorunlu hale gelmiştir. Bu tez çalışması, "Tek Sağlık" yaklaşımıyla uyumlu veri setleri sunarak su temin zincirini analiz etmeyi ve ülke genelinde uygulanabilecek bir standardizasyonun temelini oluşturmayı hedeflemektedir. Ayrıca, bu çalışma, gelecekte yapılacak araştırmalara referans niteliği taşıyan bir ön araştırma olup, alandaki bilgi birikimine katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Benzer çalışmaların artması ve bu çalışmaların sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi, daha etkin izleme ve kontrol sistemlerinin geliştirilmesine önemli katkılar sunacaktır.

## KAYNAKLAR

- Allan, E. J., Hoischen, C., & Gumpert, J. (2009). Bacterial L-forms. *Advances in Applied Microbiology*, 68, 1-39. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01201-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01201-5)
- Allen, H.K., Donato, J., Wang H. H., Cloud-Hansen K.A., Davies J., & Handelsman J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 8251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Allen, M. J., Edberg, S. C., & Reasoner, D. J. (2004). Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*, 92(3), 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.017>
- Alum, A. ve Isaacs, G. Z. (2016). Aerobiology of the built environment: synergy between Legionella and fungi. *American Journal of Infection Control*, 44(9), S138-S143. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.06.004>
- Amato, S. M., Fazen, C. H., Henry, T. C., Mok, W. W. K., Orman, M. A., Sandvik, E. L., Volzing K. G., & Brynildsen M. P. (2014). The role of metabolism in bacterial persistence. *Frontiers in Microbiology*, 5:70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00070>
- American Society for Microbiology. Plants may be transmitting superbugs to people. ScienceDaily.[www.sciencedaily.com/releases/2019/06/190623122530.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2019/06/190623122530.htm) So n erişim tarihi: 11 Temmuz 2019.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). (2008). ASTM D5952-08 Standard Guide for Inspection of Water Systems for *Legionella* and the Investigation of Possible Outbreaks of Legionellosis (Legionnaires' Disease or Pontiac Fever) (West Conshohocken, PA).
- Anuj, S.N., Whiley, D.M., Kidd, T.J., Bell, S.C., Wainwright, C.E., Nissen, M.D., & Sloots, T.P. (2009). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.018>
- APHA/AWWA/WEF. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. Government Printing Office, Washington, DC.
- ASM Microbe, 2019. San Francisco, California, USA

- Barbaree, J.M., Gorman, G.W., Martin, W.T., Fields, B.S., & Morrill, W.E. (1987). Protocol for sampling environmental sites for legionellae. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (7), 1454-1458. <https://doi.org/10.1128/aem.53.7.1454-1458.1987>
- Bartie, C., Venter, S.N., & Nel, L.H. (2001). Evaluation of detection methods for *Legionella* species using seeded water samples. *Water SA*. 27 (4), 523-527. <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i4.4966>
- Bartram, J., Corrales, L., Davison, A., Deere, D., Drury, D., Gordon, B., Howard, G., Rinehold, A., ve Stevens, M. (2009). *Water safety plan manual: step-by-step risk management for drinking-water suppliers*. World Health Organization. Geneva.
- Benjamin M., Sontheimer H., Leroy P. (1996). Corrosion of iron and steel. In: Internal corrosion of water distribution systems, second edition. Denver (CO): American Water Works Association Research Foundation; and Karlsruhe: DVGW-Technologiezentrum Wasser
- Bernier S. P., Lebeaux D., Defrancesco A. S., Valomon A., Soubigou G., Coppée J.-Y., et al. (2013). Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLOS Genetics*, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>
- Beumer, A. ve Robinson, J.B. (2005). A broad host range generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8301–8304. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8301-8304.2005>
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), 560-602. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004>
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotin, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., ... Burden of AMR Collaborative Group. (2018). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 56-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2005). *Procedures for the Recovery of Legionella from the Environment*. National Center for Infectious Diseases (U.S.). Erişim adresi <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11895>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2011). *Legionellosis – United States, 2000–2009*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 60(32), 1083–6. Erişim adresi <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6032a3.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). *Naegleria fowleri – Primary amoebic meningoencephalitis (PAM): public drinking water system*. Centers for Disease Control and Prevention.



- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States*, (AR Threats Report). Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/data-research/threats/index.html>
- Cizmas, L., Sharma, V. K., Gray, C., & McDonald, T. J. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environmental Chemistry Letters*, 13, 381-394. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0524-4>
- Clasener, H. (1972). Pathogenicity of the L-phase of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 26: 55-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.26.100172.000415>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 1265-1274. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt528>
- Costerton J.W., Stewart P.S., & Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- D'Onofrio, A., Crawford, J. M., Stewart, E. J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J., & Lewis, K. (2010). Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry & Biology*, 17, 254-264. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.02.010>
- Dorsch, M. M., Cameron, A. S., & Robinson, B. S. (1983). The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3):372-7. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90167-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90167-0)
- Dalebroux Z. D., ve Swanson M. S. (2012). ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 203-212. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2720>
- Davies, J., ve Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 417-433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- de Jesus Gaffney, V., Almeida, C.M.M., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M.J., & Cardoso, V.V. (2015). Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research*, 72, 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.027>
- Denoncourt, A. M., Paquet, V. E., & Charette, S. J. (2014). Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5, 240. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00240>
- Dienes, L. (1947). The morphology of the L1 of Klieneberger and its relationship to *Streptobacillus moniliformis*. *Journal of Bacteriology*, 54, 231-237. <https://doi.org/10.1128/jb.54.2.231-237.1947>
- Dienes, L., ve Weinberger, H. J. (1951). The L forms of bacteria. *Bacteriological Reviews*, 15: 245-288. <https://doi.org/10.1128/br.15.4.245-288.1951>

- Dikici, A. (2009). Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, 3, 59-68.
- Dodd, M.C. (2012). Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring*, 14, 1754-1771. <https://doi.org/10.1039/c2em00006g>
- Domingue G. J. ve Woody H. B. (1997). Bacterial persistence and expression of disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(2), 320–44. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.2.320>
- Du, H., Li, J., Moe, B., McGuigan, C. F., Shen S., & Li, X. F. (2013). Cytotoxicity and oxidative damage induced by halobenzoquinones to T24 bladder cancer cells. *Environ Science & Technology*, 47(6):2823–30. <https://doi.org/10.1021/es303762p>
- Dutka-Malen, S., Evers, S., & Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 24–27. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.1.24-27.1995>
- Ellison, C. K., Dalia, T. N., Ceballos, A. V., Wang, J. C. Y., Biais, N., Brun, Y. V., & Dalia, A. B. (2018). Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*. *Nature microbiology*, 3(7), 773. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0174-y>
- Epstein, S. S. (2013). The phenomenon of microbial uncultivability. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.003>
- Errington, J., Mickiewicz, K., Kawai, Y., & Wu, L. J. (2016). L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1707), 20150494. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0494>
- Espelund, M. ve Klaveness, D. (2014). Botulism outbreaks in natural environments- an update. *Frontiers in Microbiology*, 5, 287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00287>
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 251-275. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>
- Faucher, S. P. ve Charette, S. J. (2015). Editorial on: Bacterial pathogens in the non-clinical environment, *Frontiers in Microbiology*, 6, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00331>
- Ferroni, A., Nguyen, L., Pron, B., Quesne, G., Brusset, M.C., & Berche, P. (1998). Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *Journal of Hospital Infection*, 39 (4), 301-307. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(98\)90295-X](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(98)90295-X)
- Fineran, P. C., Petty, N. K., ve Salmond, G. P. C. (2009). Transduction: host DNA transfer by bacteriophages. M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 666–679). Elsevier Academic Press.

- Flemming, H. C. ve Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flournoy, R. L., Monroe, D., Chestnut, N. H., & Kumar, V. (1999). Health effects from vinyl chloride monomer leaching from pre-1977 PVC pipe. In: *Proceedings of the AWWA Annual Conference. Denver (CO): American Water Works Association.*
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., & Parkin, W. E. (1989). Legionnaires Disease: Description of an Epidemic of Pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, 297, 1189–1197. <https://doi.org/10.1056/NEJM197712012972201>
- Garner, E., McLain, J., Bowers, J., Engelthaler, D. M., Edwards, M. A., & Pruden, A. (2018). Microbial ecology and water chemistry impact regrowth of opportunistic pathogens in full-scale reclaimed water distribution systems. *Environmental Science & Technology*, 52(16), 9056-9068. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02818>
- Glover, W. A., Yang, Y., & Zhang, Y. (2009). Insights into the molecular basis of L-form formation and survival in *Escherichia coli*. *PLoS one*, 4(10), 7316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007316>
- Halabi, M., Wiesholzer-Pittl, M., Schoberl, J., & Mittermayer, H. (2001). Non-touch fittings in hospitals: a possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella spp.*. *Journal of Hospital Infection*, 49(2), 117-121. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1060>
- Hammes, F., Berney, M., & Egli, T. (2011). Cultivation-independent assessment of bacterial viability. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 124, 123–150. [https://doi.org/10.1007/10\\_2010\\_95](https://doi.org/10.1007/10_2010_95)
- Hardwick, S.A., Stokes, H.W., Findlay, S., Taylor, M., & Gillings, M.R. (2008). Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 278, 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00992.x>
- Hattori, N., Sakakibara, T., Kajiyama, N., Igarashi, T., Maeda, M., Murakami, S. (2003). Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride. *Analytical Biochemistry*, 15;319(2):287-95. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00322-1](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00322-1). PMID: 12871724.
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, 4(9), 1432-1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Highmore, C. J., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S. A., & Keevil, C. W. (2018). Viable-but-Nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson Induced by Chlorine Stress Remain Infectious. *mBio*, 9, 2, 1-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00540-18>
- Horsburgh, C. R. (1991). Mycobacterium avium complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 324 (19), 1332–1338. <https://doi.org/10.1056/NEJM199105093241906>

- International Standards Organization (ISO), (2004). *ISO 11731-2:2004 Water Quality Detection and Enumeration of Legionella - Part 2: Direct Membrane Filtration Method for Waters with Low Bacterial Counts*. Geneva, Switzerland.
- Jonas, K. (2014). To divide or not to divide: control of the bacterial cell cycle by environmental cues. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.006>
- Joseleau-Petit, D., Liébart, J. C., Ayala, J. A., & D'Ari, R. (2007). Unstable *Escherichia coli* L forms revisited: growth requires peptidoglycan synthesis. *Journal of Bacteriology*, 189(18), 6512–6520. <https://doi.org/10.1128/JB.00273-07>
- Joux, F., Lebaron, P., & Troussellier, M. (1997). Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(1), 65-76. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(96\)00077-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(96)00077-3)
- Kaeberlein, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2002). Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296, 1127–1129. <https://doi.org/10.1126/science.1070633>
- Karl, D. M. (1980). Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiology Reviews*, 44, 739–796. <https://doi.org/10.1128/mr.44.4.739-796.1980>
- Keen, E.C. ve Dantas, G. (2018). Close encounters of three kinds: bacteriophages, commensal bacteria, and host immunity. *Trends in Microbiology*, 26, 943–954. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.009>
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. P., & Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230, 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00856-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00856-5)
- Koplan, J. P., Bond, T. C., Merson, M. H., Reddy, K. S., Rodriguez, M. H., Sewankambo, N. K., & Wasserheit, J. N. (2009). Towards a common definition of global health. *The Lancet*, 373(9679), 1993-1995. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60332-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60332-9)
- Krasner, S.W. (2009). The formation and control of emerging disinfection by-products of health concern. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1904), 4077–95. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0108>
- Lang, A., Zhaxybayeva, O. & Beatty, J. (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic Exchange. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2802>
- Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., & Hammes, F. (2010). Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Research*, 44, 4868–4877. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.032>

- Lavenir, R., Sanroma, M., Gibert, S., Crouzet, O., Laurent, F., Kravtsoff, J., Mazoyer, M. A., & Cournoyer, B. (2008). Spatio-temporal analysis of intra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *Journal of Applied Microbiology* 105(5), 1491-1501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03907.x>
- Leaver, M., Dominguez-Cuevas, P., Coxhead, J. M., Daniel, R. A., & Errington, J. (2009). Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature*, 457(7231), 849. <https://doi.org/10.1038/nature07742>
- Lechner, S., Lewis, K., & Bertram, R. (2012). *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 22, 235–244. <https://doi.org/10.1159/000342449>
- Lennon, J. T., & Jones, S. E. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 119. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Li, Z., Xiang, X., Li, M., Ma, Y., Wang, J., & Liu, X. (2015). Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and personal care products and endocrine disrupting chemicals in reclaimed water and receiving groundwater in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.031>
- Liguori, K., Keenum, I., Davis, B. C., Calarco, J., Milligan, E., Harwood, V. J., & Pruden, A. (2022). Antimicrobial Resistance Monitoring of Water Environments: A Framework for Standardized Methods and Quality Control, *Environmental Science & Technology*, 56, 13, 9149–9160, <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08918>
- Liu, G., Bakker, G. L., Li, S., Vreeburg, J. H., Verberk, J. Q., Medema, G. J., Liu, W. T., & Van Dijk J. C. (2014). Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. *Environmental Science & Technology*, 48, 5467–5476. <https://doi.org/10.1021/es5009467>
- Liu, S., Gunawan, C., Barraud, N., Rice, S.A., Harry, E.J., Amal, R. (2016). Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 8954-76. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00835>
- Lytle D. A. & Schock M. R. (1996). *Stagnation, time, composition, pH and orthophosphate effects on metal leaching from brass*. United States Environmental Protection Agency (EPA/600/R-96-103).
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Prentice Hall.
- Martínez, J. L. (2014). Short-sighted evolution of bacterial opportunistic pathogens with an environmental origin. *Frontiers in Microbiology*, 5:239. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00239>
- Mattman, L. (2000). *Cell Wall Deficient Forms: Stealth Pathogens* (3rd ed.). CRC Press. Boca Raton, FL. <https://doi.org/10.1201/b16928>

- McDaniel, L. D., Young, E., Delaney, J., Ruhnau, F., Ritchie, K. B., & Paul, J. H. (2010). High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science*, 330, 50. <https://doi.org/10.1126/science.1192243>
- McDougald, D., Rice, S. A., Weichart D. & Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: adaptation or debilitation?. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00455.x>
- Mercier, R., Kawai, Y., & Errington, J. (2013). Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. *Cell*, 152(5), 997-1007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.043>
- Morran, J., Whittle, M., Fabris, R. B., Harris, M., Leach, J. S., Newcombe, G., & Drikas, M. (2011). Nitrosamines from pipeline materials in drinking water distribution systems. *Journal of the American Water Works Association.*, 103(10), 76–83. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2011.tb11549.x>
- Morran, J., Whittle, M., Leach, J., & Harris, M. (2009). A new source of NDMA in potable water supplies. *Water*, 36(5), 99–101.
- Murray, G. E., Tobin, R. S., Junkins, B., & Kushner, D. J. (1984). Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage related bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 73–77. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.73-77.1984>
- Möker, N., Dean, C. R., & Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of Bacteriology*, 192, 1946–1955. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>
- National Research Council. (2005). Public water supply distribution systems: assessing and reducing risks – First report. Washington (DC): The National Academies Press (<http://www.nap.edu/catalog/11262.html>, Son erişim tarihi: 10 Haziran 2015).
- National Research Council. (2006). Drinking water distribution systems: assessing and reducing risks. Washington (DC): The National Academies Press, [http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=11728](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=11728), Son erişim tarihi: 10 Haziran 2015.
- Nescerecka, A., Rubulis, J., Vital, M., Juhna, T., & Hammes, F. (2014). Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network. *PLOS ONE*, 9: e96354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096354>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43, 93–100.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (3), 538–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- Pico, Y., ve Barcelo, D. (2015). Transformation products of emerging contaminants in the environment and high-resolution mass spectrometry: a new horizon. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 6257-6273. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8739-6>

- Power, K.N., Schnerder, R.P., & Marshall, K.C. (1997). The effect of growth conditions on survival and recovery of *Klebsiella Oxytoca* after exposure to chlorine. *Water Research*, 31, 135–139. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00220-5)
- Power, K.N., ve Nagy, A. L. (1999). Relationship between bacterial regrowth and some physical and chemical parameters within Sydney's drinking water distribution system. *Water Research*, 33(3), 741–50. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00251-6)Get rights and content
- Pruden, A. (2014). Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance. *Environmental Science & Technology*, 48, 5-14. <https://doi.org/10.1021/es403883p>
- Prütz, W.A. (1996). Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332, 110-120. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0322>
- Prütz, W.A. (1998). Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 349, 183-191. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0440>
- Radomski, N., Lucas, F.S., Moilleron, R., Cambau, E., Haenn, S., & Moulin, L. (2010). Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7348–7351. <https://doi.org/10.1128/AEM.00942-10>
- Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (4), 1094–156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998>
- Reasoner, D. J. (2004). Heterotrophic plate count methodology in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 307-315. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.008>
- Richardson, S. D. ve Ternes, T. A. (2014). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 86, 2813-2848. <https://doi.org/10.1021/ac500508t>
- Rittman, B. ve Snoeyink, V.L. (1984). Achieving biologically stable drinking Water. *Journal American Water Works Association*, 76 (10), 9. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1984.tb05427.x>
- Robertson, P., Abdelhady, H., & Garduño, R. A. (2014). The many forms of a pleomorphic bacterial pathogen—the developmental network of *Legionella pneumophila*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00670>
- Roller, S. D., Olivieri, V. P., Kawata, K. (1980). Mode of bacterial inactivation by chlorine dioxide. *Water Research*, 14, 635-641. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90121-9)
- Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Stessl, B., Rossmanith, P., & Mester, P. (2019). A Fast and Easy ATP-Based Approach Enables MIC Testing for Non-resuscitating VBNC Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1365. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01365>

- Schmidtke, L. M. ve Carson, J. (1999). Induction, characterization and pathogenicity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) of *Lactococcus garvieae* L-forms. *Veterinary Microbiology*, 69, 287–300. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00120-0)
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 325–335. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00444-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00444-0)
- Schock, M. R., Lytle, D. A., & Clement, J. A. (1995). *Effect of pH, DIC, orthophosphate, and sulfate on drinking water cuprosolvency*. Cincinnati (OH), United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development (EPA/600/R-95/085).
- Shakoor, S., Beg, M. A., Mahmood, S. F., Bandea, R., Sriram, R., Noman, F., Ali, F., Visvesvara, G. S., & Zafar, A. (2011). Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), 258–61. <https://doi.org/10.3201/eid1702.100442>
- Sharma, V. K., Liu, F., Tolan, S., Sohn, M., Kim, H., Oturan, M.A. (2013). Oxidation of beta-lactam antibiotics by ferrate(VI). *Chemical Engineering Journal*, 221, 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.024>
- Shih, K. ve Lederberg, J. (1976). Effects of chloramine on *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 125, 934–945. <https://doi.org/10.1128/jb.125.3.934-945.1976>
- Silbergeld, E. K., Graham, J., & Price, L. B. (2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual Review of Public Health*, 29, 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090904>
- Skjerve, I., Lund, V., Ormerod, K., Due, A., Herikstad, H. (2004). Biofilm in water pipelines; a potential source for off-flavours in the drinking water. *Water Science Technology*, 49 (9), 211–17. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0573>
- Spoering, A. L. ve Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183, 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>
- Surette, M. D. ve Wright, G. D. (2017). Lessons from the environmental antibiotic resistome. *Annual review of microbiology*, 71(1), 309–329. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093420>
- Suzuki, M. T., Taylor, L. T., & DeLong, E. F. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4605–4614. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000>
- Traxler, M. F., Chang, D. E., & Conway, T. (2006). Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxic in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 103, 2374–2379. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510995103>



- U. K. Environmental Agency. (2005). *The Determination of Legionella Bacteria in Waters and Other Environmental Samples (2005)- Part 1- Rationale of Surveying and Sampling - Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*. Erişim adresi chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\_data/file/755582/book\_200\_1028650.pdf
- UNHCR The office of the United Nations High Commissioner for Refugees. (2020). [https://www.ohchr.org/en/ohchr\\_homepage](https://www.ohchr.org/en/ohchr_homepage) Son erişim tarihi: 15 Mayıs 2024.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (2006). Distribution system indicators of drinking water quality. Total Coliform Rule Issue Paper. Washington (DC): United States Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Ground Water and Drinking Water.
- Vaerewijck, M. J. M., Huys, G., Palomino, J. C., Swings, J., & Portaels, F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 5, 911–934, <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.02.001>
- van der Kooij, D. (2000). Biological stability: a multidimensional quality aspect of treated Water. *Water Air Soil Pollution*, 123, 25–34. <https://doi.org/10.1023/A:1005288720291>
- van der Wielen, P. W., ve van der Kooij, D. (2010). Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Water Research*, 44, 4860–4867. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.016>
- van der Wielen, P. W. J. J. ve van der Kooij, D. (2013). Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 825-834. <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-12>
- Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2012). Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, 8, 431–433. <https://doi.org/10.1038/nchembio.915>
- Versporten, A., Bolokhovets, G., Ghazaryan, L., Abilova, V., Pyshnik, G., Spasojevic, T., Korinteli, I., Raka, L., Kambaralieva, B., Cizmovic, L., Carp, A., Radonjic, V., Maqsudova, N., Celik, H. D., Payerl-Pal, M., Pedersen, H. B., Sautenkova, N., Goossens, H., & WHO/Europe-ESAC Project Group. (2014). Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. *The Lancet infectious diseases*, 14, 5, 381-387. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70071-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70071-4)
- Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., & Hammes, F. (2012). Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Research*, 46, 4665–4676. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.010>
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D. N., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00317>

- Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. (2019). *Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance: annual report 2019*, WHO Regional Office for Europe, Denmark, WHO Regional Office for Europe. Erişim adresi <https://iris.who.int/handle/10665/359080>
- Waak, M.B., LaPara T. M., Hallé, C., & Hozalski, R. M. (2019). Nontuberculous Mycobacteria in Two Drinking Water Distribution Systems and the Role of Residual Disinfection, *Environmental Science & Technology*, 53, 15, 8563–8573, <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01945>
- Wang, H., Edwards, M., Falkinham, J. O., & Pruden, A. (2012). Molecular Survey of the Occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Amoeba* Hosts in Two Chloraminated Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01492-12>
- Wingender J. ve Flemming H.C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene Environmental Health*, 214, 417–23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
- Wood, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, B. W. (2013). Bacterial persister cell formation and dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7116-7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>
- World Health Organization [WHO] (2006). *Guidelines for Drinking Water Quality: Incorporating First Addendum*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2011). *Guidelines for drinking-water quality, fourth edition*. Geneva: WorldHealthOrganization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950> Son erişim tarihi: 05 Haziran 2024.
- Yu, F. P. ve McFeters, G. A. (1994). Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2462-2466. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2462-2466.1994>
- Zhang, W.D. ve DiGiano, F.A. (2002). Comparison of bacterial re growth in distribution systems using free chlorine and chloramine: a statistical study of causative factors. *Water Research*, 36, 1469–1482. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00361-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00361-X)
- Zhong, D., Zhou, Z., Ma, W., Ma, J., Feng, W., Li, J., & Du, X. (2022). Antibiotic enhances the spread of antibiotic resistance among chlorine-resistant bacteria in drinking water distribution system, *Environmental Research*, 211, 113045, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113045>.
- Zuo, Y., Wang, Y., & Steitz, T. A. (2013). The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Molecular cell*, 50(3), 430-436. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.020>

## ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Binnur KIRATLI

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2008, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yüksek lisans ABD** : 2013, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Çevre Mühendisliği

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2009-2010 yıllarında Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Öğrenci asistanlığı yaptı.
- 2013 yılından beri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde Biosidal ve ARGE Laboratuvarlarında Uzman olarak çalışmaktadır.
- TÜBİTAK BİDEB 2250- (2022). Performans Bursunu kazandı.
- TÜBİTAK BİDEB 2250- (2023- İlk dönem). Performans Bursunu kazandı.
- TÜBİTAK BİDEB 2250- (2023- İkinci dönem). Performans Bursunu kazandı.
- TÜBİTAK BİDEB 2250- (2024 - İlk dönem). Performans Bursunu kazandı.
- TÜBİTAK BİDEB 2250- (2024 - İkinci dönem). Performans Bursunu kazandı.

### DİĞER ESERLER:

- Canbulat, S., Berber, A., & Kıratlı, B. (2010). Examination of External and Internal Genital Structures of Some Male Species of the genus *Dichochrysa* Insecta Neuroptera Chrysopidae. Pamukkale University, 20. *National Biology Congress*. (No:902495), Denizli, Türkiye. (Poster)
- Herand, B. K., Öncel S., & Özkan M. (2011). Bioremoval of heavy metals from synthetic wastewater by local Bacterial isolates immobilized on polymeric matrix, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(1), 7. (Poster)
- Demirkan, S., Kadioglu, D., Guvenc, B., Etemoglu, S., Kıratlı, B., & Sahin, F. (2017) Acquisition of 3D Natural Scaffold by Decellularization. (Poster)

- Ölmezoğlu, E., Herand, B. K., Öncel, M. S., Tunc, K., & Ozkan, M. (2012). Copper bioremoval by novel bacterial isolates and their identification by 16S rRNA gene sequence analysis. *Turkish Journal of Biology*, 36(4), 469-476.
- Herand, B. K., Simsek, E. K., Öncel, M. S., & Ozkan, M. (2014). Continuous metal bioremoval by new bacterial isolates in immobilized cell reactor. *Annals of Microbiology*, 64(2), 699-706.
- Akşit Bıçak, D., Akyuz, S., Kıratlı, B., Usta, M., Urgancı, N., Alev, B., Yarat, A., & Sahin, F. (2017). The investigation of *Helicobacter pylori* in the dental biofilm and saliva samples of children with dyspeptic complaints. *BMC Oral Health*, 17(1), 67.
- Dogan, A., Demirci, S., Kıratlı, B., & Sahin, F. (2017). Cytochrome c: a potential marker for adipogenic differentiation in preadipocytes in vitro. *Cytotechnology*, 69(1), 157-165.
- Hayal, T. B., Kıratlı, B., Sisli, H. B., Sahin, F., & Dogan, A. (2018). Mesenchymal stem cells as regulators of carcinogenesis. *Cell Biology and Translational Medicine*, Volume 5, 147-166.
- Bouali, W., Sahin, F., Aissaoui, N., Altin, G., Mesli, B., Kıratlı, B., Kalaycı, S., & Abdelouahid, D. E. (2019). Polyextremotolerant *Bacillus cereus* groups isolated from Algerian arid ecosystems and bioprospecting for their bioactive compounds. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 9(6), 222-228. ISSN: 2230-9799
- Demirci, S., Hayal, T. B., Kıratlı, B., Sisli, H. B., Demirci, S., Sahin, F., & Dogan, A. (2019). Design and synthesis of phenylpiperazine derivatives as potent anticancer agents for prostate cancer. *Chemical Biology & Drug Design*, 94(3), 1584-1595.
- Sisli, H. B., Hayal, T. B., Seckin, S., Senkal, S., Kıratlı, B., Sahin, F., & Dogan, A. (2019). Gene editing in human pluripotent stem cells: recent advances for clinical therapies. *Cell Biology and Translational Medicine*, Volume 7, 17-28.
- Hayal, T. B., Dogan, A., Sisli, H. B., Kıratlı, B., & Sahin, F. (2020). Ubiquitin-specific protease 7 downregulation suppresses breast cancer in vitro. *Turkish Journal of Biology*, 44(4), 145-157.
- Şişli, H. B., Hayal, T. B., Şenkal, S., Kıratlı, B., Sağraç, D., Seçkin, S., Özpolat, M., Şahin, F., Yılmaz, B., & Dogan, A. (2020). Apelin receptor signaling protects GT1-7 GnRH neurons against oxidative stress in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-23.
- Olçay, K., Taşlı, P. N., Güven, E. P., Ülker, G. M. Y., Ögüt, E. E., Çiftçioğlu, E., Kıratlı, B., & Şahin, F. (2020). Effect of a novel bioceramic root canal sealer on the angiogenesis-enhancing potential of assorted human odontogenic stem cells compared with principal tricalcium silicate-based cements. *Journal of Applied Oral Science*, 28.
- Dogan, A., Senkal, S., Sisli, H., Hayal, T., Sağraç, D., Sahin, F., Asutay, A., Sümer, E., & Kıratlı, B. (2021). Neuromesodermal progenitors (NMPS) with primitive streak origin differentiate into functional mesenchymal stem cells (MSCs). *Cytotherapy*, 23(5), S124-S125.

- Şenkal, S., Hayal, T. B., Sağraç, D., Şişli, H. B., Asutay, A. B., Kıratlı, B., Sümer, E., Rizvanov, A.A., Şahin F., & Doğan, A. (2022). Human ESC-derived Neuromesodermal Progenitors (NMPs) Successfully Differentiate into Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Stem Cell Reviews and Reports*, 1-16.
- Şişli, H. B., Hayal, T. B., Şenkal, S., Bulut, E., Kıratlı, B., Asutay, A. B., Şahin, F., Bayrak, Ö. F., & Doğan, A. (2023). Activation of Wnt Pathway Suppresses Growth of MUG-Chor1 Chordoma Cell Line. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 81(4), 823-837.
- Şahin, F., İyigünoğlu Z., Demir, O., Kalaycı, S., Kıratlı, B. (2019). Antimicrobial insect repellent compositions. Patent numarası: WO/2019/032061 (Patent)

