İstanbul'daki Yüzme Havuzu Suları ve Biyofilm Örneklerinde *Legionella* ve Serbest Yaşayan Amiplerin Görülme Sıklığının Farklı Yöntemlerle Araştırılması

Investigation of the Incidence of *Legionella* and Free-Living Amoebae in Swimming Pool Waters and Biofilm Specimens in Istanbul by Different Methods

Zuhal ZEYBEK¹(ID), Ayşenur TÜRKMEN²(ID)

¹ İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Istanbul University Faculty of Science, Department of Biology, Department of Fundamental and Industrial Microbiology, Istanbul, Turkey.

² İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

² Istanbul University, Institute of Graduate Studies in Science and Engineering, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 9269).

** Bu çalışma, "1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on entrepreneurship and innovation (ISGRS 2018)" Sempozyumu (4-6 Ekim 2018)'nda sunulmuştur.

Makale Atfı: Zeybek Z, Türkmen A. İstanbul'daki yüzme havuzu suları ve biyofilm örneklerinde *Legionella* ve serbest yaşayan amiplerin görülme sıklığının farklı yöntemlerle araştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(1):50-65.

ÖZ

Serbest halde yaşayan ya da biyofilmde bulunan *Legionella* cinsi bakteriler ve serbest yaşayan amipler (SYA), yüzme havuzları aracılığıyla insanlara bulaşıp çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. SYA, ayrıca *Legionella* ve diğer bazı bakteriler için konak olma yeteneğinde oldukları için de yüzücülerin sağlığını tehdit edebilmektedir. Bu çalışmada, İstanbul'daki yüzme havuzu suları ve biyofilm örneklerinde toplam aerobik heterotrofik bakteriler (TAHB), SYA ve *Legionella* bakterilerinin varlığının kültür ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. TAHB, *Legionella* ve SYA'nın kültürü için sırasıyla "water plate count agar (wPCA)", glisin-vankomisin-polimiksin-sikloheksimit (GVPC) eklenmiş "buffered charcoal yeast extract (BCYE)" agar, *Escherichia coli* ekilmiş "non-nutrient agar (NNA)" kullanılmıştır. FISH yöntemiyle analiz amacıyla *Legionella* için floresan boya ile işaretli Leg 705 ve Leg PNE1 problemleri, *Acanthamoeba* cinsi SYA için ACANTHA probu kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152, *L. pneumophila* serogrup 3 ATCC 33155, *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 suşları kullanılmıştır. Su ve biyofilm örneklerinin %92 ve %84'ünde TAHB üretilmiştir. Su örneklerinin hiçbirinde *Legionella* bakterileri üretilmediği halde, FISH yöntemiyle 6 (%24) su örneğinde bakteri tespit edilmiştir. Bu bakteriler biyofilm örneklerinin 1 (%4)'inde üretilmediği halde FISH yöntemiyle 7 (%28)'inde tespit edilmiştir. SYA, su örneklerinde kültürle %16, FISH analiziyle %28

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Zuhal Zeybek, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Tel (Phone): +90 212 455 57 00, **E-posta (E-mail):** zeybek@istanbul.edu.tr

oranında saptanmıştır. Bu amipler, biyofilm örneklerinde, kültür ve FISH yöntemiyle sırasıyla %8 ve %24 oranında tespit edilmiştir. İzole edilen bir SYA izolatının termotoleran aktiviteye sahip (potansiyel patojen) olduğu bulunmuştur. Bir su ve dört biyofilm örneğinde *L.pneumophila* serogrup 1 varlığı tespit edilmiştir. Kültür yöntemine göre, TAHB ve SYA'ya su örneklerinde biyofilm örneklerindeki göre daha fazla, *Legionella* cinsi bakterilere ise biyofilm örneklerinde su örneklerindeki göre daha fazla oranda rastlandığı tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). *Legionella* cinsi bakterilerin tespitinde FISH yönteminin kültür yöntemine göre üstün olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Bu çalışma ile denetimi yapılan yüzme havuzlarında TAHB sayısının Sağlık Bakanlığının belirlediği sınırlar içerisinde (≤ 200 kob/ml) olduğu saptanmıştır. TAHB, SYA ve *Legionella* tespitinde hem su hem de biyofilm örneklerinin incelenmesi yerinde olacaktır. Gerek su gerekse biyofilm örneklerindeki SYA'nın varlığının tespiti için kültür ve FISH yöntemlerinin her ikisinin de kullanılması uygun olabilir. Bu çalışma, İstanbul'daki yüzme havuzlarında *Legionella* ve SYA'ların varlığının araştırıldığı ilk çalışma olup daha fazla sayıda havuz suyu ve biyofilm örneklerinin inceleneceği yeni çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Elde edilecek veriler sayesinde yüzme havuzlarının sağlık esasları ve denetimleri yeniden ele alınıp, halk sağlığına katkı sağlanabilecektir.

Anahtar kelimeler: Yüzme havuzu suyu; biyofilm; *Legionella*; serbest yaşayan amipler; FISH.

ABSTRACT

Legionella bacteria living in free form or in biofilm and free-living amoebae (FLA) can infect humans through swimming pools and can cause various diseases. FLA may also threaten the health of swimmers because they are capable of being hosts for *Legionella* and some other bacteria. The aim of this study was to investigate the presence of total aerobic heterotrophic bacteria (TAHB), FLA and *Legionella* bacteria in swimming pool waters and biofilm samples in Istanbul by using culture and FISH methods. Water plate count agar (WPCA), buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar supplemented with glycine-vancomycin-polymyxin-cycloheximide (GVPC) and *Escherichia coli* cultivated non-nutrient agar (NNA) were used for the culture of TAHB, *Legionella* and FLA. For the FISH method analysis, Leg 705 and Leg PNE1 probes labeled with fluorescent dye for *Legionella* and ACANTHA probe for *Acanthamoeba* genus FLA were used. *Legionella pneumophila* serogroup 1 ATCC 33152, *L.pneumophila* serogroup 3 ATCC 33155 and *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 were used as positive controls. TAHB were grown in 92% and 84% of water and biofilm samples. Although *Legionella* bacteria could not be grown in any of the water samples, it was detected in 6 (24%) water samples by FISH method. Although these bacteria could be grown in 1 (4%) of biofilm samples, 7 (28%) were detected by FISH method. FLA were found to be 16% by culture in water samples and 28% by FISH analysis. These amoebae were detected 8% and 20% in biofilm samples by culture and FISH method, respectively. It was determined that one of the isolates of FLA had thermotolerant activity (potentially pathogenic). *L.pneumophila* serogroup 1 was detected in one water sample and in four biofilm samples. According to the culture method, TAHB and FLA were found to be more common in water samples than in biofilm samples and *Legionella* bacteria were more common in biofilm samples than in water samples ($p \leq 0.05$). In the detection of *Legionella* bacteria, the superiority of FISH method compared to culture method was found to be statistically significant ($p \leq 0.05$). In this study, it was found that the number of TAHB in the controlled swimming pools was within the limits determined by the Ministry of Health (≤ 200 cfu/ml). It will be appropriate to examine both water and biofilm samples for the investigation of TAHB, FLA and *Legionella*. It may be appropriate to use both culture and FISH methods to detect the presence of FLA in water and biofilm samples. This study is the first study to investigate the presence of *Legionella* and FLA in swimming pools in Istanbul, and further studies are needed to examine more pool water and biofilm samples. With the data obtained, the health principles and controls of swimming pools will be re-considered and will be contributed to public health.

Keywords: Swimming pool waters; biofilm; *Legionella*; free-living amoeba; FISH.

GİRİŞ

Yüzme havuzları, sitelerde, özel konutlarda, okullarda, spor salonlarında gerek spor gerekse eğlence amacıyla tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yoğun olarak yüzücü-ler tarafından kullanılmaktadır. Bakımı, temizliği ve dezenfeksiyonu iyi yapılmadığı takdirde yüzme havuzları birçok mikroorganizmanın kaynağı haline gelip, insanlarda birçok hastalığa neden olabilmektedir. Havuz sularında yaşayan mikroorganizmalar, zamanla havuz cidarında, derz aralarında, havuz içi sirkülasyonun oluşmadığı ölü bölgelerde, kum filtrelerinin içinde vb. biyofilm tabakası da oluşturarak dezenfeksiyonda büyük sorunların oluşmasına yol açabilirler¹.

Ülkemizde yüzme havuzlarında uyulması gereken sağlık esasları ve şartları T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 6 Mart 2011 tarihinde T.C. Resmi Gazete'de yayımlanan yönetmelik ile bildirilmiştir. Bu esaslar, kimyasal ve fiziksel parametrelerin yanı sıra, toplam aerobik heterotrofik bakteri (TAHB), toplam koliform bakteri, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* için belirlenmiş değerler ile mikrobiyolojik parametreleri içermektedir². 2015 yılında Ulusal Havuz Enstitüsü tarafından *Legionella* bakterilerinin de önemi belirtilerek, 100 ml havuz suyunda hiç bulunmaması gerektiği yazılı olarak bildirilmiştir³. *Legionella* cinsi bakteriler içerisinde özellikle *Legionella pneumophila* aerosol halde suyun solunmasıyla bulaşan ve pnömoniyle seyreden ciddi enfeksiyonlar oluştururlar⁴. Ayrıca serbest yaşayan amipler (SYA), *Legionella* cinsi bakterileri hücrelerinin içerisine alabilir ve böylece onları dış ortamın olumsuz koşullarından korur, bakteriler ise SYA içerisinde çoğalıp, şartlar uygun hale geldiğinde amip hücrelerini parçalayarak sayılarını da arttırmış olarak dış ortama yayılabilirler⁵⁻⁷. SYA hem bu yetenekleri hem de su ile insanlara bulaşarak granülomatöz amibik ensefalit (GAE), keratit gibi çeşitli hastalıklara neden olma yetenekleri sayesinde bilim insanlarının oldukça ilgisini çekmektedir⁷.

Bu çalışmada, İstanbul'daki yüzme havuzlarından alınan hem su hem de biyofilm örneklerinde TAHB, *Legionella* cinsi bakteriler ve SYA'nın varlığı/sayıları kültüre dayalı ve kültüre dayalı olmayan yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, İstanbul'da altısı açık, 19'u kapalı olan 25 adet yüzme havuzundan alınan su ve biyofilm örnekleri mikrobiyolojik açıdan incelendi (Resim 1). Örneklerin alınması sırasında termometre (Isolab, ölçüm aralığı -20/+50) kullanılarak su sıcaklıkları, Chembio (Bilge kimyevi Lab., Türkiye) klor ve pH kitleriyle, üretici firmanın önerileri doğrultusunda kolorimetrik yöntemle, serbest klor ve pH değerleri ölçüldü. Örneklerin alınması aşamasında sıklıkla havuz işletmelerindeki yetkili kişilerin engellemeleriyle karşılaşıldı. Bakırköy Belediyesi Çevre Koruma ve Kontrol Birimi çalışanlarının desteği ile denetim amacıyla örnek aldıkları takvime uyularak (dokuz havuz için) aynı anda örneklem toplandı.

Örneklerin Toplanması

Yüzme havuzu sularından SYA'nın ve TAHB'nin analizi için 500'er ml'lik steril cam şişeler, *Legionella* cinsi bakterilerin analizi için 3000 ml'lik steril plastik bidonlar kullanıldı.

Resim 1. İstanbul'da örnek alınan yüzme havuzlarının bulunduğu bölgeler.

Su numuneleri T.C. Sağlık Bakanlığı havuz suyu yönetmeliğinde belirtildiği gibi havuz kenarının 50 cm ötesinden ve su yüzeyinin 20 cm altından, şişeler tamamen doldurulmak suretiyle alındı². Örneklerin alınmasından önce havuz suyunda bulunan klorun nötralizasyonu amacıyla örnek kaplarının içerisine 0.5 ml/L %0.5'lik sodyum tiyosülfat eklendi⁸.

Aynı yüzme havuzlarına ait biyofilm örnekleri havuz cidarının 10 cm²'lik alanından steril eküvyon yardımıyla alınıp içerisinde 10 ml steril çeşme suyu bulunan santrifüj tüpü içerisine koyularak en kısa zamanda laboratuvara ulaştırıldı⁹. Alınan tüm örnekler, kültür ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemine göre incelenmek amacıyla, güneş ışığına maruz bırakılmadan 5°C'de en kısa zamanda laboratuvara ulaştırıldı.

Mikrobiyolojik Kültür Yöntemi

Toplam aerobik heterotrofik bakteri kültürü: Laboratuvara getirilen su örnekleri 0.45 µm por çaplı steril membran filtre ve çelik filtre sistemi (Sartorius, Almanya) kullanılarak yoğunlaştırıldı. Biyofilm örnekleri iki dakika "stomacher" (IUL Instruments, 120 sn/50 Hz) cihazında tutuldu ve sonra bir dakika vorteksleildi. Örneklerde TAHB'lerin kültürü için "water plate count agar (wPCA)" besiyeri kullanıldı. Tüm besiyerleri 22°C'de 72 saat, 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Plaklarda üreyen bakteri kolonileri sayılarak kaydedildi. Tüm kültürler üç kez tekrar edilerek çalışıldı¹⁰.

Serbest yaşayan amip kültürü: Laboratuvara getirilen su örnekleri 0.45 µm por çaplı steril membran filtre ve çelik filtre sistemi (Sartorius, Almanya) kullanılarak yoğunlaştırıldı. Biyofilm örnekleri iki dakika "stomacher" (IUL Instruments 120 sn/50 Hz) cihazında tutuldu ve vorteksleildi. Süspansiyonun bir kısmı %50 etanol eklenerek (1/1) FISH yönteminde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı, kalan kısmı kültür yönteminde kullanıldı. Örneklerdeki SYA'nın kültürü için, önceden 200 µl cansız *E.coli* süspansiyonu besiyerine

yayıldı, besleyici değeri olmayan nonnutrient agar (NNA) kullanıldı, 28°C'de 3-10 gün inkübe edildi. Tüm ekimler üç kez tekrar edilerek çalışıldı. Amiplerin trofozoit ve kist şekilleri günlük olarak ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) (100x) incelendi¹¹. Ayrıca, 28°C'de üreyen SYA'nın termotoleran aktivitelerinin araştırılması için yüzeyine taze *E.coli* ekilmiş NNA besiyerine pasajları yapılarak 44°C'de üç gün inkübe edildi¹².

Legionella kültürü: Laboratuvara getirilen su örnekleri *Legionella* cinsi bakterilerin analizi amacıyla 142 mm çaplı, 0.2 µm por çaplı naylon membran filtreler (Sartorius-Sartolon, Almanya) kullanılarak çelik filtre sisteminden süzüldü. Biyofilm örnekleri iki dakika "stomacher" (IUL Instruments 120 sn/50 Hz) cihazında tutuldu ve vorteksleildi. Bu süspansiyonun bir kısmı kültür yönteminde kullanıldı, bir kısmı %50 etanol eklenerek (1/1) FISH yönteminde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. *Legionella* cinsi bakterilerin kültürü için, örnekler asit (HCl-KCl) ve ısı ile (50°C, 30 dakika) muamele edildikten sonra glisin-vankomisin-polimiksin-sikloheksimid (GVPC) eklenmiş "buffered charcoal yeast extract (BCYE)" besiyerine ekimi yapılarak 37°C'de 14 gün inkübe edildi. Tüm ekimler üç kez tekrar edilerek çalışıldı. İnkübasyon sonrası üreyen şüpheli kolonilerden Gram boyama, triptik soy agarda üreme özellikleri incelendi, serolojik tanımlama *Legionella* lateks aglütinasyon kiti kullanılarak (Oxoid, İngiltere) gerçekleştirildi¹³⁻¹⁶.

Floresan İn Situ Hibridizasyon Yöntemi

-20°C'de saklanmış olan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra, *Legionella* ve *Acanthamoeba* cinsi SYA'nın varlığı açısından FISH yöntemiyle analiz edildi¹⁷⁻¹⁹. Hem su hem de biyofilm örnekleri, *Legionella* bakterileri için %4, *Acanthamoeba* cinsi için %2 paraformaldehit (PFA) ile +4°C'de bir gece fikse edildi. *Legionella* için 13000 rpm'de, *Acanthamoeba* için 8230 rpm'de 1xPBS ile üç kez santrifüj (Beckman, ABD) edilerek yıkandı. Yıkama işleminden sonra 10 µl örnek alınarak, teflon kaplı kuyucuklu lama koyuldu, kuruması bekledi ve dehidrasyon amacıyla yükselen alkol serilerinde (%50, %80, %96) üçer dakika 46°C'de bekletildi. Süre sonunda kuyucuklara %20 formamit içeren hibridizasyon tamponu (0.9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, %0.01 SDS) ve spesifik floresan boya ile işaretli uygun problemler ilave edildi. Bu problemler (Integrated DNA Technologies Inc, ABD) *Acanthamoeba* cinsi SYA, *Legionella* cinsi, *L.pneumophila* serogroup 1 için sırasıyla ACANTHA (150 ng/µl), LEG 705 (50 ng/µl) ve LEG PNE1 (50 ng/µl) olup Tablo I'de gösterilmiştir. Tüm lamalar, 46°C'de 24 saat karanlık ve nemli ortamda inkübe edildikten sonra kuyucuklara 2 µl DNA bağlama boyası 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) eklenerek 30 dakika daha bekletildi. Süre sonunda lamalar, yıkama tamponu (20 mM Tris/HCl, pH 7.6, %0.01 sodyum dodesil sülfat, 5 mM EDTA, 160 mM NaCl) ile 46°C'de 15 dakika bekletilerek son yıkama işlemi +4°C'de 10 dakika bidistile su kullanılarak gerçekleştirildi. Lamaların kurumasını takiben kuyucuklara 5 µl "anti-fading" çözeltisi damlatılarak epifloresan mikroskopta (Nikon Eclipse 80i, Japonya) üç kez incelendi. Pozitif kontrol olarak *L.pneumophila* serogroup 1 ATCC 33152, *L.pneumophila* serogroup 3 ATCC 33155, *A.castellani* ATCC 50373 suşları kullanıldı. EUK 516 probu ökaryotlar için pozitif kontrol, NON 338 probu öbakteriler için negatif kontrol olarak kullanıldı (Tablo I).

Tablo I. Hibridizasyon Deneylerinde Kullanılan Floresan Boya ile İşaretli Problar

Prob adı	Oligonükleotit prob	Floresan boya
ACANTHA	5'-TTC-ACG-GTA-AAC-GAT-CTG-GGC-C-3'	FAM-5'
EUK 516	5'-ACC-AGA-CTT-GCC-CTC-C-3'	CY3-5'
Leg PNE1	5'-ATC-TGA-CCG-TCC-CAG-GTT-3'	CY3-5'
Leg 705	5'-CTG-GTG-TTC-CTT-CCG-ATC-3'	FAM-5'
NON338	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3'	FAM-5'

FAM: Carboxyfluorescein, CY3: Cyanin 3.

İstatistiksel Analiz

Kültür yöntemiyle araştırılan mikroorganizmaların (TAHB, SYA, *Legionella*) su ve biyofilm içinde rastlanma oranları analizleri için parametrik yöntemler tercih edildi. Bu amaçla ikili karşılaştırmalar yapıldı ve t-testi kullanıldı.

Su ve biyofilm örneklerindeki *Legionella* ve SYA araştırılmasında kültür ve FISH yöntemlerinin birbiriyle uyumlu olup olmaması parametrik olmayan tekniklerden biri olan Cohen'in kappa katsayısı (k) vasıtasıyla incelendi.

FISH yöntemiyle araştırılan *Acanthamoeba* cinsi mikroorganizmaların, su ve biyofilm içindeki miktarlarının farklı olup olmadığını belirlemek amacıyla parametrik olmayan tekniklerden Wilcoxon Signed Rank (WSR) testi gerçekleştirildi.

Değerlendirme kriteri olarak belirlenen üç kriter (havuz suyu sıcaklıkları, serbest klor ve pH değerleri) bazında havuzların açık ya da kapalı olma durumunun herhangi bir farklılığa neden olup olmadığı parametrik olmayan tekniklerden birisi olan Mann-Whitney U testi tercih edilerek kullanıldı.

Havuz sularında ölçülen farklı klor düzeylerine (normal, yüksek, düşük) göre *Legionella* ve SYA'ya rastlama (pozitif) ve rastlamama (negatif) durumu parametrik olmayan tekniklerden bir diğeri olan Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

Kültür yöntemine göre; su örneklerinin 23 (%92)'ünde TAHB, 4 (%16)'ünde SYA saptanmış, fakat hiçbirinde *Legionella* cinsi bakterilere rastlanmamıştır (Tablo II, Resim 2). İzole edilen SYA'nın birinin 44°C'de üreme yeteneği sayesinde termotoleran aktiviteye sahip izolat olduğu saptanmıştır. Aynı örneklerin FISH yöntemine göre incelenmesi sonucunda 7 (%28)'sinde SYA, 6 (%24)'sında *Legionella* cinsi bakteriler tespit edilmiştir (Tablo II, Resim 3).

Kültür yöntemine göre; biyofilm örneklerinin 21 (%84)'inde TAHB, 2 (%8)'sinde SYA, 1 (%4)'inde *Legionella* cinsi bakteriler saptanmıştır. Aynı örneklerin FISH yöntemine göre incelenmesi sonucunda 6 (%24)'sında SYA, 7 (%28)'sinde *Legionella* cinsi bakteriler tespit edilmiştir.

Tablo II. İncelenen Havuzlarda Kültür ve FISH Yöntemine Göre Saptanan Mikroorganizmaların Dağılımı

	Kültür		FISH	
	Su (%)	Biyofilm (%)	Su (%)	Biyofilm (%)
TAHB	92	84	-	-
SYA	16	8	28	20
<i>Legionella</i> spp.	0	4	24	28

TAHB: Toplam aerobik heterotrofik bakteriler, SYA: Serbest yaşayan amipler.

Resim 2. NNA besiyerinde üremiş serbest yaşayan amiplerin ışık mikroskopundaki görüntüsü (x100). A. Trofozoit, B. Kist.

Resim 3. Acanthamoeba'nın epifloresan mikroskoptaki görüntüleri. A. ACANTHA-DAPI (500x), B. ACANTHA-FAM (500x), C. ACANTHA-DAPI (1000x), D. ACANTHA-FAM (1000x).

İstatistiksel analiz sonucunda kültür yöntemiyle araştırılan mikroorganizmaların (TAHB, SYA, *Legionella*) su ve biyofilm içinde rastlanma oranları arasında bir ilişkinin söz konusu olduğu tespit edilmiş ($X^2= 0.042$; $p\leq 0.05$), bu ilişkinin pozitif ve %17.4 düzeyinde olduğu saptanmıştır. TAHB ve SYA'ya su örneklerinde biyofilm örneklerindeki göre daha fazla, *Legionella* cinsi bakterilere ise biyofilm örneklerinde su örneklerindeki göre daha fazla oranda rastlandığı saptanmıştır ($p\leq 0.05$).

İncelenen havuz suyu örneklerinin 5 (%20)'inde TAHB sayısı, 200 kob/ml'yi aşmıştır. Aynı havuzlara ait biyofilm örneklerindeki TAHB sayısı, 22°C'deki kültürlerin 4 (%16)'ünün 37°C'deki kültürlerin 3 (%12)'ünün 200 kob/ml'yi aştığı saptanmıştır (Tablo III).

Tablo III. Yüzme Havuzlarından Kültür Yöntemiyle İzole Edilen TAHB Sayıları ve Havuz Sularının Fiziksel/ Kimyasal Özellikleri

Havuz no	Su (kob/ml)		Biyofilm (kob/cm ²)		Sıcaklık (°C)	Serbest klor (mg/L)	pH
	22°C	37°C	22°C	37°C			
1**	345	280	128	80	8	0.15	6.8
2**	240	397	218	157	8	0.15	6.8
3	57	66	1	0	30	4	7.2
4	0	0	15	59	28	3	6.8
5	0	0	0	0	28	4	6.8
6	3	0	0	1	27	3	6.8
7	166	5	5	1	29	4	7.4
8	30	0	256	275	28	1.5	6.8
9	102	16	38	0	28	1.5	6.8
10	460	685	525	465	24	0.6	6.8
11**	163	86	1	0	18	3	6.8
12**	28	13	0	15	9	4	7.4
13	60	135	85	14	30	1.5	6.8
14**	202	345	101	27	8	1	7.2
15 ^a	116	53	0	0	27	0.30	7.4
16 ^a	48	78	36	1	29	1	7.4
17**	45	33	1	0	8	1	6.8
18 ^a	84	64	0	0	28	1	7.2
19 ^a	130	149	77	89	28	0.40	7.4
20 ^a	117	40	40	56	38	0.15	7.4
21 ^a	30	26	1	0	28	1.5	7.4
22 ^a	24	24	0	0	33	1.5	7.2
23 ^a	24	22	2	1	20	3	6.8
24 ^a	22	19	7	5	27	1.5	7.2
25	560	370	236	230	29	0.60	6.5

a: Bakırköy Belediyesinin denetiminde olduğu bilinen havuz işletmeleri.

** : Açık yüzme havuzları.

İncelenen havuz sularında su sıcaklıkları, serbest klor ve pH değerleri ölçüm aralıkları sırasıyla 8-38°C, 0.15-4 mg/L, 6.5-7.4 olarak tespit edilmiştir (Tablo III). Bu çalışmada, incelenen havuz sularının bu fiziksel ve kimyasal değerleri incelendiğinde en dengeli sonuçların pH değerlerinde, en büyük değişimlerin serbest klor değerlerinde ortaya çıktığı, kapalı havuzların (ortalama 23.37°C) açık havuzlardan (ortalama 9.33°C) daha sıcak olduğu ($p \leq 0.05$) saptanmıştır. Havuz sularında saptanan klor düzeylerindeki artış ile SYA ve *Legionella*'ya rastlamama durumu arasında (-) yönlü ve anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p \leq 0.05$).

Kültür yöntemine göre, incelenen su örneklerinin dördünde (Havuz no: 2, 13, 14, 20), biyofilm örneklerinin ikisinde (Havuz no: 10, 20) SYA saptanmıştır (Resim 2). İncelenen örneklerin ACANTHA probu kullanılarak FISH yöntemiyle incelenmesi sonucunda tespit edilen *Acanthamoeba* cinsi bakterilerin floresan görüntüsü (Resim 3) ve SYA'nın dağılımı (Tablo IV) verilmiştir. Kültür yönteminde tespit edilemediği halde üç su örneğinde (Havuz no: 1, 4, 10) ve üç biyofilm örneğinde SYA tespit edilmiştir ($\kappa_{su} = 0.66$, $\kappa_{biyofilm} = 0.52$).

Tablo IV. Yüzme Havuzlarında FISH Yöntemiyle Tespit Edilen *Acanthamoeba* Cinsi SYA Sayıları

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

İncelenen yüzme havuzlarında FISH yöntemi kullanılarak tespit edilen *Acanthamoeba* cinsi mikroorganizmaların, su (hücre/ml) ve biyofilm (hücre/cm²) içindeki miktarlarının arasında Wilcoxon işaretli sıralar testine göre istatistiksel farklılığa rastlanmamıştır ($p > 0.05$).

Örneklerin kültür yöntemine göre incelenmesi sonucunda sadece bir biyofilm örneğinde *Legionella* cinsi bakteri (200 kob/cm²) saptanmış olduğu halde, Tablo V'te görüldüğü gibi FISH yöntemiyle bu bakteriler altı su ve yedi biyofilm örneğinde tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\kappa_{su} = 0.93$, $\kappa_{biyofilm} = 0.86$). Bir su ve dört biyofilm örneğindeki bu bakteriler *L.pneumophila* serogrup 1 olarak tanımlanmıştır.

Tablo V. Yüzme Havuzlarında FISH Yöntemiyle Tespit Edilen Legionella Cinsi Bakteri Sayıları.

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

LPS1: *Legionella pneumophila* serogrup 1, LEG: *Legionellaceae*.

TARTIŞMA

Çeşitli ülkelerde yüzme havuzlarının mikrobiyolojik açıdan kabul edilen standart değerleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin TAHB sayısı 20°C ve 36°C için Almanya standartlarında ≤ 100 kob/ml, İtalya standartlarında (36°C) ≤ 200 kob/ml, İngiltere standartlarında (36°C) < 10 kob/ml, Avustralya standartlarında ≤ 100 kob/ml olarak belirlenmiştir²⁰. Ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2011'de yayımlanan genelleme 37°C'de 24 saat inkübasyon sonucu TAHB sayısının ≤ 200 kob/ml olması gerektiği belirtilmiştir². Yüzme havuzlarının temizliğinin/dezenfeksiyonunun sağlanması ve bunun anlaşılması için yapılan denetimler, mikrobiyolojik standart değerlerinin sağlanması ve dolayısıyla havuzu kullananların sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada incelenen havuz sularının temizliklerinin/dezenfeksiyonlarının periyodik olarak yapıldığı bilgisine dolaylı yoldan erişilmiştir. İncelenen ve Bakırköy Belediyesi Çevre Koruma ve Kontrol Biriminin denetiminde olduğu öğrenilen dokuz yüzme havuzundan örnek alım zamanımız bu kurumun denetim zamanıyla eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiş ve bu havuz sularının tümünün TAHB açısından T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından belirtilen standartlara uygun olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, havuz sularındaki TAHB sayısının kontrol altında tutulması için ülkemizde otoriteler tarafından yapılan periyodik kontrollerin gerekliliğini ve amacına ulaştığını göstermektedir. Diğer işletmelerde denetimlerin yapılması hakkında bilgiye ulaşamamakla birlikte, çalışmada incelenen havuz sularının %80'inin TAHB açısından riskli olmadığı saptanmıştır (Tablo III). Öte yandan biyofilm örneklerine ait standart değerler konusunda herhangi bir yönetmelik olmamasına rağmen, aynı havuzlardan alınan biyofilm örneklerinin incelenmesinden elde edilen sonuçlara göre 22°C'de inkübe edilen örneklerin %16'sında, 37°C'de inkübe edilen örneklerin %12'sinde 200 kob/ml sınırını aştığı bulunmuştur. Çalışmamıza benzer olarak, Avrupa, Amerika ve Avustralya'da yapılan çalışmalarda da ülkelerin belirlediği standart değerlerin üstünde TAHB'lerin varlığı saptanmıştır²⁰⁻²².

Önceki çalışmamızda²³ yüzme havuzlarında kullanılan klor konsantrasyonlarının havuzlardan izole edilen SYA için inhibe edici etki göstermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, SYA ve *Legionella* cinsi bakterilerin (özellikle lejyoner hastalığı etkeni olan *L.pneumophila*'nın) aynı su ortamında birlikte bulunması, risk grubundaki bireylerin sağlığını ciddi ölçüde tehdit edebilmektedir. Bu çalışmada üç su (Havuz no: 2, 13, 14) ve bir biyofilm örneğinde (Havuz no: 10) hem SYA hem *Legionella* cinsi bakteriler tespit edilmiştir (Tablo IV,V). Yüzme havuzlarında bu iki mikroorganizmanın varlığının tespit edilmesi durumunda su kontrol önlemlerinin yeniden gözden geçirilmesi, örneğin etkili dezenfektan konsantrasyonunun yeniden belirlenmesi gibi önlemlerin alınması mümkün olacaktır. Ayrıca, çalışmamızda üç su (1, 4, 20) ve iki biyofilm (örnek no: 13, 20) örneğinde *Legionella* cinsi bakteriler bulunmadığı halde *Acanthamoeba* cinsi amiplerin saptanmış olması bu örneklerde *Legionella* cinsi bakterilerin bu amipler içerisinde saklı olma ihtimalini akla getirmektedir. Konunun aydınlığa kavuşturulması, ülkemiz havuz su/biyofilm örneklerinden izole edilen amip hücreleri içerisinde bu bakterilerin varlığı/tanımlanmasını sağlayacak olan yeni çalışmaların gerçekleştirilmesiyle mümkün olacaktır.

TAHB'lerin yanı sıra, SYA'larda pek çok su ortamında yaşayabildiği gibi yüzme havuzlarında da yaşayıp çoğalarak sağlık riski oluşturabilirler. 1960'lardan bu yana yapılan araştırmalar, SYA'ların bazı suşlarının insanlar için patojenik olabileceğini göstermiştir. Örneğin klorlanmamış havuzlarda yüzerken veya kontakt lens takarken insanlarla yakın temas halindeyken hastalık oluşturabilirler. *Acanthamoeba* cinsi SYA özellikle immün sistemi baskılanmış insanlarda, santral sinir sisteminde ortaya çıkan, granülomatöz amibik ensefalit (GAE) etkenidir. Öte yandan, *Acanthamoeba* keratiti sağlıklı bireylerde kontamine suya maruz kalma ile ilişkili olabilmektedir⁷. Ayrıca bu mikroorganizmalar, hem dirençli kist formları sayesinde kendilerini hem de *Legionella* cinsi bakterileri (ve diğer bazı prokaryotlara) üzerlerinde konak olarak bulundurmaları nedeniyle havuz sularına uygulanan dezenfektanlardan koruyabilmektedir⁵⁻⁷. Çalışmamızda havuz suyu örneklerinin yedisinde, biyofilm örneklerinin beşinde SYA'ya rastlanmış olması ve bir izolatin potansiyel patojen (termotoleran)^{12,24} olarak saptanması bu havuzların sağlık açısından riskli olduğunu akla getirmektedir. Nitekim, son yıllarda yapılan çalışmalarda ülkemizin doğal sularında da patojen SYA'nın varlığı gösterilmiştir^{25,26}. Bu tip patojen amipleri içeren doğal suların havuz suyu olarak kullanılma ve amiplerin uygulanan dezenfektan konsantrasyonlarına dirençli olma olasılıkları nedeniyle, havuzları kullanan yüzücülerin sağlığının tehdit altında olduğu düşünülmekte ve yapılacak çalışmaların artırılması gerekmektedir.

Gerek su gerekse biyofilm örneklerindeki SYA'nın varlığının tespiti için kültür ve FISH yöntemlerinin kullanılması uygun olabilir. Kültür yönteminde morfolojinin tanımlama için yanıltıcı olması, fazla emek ve zamana ihtiyaç göstermesi, hücre sayısının saptanamaması vb. dezavantajlarını FISH yöntemi ile ortadan kaldırmak mümkündür¹¹. Ancak bu mikroorganizmaların izole edilerek patojenitelerinin, fizyolojik özelliklerinin ve bakterilerle olan ilişkilerinin araştırılabilmesi için mutlaka kültür yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı SYA'nın varlığı/patojenitesi çalışmalarında yüzme havuzlarının hem su hem de biyofilm örneklerinin, hem kültür hem de FISH yöntemi kullanılarak analiz edilmesi gerekmektedir. SYA tespit edilmesi durumunda etkin dezenfeksiyon yöntemlerinin uygulanması sayesinde konaklık ettiği patojen bakterilerin de ortadan kaldırılması mümkün olacak ve halk sağlığı korunmuş olacaktır.

Çalışmamızın istatistiksel analiz sonuçları ($p \leq 0.05$), yüzme havuzlarında gerek SYA gerekse *Legionella* cinsi bakterilerin kültür yöntemiyle tespiti için hem su hem de biyofilm örneklerinin incelenmesinin bilimsel gereksinim olacağını düşündürmektedir (Tablo II). Bulgularımıza benzer olarak, Wisconsin'deki havuzları kullanan otel misafirleri arasında bir dizi hastalığa sebep olan *Legionella micdadei*'nin havuz suyu örneklerinden kültür yapılmasıyla izole edilemediği halde havuz filtresinden (150 kob/ml) izole edildiği bildirilmiştir²⁷. *Legionella* cinsi bakterilerin, yüzme havuzu sularında saptanmamasına karşın, zamanla biyofilmde ve aynı havuzlarda yaşadığını tespit ettiğimiz SYA içerisinde de çoğalması mümkün olabilmektedir. Böylece, dezenfektanlara direnç ortaya çıkabil-

mektedir²⁴, bu amiplerin parçalanmasıyla da bakteri artan oranlarda havuz suyuna geçebilmektedir. Tüm bunların sonucunda havuzda yüzen insanların sağlığı büyük tehdit altına girebilir. Çalışmamızda kültür yöntemiyle yalnız bir havuza ait biyofilm örneğinde *Legionella* cinsi bakteriler tespit edilebildiği halde FISH yönteminin kullanılmasıyla altı su ve yedi biyofilm örneğinde saptanmış olması bu bakterilerin tespitinde FISH yönteminin daha üstün bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir ($\kappa_{su} = 0.93$, $\kappa_{biyofilm} = 0.86$). Bu bakterilerin, varlığının kültür yöntemiyle tespit edilememesinin nedeni, canlı fakat (üretilemeyen faza girebilmeleriyle açıklanabilir²⁸. Nitekim Steinert ve arkadaşları, *L.pneumophila* Philadelphia I JR 32 suşunu steril musluk suyuna ekerek bakteri sayısındaki azalmayı inceledikleri çalışmalarında²⁹, durgun su içinde, oda sıcaklığında, karanlık ortamda 125 gün inkübasyondan sonra kültür yöntemiyle izolasyon gerçekleştiremedikleri halde, FISH yöntemiyle inceleme sonucunda bu bakterileri tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, tıpkı SYA'da olduğu gibi *Legionella* cinsi bakterilerin doğru izole edilebilmesi ve daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi için kültür yönteminin de kullanılması gereklidir.

Yüzme havuzu sularının pH, serbest klor değeri ve sıcaklığı mikroorganizmaların varlığını etkileyebilecek olan parametrelerden olup normal değerleri T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 6 Mart 2011 tarihinde Resmi Gazete'de yayımlanan yönetmelikte belirtilmiştir. Bu çalışmada incelenen havuz sularının bu fiziksel ve kimyasal değerleri incelendiğinde (Tablo III) en dengeli sonuçların pH değerlerinde, en büyük değişimlerin serbest klor değerlerinde ortaya çıktığı, kapalı havuzların (ortalama 23.37°C) açık havuzlardan (ortalama 9.33°C) daha sıcak olduğu ($p \leq 0.05$) saptanmıştır. İncelenen 19 kapalı havuzun 10'unun su sıcaklığının T.C. Sağlık Bakanlığınca belirlenen mevzuata uygun olduğu, açık havuzların tümünün bu sınırların altında olduğu saptanmıştır. Termotoleran (potansiyel patojen) SYA izolatu bu sınırların dışında kalan 38°C su sıcaklığına sahip kapalı termal havuzda tespit edilmiştir. Çalışmamızda incelenen 25 havuzun 11'inde normal, yedisinde düşük, yedisinde yüksek düzeyde serbest klor değeri tespit edilmiştir. TAHB sayıları ≤ 200 kob/ml olan havuzların 10'unda serbest klor değerleri mevzuata uygun değerde, yedisinde oldukça yüksek değerde (3-4 mg/L), üçünde oldukça düşük değerde ölçülmüştür. *Legionella* cinsi bakteriler, mevzuata uygun serbest klor değerine sahip olmasına rağmen dört havuzda, yüksek değere sahip olmasına rağmen iki havuzda tespit edilmiştir. SYA ise mevzuata uygun serbest klor değerine sahip olmasına rağmen iki havuzda, yüksek değere sahip olmasına rağmen bir havuzda tespit edilmiştir. İncelenen tüm havuz sularının pH değerleri mevzuata uygun bulunmuştur. *Legionella* ve SYA'nın aynı anda tespit edildiği havuz sayılarının, düşük serbest klor düzeyine sahip havuzlardan, mevzuata uygun ve daha yüksek serbest klor düzeyine sahip havuzlara gidildikçe azaldığı saptanmıştır ($p \leq 0.05$). Yüksek serbest klor düzeyinin (3 mg/L), *Legionella* ile kontamine olmuş su sistemlerinde uzun süre (2-24 saat) uygulanması bu bakterinin sebep olduğu kontaminasyonu ortadan kaldırmak için kullanıldığı bilinmektedir. Ancak bu doz, SYA kistlerine etkili olmayabilir, insan sağlığı açısından da riskli ve

rahatsızlık vericidir^{4,5,23,30}. Bu bilgiler ışığında bu çalışma yüzme havuzu sularının fiziksel ve kimyasal parametreler açısından denetlenmesinin gerekli olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur. Yüzme havuzlarında mevcut patojen mikroorganizmaların üremelerine engel olacak şekilde uygun eradikasyon ve dezenfeksiyon yöntemlerinin seçilmesi, yüzücülerin sağlığı açısından oldukça önemlidir. Havuzlardaki mikroorganizmaların üremesi üzerine etkisi olabileceği düşünülen ve araştırılmış parametrelere (su sıcaklığı, pH ve serbest klor) ek olarak diğer faktörlerin de (havuzların kullanım sıklığı, temizlik şekli/sıklığı, havuz içi malzemelerin cinsi/biyofilm açısından uygun olup olmadığı vb.) araştırılacağı, birlikte değerlendirileceği resmi kurumlar arası protokollere dayalı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma ülkemizde yüzme havuzlarında *Legionella* cinsi bakteriler ve SYA'nın varlığını ortaya çıkartan ilk çalışmadır. Elde edilen bilgiler ışığında İstanbul'da özellikle belediye kontrolü altında bulunan yüzme havuzlarının TAHB açısından riskli olmadığı, sağlık kriterlerine uygun olduğu görülmüştür. Ancak bu mikroorganizmaların dışında yüzme havuzlarımızda varlığı bu çalışma ile kanıtlanmış olan *Legionella* cinsi bakteriler (özellikle *L.pneumophila* serogrup 1) ve SYA'nın da halk sağlığı açısından çok önemli olduğu unutulmamalıdır. Bu mikroorganizmaların varlığını/çoğalmasını etkileyen tüm faktörleri değerlendirmek amacıyla ve daha fazla sayıda yüzme havuzlarını içeren kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesi, bu mikroorganizmaların çoğalmalarına karşı önlemlerin alınması açısından gerekli olduğu düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

İstatistiksel analizlerde yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi İstatistik Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü Doç. Dr. Haluk Zülfikâr'a teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881-90.
2. Yüzme Havuzlarının Tabi Olacağı Sağlık Esasları Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete Tarihi: 06.03.2011 Resmi Gazete Sayısı: 27866 [www.mevzuat.gov.tr] (Erişim tarihi: 10.10.2019).
3. Umumi Kullanıma Açık Yüzme ve Terapi Havuz Tesisleri İçin Kurallar. 28 Şubat 2015 [www.uhe.org.tr] (Erişim tarihi: 10.10.2019).
4. Yavuz CI. Su kaynaklı bir hastalık olarak lejyoner hastalığı ve çevresel surveyans. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2018;48(4):211-27.
5. Cervero-Arago S, Rodriguez-Martinez S, Puertas-Bennasar A, Araujo RM. Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free *Legionella* and amoebae-associated *Legionella*. *Plos One* 2015;10(8):1-18.
6. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwai Y. Amoeba as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(1):20-8.

7. Scheid P. Free-living amoebae as human parasites and hosts for pathogenic microorganisms. *Proceedings* 2018;2(692):1-11.
8. Yılmaz Ş. İçme kullanma suyu denetimi, pp: 71-81. In: Oğuz Z, Evci D, Özdemir M, Şentürk Ş, Aycan, S (eds), *Turizm Sağlığı Eğitimi Kitabı*, T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. 2001, Ankara.
9. Zeybek Z, Doğruöz Güngör N, Türetgen İ. Investigation of heterotrophic bacteria, *Legionella* and free-living amoeba in cooling tower samples by FISH and culture methods. *Eur J Biol* 2017;76(1):7-13.
10. HPA, W 22. Enumeration of viable micro-organisms: aerobic colony count by membrane filtration method. National standard method, 2007: W 22, Issue 1.
11. HPA, W 17. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species. National standard method 2004; Issue 2.
12. Wannasan A, Chaiwong P, Bunchoo M, Morakote N. Occurrence of thermotolerant *Naegleria* and *Acanthamoeba* in some natural water sources in Chiang Mai. *Chiang Mai Med J* 2009;48(3):117-24.
13. HPA, BSOP ID 18. National standard method: Identification of *Legionella* species. National standard method, 2007.
14. HPA, W 12 Detection and enumeration of *Legionella* species by filtration and centrifugation. National standard method, 2006.
15. HPA, W15 Detection and enumeration of *Legionella* species in biofilms and sediments. National standard method 2006; Issue 1.
16. ISO Water quality-detection and enumeration of *Legionella*, 1998:11731.
17. Stothard DR, Hay J, Schroeder-Diedrich JM, Seal DV, Byers TJ. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol* 1998;37(8):2687-93.
18. Grimm D, Merkert H, Ludwig W, Schleifer KH, Hacker J, Brand BC. Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(7):2686-90.
19. Manz W, Amann R, Szewzyk R, Szewzyk U, Stenström TA, Hutzler P, et al. In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 1995;141(Pt 1):29-39.
20. Leoni E, Legnani P, Guberti E, Masotti A. Risk of infection associated with microbiological quality of public swimming pools in Bologna, Italy. *Public Health* 1999;113(5):227-32.
21. Esterman A, Roder DM, Cameron AS, Robinson BS, Walters RP, Lake JA, et al. Determinants of the microbiological characteristics of South Australian swimming pools. *Appl Environ Microbiol* 1984;47(2):325-8.
22. Keswick BH, Gerba CP, Goyal SM. Occurrence of enteroviruses in community swimming pools. *AJPH* 1981;71(9):1026-30.
23. Zeybek Z, Demir B, Üstüntürk-Onan M. Unnoticed microorganisms in disinfection of swimming pools: free-living amoeba. *Fresenius Environ Bull* 2017;26(12):7651-7.
24. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(2):273-307.
25. Yazar S, Gürbüz E, Sönmez MF, Çetinkaya Ü, Kuk S. Investigation of potentially pathogenic free-living amoebae and their in vivo pathogenicity in water supplies of Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2019;50(3):449-59.
26. Özçelik S, Coşkun KA, Yünlü Ö, Alim A, Malatyali E. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free living amoeba from tap water and environmental water sources in Sivas. *Türkiye Parazitol Derg* 2012;36(4):198-203.
27. Fields BS, Haupt T, Davis JP, Arduino MJ, Miller PH, Butler JC. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. *J Infect Dis* 2001;184(10):1289-92.

28. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, et al. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res* 2018;15(141):428-38.
29. Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(5):2047-53.
30. Vural T. *Legionella* infeksiyonları. *Ankem Derg* 2014;28(2):167-76.