



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MANGAN OKSİTLEYEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU ve
MARTENZİTİK ÇELİK ÜZERİNE KOROZİF ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Polen YILMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Esra İLHAN SUNGUR**

Ekim, 2019

İSTANBUL

Esra İlhan Sungur

Bu çalışma, 21.10.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Esra İLHAN SUNGUR (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nurhan CANSEVER
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



Doç. Dr. Duygu KADAİFÇİLER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Akademik bakış açısına ve çalışma disiplinine her daim hayranlık duyduğum, yüksek lisans öğrenimim boyunca destekleyici ve yol gösterici tutumunu benden esirgemeyen, tez çalışmalarım sırasında bana olan güvenini her zaman hissettiren, üzerimde ve tezimde büyük emekleri olan danışmanım ve Sayın Hocam Prof. Dr. Esra ILHAN SUNGUR`a,

Tez çalışmalarım sırasında sabrını, yardımlarını, kıymetli bilgi ve fikirlerini benden esirgemeyen, içten desteğini her zaman hissettiğim Sayın Prof. Dr. Nurhan CANSEVER`e,

Pratik ve yaratıcı çözümleri ile yüksek lisans öğrenimimi daha kolay kılan, tez çalışmalarım sırasında benden değerli yorumlarını, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Dr. Miray ONAN`a

Tez çalışmalarım için gerekli olan çelik numunelerinin temini ve hazırlanmasında gösterdiklerini kolaylıklar ile bilime olan desteklerini esirgemeyen Valbruna Turkey Paslanmaz Çelik Sanayi ve Ticaret A.Ş.`ye ve Saymet Makine Kalıp`a,

Tezimin gerçekleşmesi sırasında yardım dileklerimi geri çevirmeyen Uzman Biyolog Simge ARKAN`a, tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında bana destek olan Arş.Gör. İrem Cemre TÜRÜ ve Arş.Gör. Seda Aysel TEPE`ye,

Yaptığım seçimlere her zaman saygı duyan ve beni sonuna kadar destekleyen, bana olan umudunu ve inancını asla yitirmeyen, hayatım boyunca olduğu gibi bu tezin meydana gelmesinde de yardımlarını hiç esirgemeyen, başta sevgili annem olmak üzere tüm aileme,

içtenlikle teşekkür ederim.

Ekim, 2019

Polen YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. MANGAN ELEMENTİNİN BİYOJEOKİMYASI.....	4
2.1.1. Doğada Mangan Elementi	4
2.1.2. Manganın Oksidasyonu	5
2.1.2.1. <i>Manganın Abiyotik Oksidasyonu</i>	8
2.1.2.2. <i>Manganın Biyotik Oksidasyonu</i>	9
2.1.2.3. <i>Mangan Oksitler</i>	10
2.2. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLER.....	15
2.2.1. Bakterilerin Mangan Oksitleme Mekanizmaları	19
2.2.2. MnOB`lerin İzolasyonu ve Mangan Oksit Varlığının Tespiti.....	23
2.3. BİYOFİLM	29
2.4. METALLERİN KOROZYONU	32
2.4.1. Mikrobiyolojik Olarak Desteklenen Korozyon (MIC).....	34
2.4.1.1. <i>MnOB`lerin Meydana Getirdiği MIC`in Mekanizması ve Tanısı</i>	37
2.5. HİDROELEKTRİK SANTRAL (HES)	40
2.5.1. Korozyona Uğrayan HES Elemanları	42
2.5.2. Bir HES Elemanı: AISI 415 Martenzitik Paslanmaz Çelik.....	44
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	46
3.1. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU.....	46
3.1.1. Hidroelektrik Santralden Su ve Biyofilm Örneklerinin Alınması.....	46
3.1.2. Su ve Biyofilm Örneklerinden MnOB`lerin İzolasyonu	46

3.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASINA YÖNELİK BAZI DENEYSEL KOŞULLARIN BELİRLENMESİ.....	47
3.2.1. Korozyon Çalışmaları İçin Uygun Bakteri İzolatının ve Besiyerinin Seçimi	48
3.2.2. Korozyon Çalışmalarında Kullanılacak Besiyeri İçin Maksimum Mn Konsantrasyonunun Belirlenmesi	49
3.3. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİ İZOLATININ TANIMLANMASI.....	50
3.3.1. Seçilen Bakteri İzolatının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	50
3.3.1.1. <i>Oksidaz Testi</i>	50
3.3.1.2. <i>Katalaz Testi</i>	50
3.3.1.3. <i>Hidrojen Sültür, İndol ve Hareket Testi</i>	51
3.3.1.4. <i>Sitrat Kullanımı</i>	51
3.3.1.5. <i>Üç-Şekerli Demir (TSI) Testi</i>	51
3.3.1.6. <i>Metil Kırmızısı (MR) ve Voges Proskauer (VP) Testi</i>	51
3.3.1.7. <i>Karbonhidrat Fermentasyonu</i>	52
3.3.1.8. <i>Jelatin Hidrolizi</i>	52
3.3.1.9. <i>Kazein Hidrolizi</i>	52
3.3.1.10. <i>Nişasta Hidrolizi</i>	52
3.3.1.11. <i>Nitrat Redüksiyonu</i>	52
3.3.2. Seçilen Bakteri İzolatının Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması.....	52
3.3.2.1. <i>Bakteri İzolatından DNA Eldesi</i>	53
3.3.2.2. <i>DNA Örneğinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılması ve Dizi Analizi</i>	53
3.4. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASI.....	55
3.4.1. Martenzitik Paslanmaz Çelik Kuponların Hazırlanması	55
3.4.2. Laboratuvar Ölçekli Deney Düzenine Kurulumu, İşletilmesi ve Gerçekleştirilen Analizler	57
3.4.2.1. <i>Bakteri Sayısının Tespiti</i>	59
3.4.2.2. <i>EPS Eldesi ve İçeriğindeki Toplam Karbonhidrat ile Protein Miktarının Tayini</i>	60
3.4.2.3. <i>MnO_x Miktarının Tespiti</i>	63
3.4.2.4. <i>Mn⁺², Cl⁻ ve pH Parametrelerinin Tespiti</i>	63
3.4.2.5. <i>Korozyon Hızı Hesabı</i>	63
3.4.2.6. <i>SEM Analizleri</i>	64
3.4.2.7. <i>XRD Analizleri</i>	64
3.4.3. Laboratuvar Ölçekli Kontrol Düzenine Kurulumu, İşletilmesi ve Gerçekleştirilen Analizler	65

3.4.3.1. <i>MnO_x Miktarının Tespiti</i>	65
3.4.3.2. <i>Mn⁺², Cl⁻ ve pH Parametrelerinin Tespiti</i>	65
3.4.3.3. <i>Korozyon Hızı Hesabı</i>	66
3.4.3.4. <i>SEM Analizi</i>	66
3.4.3.5. <i>XRD Analizi</i>	66
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ	66
3.6. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER	66
3.6.1. MnOB Besiyeri	66
3.6.2. LBB Besiyeri	67
3.6.3. PYG Besiyeri	67
3.6.4. LB Besiyeri	68
3.6.5. R2A Besiyeri	68
3.6.6. Nitrat Oluşum Besiyeri	68
3.6.7. Oksidasyon-Fermentasyon Besiyeri	69
3.6.8. Triple-Sugar-Iron Agar	69
3.6.9. Simmons's Sitrat Besiyeri	70
3.6.10. Clark-Lubs Besiyeri	70
3.6.11. Glukozlu Buyyon	70
3.6.12. Jelatin Besiyeri	70
3.6.13. Nişastalı Agar	71
3.6.14. Kovac`s Ayracı	71
3.6.15. Protein Tayininde Kullanılan Reaktifler	71
3.6.15.1. <i>A Reaktifi: %2 Na₂CO₃ (0.1 N NaOH içerisinde)</i>	71
3.6.15.2. <i>B Reaktifi: %0.5 CuSO₄.5H₂O (%1 Dipotasyum Tartarat İçerisinde)</i>	72
3.6.15.3. <i>C Reaktifi (Alkali Bakır Çözeltisi)</i>	72
3.6.16. %0.04'lük LBB Solüsyonu	72
3.6.17. 3N Ayarlı Nitrik Asit Çözeltisi	72
3.6.18. 10N Ayarlı NaOH Çözeltisi	72
3.6.19. Fenolftalein İndikatör Çözeltisi	72
3.6.20. Korozyon Analizinde Kullanılan Asit Çözeltisi	73
4. BULGULAR	74
4.1. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU	74
4.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASINA YÖNELİK BELİRLENEN DENEYSEL KOŞULLAR	75

4.2.1. Korozyon Çalışmaları İçin Uygun Bakteri İzolatının ve Besiyerinin Seçimi	75
4.2.2. Korozyon Çalışmalarında Kullanılacak Besiyeri İçin Maksimum Mn Konsantrasyonunun Belirlenmesi	80
4.3. MNOB İZOLATININ TANIMLANMASI.....	82
4.3.1. Seçilen Bakteri İzolatının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	82
4.4. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASI.....	85
4.3.1. Kültürdeki ve Biyofilmdeki Bakteri Sayıları	85
4.3.2. Biyofilmdeki Toplam Karbonhidrat ve Protein Miktarı.....	88
4.3.3. MnO _x Miktarı	89
4.3.4. Mn ⁺² , Cl ⁻ ve pH Parametreleri.....	90
4.3.5. Ağırlık Kaybı ve Korozyon Hızı Verileri.....	95
4.3.6. XRD Analiz Sonuçları.....	99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	101
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ	130

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Mn – H ₂ O için Eh-pH diagramı	6
Şekil 2.2: Manganın doğadaki oksidasyon hallerinin döngüsü	6
Şekil 2.3: Zincir/tünel (todorokite, hollandite, ramsdellite) ve tek katman (birnessite) yapılu mangan oksit kristalleri	12
Şekil 2.4: Mangan okside eden ve redükleyen bakterilerin mangan ve karbon döngüsündeki rolü	17
Şekil 2.5: Mn`nın bakteriyel oksidasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan üç model bakteri türünün taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile çekilmiş mikrografları; a) Kiel, Almanya yakınlarında bir göletten izole edilmiş Leptothrix sp. ve hücreleri çevreleyen hücre dışı kılıf (okla işaretlenmiş olan bölge, kılıfın su-hava ara yüzeyine tutunduğu kısmı işaret etmektedir), b) Denizden izole edilmiş bir Bacillus sp. SG-1 sporu ve sporu çevreleyen ekzosporiyum tabakası, c) Pseudomonas putida MnB1 ve hücrelerini çevreleyen glikokaliks (dış membran).....	20
Şekil 2.6: Bakteriyel Mn ⁺² oksidasyonunda Mn ⁺³ `nin Mn ⁺⁴ `e dönüşüm senaryoları ve muhtemel dönüşüm yolları (a,b,c).....	23
Şekil 2.7: Spot test öncesi bakteri kültürü (a); LBB ile gerçekleştirilen spot test sonrası MnOB şüpheli kahverengi kolonilerin etrafında mavi renk oluşumu	28
Şekil 2.8: Elektron mikroskobu görüntüleri ile birlikte biyofilmin oluşum aşamaları	31
Şekil 2.9: Mikroskobik korozyon hücresi	33
Şekil 2.10: Mikrobiyal yüzey filmi altında diferansiyel havalandırma hücresinin oluşumu	35
Şekil 2.11: MnOB`ler tarafından paslanmaz çelikte meydana getirilen MIC`in şeması	38
Şekil 2.12: Hidroelektrik santralin ana bölümleri	42
Şekil 2.13: Kaplan tipi hidrolik türbin ve yapısı	42
Şekil 3.1: Standart KMnO ₄ konsantrasyonları ile hazırlanmış standart eğri ve denklem.....	49
Şekil 3.2: 1 Kb DNA Extension Ladder markırının (Invitrogen) jeldeki görüntüsü ve bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA büyüklükleri (ng)	53
Şekil 3.3: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) moleküler markırının jeldeki görüntüsü ve bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA miktarları ve büyüklükleri.....	55

Şekil 3.4: AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kupon; makroskobik görüntüsü (a), optik mikroskop görüntüsü (b)	56
Şekil 3.5: Deney düzeneği; deney ortamının bulunduğu beher, kupon taşıyıcı ve taşıyıcıya ipler ile bağlanmış kuponların genel görüntüsü (a). Deney düzeneğinin işletilmesi; deney ve kontrol düzeneklerinin karıştırıcı üzerinde ve bir etüv içerisinde, üzerleri steril alüminyum ve poşet ile kapatılmış görünümü (b)	58
Şekil 3.6: Standart glikoz konsantrasyonları ile hazırlanmış standart eğri ve denklemi	61
Şekil 3.7: Standart protein konsantrasyonları ile hazırlanmış standart eğri ve denklemi	62
Şekil 4.1 : PYG (a), MnOB (b) ve LBB (c) besiyerinde MnOB şüpheli bakteri kolonilerinin morfolojileri	74
Şekil 4.2: MnOB besiyerinde oluşan kolonilerin a) dört günlük ve b) üç haftalık inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü	74
Şekil 4.3: MnOB şüpheli bakteri kolonisine ait pozitif LBB spot test görüntüsü.....	75
Şekil 4.4: İzolat 1 (a), İzolat 2 (b), İzolat 3 (c), İzolat 4 (d), İzolat 5 (e), İzolat 6 (f) ve İzolat 7 (g) `nin LBB ve MnOB besiyerindeki üreme eğrileri	77
Şekil 4.5: MnOB izolatları tarafında LBB besiyerinde üretilen MnO _x miktarlarının zamana bağlı değişimi	80
Şekil 4.6: 4.7 g/l MnSO ₄ içeren (solda) ve 3 g/l MnSO ₄ içeren (sağda) MnOB besiyeri.....	81
Şekil 4.7: İzolat 1`in beş farklı MnSO ₄ konsantrasyonu (0.15, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) ile hazırlanmış MnOB besiyerlerindeki üreme eğrileri	81
Şekil 4.8: İzolat 1`in ışık (a) ve faz kontrast (b) mikroskobundaki görüntüsü	82
Şekil 4.9: İzolat 1`e ait genomik DNA örneğinin jeldeki görünümü	84
Şekil 4.10: İzolat 1`e ait PZR örneklerinin jeldeki görünümü	85
Şekil 4.11: Deney süresince kültürdeki ve biyofilmdeki <i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3 bakterisinin üreme eğrisi	86
Şekil 4.12: AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponun deney öncesi (a) ve 8 sa`lık maruziyet sonrası (b) makroskobik görüntüsü	86
Şekil 4.13: <i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3 ortamına maruz bırakılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasının SEM görüntüleri; (a) 240. sa ve (b) 792. sa	87
Şekil 4.14: LIVE/DEAD kit uygulaması sonucunda, 624. sa biyofilm örneğinde bulunan canlı (yeşil) ve ölü (kırmızı) hücreler	88
Şekil 4.15: Biyofilmdeki karbonhidrat ve protein miktarının zamana bağlı değişimi.....	89

Şekil 4.16: Kontrol düzeneğindeki steril MnOB besiyerinin MnO _x içeriğinin zamana bağlı değişimi	90
Şekil 4.17: Deney ve kontrol ortamlarındaki Mn ⁺² miktarının zamana bağlı değişimi	92
Şekil 4.18: Kültür ve biyofilmdeki Enterobacter tabaci YIM Hb-3 sayıları ile Mn ⁺² miktarlarının zamana bağlı değişimleri	93
Şekil 4.19: Deney düzeneğindeki Enterobacter tabaci YIM Hb-3 kültürünün ve kontrol düzeneğindeki steril MnOB besiyerinin pH değerlerinin zamana bağlı değişimi.....	94
Şekil 4.20: AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponlarını içeren ve içermeyen MnOB besiyerinin pH değerlerinin zamana bağlı değişimi	95
Şekil 4.21: Deney ve kontrol düzeneğindeki AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların ağırlık kayıplarının zamana bağlı değişimi	97
Şekil 4.22: Deney ve kontrol düzeneğindeki AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların korozyon hızlarının zamana bağlı değişimi	97
Şekil 4.23: Deney düzeneğinden 792. sa`da çıkarılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponun temizlenmemiş yüzeyinin SEM görüntüsü	98
Şekil 4.24: Deney düzeneğinden (a) ve kontrol düzeneğinden (b) 792. sa`da çıkarılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların temizlenmiş yüzeylerinin SEM görüntüleri	98
Şekil 4.25: Deney düzeneğinden 240. sa`da (a) ve 792. sa`da (b) alınan tortu örneklerine ait XRD analizi sonuçları..	99
Şekil 4.26: Kontrol düzeneğinden 792. sa`da çıkarılan kuponun yüzeyine ait XRD analizi sonucu	100

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Karbon döngüsünde elektron alıcısı olarak görev alan mangan mineralleri.....	7
Tablo 2.2: Önemli mangan oksit mineralleri.....	11
Tablo 2.3: Bakteriyel Mn ⁺² oksidasyonuna dahil olan genler	21
Tablo 2.4: Literatürde yer alan MnOB izolasyon besiyerleri, izole edilen cinsler ve izole edildikleri bölgeler.....	24
Tablo 2.5: Literatürde mangan oksit tespiti için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik boyalar	27
Tablo 2.6: MIC ile bağlantılı olduğu bulunan bazı mikroorganizmalar	36
Tablo 3.1: Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primerler	54
Tablo 3.2: Polimeraz zincir reaksiyonu programı	54
Tablo 3.3: Deneylerde kullanılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çeliğin kimyasal bileşimi	56
Tablo 4.1: İzolat 1`e ait morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları	83
Tablo 4.2: Deney süresince deney ve kontrol düzeneğindeki Mn ⁺² değerleri.....	91
Tablo 4.3: Deney süresince deney ve kontrol düzeneğindeki pH değerleri	94
Tablo 4.4: Deney süresince deney ve kontrol düzeneklerindeki AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızı verileri	96

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat
cm²	: Santimetrekare
dk	: Dakika
g	: Gram
h/cm²	: Hücre/santimetrekare
h/ml	: Hücre/mililitre
l	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
N	: Normal
nm	: Nanometre
ppm	: Milyonda bir
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sa	: Saat
sn	: Saniye
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
EPS	: Hücre dışı polimerler
MIC	: Mikrobiyolojik olarak desteklenen korozyon
Mn	: Mangan
MnOB	: Mangan okside eden bakteri
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
XRD	: X-ışını kristalografisi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MANGAN OKSİTLEYEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU ve MARTENZİTİK ÇELİK ÜZERİNE KOROZİF ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Polen YILMAZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Esra İLHAN SUNGUR

Mangan (Mn); doğada bol miktarda bulunan ve biyojeokimyasal döngülerde kilit rol oynayan önemli bir geçiş metalidir. Mn'nın doğada en yaygın bulunan formu olan Mn-oksit; çeşitli organik/inorganik tür ve bileşiklerin redoks tepkimelerine katılan, yüksek emme kapasitesiyle birçok iyonu absorbe ederek toksik ve zorunlu elementlerin dağılımını ve biyoyararlamını kontrol eden yüksek reaktif bir mineraldir. Normal pH değerlerinde abiyotik olarak okside olabilen Mn, doğada çoğunlukla Mn okside eden bakteriler (MnOB) tarafından abiyotik oksidasyona kıyasla oldukça hızlı gerçekleşen tepkimeler ile biyotik olarak oksitlenirler. Bu tepkimeler sonucu açığa çıkan ve doğadaki en güçlü oksidanlardan olan Mn-oksitler, endüstriyel sistemlerin metalik yapı elemanlarında elektrokimyasal etkilerle aralık ve oyuklanma korozyonuna sebep olurlar. Mn-oksitlerin metal yüzeyi ile aralarında oluşan galvanik çiftin yarattığı elektrokimyasal etkiler, metali korozyona uğratmaktadır. MnOB ile ilişkili korozyon problemleri, başta hidroelektrik santrallerin yapı elemanları olmak üzere; içme suyu sistemleri, kağıt, petrol ve gıda gibi sektörlerde daha önce rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, Türkiye`de bulunan bir hidroelektrik santralden alınan biyofilm ve su örneklerinden bir MnOB türü izole ederek, bu türün martenzitik paslanmaz çeliğin mikrobiyolojik korozyon davranışı üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Elazığ`da bulunan bir hidroelektrik santralden biyofilm ve su örnekleri alınmış, bu örneklerden 7 adet MnOB izolatu elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar arasında en aktif olanı belirlenebilmesi için, her izolatu izolasyonda kullanılan besiyerlerindeki üreme ve Mn oksitleme aktivite eğrileri çizilerek birbirleri ile kıyaslanmıştır. En yüksek bakteri sayısına ulaşan ve en fazla Mn oksiti meydana getiren bakteri izolatu ile bu üreme şekline en uygun ortamı sağlayan besiyeri, korozyon deneyinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçimi yapılan izolatu, biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Biyokimyasal testler sonucunda Enterobacteriaceae ailesinden olduğu belirlenen bakteri izolatu'nun, moleküler dizi analiz sonuçlarına göre %98 oranı ile *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 türüne uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Korozyon deneyinden önce, deney ortamı olarak kullanılacak besiyeri farklı Mn konsantrasyonlarında hazırlanarak *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 suşunun üremesini sınırlamayan en yüksek Mn konsantrasyonu belirlenmiş; korozyon deneyi, belirlenen Mn konsantrasyonunu içeren besiyeri, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 suşu ve AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Korozyonunun tespiti ağırlık kaybı yöntemi ile yapılmıştır. Gerçekleştirilen korozyon deneyi sonucunda, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3`nin hem planktonik hem de sesil formlarının difazik bir üreme şekli gösterdiği gözlemlenmiştir. Kültürdeki Mn⁺² konsantrasyonunun anlamlı derece düştüğü tespit edilmiştir (p<0.01). Karbonhidrat ve protein analizleri ile bakterinin ürettiği karbonhidrat miktarının protein miktarından yüksek olduğunu, bakterinin kendi ürettiği karbonhidrat ve proteini tüketebildiği gösterilmiştir. SEM analizleri, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde biyofilm tabakası oluşturduğunu göstermiştir. Korozyon analizleri, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin martenzitik paslanmaz çeliği mikrobiyolojik olarak korozyona uğrattığına işaret etmektedir. XRD analizi ile deney düzeneğinde Mn oksit bileşiklerinin tespiti de bu bulguyu doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında ilk kez, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin Mn oksitleyen bir bakteri türü olduğu ve martenzitik paslanmaz çeliği mikrobiyolojik olarak korozyona uğrattığı rapor edilmiştir.

Ekim 2019, 147 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mangan okside eden bakteriler (MnOB), Mangan oksit, Mikrobiyolojik korozyon (MIC), Martenzitik paslanmaz çelik, Hidroelektrik santral.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ISOLATION of MANGANESE OXIDIZING BACTERIA and INVESTIGATION of THEIR CORROSIVE EFFECTS on MARTENSITIC STEEL

Polen YILMAZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Esra ILHAN SUNGUR

Manganese (Mn) is an important transition metal that is very abundant in nature and plays a key role in biogeochemical cycles. Mn oxide, which is the most common form of Mn in nature; is a highly reactive mineral that participates in the redox reactions of various organic / inorganic species and compounds, also controls the distribution and bioavailability of toxic and essential elements by absorbing many ions with high absorption capacity. Mn, which can be oxidized abiotically at normal pH values, is biotically oxidized in nature by the reactions of Mn oxidizing bacteria (MnOB) that occur quite rapidly compared to abiotic oxidation. As a result of these reactions, Mn oxides, which are the most powerful oxidants in nature, cause crevice and pitting corrosion in the metallic structure components of industrial systems by electrochemical effects. The electrochemical effects of the galvanic couple formed between the metal surface and the Mn oxides corrode the metal. Corrosion problems associated with MnOB have been reported previously in drinking water systems, industrial systems such as paper, oil, food, and especially structural elements of hydroelectric power plants.

The purpose of this study to isolate a MnOB strain from biofilm and water samples of a hydroelectric power plant located in Turkey and to determinate its corrosive effects on martensitic stainless steel by gravimetric method.

Biofilm and water samples were taken from a hydroelectric power plant in Elazığ and seven MnOB strains were isolated from these samples. In order to determine the most active strain among the isolated MnOB, growth and Mn oxidation activity curves of each strain in all isolation media used during the study were compared with each other. As a result of the comparison, the bacterial strain that reached the highest number with the production of the most Mn oxides and the medium that provides the most suitable environment for this growth type were selected for use in corrosion experiment. The selected strain was identified by biochemical and molecular methods. As a result of biochemical tests, it was determined that bacterial strain belonging to Enterobacteriaceae family was compatible with the sequence analysis results that revealed the isolate showed 98% similarity with *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 strain.

Prior to the corrosion experiment, the test system medium was prepared with different Mn concentrations and the highest Mn concentration which did not limit the growth of *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 strain was determined. Corrosion experiment was carried out by use of the medium containing the maximum Mn concentration which did not limit the bacterial growth, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 strain and AISI 415 martensitic stainless steel coupons. In results, it was observed that planktonic and sessile forms of *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 showed a diphasic growth pattern. The amount of Mn^{+2} in culture medium which used by bacteria decreased significantly ($p < 0.01$). Carbohydrate and protein analyses revealed that the carbohydrate amount was higher than the protein amount which bacteria produced and bacteria had the ability to biodegrade the carbohydrate and protein produced by own. SEM results demonstrated that *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 cells formed a biofilm layer on the AISI 415 martensitic stainless steel surfaces. Corrosion analysis pointed out that *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 corroded AISI 415 martensitic stainless steel coupons microbiologically. Besides, the detection of Mn oxide compounds in the test system by XRD analysis also confirms this finding.

As a result, for the first time in this thesis, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 was reported to be an Mn oxidizing bacterium and microbiologically corrosive to martensitic stainless steel.

October 2019, 147 pages.

Keywords: Manganese oxidizing bacteria (MOB), Manganese oxide, Microbiologically influenced corrosion (MIC), Martensitic stainless steel, Hydroelectric power plant.

1. GİRİŞ

Mangan (Mn), yer kabuğunun beşinci en yaygın metali ve demirden sonra dünyanın ikinci en verimli geçiş metalidir (World Health Organization 2001). Doğada saf halde bulunmamakta olup oksit, karbonat ya da silikat formunda bulunur. Mn'nin doğada en yaygın bulunan formu olan Mn-oksit; çeşitli organik/inorganik tür ve bileşiklerin redoks tepkimelerine katılan, yüksek emme kapasitesiyle birçok iyonu absorbe ederek toksik ve zorunlu elementlerin dağılımını ve biyoyararlanımını kontrol eden yüksek reaktif bir mineraldir (Tebo ve diğ., 2004).

Mn(II)'nin kompleks formları, oksik ve nötral pH koşullarında okside olabilirler ancak abiyotik oksidasyonları biyotik oksidasyona kıyasla oldukça yavaştır. Doğada Mn'nin biyotik oksidasyonu, mikroorganizmaların öncülüğünde gerçekleştirilmektedir. Bakteri ile bazı alg ve fungus türleri, bu reaksiyonların sayısını arttırarak daha hızlı Mn-oksit birikimine sebep olurlar (Tebo ve diğ., 2004). Tamamı aerob olan bu mikroorganizmaların her biri, Mn'nin dönüştürülmesinde çok farklı mekanizmalara sahiptirler (Linhardt, 2004).

Bilim adamları, biyosferde meydana gelen biyotik Mn oksidasyonunun büyük bir çoğunluğunun bakteriler tarafından gerçekleştirildiğini ön görmektedir. Mn okside eden bakteriler (MnOB'ler); ferromanganez nodüllerinden denizlere, volkanik taşlardan çöllere kadar geniş bir jeografik alana yayılmakla birlikte Firmicutes, Aktinobakterler ve Alfa-/Beta-/Gama- proteobakterlerin temsilcileri olarak büyük bir filogenetik yaygınlık göstermektedirler (Tebo ve diğ., 2005). Model olarak kullanılan bazı MnOB'ler üzerinde yapılan çalışmalarda her bir bakterinin farklı bir oksitleme mekanizması kullandığı ancak bazı türlerde ortak olarak, Ca^{+2} bağlayıcı heme-peroksitlerden olan Multicopper oxidase (MCO) ve MopA enzimlerinin oksidasyona dahil olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra; EPS (hücre dışı polimerler) üreten veya olduğundan daha fazla miktarda üreten bakterilerin, EPS üretmeyen veya az üretenlere kıyasla daha hızlı Mn okside ettiği keşfedilmiştir. Bu durum, EPS'nin Mn iyonları için uygun aktif bir bölge olması ve Mn oksidaz enzimlerinin içine gömülü olması ile açıklanmıştır (Smythe, 2017).

EPS, bakteriler tarafından üretilen, temelde polisakkaritler olmak üzere; lipitler, üronik asitler, nükleik asitler ve proteinlerden oluşan hücre dışı polimerik maddelerdir. Mikroorganizmanın yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve biyofilmi meydana getiren ana

öğelerdendir (Sleytr, 1997). Biyofilm, meydana getirdikleri EPS içinde yaşayan, canlı ya da cansız bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş, organize bir mikroorganizma kümesini ifade eder (Luis ve diğ., 2018). Su ekosisteminde, bakteriler %99'luk bir oranla planktonik yaşam (serbest ve bireysel halde) yerine sesil formda (yüzeye tutunmuş ve kümeleşmiş halde) yaşamayı tercih etmektedirler (Costerton ve diğ., 1986).

Korozyon, bir materyalin (genellikle metallerin) karakteristik özelliklerini değiştirerek işlevinin bozulmasına yol açan, materyal ile çevresi arasında meydana gelen kimyasal veya elektrokimyasal reaksiyonlardır (Garcia ve diğ., 2012). Bu olay, metalin doğal bileşiminden kaynaklı olarak gerçekleşebileceği gibi çeşitli mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri ve salgıladıkları reaktif ürünler nedeniyle de başlayabilir veya şiddetlenebilir. Biyofilm içinde, sinerjistik olarak hareket eden bakteri türleri, tek bir türün yaratabileceği korozyondan çok daha şiddetlisini meydana getirebilmektedir (Zuo, 2007; Lee ve diğ., 2013). Bu tür biyofilmlerde, farklı türler arasındaki etkileşimler biyofilmin oksik ve anoksit bölgelerindeki biyokimyasal tepkimeleri arttırarak korozyonu şiddetlendirir (Zuo, 2007; Videla ve Herrera, 2009).

MnOB'lerin metallerde yarattığı korozyon ilk defa Tyler ve Marshall tarafından 1967'de bir hidroelektrik santralin boru hattında meydana gelen MnOB kaynaklı korozyon üzerine yayınlanan çalışma ile gündeme gelmiştir (Tyler ve Marshall, 1967). Bu çalışmadan yıllar sonra, 1994'de, dünyanın çok farklı noktalarında yer alan hidroelektrik santrallerde benzer problemler ile karşılaşan Linhardt tarafından MnOB'lerin metallerde yarattıkları korozyonun mekanizmasına ilişkin bir yaklaşımda bulunulmuştur (Linhardt, 1994). Bu teoriye göre, MnOB'ler çözünebilir Mn iyonlarını (Mn^{+2}) oksitleyerek metal yüzeyinde katı Mn-oksitleri meydana getirmekte; katı formdaki Mn-oksitler de Mn^{+2} 'ye geri indirgenerek metalde katodik reaksiyon gerçekleştirmekte ve korozyona etki etmektedirler (Hakkarainen, 2003). Bunun yanı sıra araştırmacılar, MnOB'lerin yarattığı korozif etkilerin yalnızca metaldeki değişimlerle sınırlı olmadığını, Mn-oksit birikintilerinin diferansiyel havalandırma hücrelerinin oluşumunu ve bu sayede mikrobiyolojik korozyona (MIC) neden olan sülfat indirgeyen bakteri (SRB) ve diğer anaerobların büyümesini teşvik edebileceğini belirtmektedirler (Dickinson ve Lewandowski, 1996; Wiatr, 2008; Dickinson ve Wiatr, 2013).

Günümüzde, hidroelektrik endüstrisinde kullanılmak üzere metal korozyonuna karşı birçok yöntem geliştirilmiştir (Goldberg ve Lier, 2011; Höhle ve Nestler, 2011; Forssander ve diğ., 2012). Ancak bazı literatürde bu yöntemlerin, mikroorganizma kaynaklı metal korozyonunu

(mikrobiyolojik korozyon - MIC) azaltmadığı bildirilmiştir (Tyler ve Marshall, 1967; Linhardt ve Nichtawitz, 2003; Marangoni ve diğ., 2013; Linhardt, 2015). Özellikle santrallerin hidrolik türbinlerinde; türbin bıçakları, dönel çark, sabit ve ayar kanatlarında meydana gelen kavitasyon ve oyuklanma korozyonuna bağlı olarak oluşan aşınmaların türbin ömrünü kısaltan en önemli sorunların başında geldiği bildirilmektedir (Goldberg ve Lier 2011; Höhle ve Nestler 2011).

Bir metal alaşımı olan paslanmaz çelik, içeriğindeki farklılıktan dolayı sertlik, kaynak kabiliyeti ve yüksek korozyon direncine sahip olduğundan endüstriyel sistemlerde sıkça kullanılan bir malzemedir (Outokumpu Oyj, 2013). Günümüzde, hidroelektrik santral türbinlerinin bıçak, dönel çark, sabit ve ayar kanat kısımları çoğunlukla martenzitik paslanmaz çelikten meydana gelmektedir. Standartlaştırılmış bu çelik tipi, alaşımında yalnızca %13 Cr ve %4 Ni barındırdığından endüstriyel açıdan düşük maliyetlidir ve manyetik özellikte olduğundan metalin kontrol amaçlı yapılan tahribatsız muayenesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca paslanmaz çelik özelliğinde olması korozyona karşı önemli bir direnç sağlamaktadır (Linhardt, 2010). Ancak, endüstriyel açıdan bir çok olumlu özelliğe sahip olan ve korozyon dayanıklılığı ile bilinen paslanmaz çeliğin MnOB'lere sanıldığı kadar dirençli olmadığı birçok araştırmacı tarafından ispatlanmıştır (Lutey ve Richardson, 2002; Linhardt, 2003; Anandkumar ve diğ., 2011; Thyssen ve diğ., 2015).

Yapılan literatür taramalarında, ulusal literatürde MnOB'ler ve izolasyon yöntemleri hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte MnOB olarak tanımlanan bir bakteri türü ile gerçekleştirilmiş korozyon çalışması da bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, MnOB türlerinin izolasyonu ve martenzitik paslanmaz çeliğe etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, akarsu üzerinde bulunan ve türbin elemanları martenzitik paslanmaz çelikten imal edilmiş bir hidroelektrik santralden su ve biyofilm örnekleri alınmış, ardından MnOB izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra, MnOB olarak tanımlanan bir bakteri türü ile martenzitik paslanmaz çelik üzerinde mikrobiyolojik korozyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MANGAN ELEMENTİNİN BİYOJEOKİMYASI

2.1.1. Doğada Mangan Elementi

Mangan (Mn); toprakta, suda, çökeltilerde ve biyolojik materyallerde geniş ölçüde dağılım gösteren bir metal türüdür. Mn konsantrasyonu, okyanusal kabukta kıtasal kabuğa göre %60 oranında daha yüksektir (Marbaniang 2012). Yer kabuğu üzerinde bulunan kayalar ortalama olarak %0.1 oranında Mn içerirler. Mn, jeokimyasal olarak Mg, Fe, Ni ve Co elementleri gibi davranarak magmatik kristalleşmenin ilk safhalarında meydana gelen minerallere ayrışmaya eğilim gösterir. Yüzey ve yer altı sularının etkisi ile Mn, volkanik ve metamorfik kayalardan hızlıca çözünerek oldukça hareketli hale geçebilir (Post, 1999). Biyosferde var olan elementler içerisinde en yaygın 12. element; metallere içerisinde ise en yaygın 5. metal olarak kabul edilmektedir (World Health Organization, 2001). Bunun yanı sıra Fe`den sonra dünyanın ikinci en verimli geçiş metalidir. Doğada farklı değerliklerde bulunması ve birçok organizma için zorunlu mikroelementlerden olması nedeniyle Fe ile benzerlik göstermektedir (Tebo ve diğ., 2004).

Doğada saf halde bulunmayan Mn; oksit, karbonat ve silikat formunda bulunur. En sık karşılaşılan formu, bir çeşit Mn-oksit olan Pyrolusit`tir (MnO_2). Mn, 0`dan +7`ye kadar farklı oksidasyon hallerinde bulunabilmesine karşılık genellikle +2 (II), +3 (III) ve +4 (IV) hallerinde bulunur ve bu formlar biyolojik açıdan yüksek öneme sahiptir.

Ağır metallerin salınımını, ayrışmasını, biyoyararlanımını ve toksisitesini etkileyebilen Mn, tüm ekosistem ve üzerinde yaşayan canlılar için hayati bir öneme sahiptir. Kofaktör olarak enzimlerin yapısına katılabilen (örneğin; mitokondride bulunan Mn-superoksit dismutaz, Fotosistem II`de görevli bazı enzimler) Mn; bitkilerde oksidasyon reaksiyonları, karboksilasyon, karbonhidrat metabolizması, fosfor reaksiyonları ve sitrik asit döngüsünde görev alan 35 farklı enzimi aktive edebilir (Mousavi ve diğ., 2011). Aynı zamanda memelilerin normal ve vücut fonksiyonlarının gelişimi açısından da temel minerallerdendir. Sinir ve bağışıklık sistemini koruduğu gibi kan şekerinin ayarlanmasına da yardımcı olur. Ayrıca vitamin B ve E1 yararlanımında rol alır, kemik gelişimi ve kan pıhtılaşma bozukluklarının önlenmesine de katkı sağlar. İnsan vücudu yaklaşık 10-20 mg Mn içerir ve bunun 5-8 mg`ı

günlük olarak kullanır. En temel Mn deposu kemiklerdir. Vücutta Mn^{+2} , Mn^{+3} ve Mn^{+4} formunda bulunabildiği gibi, dokuda genellikle Mn^{+2} formunda bulunmaktadır. Vücudun günlük Mn ihtiyacı 12 mg olarak kabul edilmektedir ve bu ihtiyaç Mn deposu olduğu bilinen yeşil sebzeler, yulaf, fıstık, çay, ananas gibi yiyeceklerle karşılanabilmektedir. Mn eksikliğine insanlarda çok rastlanılmamakla birlikte, görüldüğünde iskelet anormallikleri, ataksi, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında bozukluklar, osteoporoz, epilepsi ve geç iyileşen yaralar ile ilişkilendirilir (Marbaniang, 2012).

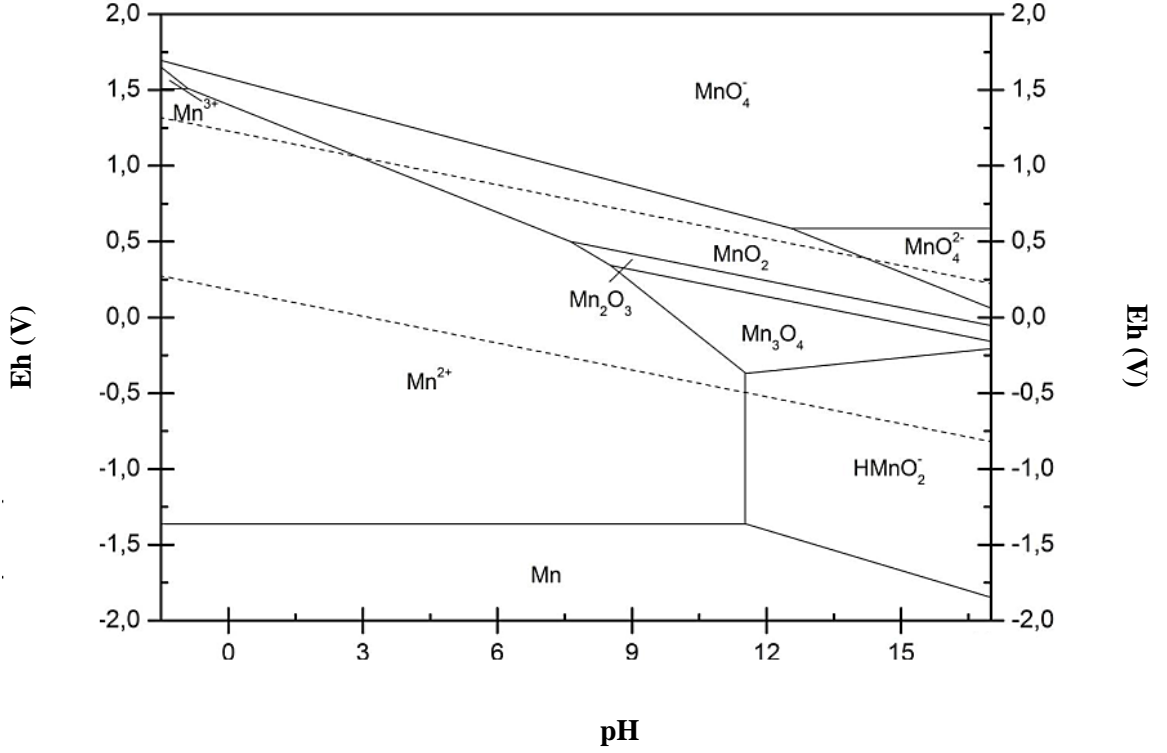
Oldukça fazla yararı olmasına rağmen, yüksek oranda Mn'a maruz kalınması durumunda vücutta ortaya çıkan bazı belirtiler tedavi ile azaltılabilmek ile birlikte beyinde oluşan zarar sürekliliğini korumaktadır. Aşırı seviyelerde alınan Mn, nörotoksin özelliği taşımakla birlikte kalsiyum metabolizmasını engelleyebilir ve mitokondriyal DNA'nın replikasyonu sırasında hataların artmasına sebep olabilir. Çok fazla Mn külü ve tozunu solumak akciğerlerde tahrişe, boğaz kuruluşuna, öksürüğe, göğüs sıkışmasına, hafif sırt ağrılarına, kusmaya, bitkinliğe, uykusuzluğa, zihinsel karışıklığa, zayıflığa, spastik hareketlere hatta felce neden olabilmektedir. Özellikle Mn'a uzun süre maruz kalan endüstri çalışanlarında görülen ve "Manganizm" olarak bilinen hastalık ruhsal bozukluklara sebebiyet vermekte ve motor becerilerinde azalmayla kendini gösteren Parkinson hastalığı benzeri semptomlar ortaya çıkarmaktadır (Bulut, 2012).

Günümüzde Mn cevheri, esas olarak metalürjik süreçlerde oksijen giderici ve kükürt arıtıcı katkı maddesi; aynı zamanda bir alaşım elementi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kuru hücreli pillerin üretiminde, deri ve tekstil endüstrisinde, kimyasalların imalatlarında, cam imalatında, su arıtıcı ajanların yapısında, kümes hayvanlarının yemlerinde katkı maddesi ve bitki gübresi olarak kullanılmaktadır (Post, 1999; World Health Organization, 2001). Mn cevherinin üretilmesinde yüksek oranda Mn içeren kayalar kullanılmaktadır. Üretilen bu cevherin %80-90'ı çelik endüstrisi tarafından tüketilmektedir. Mn'nin çelik yapımında bu derece tercih edilmesinin en büyük sebebi, çeliğin sertliğini ve dayanıklılığını arttırmasıdır (Post, 1999; Bulut, 2012).

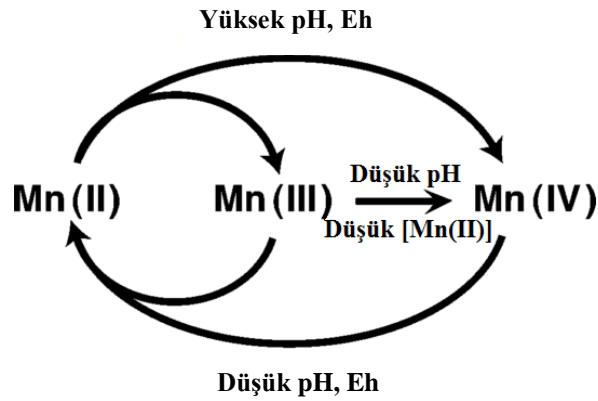
2.1.2. Manganın Oksidasyonu

Mn'nin oksidasyonunu Co, Cu, Ni, Pb, Fe, Ra, U ve doğada nadir bulunan çoğu elementin dağılımı kontrol etmektedir. Oksijen yokluğunda, düşük pH'da ($pH < 8.5$) ve Eh (redoks

potansiyeli) değerlerinde termodinamik olarak kararlı olan Mn^{2+} , oksijen varlığında ve yüksek pH'da Mn^{3+} veya Mn^{4+} formuna dönüşerek okside olmaktadır (Şekil 2.1). Uygun çevre koşullarında ise bu tepkimelerin geri dönüşümü mümkündür (Şekil 2.2).



Şekil 2.1: Mn – H₂O için Eh-pH diagramı (25°C, 1 atm, $a_{[Mn]} = 1 \text{ mol l}^{-1}$) (Nikolaychuk, 2015)



Şekil 2.2: Manganın doğadaki oksidasyon hallerinin döngüsü (Tebo ve diğ., 2004).

Mn'n indirgenmemiş formu olan Mn^{+2} , Mn^{+3} ve Mn^{+4} 'e kıyasla sulu çözeltide serbest iyon halinde bulunabilmektedir. Mn^{+3} ise Mn'nin karasız bir halidir; Mn^{+2} veya Mn^{+4} 'e dönüşme eğilimindedir. Sulu çözeltide serbest halde bulunmaları mümkündür ancak organik ya da inorganik ligandlar ile kompleks bir yapı oluşturmaları gerekmektedir. Mn^{+4} , Mn'nin suda çözülemeyen bir oksidasyon halidir. Doğadaki en güçlü oksidanlardan olan, inorganik ve organik bileşikler (Fe^{+2} , UO_2 gibi) oksitleyebilen ve Se, As, Cr gibi bazı toksik metallerin indirgenmiş formlarının varlığını oksidatif çökeltme/çözme yoluyla kontrol edebilen Mn-oksitleri meydana getirir.

Tıpkı Fe^{+3} 'e olduğu gibi, Mn'nin oksidasyonu da doğadaki redoks dengesinin ve karbon (C) döngüsünün kontrolünde vazgeçilmez bir öneme sahiptir. Mn'nin bu döngüdeki rolü; okside olmuş/indirgenmiş formlarının (Mn-oksitler) yüksek enerjili oksidanlar olarak elektron alıcısı görevini üstlenmesi ve organik karbonun degrade olmasını (oksidasyonunu) sağlamasıdır (Cerrato, 2010). Tablo 2.1'de elektron alıcısı olarak görev alan Mn mineralleri; bu minerallerin elektron potansiyelleri (verilen her bir değer, mineralin nötral pH değerindeki elektron aktivitesini temsil etmektedir), doğal koşullardaki genel konsantrasyonları, her bir mineralin görev aldığı genelleştirilmiş organik karbon oksidasyon eşitlikleri ve reaksiyon sonucu ortaya çıkan serbest enerji verilmektedir. Tabloda temsil edilen organik karbonun (C_o) formülü $(CH_2O)_{106}(NH_3)_{16}(H_3PO_4)$ 'tır (Nealson ve Saffarini, 1994).

Tablo 2.1: Karbon döngüsünde elektron alıcısı olarak görev alan mangan mineralleri (Nealson ve Saffarini, 1994).

Elektron Alıcısı	Elektron Potansiyeli (pE^0)	Doğal Koşullarda Konsantrasyonu	Organik Karbon Oksidasyon Eşitlikleri	Serbest Enerji (kJ/M glukoz)
Mangan (birnessite)	+ 8.9	< μM ile > mM arası	$C_o + 236 MnO_2 + 472 H^+ \rightarrow 236 Mn^{2+} + 106 CO_2 + 8 N_2 + H_3PO_4 + 366 H_2O$	- 3090
Mangan (nsutite)	+ 8.9	< μM ile > mM arası	$C_o + 236 MnO_2 + 472 H^+ \rightarrow 236 Mn^{2+} + 106 CO_2 + 8 N_2 + H_3PO_4 + 366 H_2O$	- 3050
Mangan (pyrolusite)	+ 8.9	< μM ile > mM arası	$C_o + 236 MnO_2 + 472 H^+ \rightarrow 236 Mn^{2+} + 106 CO_2 + 8 N_2 + H_3PO_4 + 366 H_2O$	- 2920

Mn, abiyotik (otokatalitik) oksidasyon ve biyotik oksidasyon olmak üzere doğada iki şekilde okside olmaktadır. Mn^{+2} 'nin kompleks formları, oksik ve nötral pH koşullarında okside olabilirler ancak abiyotik oksidasyonları biyotik oksidasyona kıyasla oldukça yavaştır. Doğada Mn'nin biyotik oksidasyonu, mikroorganizmaların öncülüğünde gerçekleştirilmektedir (Tebo ve diğ., 2004; Das ve diğ., 2011; Geszvain ve diğ., 2012).

2.1.2.1. Manganın Abiyotik Oksidasyonu

Abiyotik oksidasyonun en önemli faktörü oksijendir. Mn^{+2} 'nin, Mn^{+3} ve Mn^{+4} 'e oksidasyonu, Mn döngüsündeki en önemli olaydır. Doğal şartlarda, 6-9 pH aralığında, Mn oksidasyonu oldukça yavaş olmakla birlikte, tepkimelerin tamamlanması günler almaktadır (Tebo ve diğ., 2004; Cerrato, 2010). Mn^{+2} 'nin abiyotik oksidasyonunun genel eşitliği Denklem 2.1'de verilmiştir (Stumm and Morgan, 1996; Morgan, 2005).

$$- \frac{d[Mn(II)]}{dt} = k_1 [Mn(II)] + k_2 [Mn(II)][MnO_{x(s)}] + k_3 [Mn(II)][Substrat]$$

Homojen Mn oksidasyonu

Heterojen katalitik etki

(2.1)

Bu eşitlik; homojen Mn oksidasyonu ile birlikte henüz okside olmuş Mn yüzeyleri ve dış mineral substratların varlığında meydana gelen heterojen katalitik etkiyi bir arada temsil etmektedir (Davies ve Morgan, 1989; Cerrato, 2010). Buradaki "homojen" terimi, çözeltideki Mn^{+2} abiyotik oksidasyonunun yalnızca oksijen tarafından gerçekleştiğini ifade ederken; "heterojen" terimi oksidasyonun yüzey substratlarının varlığında gerçekleştiğini ifade etmektedir (Cerrato, 2010).

Metal oksitlerin yüzeyleri, oksijen varlığında, Mn^{+2} oksidasyonu üzerine katalitik bir etki gösterir. Mikroskopik ve spektroskopik çalışmalar göstermektedir ki, heterojen Mn^{+2} oksidasyonu sırasında gerçekleşen absorpsiyon ve oksidasyon reaksiyonlarının en aktif şekilde gerçekleştiği bölgeler, metal oksitlerin yüzeyleridir (Davies ve Morgan, 1989; Junta ve Hochella, 1994; Junta-Rosso ve diğ., 1997; Morgan, 2005; Cerrato, 2010).

2.1.2.2. Manganın Biyotik Oksidasyonu

Biyotik Mn oksidasyonu, yüzey kataliz reaksiyonları dahil abiyotik Mn oksidasyonuna göre çok daha hızlıdır ve doğada abiyotik oksidasyona üstün geldiği ön görülmektedir (Chapnick ve diğ., 1982; Emerson ve diğ., 1982; Cowen ve diğ., 1990; Tebo, 1991; Mandernack ve Tebo, 1993; Aguilar ve Nealson, 1998; Harvey ve Fuller, 1998; Marble ve diğ., 1999; Tebo ve diğ., 2004). Bu nedenle doğada kendi kendine meydana gelen Mn-oksitlerin büyük bir çoğunluğunun ya biyotik oksidasyon ile ya da var olan biyotik Mn-oksitlerin değişim geçirmeleri sonucu oluştuğu düşünülmektedir (Tebo ve diğ., 2004). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda; toprakta, sedimentlerde ve tüm doğal sularda biyotik oksidasyonun, direkt veya dolaylı yollarla, çoğunluğu bakteri olmak üzere alg ve fungus gibi mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Tamamı aerop olan bu mikroorganizmaların her biri, Mn²⁺'nin dönüştürülmesinde çok farklı mekanizmalara sahiptirler (Linhardt, 2004).

Alglerin, Fotosistem II' de önemli kofaktör olan Mn²⁺'yi hem direkt hem de dolaylı olarak sudan uzaklaştırabildiğine dair bir teori mevcuttur. Direkt uzaklaştırmada alg, bir dizi hücre içi aktivite ile Mn²⁺'yi ortamdan direkt olarak alabilir, taşıyabilir ve biriktirebilir. Dolaylı uzaklaştırmada ise bulunduğu su ortamının pH'nın uygun değere gelmesi ile birlikte Mn²⁺'nin Mn⁴⁺ e okside olmasına sebep olur. Alg bu oksidasyonu, fotosentetik aktiviteler aracılığıyla yapar ve teorilere göre bunun için iki farklı yol kullanır. Bunlardan ilki, fotosentez yapacak bireysel alg hücrelerinin veya bir araya gelmiş alg kümelerinin etrafında oksijen ve pH değerleri farklılaşmış bir bölge meydana getirmeleri, Mn²⁺'nin okside olması için uygun şartları sağlayan bu bölgede oksidasyonun gerçekleştirilmesi, oluşan Mn-oksitlerin bu bölgelerde hapsolmesi ve böylece bölgede Mn döngüsünün sürekli hale gelmesidir. İkinci yol ise alglerin fotosentetik aktivitelerinin, oksijen ve pH değerlerini uygun değerlere getirerek Mn²⁺'nin kimyasal oksidasyonuna ortam hazırlamasıdır (Richardson ve diğ., 1988). Konu üzerine dikkat çekici nokta şudur ki, Richardson ve diğ. (1988) tarafından *Chlorella* sp. ile yapılan laboratuvar çalışmalarına göre artan pH'ın yanı sıra görülebilir ışığın varlığı da algin Mn oksidasyonunu katalizlemekte, oksidasyon oranı ışık varlığında artış göstermektedir.

Bazı fungus türleri de algler gibi Mn oksitleme yeteneğine sahiptirler. 18S rRNA ile yapılan moleküler tanımlamalarda Mn oksitleyen fungus türlerinin, doğada oldukça yaygın görülen "asklı fungus" veya "askomiset" isimleri ile bilinen fungus şubesine bağlı oldukları rapor edilmiştir (Tebo ve diğ., 2005). Fungusların Mn²⁺'i nasıl okside ettiğine dair yapılan çalışmalar

kısıtlı olmakla birlikte, kullanılan model mikroorganizmalar çoğunlukla askomisetlerden seçilmiş olup, bunlar arasında *Acremonium* sp. KR21-2, *Paraconiothyrium sporulosum*, *Pyrenochaeta* sp. ve *Stagonospora* sp. türleri bulunmaktadır (Miyata ve diğ., 2004; Sutherland ve diğ., 2018). Miyata ve diğ., 2004`de KR21-2 ile yaptıkları çalışma ile hücre dışı bir proteinin Mn oksidasyonuna dahil olduğunu rapor etmişlerdir (Miyata ve diğ., 2004). Bunun yanı sıra fungusların, ligninin yıkımında görev alan lakkaz ve Fe içerikli Mn peroksitleri kullanarak da Mn`ı okside edebildikleri rapor edilmiştir (Hofer ve Schlosser, 1999; Schlosser ve Hofer, 2002; Tebo ve diğ., 2005).

Bilim insanları, alg ve funguslara rağmen biyosferde meydana gelen biyotik Mn oksidasyonunun büyük bir çoğunluğunun bakteriler tarafından gerçekleştirildiğini ön görmektedirler. Mn okside eden bakteriler (MnOB`ler); ferromanganez nodüllerinden denizlere, volkanik taşlardan çöllere kadar geniş bir jeografik alana yayılmakla birlikte Firmicutes, Aktinobakterler ve Alfa-/Beta-/Gama– Proteobakterlerin temsilcileri olarak büyük bir filogenetik yaygınlık göstermektedirler (Tebo ve diğ., 2005). Model olarak kullanılan bazı MnOB`ler ile yapılan çalışmalarda, her bir bakterinin farklı bir oksitleme mekanizması kullandığı ancak bazı türlerde ortak olarak, Ca⁺² bağlayıcı heme-peroksitlerden olan Multicopper oxidase (MCO) ve MopA enzimlerinin oksidasyona dahil olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra; EPS (hücre dışı polimerler) üreten veya olduğundan daha fazla miktarda üreten bakterilerin, EPS üretmeyen veya az üretenlere kıyasla daha hızlı Mn okside ettiği keşfedilmiştir. Bu durum, EPS`nin Mn iyonları için uygun aktif bir bölge olması ve Mn-oksidad enzimlerinin içine gömülü olması ile açıklanmıştır (Smythe, 2017). MnOB`ler ve oksidasyon mekanizmaları ile ilgili daha geniş bilgi “2.2. Mangan Okside Eden Bakteriler” başlığı altında verilmiştir.

2.1.2.3. Mangan Oksitler

Mn-oksitler/oksihidroksitler genellikle hidrotermal partiküllerde, ferromanganez nodüllerinde; yıpranmış mafik kayaların (bazalt gibi), tortul kayaların (çöl verniği gibi) ve sedimentlerin su altında kalan alt yüzeylerinde meydana gelirler (Divekar, 2010). Yüzey ve yer altı sularının etkisiyle volkanik ve metaformik kayalardan çözünebilen Mn, bilinen 30`dan fazla Mn-oksit mineralinin oluşumuna sebep olmaktadır (Post, 1999). Doğada en sık karşılaşılan Mn-oksitler Tablo 2.2`de verilmiştir.

Tablo 2.2: Önemli mangan oksit mineralleri (Post, 1999).

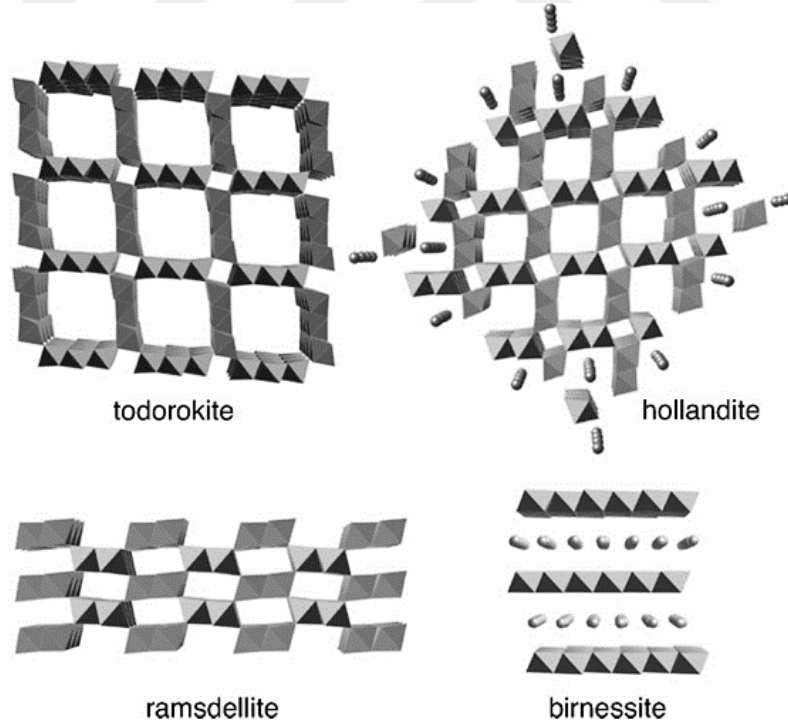
Mineral	Kimyasal Formülü
Pyrolusite	MnO ₂
Ramsdellite	MnO ₂
Nsutite	Mn(O,OH) ₂
Hollandite	Ba _x (Mn ⁴⁺ ,Mn ³⁺) ₈ O ₁₆
Cryptomelane	K _x (Mn ⁴⁺ ,Mn ³⁺) ₈ O ₁₆
Manjiroite	Na _x (Mn ⁴⁺ ,Mn ³⁺) ₈ O ₁₆
Coronadite	Pb _x (Mn ⁴⁺ ,Mn ³⁺) ₈ O ₁₆
Romanechite	Ba _{.66} (Mn ⁴⁺ ,Mn ³⁺) ₅ O ₁₀ ·1.34H ₂ O
Todorokite	(Ca,Na,K) _x (Mn ⁴⁺ ,Mn ³⁺) ₆ O ₁₂ ·3.5H ₂ O
Lithiophorite	LiAl ₂ (Mn ⁴⁺ Mn ³⁺)O ₆ (OH) ₆
Chalcophanite	ZnMn ₃ O ₇ ·3H ₂ O
Birnessite	(Na,Ca)Mn ₇ O ₁₄ ·2.8H ₂ O
Vernadite	MnO ₂ ·nH ₂ O
Manganite	MnOOH
Groutite	MnOOH
Feitknechtite	MnOOH
Hausmannite	Mn ²⁺ Mn ³⁺ O ₄
Bixbyite	Mn ₂ O ₃
Pyrochroite	Mn(OH) ₂
Manganosite	MnO

Suda çözünemeyen, kahverengi-siyah renkli Mn-oksit mineralleri, kayaçların yanı sıra okyanus nodüllerinde de oldukça yoğun miktarda bulunurlar. Okyanus Mn nodülleri tipik olarak 3-4 m derinlikte, kahverengi siyah renkte, üzüm salkımını andıran küresel şekilli, genellikle Mn²⁺ olarak Fe de içeren konsantre oksit tabakalarından meydana gelir (Post, 1999). Doğal sistemlerde Mn ve Fe, benzer dağılım şekilleri göstererek bir arada oldukça sık görülürler. Fe²⁺, Mn²⁺ ye göre çok daha kolay ve hızlı şekilde okside olduğundan; doğal su sistemlerinin oksik bölgelerinde, Fe-oksitler Mn-oksitlerin altında yer alırlar. Ancak çoğunlukla birbirlerine karışmış haldedirler. Suboksik bölgelerde ise Mn²⁺, Fe³⁺ ün üzerinde bulunmaktadır. Bunun sebebi ise Fe ve Mn'nin oksit formlarının sahip olduğu indirgeme potansiyelleri ve Fe²⁺ nin çoğu Mn⁴⁺ ü indirgeyebilme özelliğinde olmasıdır (Nealson ve Saffarini, 1994).

Çoğu Mn-oksitin genel olarak kahverengi-siyah renkte, iç içe geçmiş ince taneciklerden oluşan zayıf kristal kümeler veya tabakalar halinde oluştuğu bilinmekle birlikte, farklı formlarını birbirinden ayırmak oldukça güçtür. Bir Mn mineralinin ortalama oksidasyon değerliğini (AOS) ölçmek oldukça kolayken, Mn²⁺/Mn³⁺/Mn⁴⁺ ün oranlarını hesaplamak bir o kadar zordur. Bunun sebebi olarak ise tek bir Mn-oksit mineralinde bile Mn'nin farklı farklı

değerliklerde bulunabilmesi gösterilir. Örneğin; Manganite ($MnOOH$), tamamen Mn^{+3} ten oluşabileceği gibi, yarısı Mn^{+2} den yarısı Mn^{+4} ten de meydana gelebilmektedir (Post, 1999).

Mn-oksitlerin minerolojik özelliklerinin (yapı, yüzey alanı ve aktiflik), önemli katyonların ve iz elementlerin doğal su ortamındaki iyon değişimleri ve emilimleri üzerine oldukça büyük etkisi olduğundan, gerek abiyotik gerekse biyotik oksitlerin minerolojik yapılarını bilmek önem arz etmektedir (Divekar, 2010). Mn-oksit minerallerinin yapısına dair bilgiler çoğunlukla laboratuvar ortamında ekstrem pH, Mn^{+2} konsantrasyonu ve sıcaklık koşullarında sentetik olarak yapılan Mn-oksitlere dayanır. Mn-oksitler karakteristik olarak; negatif yüke sahip geniş bir yüzey alanı ve Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} gibi transfer edilebilir yük dengeliyici katyonları içeren açık kristal yapıda minerallerdir. Çoğu Mn-oksitin temel birimi MnO_6 oktahedron olarak adlandırılan, zincir/tünel (todorokite, hollandite, ramsdellite gibi) ya da tek katman (birnessite gibi) halinde meydana gelen yapılardır (Şekil 2.3.) (Tebo ve diğ., 2004).



Şekil 2.3: Zincir/tünel (todorokite, hollandite, ramsdellite) ve tek katman (birnessite) yapıları mangan oksit kristalleri (Tebo ve diğ., 2004).

Tek katman halinde olan oktahedronlarda, su ve çeşitli katyonlar iki oktahedron tabakası arasındaki bölgeye katılır. Tünel/zincir şeklinde oluşan oktahedronlar ise, enine kesitte, kare ya da dikdörtgen tüneller oluşturarak köşeleri bir araya gelen zincir şeklindeki yapılardır. Bu zincirler tekli, çiftli ya da üçlü olarak bir araya gelebilir. Zincir sayısı ve uzunluğundaki farklılık oksitlerin yüzey alanını, hidrasyonunu ve transfer edilebilir katyonlara erişilebilirliği farklılaştırmaktadır. Doğada en sık karşılaşılan Mn-oksit olan Pyrolusit'in yapısı tekli zincir şeklindeki oktahedrondan meydana gelmektedir (Tebo ve diğ., 2004).

Biyosferde bulunun Mn-oksitlerin büyük çoğunluğunun biyotik kökenli olduğu ön görülmele birlikte, bu oksitler genellikle toprak ve su sistemlerinin oksidasyon-redüksiyon ara yüzeylerinde yoğun şekilde bulunurlar. Biyotik oksitlerin ortamdaki Mn^{+3} ve/veya Mn^{+2} ile birleşerek 4'den düşük AOS değerleri ortaya çıkarabilmesi, tek başına minerolojik olarak tanımlanmasını zorlaştırmaktadır (Clement, 2006). Bu sebeple, bakteriyel oksidasyon mekanizmaları, ancak iyi karakterize edilmiş abiyotik Mn-oksitlerin denge reaksiyonlarına dayandırılarak açıklanabilmektedir. Biyotik ve abiyotik Mn-oksitler arasındaki morfolojik farklılıklar hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Biyotik Mn-oksitlerin yapılarının açığa çıkarılması ve abiyotik oksitlerden farklarının ortaya konması, şüphesiz ki mikroorganizmaların oksidasyon mekanizmalarının daha doğru ve detaylı şekilde açıklanmasına katkı sağlayacak; tarih öncesi devirlerden günümüze kalan kayaçların tortularında bulunan Mn-oksitler karakterize edilecek ve mikroorganizmaların bu tortuların oluşmasındaki rolü ortaya konulabilecektir (Tebo ve diğ., 2004; Smythe, 2017). Tebo ve diğ., 2005 yılında yayınladıkları makalede, biyotik Mn-oksitlerin yapıları üzerine yoğunlaşmanın aydınlatılabileceği konular üzerine bazı teorilerini paylaşmışlardır. Bu teorilerden birine göre, birçok kimyasal ve biyolojik aktivitede Mn-oksit varlığının indikatör özelliği taşıması, Mn-oksitlerin biyomarkır olarak nitelendirilmesine olanak sağlayabilecektir. Buradan yola çıkarak, mikrofosillerin oksijen konsantrasyonu, pH ve sıcaklık açısından buldukları paleotik dönem çevre koşulları ve mikrobiyal orjinleri hakkında bilgi sahibi olunması da mümkündür. Örneğin, Güney Afrika'da 2.2 milyon yıl önce oluşan Kalahari Mn-oksit tortularının oluşma mekanizmasının aydınlatılması, erken dönem dünya tarihinde meydana gelen kimyasal ve biyolojik olayların aydınlatılmasına katkı sağlayabilecektir (Tebo ve diğ., 2005).

Çoğunlukla bakteriler tarafından meydana getirilen biyotik Mn-oksitlerin yapılarının ortaya konmasında *Bacillus* sp. SG-1 (Bargar ve diğ., 2005; Smythe 2017), *Pseudomonas putida*

MnB1 (Villalobos ve diğ., 2003), *Pseudomonas putida* GB-1 (Smythe, 2017) ve *Erythrobacter* sp. SD21 (Smythe, 2017) bakteri türleri kullanılmıştır. Yapılan araştırmalarda, tipik olarak yüksek oksidasyon hallerine sahip olan biyotik Mn-oksitler; geniş spesifik yüzey alanlarına sahip, δ -MnO₂ ve H⁺-birnessite oksitlerin yapılarını andıran zayıf kristallerdir. Ayrıca yanlamasına uzanabilen, birkaç nanometreden (nm) yüzlerce nanometre kalınlığa kadar ulaşabilen, bakteriyel organik materyaller (hücre sel yapılar ve EPS gibi) ile bir arada bulunan nano tabakalardan meydana gelmektedirler (Villalobos ve diğ., 2003; Bargar ve diğ., 2005; Tebo ve diğ., 2005; Smythe 2017).

Mn-oksitler, metallerin ve organik bileşiklerin dağılımı ve biyoyararlılığında önemli bir rol oynamaktadırlar. Düşük konsantrasyonlarda bile önemli miktarlarda Cu, Co, Cd, Zn, Ni, Sn, Pb, Ca, Fe, Ra, Hg, U, Pu, Po, As, Se, ve Th elementi ile birleşebilir ve absorbe edebilirler. Ayrıca doğal sulardan ve sediment yüzeylerinden fosfatı absorbe edici özellikleri vardır. Ra, Pb, ve Po'nun deniz suyundan geri kazanımlarını sağlarken, doğal yollarla oluşan radyonüklidlerin (²³⁴Th, ²²⁸Th, ²²⁸Ra ve ²²⁶Ra) jeokimyasal dağılımını kontrol ederler (Post 1999). Doğadaki en güçlü oksidanlardan olarak humik ve fulvik asitler, aktinitler, aromatik hidrokarbonlar ve hidrojen, sülfat gibi birçok organik ve inorganik bileşiği indirgeyebilir ve yükseltgeyebilirler (Yao ve Millero, 1996; Tebo ve diğ., 2004; Bargar ve diğ., 2005). Bunun yanı sıra, Cr ve U hariç bazı toksik metaller, Mn-oksitler tarafından çöktülebilir (Tebo ve diğ., 2004). Örneğin, yüksek derecede toksik olan trivalent arsenik (As), daha az toksik olan pentavalent arsenik formuna dönüştürebilir (Tournassat ve diğ., 2002). Fenol ve klorlanmış fenoller, klorlanmış anilinler ve kirletici atrazinler başta olmak üzere kompleks organiklerin bozunmalarını teşvik eden Mn-oksitler, tolüen gibi organik kirleticilerin bakteriyel yıkımında elektron alıcısı olarak görev alırlar (Tebo ve diğ., 2004). Doğaya katkılarının yanı sıra, bazı metal(loid)lerin toksisitesini arttıran reaksiyonları katalizlemeleri de mümkündür. Örneğin, kromun (Cr) oldukça zararsız bir formu olan Cr⁺³'ü, oldukça hareketli ve karsinojenik bir formu olan Cr⁺⁴'e hızlı bir şekilde dönüştürebilirler (Murray et al. 2005; Marcus et al. 2017).

Mn-oksitlerin toprakta ve doğal su ortamında kalış süresinin, indirgenmiş Fe, S ve C'nun oksidasyonundaki katalitik rolü sebebiyle kısa olabileceği üzerinde durulmaktadır (Tebo ve diğ., 2005). Ayrıca, gerçekleştirdikleri iyon değişimi, metal Emilimi ve çökelmesine tesir eden birkaç etmen mevcuttur. Bunlar; Mn-oksitlerin güçlü oksitleyici doğası, Mn⁺³/Mn⁺⁴ oranı,

yüzeydeki Mn-oksit partiküllerinin ve tabakalarının değişimi, katyon değişim reaksiyonlarının kapasitesi, Mn-oksitin kristal yapısı, büyüklüğü ve kristallik derecesidir (Tebo ve diğ., 2004).

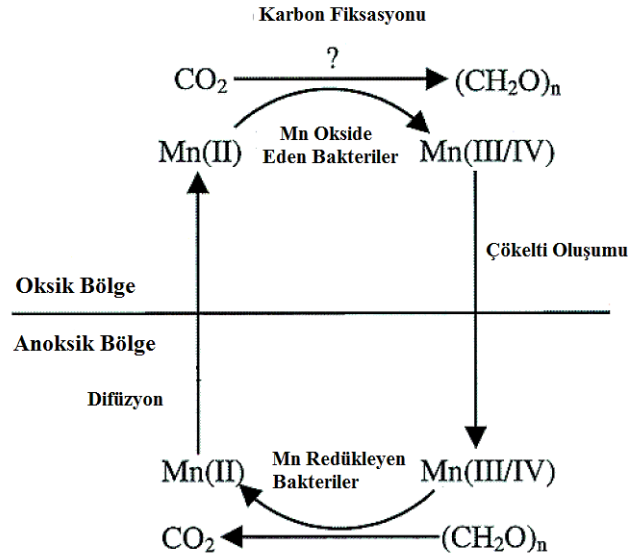
Mn-oksitler, kirletici maddeler üzerine detoksifiye etkileri olması nedeniyle, doğal ekosistemlerde ve antropojenik ortamlardaki metal kireticilerin doğal yollarla azaltılmasında ekolojik ve ekonomik bir çözüm olarak görülmektedirler (Bohu ve diğ., 2016). Su ve atık su arıtma sistemlerinde, toprağın ve sedimentlerin iyileştirilmesinde, metallerin giderimi ve geri kazanımında katalizör, emici ve elektrik iletkenleri olarak kullanılmaktadırlar (Tebo ve diğ., 2004). Örneğin; içme sularının temizlenmesinde yaygın olarak kullanılan, “Manganese Greensand” olarak adlandırılan ve içeriğinde çeşitli değerliklerde Mn-oksitler ve glokonit olan bir filtrasyon mediumu, özel olarak Mn^{+2} , Fe^{+2} , H_2S ve As^- ’i sudan uzaklaştırmak için dizayn edilmiştir (Casale ve diğ., 2002). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda; Cd, Pb veya Cd/Pb kontamine topraklarda yetişen çavdar otuna, Mn-oksitli toprak takviyesi yapıldığında bitkinin metallere, kireçten, fosfat bazik cüruftan, Fe oksitlerden ve modifiye olmuş alüminosilikattan korunduğu görülmüştür (Mench ve diğ., 1994; Tebo ve diğ., 2004).

2.2. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLER

Literatürde, Mn okside eden mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunu bakteriler oluşturmaktadır. Mn okside eden bakteriler (MnOB’ler), oksik ve anoksik ara yüzeylerde yoğunlukta olmak üzere; okyanus diplerindeki metal çökeltilerinde, yıpranmış volkanik taşların ve çöl kayalarının yüzeylerinde, hidrotermal birikintilerde, nehir ve akarsularda, göl ve topraktaki ferro-manganez nodülerinde bulunmaktadır. Buldukları çevreler kadar filogenetik olarak da yaygınlık gösteren bu bakterilerin temsilcileri Firmicutes, Aktinobakterler, α -, β -, γ -Proteobakterlerdir (Tebo ve diğ., 2005). Tamamı heterotrof olan bu bakteriler, aerob olarak üremektedirler. Model olarak sıkça kullanılan MnOB türleri; Gram pozitif ve sporlu bir bakteri olan *Bacillus* sp. strain SG1 (de Vrind ve diğ., 1986), bir γ -Proteobakter olan *Pseudomonas putida* MnB1 ve GB-1 (Caspi ve diğ., 1998; Brouwers ve diğ., 1999) ve protein kılıfla örtülü bir β -Proteobakter olan *Leptothrix discophora* strain SS-1’dir (Adams ve Ghiorse, 1987).

Bakterilerin neden Mn okside ettiği günümüzde hala aydınlatılamamıştır. Tebo ve diğ. (2005) yayınladıkları makalede, konu üzerine olan teorilerini detaylı şekilde tartışmaktadırlar. Bu

terorilerden biri, bakteriyel Mn oksidasyonunun hücrenel ya da hücre dışı ürünler arasındaki spesifik olmayan tesadüfi etkileşimler sonucu ortaya çıkmasıdır. Bir diğer teori ise, bu davranışın biyolojik bir rolü olmasından çok evrimsel süreçte kazanılmış, ancak fizyolojik olarak artık bir önemi olmayan bir özellik olduğudur. Konu üzerine en yaygın terori ise, bakterilerin Mn⁺ enerji üretiminde kullanmak için okside ettiği yönündedir. Ancak bu güne kadar bu bağlantıyı direkt olarak gösterebilen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra, Mn⁺'nin birçok hücrenel fonksiyonun yerine getirilmesinde bir ihtiyaç olduğu bilinen bir gerçektir. Örneğin; hücre içi Mn²⁺, süperoksit dismütaza sahip olmayan hücrelerde bile bir antioksidan gibi davranarak hücreleri süperoksit gibi reaktif oksijen türlerinin etkilerinden korur (Archibald ve Fridovich, 1981a; Archibald ve Fridovich, 1981b). Ayrıca *Deinococcus radiodurans* bakteri türü üzerinde yapılan çalışmalar, süperoksit radikallerinin Mn²⁺ tarafından toplanması ile bakterinin yüksek seviye iyonize radyasyona dayanabilmek için bir mekanizma geliştirebileceğini göstermektedir (Daly ve diğ., 2004; Ghosal ve diğ., 2005). Buradan çıkan sonuç ise Mn oksidasyonunun hücrenel fonksiyona faydalarının yanı sıra bakterinin radyasyon gibi çevresel etkilerden korunmasına da yardımcı olabileceğidir. Hücrelerini Mn-oksitlerle kaplayan bakteriler; UV radyasyonundan, avcılardan, viral saldırılardan ve ağır metal toksisitesinden korunabilirler. Bunların yanı sıra, oksidasyon sonucu ortaya çıkan Mn⁴⁺-oksitlerin, hümik maddeleri bakteri büyümesinde kullanılabilir düşük moleküler ağırlıklı formlara dönüştürebildiği bilinmektedir (Sunda ve Kieber, 1994). Bu formların MnOB'ler ya da büyük mikrobiyal topluluklar tarafından kullanılabilirliği göz önüne alındığında, Mn oksidasyonunun avantajları açıkça görülecektir. Bu avantajlardan biri de biyojeokimyasal boyutta karbon döngüsüne bakteriler tarafından yapılabilecek katkıdır (Şekil 2.4). Ayrıca Mn-oksitlerin alternatif olarak, karbon ve enerji ortamda yeniden ulaşılabilir oluncaya kadar elektron alıcısı görevini üstlenebileceği de unutulmamalıdır (Tebo ve diğ., 1997; Tebo ve diğ., 2005).



Şekil 2.4: Mangane okside eden ve redükleyen bakterilerin mangane ve karbon döngüsündeki rolü (Brouwers ve diğ., 2000)

MnOB`ler oksidasyona ihtiyaç duymadan da hayatlarını sürdürebiliyorsa neden hala Mn okside ediyorlar? Bu soru, bilim insanları tarafından cevabı bulunamamış tek soru değildir. MnOB`lerin Mn döngüsündeki öneminin keşfi için son 30 yılda yapılan çalışmalar hız kazansa da dünya literatürü hala soru işaretleri ile doludur. MnOB`lerin diğer bakteri veya mikroorganizma grupları ile ilişkileri nelerdir? Bakteriler, Mn`ı tam olarak nasıl bir mekanizma ile oksitler? Bakteri oksidasyonu ile oluşan biyotik Mn-oksitleri abiyotik oksitlerden ayırmak mümkün müdür? Tüm bunlar ve daha birçoğu, bilim insanlarının hala üzerinde çalışmalar gerçekleştirdiği ve cevaplamaya çalıştığı sorulardır.

Günümüzde çevre kirliliğinde geline nokta, doğal kaynakların azalması ve artan maliyetler endüstrileri temizlik ve üretimde çevre dostu biyolojik yöntemler kullanmaya teşvik etmektedir. MnOB`ler ise bu amaçlara hizmet edebilen değerli organizmalardır. Su ortamlarında ağır metal kirliliği, büyük çevresel kaygılara yol açan önemli bir sorundur. Endüstriyel ve tarımsal kimyasalların, endüstriyel atık suların, katı hayvansal atıkların veya bunlarla kirlenmiş toprağın akarsulara, göllere ve yer altı sularına karışmasıyla besin zincirine katılan ağır metaller insan sağlığı için tehlikeli oluşturmaktadır (Khedr ve diğ., 2016). Dünya Sağlık Örgütü`ne (WHO) göre içme sularındaki Mn konsantrasyonu 0.4 mg/L`den yüksek olduğunda, kullanımdan önce suların Mn`dan arıtılması gerekmektedir (World Health Organization, 2001). Mn`nın içme

suyundan uzaklaştırılması genellikle sudaki çözünmüş Mn^{+2} 'nin klor ve ozon ile oksidasyonuna; ardından suyun filtrasyon yoluyla oluşan patriküllerden ayrılmasına dayanır (Kohl ve Medlar, 2006). $KMnO_4$ bileşiği de çözünmüş Mn^{+2} 'nin sudan uzaklaştırmasında etkili olan bir başka oksidandır (Knocke ve diğ., 1991). Ancak kullanılan kimyasal yöntemler masraflı olmalarının yanı sıra atık ve yan ürün oluşturmaları sebebiyle son yıllarda ilgiyi daha çevre dostu bir çözüm olan Mn'nin biyotik oksidasyonuna çekmiştir (Katsoyiannis ve Zouboulis, 2004). Biyotik oksidasyonun, Mn'nin sudan uzaklaştırılmasında %98 oranında başarılı olduğu ispatlanmıştır (Tekerekopoulou ve diğ., 2013; Hoyland ve diğ., 2014; Marcus ve diğ., 2017). Bu amaç için bakterilerden yararlanılmakta olup genellikle kullanılan MnOB cinsleri *Leptothrix*, *Crenothrix*, *Hyphomicrobium*, *Siderocapsa* ve *Metallogenium* olarak bildirilmiştir (Katsoyiannis ve Zouboulis, 2004). *Leptothrix ochracea* üzerine yapılan bir çalışmada, bakteriyel oksidasyon sonucu oluşan Mn-oksitlerin EPS (hücre dışı polimerler) ile bağlantılı olarak bakterinin yüzeyinde toplandığı görülmüştür. Bu sonuç, bakterilerin Mn'nin sudan uzaklaştırılmasındaki katalitik etkisine büyük bir kanıt niteliği taşımaktadır (Katsoyiannis ve Zouboulis, 2004). İçme suyu sistemlerinin, bakteriyel oksidasyonla Mn'dan arıtılmasında kullanılan en popüler sistem, sabit yataklı biyofilm sistemdir. Dezenfeksiyonun son aşamasında ortama yerleştirilen ve temelde bakteriyel büyümeyi destekleyen kum, antrasit ve/veya aktif granül karbon (GAC) içeren bir besiyerinden oluşan bu sistem; organik ve inorganik kirletici maddeleri okside eder, oluşan partiküllerle birlikte ortamdan uzaklaştırır (Khedr ve diğ., 2016).

Mn cevherine olan talep; doğal kaynakların azalması, büyüyen endüstriler ve artan çelik üretimi ile doğrudan bağlantılı olarak her geçen gün artış göstermektedir. Mevcut teknolojilerle, düşük dereceli cevherlerden metallerin eldesi yüksek enerji gerektiren maliyetli yöntemleri içermektedir. Ayrıca madeni atıklara sebep olan bu yöntemler ile ağır metaller toprak ve suyu kirleterek büyük çevresel sorunlara yol açmaktadırlar (Liu ve diğ., 2008; Das ve diğ., 2011). Bu nedenle üreticiler daha çevre dostu ve az maliyetli yöntemlerin arayışına girmişlerdir. Son yıllarda değer kazanan; düşük dereceli cevherler, metal ile kirlenmiş toprak veya kullanılmış pillerden metallerin mikroorganizmalar yoluyla geri kazanımı daha etkili, çevre dostu ve ucuz bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Biyomandencilik adı verilen yöntem, metallerin mikrobiyal tekniklerle madenlerde işlenmesi ve çıkarılmasını içermektedir. Günümüzde bakteriler, maden endüstrisi tarafından düşük dereceli cevherlerden Cu, U ve Au'nun çıkarılması için kullanılmaktadır. Mn cevheri için henüz endüstriyel biyomandencilik var olmasa

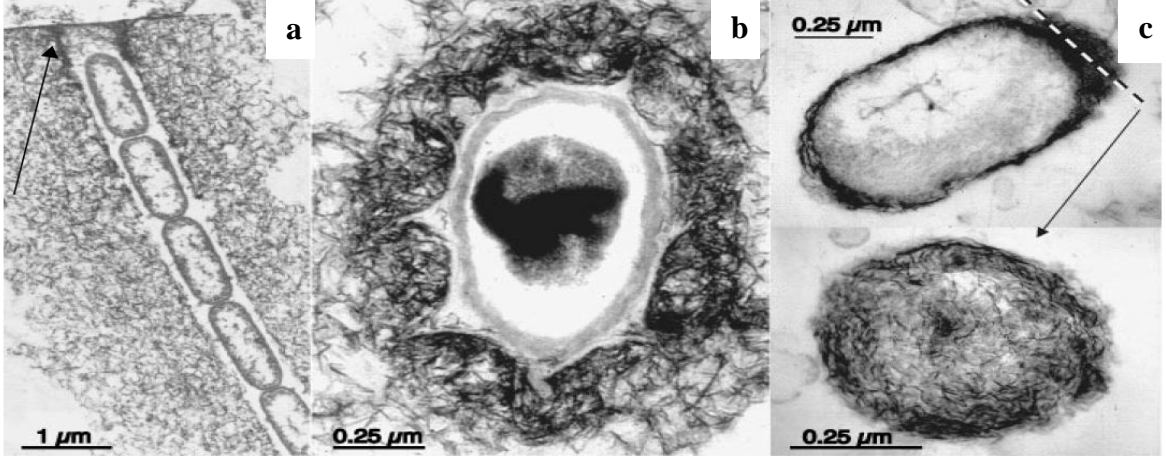
da diğer madenlere benzer süreçlerden yararlanılarak ve MnOB'ler kullanılarak Mn eldesi mümkündür (Das ve diğ., 2011).

2.2.1. Bakterilerin Mangan Oksitleme Mekanizmaları

Mn`ın oksidasyonu çok çeşitli bakteri türleri tarafından katalizlenebilmektedir. Bakterilerin Mn oksitleme sistemleri, bir çok açıdan çeşitlilik gösterdiğinden, sürecin mekanizması ve işlevleri üzerine henüz kesin bir formül ortaya konamamıştır. Temelde bakteri, Mn`ın oksidasyonunu doğrudan ve dolaylı mekanizmalar ile iki şekilde katalizleyebilir. Dolaylı mekanizmada, organizma bulunduğu sulu ortamın pH ve/veya redoks koşullarını değiştirir ya da Mn`ın kimyasal oksidasyonuna sebebiyet veren alkali ve oksitleyici metabolik ürünleri ortama salar (Richardson ve diğ., 1988; Hullo ve diğ., 2001). Doğrudan mekanizmada ise bakteri türüne özgü olarak üretilen makromoleküllerden protein (Ehrlich, 1968; Jung ve Schweisfurth, 1979; Douka, 1980; Ehrlich, 1983; de Vrind ve diğ., 1986; Adams ve Ghiorse, 1987; Boogerd ve de Vrind, 1987; Okazaki ve diğ., 1997; Larsen ve diğ., 1999; Francis ve diğ., 2001) ve polisakkaritler (van Veen ve diğ., 1978; Ghiorse ve Hirsch, 1979; Beveridge, 1989) ile oksidasyonu katalizler (Tebo ve diğ., 2004). Dolaylı mekanizmaya, reaktif oksijen türleri katılmakta iken (Learman ve diğ., 2011; Hansel ve diğ., 2012); enzimatik olarak gerçekleşen doğrudan mekanizma multi-bakır oksidazlar (MCO) ile bağlantılıdır (Bohu ve diğ., 2015). Reaktif oksijen türleri, aerobik metabolizmaların ürettiği H₂O₂, O₂⁻ ve çeşitli radikalleri (OH• gibi) kapsayan yan ürünlerdir. Bakterilerin, enzimatik süperoksit üretimi ile dolaylı olarak Mn`nın oksidasyonuna sebep olabildiği literatürde daha önceden bildirilmiştir (Learman ve diğ., 2011; Bohu ve diğ., 2015). Bakır (Cu) proteinleri, kofaktör olarak bir ya da daha fazla Cu iyonu içerirler ve redoks reaksiyonlarında görev alırlar. MCO`lar Cu proteinlerine dahil olan bir enzim sınıfı olarak, lignin (Larrondo ve diğ., 2003) ve hümik asitler (Morin ve diğ., 2012) dahil çeşitli organik substratları okside edebilirler (Brouwers ve diğ., 2000a). Bunun yanı sıra Mn⁺² den Mn^{+3/+4} e tek elektron transferinde meydana gelen iki aşamalı reaksiyonu da katalizleyebilirler (Dick ve diğ., 2008; Soldatova ve diğ., 2012; Bohu ve diğ., 2015).

Bakterilerin Mn oksitleme mekanizmalarının açıklanmasında üç model organizma kullanılmıştır: Heterotrofik, aerobik β-Proteobakterlerden olan *Pseudomonas putida*`nın MB1 ve GB1 suşları (Caspi, 1996; Brouwers ve diğ., 1998, 1999; Caspi ve diğ., 1998; de Vrind ve diğ., 1998, 2003); heterotrofik, hem Fe hem de Mn`ı oksitleme kapasitesine sahip olan, kılıf oluşturabilen γ- Proteobakterlerden olan *Leptothrix discophora* SS-1 suşu; (Corstjens ve diğ.,

1997; Brouwers ve diğ., 2000); düşük GC (guanin/sitozin) içeren, Gram pozitif, endospor oluşturabilen *Bacillus* sp. SG-1 suşu (van Waasbergen ve diğ., 1993, 1996; Francis ve diğ., 2002; Francis ve Tebo, 2002; Brouwers ve diğ., 2000b). Tüm model organizmalar, Mn^{+2} yi enzimatik olarak, hücrelerini çevreleyen polimerik matriks içinde okside etmektedirler. Oksidasyonun gerçekleştiği yapılar, *Leptothrix discophora* için hücre dışı kılıf; *Bacillus* sp. SG-1 için ekzosporiyum (sporu çevreleyen kılıf) ve *Pseudomonas putida* MB1 ve GB1 için glikokaliksidir (dış membran) (Şekil 2.5) (Tebo ve diğ., 2004). Ancak *Pseudomonas* sp. üzerinde yapılan bazı deneylerin, oksidasyondan sorumlu MCO'larının özel bir salgı yolu ile hücre yüzeyine taşınabildiğini göstermesi bu tür için oksidasyonun yalnızca dış membranda gerçekleştiğine dair bulguları şüpheli hale getirmiştir (de Vrind ve diğ., 2003). Bununla birlikte bir kısım oksidasyon aktivitesinin çözünebilir olduğu, hücre içinde ya da hücre içine açılabilen bazı bölgelerde gerçekleşebildiği rapor edilmiştir (Okazaki ve diğ., 1997). Ayrıca, Mn^{+2} iyonlarını süperoksit radikallerini temizlemek için kullanan ve hücre içi Mn oksidasyonu yapan *Lactobacillus plantarum* türünün varlığı da bilinmektedir (Archibald ve Fridovich, 1981a). Tüm bunlar; Mn oksidasyonunun yalnız hücre dışında değil, hücre içinde de gerçekleşebileceğini göstermekte olup çoklu enzimlerin varlığına ve daha karmaşık oksidasyon mekanizmalarına işaret ederek yeni araştırma alanları yaratmaktadır (Tebo ve diğ., 2005).



Şekil 2.5: Mn'nin bakteriyel oksidasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan üç model bakteri türünün taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile çekilmiş mikrografları; a) Kiel, Almanya yakınlarında bir göletten izole edilmiş *Leptothrix* sp. ve hücreleri çevreleyen hücre dışı kılıf (okla işaretlenmiş olan bölge, kılıfın su-hava ara yüzeyine tutunduğu kısmı işaret etmektedir), b) Denizden izole edilmiş bir *Bacillus* sp. SG-1 sporu ve sporu çevreleyen ekzosporiyum tabakası, c) *Pseudomonas putida* MnB1 ve hücrelerini çevreleyen glikokaliks (dış membran) (Tebo ve diğ., 2004).

Moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak, model organizmalar üzerine yapılan çalışmalar ile Mn^{+2} oksidasyonuna katılan bazı genler açığa çıkarılmıştır (Tablo 2.3). Moleküler çalışmalar neticesinde gelen en önemli bulgulardan biri, farklı bakteriyel suşların benzer Mn oksitleme mekanizmalarına sahip olabileceğinin bir kanıtı olarak, tüm model organizmaların oksitleme mekanizmalarına MCO'ları kodlayan genlerin dahil olmasıdır (Brouwers ve diğ., 2000b). Bu genler; *Leptothrix discophora*, *Pseudomonas putida* GB1 ve *Bacillus* sp. SG-1 için sırasıyla MofA, CumA ve MnxG'dir (Tebo ve diğ., 2005)

Tablo 2.3: Bakteriyel Mn^{+2} oksidasyonuna dahil olan genler (Tebo ve diğ., 2005).

Gen	Bakteri Türü	Referans
<i>ccmE</i>	<i>Pseudomonas putida</i> MB1	(Caspi ve diğ., 1998)
<i>ccmF</i>	<i>Pseudomonas putida</i> MB1 ve GB-1	(Caspi ve diğ., 1998; de Vrind ve diğ., 1998)
<i>ccmA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> MB1	(Caspi ve diğ., 1998)
<i>xcpT</i>	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	(de Vrind ve diğ., 2003)
<i>cumA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	(Brouwers ve diğ., 1999)
<i>mnxA</i>	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	(van Waasbergen ve diğ., 1996)
<i>mnxB</i>	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	(van Waasbergen ve diğ., 1996)
<i>mnxC</i>	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	(van Waasbergen ve diğ., 1996)
<i>mnxD</i>	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	(van Waasbergen ve diğ., 1996)
<i>mnxE</i>	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	(van Waasbergen ve diğ., 1996)
<i>mnxF</i>	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	(van Waasbergen ve diğ., 1996)
<i>mnxG</i>	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	(van Waasbergen ve diğ., 1996)
<i>mofA</i>	<i>Leptothrix discophora</i>	(Corstjens ve de Vrind, 1997)
<i>mofB</i>	<i>Leptothrix discophora</i>	(Brouwers ve diğ., 2000)
<i>mofC</i>	<i>Leptothrix discophora</i>	(Brouwers ve diğ., 2000)

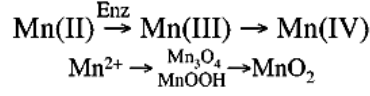
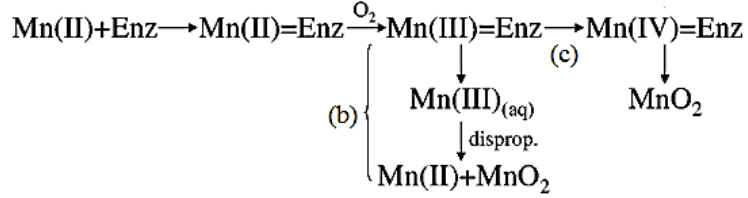
Tablo 2.3 (devam): Bakteriyel Mn(II) oksidasyonuna dahil olan genler (Tebo ve diğ., 2005).

Gen	Bakteri Türü	Referans
<i>sdhABCD</i>	<i>Pseudomonas putida</i> MB1	(Caspi ve diğ., 1998)
<i>aceA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> MB1	(Caspi ve diğ., 1998)
<i>icd</i>	<i>Pseudomonas putida</i> MB1	(Caspi ve diğ., 1998)
<i>trpE</i>	<i>Pseudomonas putida</i> MB1	(Caspi ve diğ., 1998)
<i>xcpA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	(de Vrind ve diğ., 2003)

Mn(II)'nin bakteriyel oksidasyonunun stokiyometrisi, Mn oksidasyonunun kimyasal (abiyotik) reaksiyonunu (Denklem 2.2) takiben yapılan O₂ tüketimi ve H⁺ üretimi ölçümlerine dayanmaktadır (de Vrind ve diğ., 1986; Adams ve Ghiorse, 1988).



Mn⁺²'nin Mn⁺⁴'e olan abiyotik oksidasyonu iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada Mn²⁺'nin katı formları olan Mn⁺³ içeren oksitler (Mn₃O₄ gibi) ya da oksihidroksitler (β -MnOOH gibi) meydana gelir. Ancak oluşan bu asitler, disproporsiyonlaşma ve protonasyon sebebiyle hızlıca Mn⁺⁴ formuna dönüşür. Bu oksidasyonun ikinci aşamasıdır (Murray ve diğ., 1984; Tebo ve diğ., 2004). Bakteriyel oksidasyonda neden Mn⁺²'nin Mn⁺⁴ formuna ancak Mn⁺³'ün oluşumundan sonra dönüşebildiği, oksidasyonda görevli tüm MCO'ların substratlarını tek elektron transferi ile okside etmesi ile açıklanır. Bu hipoteze göre, Mn⁺⁴'ün oluşum reaksiyonu, yalnızca enzim katalizi ile gerçekleşebileceği gibi enzim katalizi ve abiyotik reaksiyonların birleşiminden de meydana gelebilir. Örneğin; enzim katalizli reaksiyonların başlıca ürünlerinden Mn₃O₄ ve β -MnOOH, ilk senaryoya göre disproporsiyonlaşma ve protonasyon reaksiyonları ile abiyotik olarak Mn⁺⁴'e dönüşebilir (Şekil 2.6.a). İkinci senaryoya göre ise iki alternatif mevcuttur. Bunlardan ilki, oldukça kararsız olan Mn⁺³'ün enzimden ayrılarak hızlıca Mn⁺² + MnO₂'ye dönüşmesidir (Şekil 2.6.b). İkinci alternatif ise enzim ya da enzim kompleksinin Mn⁺³'ü Mn⁺⁴'e dönüştürmesidir (Şekil 2.6.c) (Tebo ve diğ., 2004). Günümüzde hala bu hipotezler ihtimal dahilinde olup henüz kesin olarak ispatlanamamıştır.

Birinci Mn(III) → Mn(IV) Dönüşüm Senaryosu (a)İkinci Mn(III) → Mn(IV) Dönüşüm Senaryosu

Şekil 2.6: Bakteriyel Mn^{+2} oksidasyonunda Mn^{+3} 'ün Mn^{+4} 'e dönüşüm senaryoları ve muhtemel dönüşüm yolları (a,b,c) (Tebo ve diğ., 2004).

2.2.2. MnOB'lerin İzolasyonu ve Mangan Oksit Varlığının Tespiti

MnOB'ler polifiletik bir grup olduğundan tür tanımlamasında yalnızca kültürel ya da yalnızca moleküler metodlar yeterli olmamaktadır. Hemen hemen her çevreden izole edilebilen bu bakteri grubu için özel bir izolasyon besiyeri olmamakla birlikte Mn^{+2} oksidasyonu için bilinen evrensel bir moleküler markır da yoktur (Dick ve diğ., 2006; Marcus ve diğ., 2017). Genellikle araştırmacılar, MnOB izolasyonu için örneğin alındığı çevrenin ortam koşullarına (sıcaklık, pH, iyon dengesi vb.) göre besiyerleri yaratırlar veya literatürde var olan besiyerlerini bu koşullara adapte ederler. Tablo 2.4'de oldukça farklı bölgelerden, farklı besiyerleri ile çeşitli cinslerde MnOB'lerin izole edildiği görülmektedir. Kullanılan besiyerlerinin içeriği, MnOB harici bakteri türlerinin de üremeleri için uygun olduğundan, kültürdeki Mn-oksitler ile reaksiyon verebilen kolorimetrik boyalar kullanılarak MnOB'ler diğer türlerden ayrılır. Mn okside ettiği belirlenen türün saf kültürünün alınmasının ardından, bakterinin çeşitli biyokimyasal testlere tabi tutulmasına takiben Bergey's Manual'e (Buchanan ve Gibbons, 1974; Holt, 1989; Holt ve diğ., 1994) göre genel tanımlaması yapılır; ardından 16rRNA gen analizlerini içeren moleküler yöntemler ile tür tanımlaması tamamlanır.

Tablo 2.4: Literatürde yer alan MnOB izolasyon besiyerleri, izole edilen cinsler ve izole edildikleri bölgeler.

Besiyerinin Adı	İzole Edilen Bakteri Cinsleri	İzolasyon Bölgesi	Referans
K Besiyeri	<i>Bacillus</i> sp.	Deniz sedimenti	(Bargar ve diğ., 2005) (Francis ve Tebo, 2002)
K Besiyeri	<i>Bacillus</i> sp. <i>Lysinibacillus</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.	Mangan madeni	(Barboza ve diğ., 2015)
K Besiyeri	<i>Bacillus</i> sp. <i>Brevundimonas</i> sp. <i>Chromobacterium</i> sp. <i>Chryseobacterium</i> sp. <i>Lysinibacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Toprak	(Grandbois ve diğ., 2018)
K Besiyeri + MnCl ₂	<i>Fulvimarina</i> sp.	Hint Denizi hidrotermal havalandırma bacası	(Ren ve diğ., 2014)
K Besiyeri + MnSO ₄ Nutrient Broth + MnSO ₄	<i>Serratia</i> sp.	Atık su	(Queiroz ve diğ., 2018)
K Besiyeri + MnCl ₂ JAC Besiyeri + MnCl ₂	<i>Roseobacter</i> sp. <i>Erythrobacter</i> sp.	Acı gölet suyu	(Estes ve diğ., 2017)
K Besiyeri + Hepes + MnCl ₂ JAC Besiyeri + Hepes + MnCl ₂ LEPT Besiyeri + Hepes + MnCl ₂ M Besiyeri + Hepes + MnCl ₂	<i>Agrobacterium</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Kömür madeni	(Santelli ve diğ., 2010)
LEPT Besiyeri + Hepes + MnCl ₂	<i>Pseudomonas</i> sp.	Kültür koleksiyonu	(Banh ve diğ., 2013)
MPSV Besiyeri	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	Atık su tesisi boru sistemi	(Ashassi-Sorkhabi ve diğ., 2012)

Tablo 2.4 (devam): Literatürde yer alan MnOB izolasyon besiyerleri, izole edilen cinsler ve izole edildikleri bölgeler.

Besiyerinin Adı	İzole Edilen Bakteri Cinsleri	İzolasyon Bölgesi	Referans
MSVP Besiyeri + MnSO ₄ R2A Besiyeri + MnSO ₄	<i>Acinetobacter</i> sp.	Sondaj kuyusu	(Beukes ve Schmidt, 2012)
ASWNA Besiyeri + MnCl ₂	<i>Bacillus</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Leptothrix</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Deniz suyu	(Priya ve diğ., 2017)
ASWNA Besiyeri + Mn(II)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	Deniz suyuyla işlem gören hidroelektrik santral	(Gopal ve diğ., 2008)
Mn Agar Base (Hi-Media)	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Gallionella</i> sp. <i>Legionella</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Ochrobium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Thiobacillus</i> sp. <i>Vibrio</i> sp. <i>Xanthobacter</i> sp.	Petrol boruları	(Rajasekar ve diğ., 2007)
Mn Agar Base (Hi-Media)	<i>Bacillus</i> sp. <i>Lysinibacillus</i> sp. <i>Planococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.	Diş telleri	(Anandkumar ve Maruthamuthu, 2008)
Mn Agar Base (Hi-Media)	<i>Bacillus</i> sp.	Kültür koleksiyonu	(Anandkumar ve diğ., 2011)
PYG Besiyeri* + Hepes + MnCl ₂	<i>Shewanella</i> sp.	Kültür koleksiyonu	(Wright ve diğ., 2016)
PYG Besiyeri (düşük pH)	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Uranyum maden bölgesi	(Bohu ve diğ., 2015)
LBB Besiyeri*	<i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Brevundimonas</i> sp.	İçme suyu sistemi	(Cerrato ve diğ., 2010)
MnOB Besiyeri*	<i>Bacillus</i> sp. <i>Leptothrix</i> sp. <i>Naumaniella</i> sp. <i>Siderocapsa</i> sp.	Göl suyu	(Zakharova ve Prfenova, 2007)

Tablo 2.4 (devam) : Literatürde yer alan MnOB izolasyon besiyerleri, izole edilen cinsler ve izole edildikleri bölgeler.

Besiyerinin Adı	İzole Edilen Bakteri Cinsleri	İzolasyon Bölgesi	Referans
MMA Besiyeri	<i>Pseudomonas</i> sp.	Kültür koleksiyonu	(Wright ve diğ., 2018)
G/M Besiyeri + Mn(II)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Kültür koleksiyonu	(Tran ve diğ., 2018)

*Bu tez çalışmasında MnOB izolasyonu için kullanılan besiyerleri.

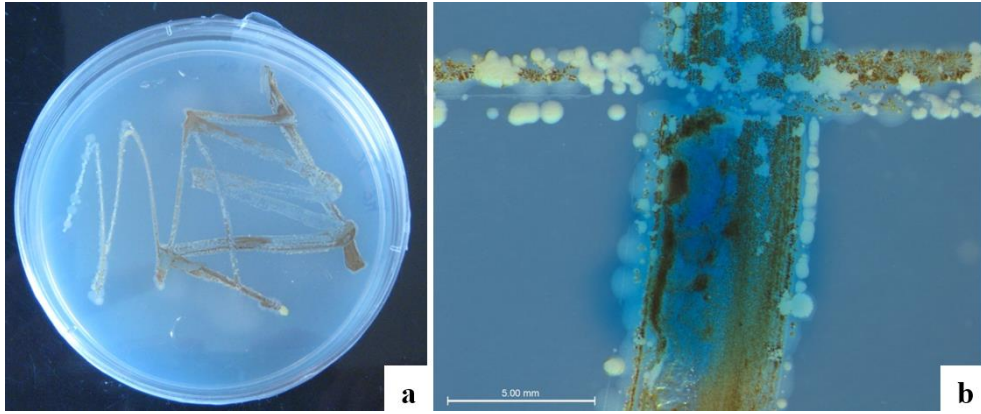
MnOB kültürlerinin en belirgin özelliği, Mn içeren besiyerindeki kolonilerin etrafında gözle görülür kahverengi-siyah renkte Mn-oksit partiküllerinin meydana gelmesidir (Krumbein ve Altmann, 1973). Kolorimetrik boyalar, hem kültürdeki MnOB`lerin tespiti hem de meydana getirdikleri Mn-oksitlerin miktarının spektrometrik yöntemlerle ölçülmesinde kullanılmaktadırlar. Mn`nın oksit formları olan Mn^{+3} ve Mn^{+4} `ün ayrımı kolorimetrik yöntemler ile yapılamadığından bu boyalar yalnızca örnekteki toplam oksitleyici eş değerlerinin ölçülmesi için kullanılmaktadır (Johnson ve Chiswell, 1993). Başka bir tabir ile kültürde ölçümü yapılan, tür ayrımı olmadan MnOB`lerin oluşturduğu toplam Mn-oksit (MnO_x)`tir. MnO_x `lerin varlığının tespiti ve miktarlarının ölçümü için literatürde sıkça kullanılan boyalar Tablo 2.5`de verilmiştir.

Kolorimetrik boyaların, Mn okside eden mikroorganizmalar üzerinde kullanımında boyanan canlının hücresel yapısına en az zararı vererek Mn-oksit varlığını belirlemesi büyük önem taşımaktadır. DPD, leucomalachite green ve *o*-tolidine, su ve toprak örneklerinde okside olmuş Mn`nın tespiti için kullanılan boyalar olmakla birlikte henüz MnOB`ler üzerinde kullanıldıklarına dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. *o*-tolidine, saflaştırılması zor, yavaş işleyen, düşük miktarlardaki Mn`ı tespit etmekte yetersiz olan ve geliştirilmesi gereken bir boya olarak literatürde yer almaktadır (Maly ve Fadrus, 1974; Johnson ve Chiswell, 1993). Oldukça basit çalışma sistemi olan leucomalachite green de küçük miktarlardaki örneklerde, düşük Mn varlığını tespit edememektedir (Yuen, 1958). DPD ise düşük Mn varlığında bile doğru, hassas ve hızlı sonuçlar verdiği için araştırmacılar tarafından önerilmektedir (Johnson ve Chiswell, 1993; Liu ve diğ., 2018a). Diğer kolorimetrik boyalardan olan leucoberbelin blue (LBB), leucocrystal violet (LCV) ve benzidin ise MnOB`lerin ve meydana getirdikleri Mn-oksitlerin tespitinde ise ağırlıklı olarak kullanılan boyalardır.

Tablo 2.5: Literatürde mangan oksit tespiti için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik boyalar.

Kolorimetrik Boya	Referanslar
Benzidin (4,4' - diaminobiphenyl)	(Feigl, 1958; Morgan ve Stumm, 1965; Nealson ve Tebo, 1980; Johnson ve Chiswell, 1993; Linhardt, 2015)
DPD (<i>N,N'</i> - dimethyl-1, 2-phenylenediamine)	(Nakano ve diğ., 1992; Johnson ve Chiswell, 1993; Lee, 2015)
Leucoberbelin Blue (LBB)	(Krumbein ve Altmann, 1973; Nealson ve Tebo, 1980; Rajasekar ve diğ., 2007; Anandkumar ve diğ., 2011; Barboza ve diğ., 2015; Priya ve diğ., 2017; Wright ve diğ., 2018; Grandbois ve diğ., 2018; Tran ve diğ., 2018)
Leucomalachite Green (4,4'- benzyldienebis)	(Yuen, 1958; Morgan ve Stumm, 1965; Nakano ve diğ., 1992; Johnson ve Chiswell, 1993)
Leucocrystal Violet (4,4',4''- methylidynetris)	(Kessick ve diğ., 1972; Spratt ve diğ., 1994; Lutey ve Richardson, 2002; Wright ve diğ., 2016)
<i>o</i> - Tolidine (3,3'- dimethylbenzidine, 4,4'- bianisidine)	(Morgan ve Stumm, 1965; Maly ve Fadrus, 1974; Kessick ve Morgan, 1975; Murray ve diğ., 1984; Johnson ve Chiswell, 1993)

Katı kültürlerde, MnOB`lerin anında tespiti için “spot test” adı verilen yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde leucoberbelin blue (LLB), leucocrystal violet (LCV) ya da benzidin boya solüsyonlarından bir damla alınarak besiyerinde kahverengileşme gösteren MnOB şüpheli koloninin üzerine konur. Eğer renksiz boya solüsyonu, koloni üzerinde renk değişimi gösterir ise bu test sonucunun pozitif olduğunu, besiyerinde Mn-oksit ve dolayısıyla MnOB varlığını gösterir (Linhardt ve Nichtawitz, 2003; Lutey ve Richardson, 2002; Bohu ve diğ., 2016). Ayrıca LBB ve LCV, sıvı MnOB kültürlerinde Mn`nın kantitatif ölçümleri için de kullanılabilir (Spratt ve diğ., 1994; Dickinson ve diğ., 1996; Beukes ve Schmidt, 2012; Tran ve diğ., 2018). Örnek olarak Şekil 2.7`de; kahverengi MnOB kolonilerini içeren bir bakteri kültürü ile bu kültür üzerinde gerçekleştirilen spot test gösterilmiştir.



Şekil 2.7: Spot test öncesi bakteri kültürü (a); LBB ile gerçekleştirilen spot test sonrası MnOB şüpheli kahverengi kolonilerin etrafında mavi renk oluşumu (Emmerich, 2010).

Spot testlerde kullanılan benzidin; Mn-oksitler tarafından oksitlendiğinde anında mavi renk alan, kullanımı oldukça basit, hassas ve etkili bir boyadır. Ancak kanserojen özelliğe olması nedeniyle spot testlerde benzidin yerine daha az toksik ve ekolojik bir boya olan LBB tercih edilmektedir (Krumbein ve Altmann, 1973; Linhardt ve Nichtawitz, 2003). LCV ise Mn-oksitler tarafından okside edildiğinde anında mor renk alan, spot testlerde LBB kadar etkili ve hızlı bir boyadır. Ancak LCV'nin, kültürdeki Mn-oksitlerin kantitatif ölçümünde kullanılmasında gerekli olan standart ve izlenecek yol LBB'ye göre daha zaman alıcıdır (Kessick ve diğ., 1972; Spratt ve diğ., 1994). Araştırmacılar, hem spot testlerde hem de kantitatif ölçümlerde daha çevreci, hızlı ve doğru sonuçlar verdiği için çoğunlukla LBB'yi tercih etmektedirler. Bu tez çalışmasında yapılan tüm spot testler ve kantitatif Mn-oksit ölçümleri de LBB ile gerçekleştirilmiştir.

LBB; yalnızca Mn-oksitler gibi güçlü oksitleyici ajanlar ile reaksiyon veren, redoks potansiyeli yüksek bir boyadır. Mn-oksitler tarafından tek elektron transferiyle okside olan LBB'nin oksitlenmiş haldeyken rengi mavidir. Renklenmenin derecesi, reaksiyon sırasında LBB'ye transfer edilen elektronların sayısının bir fonksiyonudur. Bu nedenle LBB, indirgenen Mn-oksitlerin miktarını kolorimetrik olarak ölçmek için kullanılabilir (Priya ve diğ., 2017).

2.3. BİYOFİLM

Biyofilm, meydana getirdikleri hücre dışı polimerik maddeler (EPS) içinde yaşayan, canlı ya da cansız bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş, organize bir mikroorganizma kümesini ifade etmektedir (Luis ve diğ., 2018).

Mikroorganizmalar gelişim evrelerine göre planktonik ve yerleşik (sesil) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Planktonik hücreler bireysel olarak serbest halde yaşarken, sesil hücreler bir yüzeye tutunarak ve bir araya gelerek topluluk halinde fonksiyonlarını gerçekleştirirler (Donlan ve Costerton, 2002; Gün ve Ekinci, 2009). Su ekosisteminde, bakteriler %99`luk bir oranla planktonik yaşam yerine sesil formda yaşamayı tercih etmektedirler. Bu durumun tutundukları bölgeye su akışı ile besin maddesinin taşınması ve bölgede bol oksijen bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Costerton ve diğ., 1986; Melo ve Bott, 1997).

Çevresel koşullardan, mikroorganizmaların cinslerinden, türlerinden veya alt türlerinden etkilenebilen biyofilmler; oldukça farklı yapıda kimyasal bileşenlere ve üç boyutlu mimarilere sahiptirler. Biyofilmin oluşumu; fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler tarafından yönetilen sıralı, iyi düzenlenmiş ve çok aşamalı bir olgudur. Genetik çalışmalar, aynı mikroorganizma türünün planktonik formda yaşayanlarına kıyasla sesil formda olanlarının biyofilm oluşturabilmek için farklı gen dizilerinin transkripsiyonuna ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, biyofilmin oluşumu, mikroorganizmalar arası Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama) olarak bilinen bir mekanizma ile yakından ilişkilidir. Bu mekanizma ile EPS üretimi için önemli olan bir çok gen ürünü ortama salınır. Ayrıca bakteriler bu mekanizmayı kullanarak ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçer, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissededer ve bu verilerin diğerlerine iletilmesini sağlar. (Donlan, 2002; Federle ve Bassler, 2003; Camara, 2007; Jamal ve diğ., 2018).

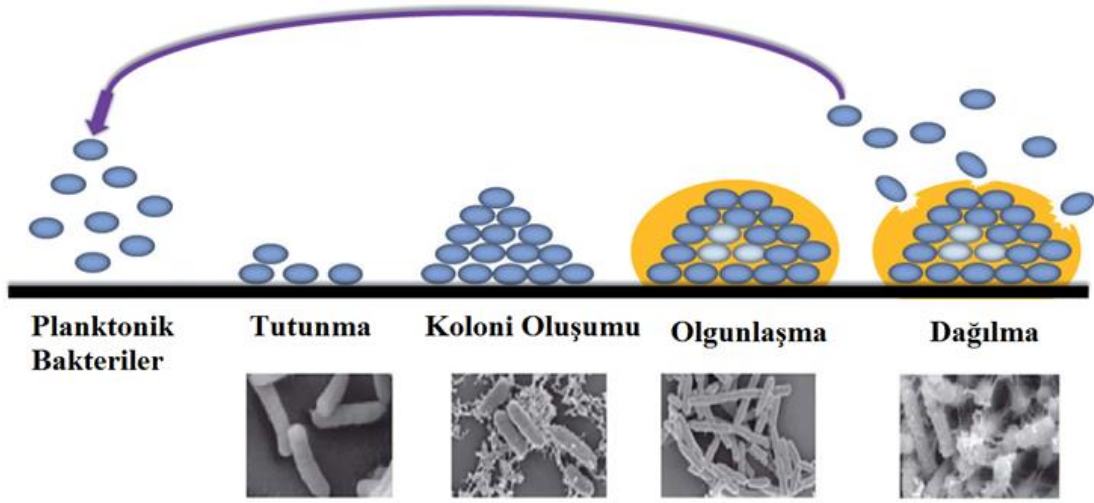
Biyofilmin oluşumu oldukça komplekstir ancak farklı araştırmacılarca açıklanmış bazı genel basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 2.8) (Characklis, 1981);

- 1. Tutunma:** Bu aşamada, çeşitli organik moleküllerin yapışması ile hazır hale gelen yüzeye, mikroorganizmalar fibril, pili, flagella gibi uzantıları kullanarak ya da bazı fiziksel kuvvetler (Van der Waals kuvveti, elektrostatik etkileşimler vb.) aracılığı ile tutunurlar. Bu tutunma biçimi, yüzeye yeni yaklaşan planktonik mikroorganizmaların

daha önce yüzeye tutunmuş mikroorganizmalar ile geçici ilişkiler kurmasından dolayı “geri dönüşümlü tutunma” olarak tanımlanır.

2. **Koloni oluşumu:** Bu basamakta biyotik ya da abiyotik yüzeye tutunan mikroorganizmaların tutunması kalıcı hale gelir. Bu nedenle tutunma artık “geri dönüşümsüz” olarak tanımlanır. Mikroorganizmalar, sudaki ve yüzeydeki besinleri kullanarak çoğalmaya başlar, EPS üretir ve böylece biyofilmin yapısını güçlendirirler.
3. **Olgunlaşma:** EPS`ye yapışan her yeni planktonik mikroorganizma hücresi yüzeyde koloni oluşturur. Ardından, aynı yüzeye başka mikroorganizma hücreleri de gelerek yeni koloniler meydana getirirler. Daha sonra, oluşan bu mikrokoloniler büyüyerek mantar ya da kule şeklindeki kompleks yapılara dönüşür. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları meydana gelmektedir. Ayrıca kuleler arasında meydana gelen mikro-ortamlar, kimyasal ve elektrokimyasal iletişim ile yatay gen aktarımını da kapsayan birçok mikrobiyal etkileşime olanak sağlar.
4. **Dağılma:** Bu aşamada, mikrobiyal hücreler sessiz formdan hareketli hale geçmek için hızlıca çoğalarak ortama dağılma eğilimine girerler. Yeni bir bölgede kolonileşmenin gerçekleşebilmesi için sakkarolitik enzimler ile EPS matriksini parçalayarak hücrelerin topluluktan ayrılmasını sağlarlar. Ayrıca bu aşamada, flagella gibi uzantıların meydana gelebilmesi için gerekli olan proteinlerin salınımı da artmaktadır. Biyofilmden ayrılma işlemi, dış kuvvetlerin etkisi ile de gerçekleşebilmektedir.

Biyofilm, bakterilere bir çok yarar sağlamaktadır. Bakterileri sararak nem, ısı ve pH gibi çevresel koşullardaki değişimlere, ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlara, biyolojik ve kimyasal antibakteriyel ajanlara karşı korur. Ayrıca, besinlerin depolanmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırır (Gün ve Ekinci, 2009). EPS`nin negatif yüklü olması nedeniyle büyük miktarlarda besin molekülünü kendine bağlayabildiği de bilinmektedir (Anwar ve diğ., 1992). Besinsizlik durumunda, bakterilerin EPS tabakasını beslenme amacıyla tüketebildikleri belirtilmiştir (Zhang ve Bishop, 2003). Bunun yanı sıra, bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşması engellenir (Gün ve Ekinci, 2009).



Şekil 2.8: Elektronik mikroskopu görüntüleri ile birlikte biyofilmin oluşum aşamaları (Luis ve diğ., 2018; Hadla ve Halabi, 2018).

Bazı bakteriler biyofilm oluşturmak için yüksek eğilime sahiptir. Bunlardan en yaygın olanları *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* cinsleridir (Gün ve Ekinci, 2009). Bir çok ortamda, karışık türlerden oluşan biyofilmlerin baskın olarak görülmesine rağmen, çeşitli medikal implantların yüzeyinde oluşan biyofilmlerin tek türden oluşması, tek tür biyofilmlerin güncel araştırmaların odak noktası olmasına neden olduğu belirtilmektedir (O'Toole ve diğ., 2000).

Biyofilmin kalınlığı genellikle 10-30 μm arasındadır. Çok büyük bir çoğunluğu sudan oluşan biyofilmin %5-35'i mikroorganizmalardan, geri kalanı ise EPS'den meydana gelmektedir (Sleytr, 1997). EPS, yapısındaki hidrojen bağları nedeni ile büyük miktarda su barındırabilir. İyi bir çözücü olan su, biyofilimde meydana gelen difüzyon süreçleri için gereklidir. Ayrıca biyofilm tabakasına jelatinimsi ve kaygan bir yapı kazandırır (Sutherland, 2001; Allison, 2003).

Mikroorganizmanın yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunması için gerekli olan EPS'nin kalınlığı genellikle 0.2-10 nm arasındadır (Sleytr, 1997). EPS, temelde polisakaritler olmak üzere; lipitler, üronik asitler, nükleik asitler ve proteinlerden oluşur. Biyofilmin yapısındaki bu makromoleküllerin oranları mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine ve fiziksel koşullara göre değişiklik gösterebilmektedir (Allison, 2003).

Patojen veya bozulma etmeni birçok mikroorganizmanın paslanmaz çelik, alüminyum, cam, ahşap, teflon ve plastik materyaller üzerinde biyofilm oluşturdıkları belirlenmiştir (Barnes, 1999; Tracho, 2003; Lindsay ve Von Holy, 2006; Planchon, 2006). Biyofilm oluşumu; su soğutma sistemleri (Choudhary, 1998; Rao, 2000), ilaç (Costerton, 1981a; Costerton, 1981b), besin (Zottola, 1991; Pontefract, 1991), petrol (Neria- González ve diğ., 2006; Rajasekar ve Anandkumar, 2010) ve elektrik (Licina ve Cubicciotti, 1989; Linhardt ve Nichtawitz, 2003) gibi birçok endüstriyel sektörde, sağlık ve güvenlik riskine ek olarak büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. EPS'nin metalik iyonları bağlayabilen karboksilik ve aminoasit gruplara sahip proteinleri içermesi, metal yüzeylerin elektrokimyasal yapısını değiştirerek korozyon sürecini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Lin & Ballim 2012). Ancak bu özellik, atık arıtımında toksik metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilirdiğinden bir açıdan yararlı sayılabilir (Hsieh ve diğ., 1985; Macaskie ve diğ., 1987; Beech ve Gaylarde, 1991).

2.4. METALLERİN KOROZYONU

Bütün metaller, tabiatta buldukları mineral haline dönüşme eğilimindedir. Bu mineral, söz konusu metalin en düşük enerji taşıyan bileşiği, yani en kararlı halidir ve özel metalurjik metotlarla, enerji harcanarak metal haline getirilir. Ancak çoğu metal, element halinde kararlı değildir. Uygun bir ortam bulması halinde üzerinde taşıdığı enerjiyi geri vererek kendiliğinden doğada bulunduğu eski bileşik haline dönmeye çalışır. Örneğin, demirin (Fe) tabiatta en çok rastlanan minerali, hematit (Fe_2O_3)'tir. Hematit, yüksek fırında kok kömürü ile indirgenerek metalik demire dönüştürülür. Elde edilen demir, sulu çözeltiler içinde veya rutubetli atmosferde kolaylıkla korozyona uğrayarak “pas” denilen korozyon ürünlerini oluşturur. Böylece metal almış olduğu enerjiyi geri vererek doğadaki hâline döner (Onat, 2015).

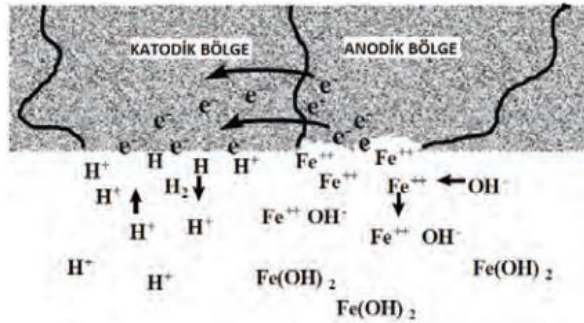
Korozyon, abiyotik ve biyotik koşullar altında, kimyasal ve elektrokimyasal olarak oluşabilmektedir (Hamilton, 1985; Revie ve Uhlig, 2008).

Abiyotik (elektrokimyasal) korozyon, metallerin elektrolite maruz kalması ve korozyon reaksiyonunun başlaması ile gerçekleşmektedir. Korozyon, 5 kısımdan oluşan bir korozyon hücresinde meydana gelir. Bunlar anot, katot, ara yüzey, elektrolit ve metalik bağdır. Elektrokimyasal korozyon, metal/elektrolit ara yüzeyindeki elektron transferlerini içeren

anodik (elektron veren-yükseltgenme) ve katodik (elektron alan-indirgenme) reaksiyonları gerektirir (İşdaş, 2010; Onat, 2015).

Elektrokimyasal korozyon süreci, su ortamında bulunan Fe içerikli bir metal üzerinden açıklanabilir. Şekil 2.9'da görülebileceği gibi üzerinde aynı anda hem anot, hem katot ve hem de metalik bağ (elektriksel yol) bulunduran bir metal, az miktarlarda hidrojen (H^+) ve hidroksil (OH^-) iyonları bulunduracak şekilde iyonize olmuş ve elektrolit görevi gören su içerisinde bulunmaktadır. Böyle bir sistemde, farklı yapı ve bileşimli bölgeler arasında, öncelikle metal iyonları, elektrolite girmek üzere anodik yüzeyden ayrılırlar. Bu sırada geride, elektriksel yol üzerinden katodik yüzeye akacak elektronları bırakırlar (anodik reaksiyon). Anottan gelen bu elektronlar, katodik yüzeye ulaştıklarında elektrolitteki hidrojen iyonları ile karşılaşılırlar. Bir hidrojen iyonunun bir elektron kabul etmesi ile iyon, hidrojen atomuna dönüşür. Oluşan hidrojen atomu, diğer bir hidrojen atomu ile birleşerek ya katodik yüzeye yapışır ya da daha sonra baloncuk olarak salınacak hidrojen gazı molekülüne dönüşür. Bunun yanı sıra bu elektronlar, ortamdaki çözülmüş oksijen ile de hidroksil iyonlarına indirgenirler (katodik reaksiyon). Elektrolitte hidroksil iyonlarıyla birleşen metal iyonları ise metal hidroksit (pas) oluşturarak metal yüzeyine çökelirler (Hamilton, 1986; İşdaş, 2010).

Biyotik koşullar altında gerçekleşen metal korozyonunda ise mikroorganizmalar metal ile elektrolit ara yüzündeki ortamı değiştirerek korozyonu başlatmakta veya var olan korozyonun şiddetini arttırmaktadır (Kip ve A van Veen, 2015). Bu korozyon tipi “Mikrobiyolojik Olarak Desteklenen Korozyon (Microbially Induced Corrosion – MIC)” olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 2.9: Mikroskobik korozyon hücresi (İşbaşı, 2010).

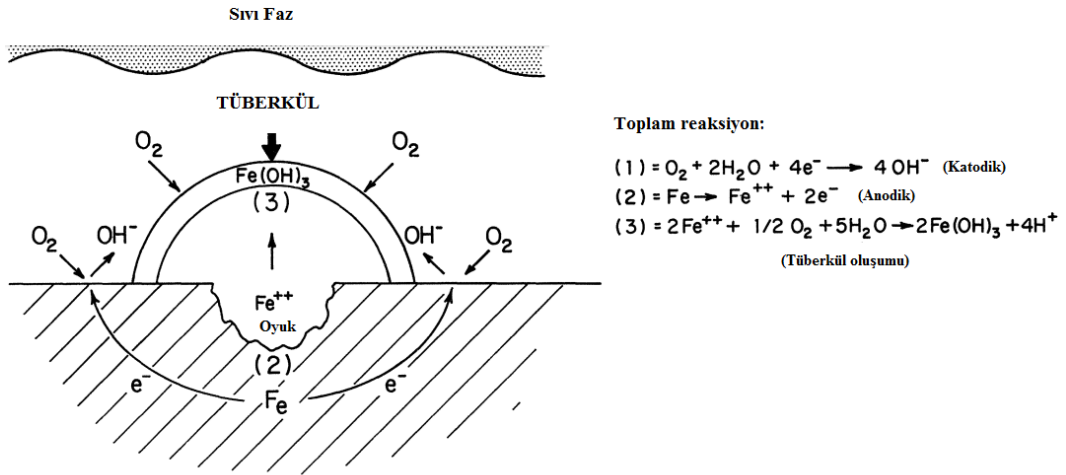
2.4.1. Mikrobiyolojik Olarak Desteklenen Korozyon (MIC)

Biyotik koşullarda gerçekleşen korozyon, abiyotik koşullarda meydana gelen korozyona benzer şekilde gerçekleşmekle birlikte mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen bir takım biyokimyasal tepkimeler ile metalden elektron ve iyonların ayrılması ile oluşur. Mikroorganizmalar, hidrojeni tüketerek katodik reaksiyonları; çeşitli enzimler ve asidik metabolitlerin salınımı ile anodik reaksiyonları tetikleyebilirler (Videla ve Herrera, 2005; Kip ve A van Veen, 2015).

En şiddetli mikrobiyolojik korozyon, farklı bakteri türlerinin bir arada bulunduğu biyofilmin varlığında gerçekleşir. Bu tür biyofilmlerde farklı türler arasındaki etkileşimler, biyofilmin oksik ve anoksik bölgelerindeki biyokimyasal tepkimeleri arttırarak korozyonu şiddetlendirir (Zuo, 2007; Videla ve Herrera, 2009). Biyofilm içinde, sinerjistik olarak hareket eden bakteri türleri, tek bir türün yaratabileceği korozyondan çok daha büyüğünü meydana getirebilmektedirler (Zuo, 2007; Lee ve diğ., 2013). Biyofilmler; metal ile çözelti arasında iyon ve oksijen konsantrasyonunu, iyon çeşidini ve pH değerlerini değiştirerek, indirgenme ve yükseltgenme potansiyeline yaptıkları etkiler ile metalin elektrokimyasal davranışını farklılaştırıp korozyona sebep olabilirler (Videla ve Herrera, 2005).

Korozyona etki eden mikrobiyal faktörler birkaç maddede özetlenebilir (Hadley, 1948; Videla, 1996) :

1. Asidik ya da inorganik filmin koruyucu özelliğini azaltan veya etkisiz hale getiren metabolitlerin üretimi.
2. Depolarizasyon etkisi ile anodik veya katodik korozyon reaksiyonlarından birinin hızlanması.
3. Mikroorganizmaların aktif çoğalmaları esnasında, koloninin altındaki oksijen konsantrasyonunu düşürmeleri ve etraflarındaki alanda konsantrasyonun değişmeden kalması sonucu farklı havalandırma hücresi oluşur (Şekil 2.10). Oluşan bu elektrokimyasal hücrede; koloninin altındaki anaerobik bölge anod gibi davranırken daha yüksek oksijen konsantrasyonuna sahip bölge ise katod alanı gibi davranmaktadır. Bu hücre, önemli bir mikrobiyal yapılaşma olsa da tam olarak bir biyokorozyon özelliği taşımamakta, daha çok bölgesel korozyon olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 2.10: Mikrobiyal yüzey filmi altında farklı havalandırma hücrelerinin oluşumu (Ford ve Mitchell, 1990).

4. Metal yüzeyindeki pasif veya korozyon ürünlerinden oluşan filmin mikroorganizmalar tarafından bozulması.
5. Korozyon inhibitörlerinin metabolik tüketimi.

Korozyonu etkilediği bilinen mikroorganizmalar, fizyolojik olarak birbirinden farklıdır ve genellikle elektron alıcısı veya enerji kaynağına göre gruplandırılarak korozyonla ilişkilendirilirler. Tablo 2.6'da korozyona sebep olan bazı bakteri türleri, oksijene olan toleransları ve korozyonu teşvik eden metabolik etkileri verilmiştir (Kip ve A van Veen, 2015).

Demir ve çelik içeren yapıların korozyonu ile ilişkili başlıca bakteri türleri; sülfat indirgeyen bakteriler (SRB), kükürt oksitleyen bakteriler (SOB), demir oksitleyen bakteriler (IRB), demir indirgeyen bakteriler (IOB), mangan okside eden bakteriler (MnOB) ile organik asit salgılayan (ABP) bakterilerdir. Bakterilerin yanı sıra, organik asitler üreterek ortamın pH değerini düşüren bazı fungus türlerinin (*Cladosporium resinae*, *Paecilomyces variot*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. vb.) ve fotosentez ile oksijen üreterek metal yüzeyindeki biyofilmin farklı bölgelerinde farklı oksijen konsantrasyonlarına neden olan alglerin de korozyona sebep olabildiği bilinmektedir (Lin ve Ballim, 2012; Natarajan, 2013; Kip ve A van Veen, 2015).

Tablo 2.6: MIC ile bağlantılı olduğu bulunan bazı mikroorganizmalar (Kip ve A vaan Veen, 2015).

Bakteri Grubu/Oksijene Tolerans	Mikroorganizma	Metabolik Süreç
SRB /Anaerop	<i>Desulfovibrio</i> sp. <i>Desulfomonas</i> sp.	SO ₄ ⁻² 'yi, S ⁻² 'ye indirgemek için hidrojeni kullanır. H ₂ S ve FeS çökeltisi oluşur.
IOB-MnOB /Aerop	<i>Gallionella</i> sp. <i>Leptothrix</i> sp. <i>Mariprofundus</i> sp.	Fe ⁺² , Fe ⁺³ ; Mn ⁺² , Mn ⁺⁴ e okside edilir. Fe ₂ O ₃ ve MnO ₂ çökeltileri oluşur.
IRB /Aerop	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Shewanella</i> sp. <i>Geothermobacter</i> sp.	Fe ⁺³ , Fe ⁺² e indirgenir.
SOB /Aerop	<i>Thiobacillus</i> sp.	S ⁻² , SO ₃ ⁻² ve H ₂ SO ₄ e okside edilir.
ABP /Anerop	<i>Clostridium</i> sp.	Nitrik, sülfürik, organik gibi asitler üretilir.

SRB`ler, *Desulfovibrio* ve *Desulfomaculum* gibi türlerin dahil olduğu Deltaproteobacteria grubunda bulunan; organik maddeleri okside eden ve son elektron alıcısı olarak sülfid, laktat veya tetratiyonatı kullanan bakterilerdir (Bermont-Bouis ve diğ., 2007; Kan ve diğ., 2011). Metabolizmalarına bağlı olarak meydana getirdikleri son ana ürün olan H₂S, metal yüzeyinde birikerek ve ortamı asitleştirerek korozyonu katalize eder (Lin ve Ballim, 2012). SOB`lar ise elementel S, H₂S, N₂S₂O₃, metal sülfidler ve tetratiyonatları okside ederek sülfürik asit oluşturan kemolitotrofik mikroorganizmalardır. *Thiobacillus*, *Beggiatoa* ve *Sulfolobus* en iyi bilinen aerobik kükürt okside eden bakteri cinsleridir (Little ve diğ., 1992). IRB`ler; çözünmez formdaki Fe⁺³'ü, çözülebilir haldeki Fe⁺²'ye indirgeyerek, metal yüzey üzerindeki koruyucu Fe₂O₃ filminin ortadan kalkmasına ve böylece korozyona sebep olurlar. Bu bakteriler arasında *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Enterobacter* sp. ve *Klebsiella* sp. türleri sayılabilir (Emde ve diğ., 1992). IOB`ler, çözülebilir haldeki Fe⁺²'yi çözünmez formdaki Fe⁺³'e çevirerek yüzeyde birikmeye sebep olarak metal korozyonuna etki ederler (Ghiorse, 1984). Biyokorozyon üzerine en çok çalışma yapılan IOB cinsleri *Gallionella*, *Leptothrix* ve *Siderocapsa* dır (Rajasekar ve diğ., 2007). Bu bakteriler mikro-aerofilik olduklarından, düşük

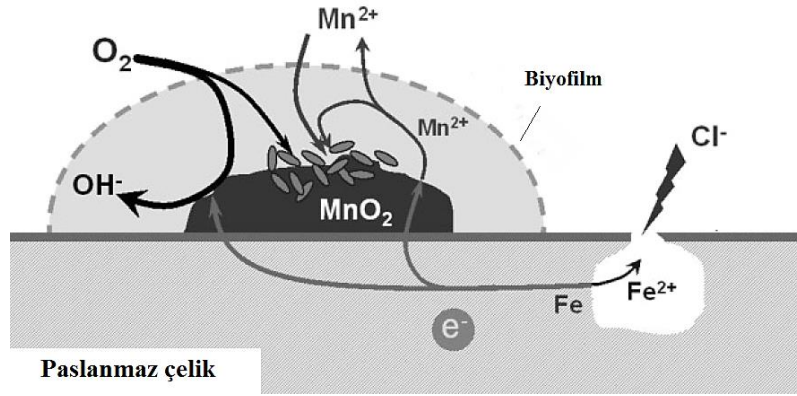
demir varlığında ve aerobik ortamlarda diğer mikroorganizmalarla yaygın olarak ilişkide bulunabilirler (Coetser ve Cloete, 2005). MnOB`ler, IOB`lere benzer olarak Mn iyonlarını oksitleyerek Mn-oksitlerin yüzeyde birikimine neden olmaktadır. Filogenetik olarak yaygınlık gösteren bu bakterilerin temsilcileri Firmicutes, Aktinobakterler, Alfa-/Beta-/Gama-Proteobakterlerdir (Tebo ve diğ., 2005). ABP`ler indirgeyici ortam koşullarında çoğaldıklarında organik asit ve metabolik ürünler üreten hetotrofik bir bakteri grubudur (Wilkie, 2005). Organik maddelerin fermantasyonu sırasında üretilen asitler, ortam pH`ının nötral seviyelerden 3.5`e kadar düşmesine neden olarak metalin yapısını değiştirir ve korozyona sebep olurlar. ABP`lerin, katodun hızlı depolarizasyonu nedeniyle biyolojik korozyona önemli katkılar sağladığı yaygın olarak bilinmektedir (Thomas, 2002).

MnOB`lerin biyojeolojik döngüdeki öneminin fark edilmesi ile paralel olarak, ürettikleri Mn-oksitler sebebiyle metallerde yarattıkları mikrobiyolojik korozyon riskinin büyüklüğü 90`lı yıllardan itibaren dikkate alınmaya başlanmıştır (Linhardt, 1994). Günümüzde, MnOB kaynaklı olarak rapor edilen korozyon vakalarına ek olarak, MnOB`ler ile sürdürülen mikrobiyolojik korozyon çalışmaları hızla devam etmektedir (Lutey ve Richardson, 2002; Linhardt, 2003; Anandkumar ve diğ., 2011; Thyssen ve diğ., 2015).

2.4.1.1. MnOB`lerin Meydana Getirdiği MIC`in Mekanizması ve Tanısı

MnOB`lerin metal yüzeylerde meydana getirdikleri korozyonun mekanizmasına yönelik, günümüze kadar tek bir yaklaşımda bulunulmuştur. 1994`de yılında Linhardt tarafından ortaya atılan bu mekanizma, MnOB`lerin paslanmaz çelikte yarattıkları MIC`e açıklık getirmektedir (Linhardt, 1994).

MnOB`lerin paslanmaz çelikte neden olduğu korozyonun mekanizması, biyotik ve abiyotik olmak üzere iki aşama ile karakterize edilmektedir. Biyotik aşamada; biyofilm içindeki Mn oksitleme yeteneğine sahip bakteriler, oksijenin yardımı ile suda serbest halde bulunan Mn^{+2} nin MnO_2 ve ilgili bileşiklere biyomineralizasyonunu sağlarlar. Meydana gelen bu yüksek oksitleyici bileşikler, doğrudan paslanmaz çeliğin yüzeyinde birikerek metalin elektrokimyasal özelliklerini değiştirirler. Abiyotik aşamada ise metal yüzeyinde biriken katı Mn-oksitlerin Mn^{+2} ye geri indirgenmesi ile metaldeki katodik reaksiyonlar artar ve çelikte korozyon meydana gelir (Şekil 2.11). Mn-oksitler pasif paslanmaz çeliğin anodik potansiyelinin de değişmesine neden olarak, klor kaynaklı oyuklanma ve aralık korozyonuna karşı duyarlılığın artmasına sebep olabilirler (Hakkarainen 2003; Linhardt 2004).



Şekil 2.11: MnOB'ler tarafından paslanmaz çelikte meydana getirilen MIC'in şeması.

Mn-oksitler, çelik ve diğer metallerin açık devre potansiyelini (ADP) pozitif yönde değiştirerek metal üzerinde oyukların oluşumuna ortam hazırlar. Artan potansiyel ve sahip oldukları yüksek katodik etki nedeni ile meydana gelen oyukların pasifleşmesi engellenerek aktif olarak kalmaları sağlanır. Oyukların oluşumu ile metal iyonlarının hidrolizi, ortamda asidik koşullar yaratır. Oluşan bu ortam koşulları, koruyucu oksit tabakanın daha da bozulmasına sebep olarak klor ve sülfat gibi yük nötrleştirici karşı iyonların ortama çekilmesine neden olur. Müdahale edilmediğinde, tüm bu işlemler hızlı bir şekilde sabitleşmiş ve kendi kendine yetebilen bir oyuklanma alanına dönüşür (Dickinson ve Wiatr, 2013).

Araştırmacılar; MnOB'lerin yarattığı korozif etkilerin yalnızca metaldeki değişimlerle sınırlı olmadığını, Mn-oksit birikintilerinin diferansiyel havalandırma hücrelerinin oluşumunu ve bu sayede MIC'e neden olan SRB ve diğer anaerobların büyümesini teşvik edebileceğini belirtmektedirler (Dickinson ve Lewandowski, 1996; Wiatr, 2008; Dickinson ve Wiatr, 2013). Paslanmaz çelik üzerinden oluşturulan bu teorik mekanizma, sırasıyla aşağıda açıklandığı gibidir (Dickinson ve Lewandowski, 1996):

1. Çelik üzerinde kolonize olan MnOB'ler, oksijeni tüketerek zengin Mn-oksit birikintileri oluştururlar.
2. Mn-oksit birikintileri metal potansiyelini artırır, oksijenin taşınmasını engeller ve metal üzerinde oksijensiz alanların oluşumuna sebep olur. Bu esnada EPS içinde, SRB'lerin büyümesini teşvik edecek çeşitli organik maddeler sentezlenir.

3. Uygun koşulların yaratılması sonucu, SRB kolonizasyonu gerçekleşir. SRB aktivitesi ile sülfür üretimi gerçekleşir ve redoks potansiyeli düşer.
4. Sülfürün toksisitesi, Mn-oksit birikintilerinde meydana gelen ve SRB`lerin büyümesini destekleyen oksidasyon tepkimeleri ile kontrol edilir.
5. Yükselen metal potansiyelinin yarattığı elektrokimyasal etkiler ve azalan redoks potansiyeli, metalde oyukların oluşumuna neden olur.
6. Mn-oksitlerin yüksek katodik etkisi, oyukların pasifleşmesini önler.
7. Mn-oksitler, difüzyon bariyeri olarak işlev gören çözünmez ferrik korozyon ürünleri yaratarak oluşan çukurların büyümesi için gerekli olan katyonların ortama çekilmesini sağlayarak korozyona sebep olur.

MnOB`ler tarafından meydana getirilen Mn-oksitlerin ve MIC`in tanısı için günümüzde bir çok yöntem uygulanmaktadır. Ancak, Mn-oksitlerin metal üzerindeki varlığına dair ilk tanı gözlem yapılarak konabilmektedir. Metal üzerinde bulunan Mn-oksitler tipik olarak kendilerini kahverengi-siyah bir tabaka halinde ya da küçük siyah noktalar şeklinde gösterirler. Paslanmaz çelikte Mn-oksitlerin varlığı aranırken, pasif yüzeyler, korozyonun meydana geldiği yüzeylerden daha büyük önem arz eder (Linhardt 2010).

MnOB`lerin aktivasyonu sonucu oluşan Mn-oksitlerin yapısal analizi ve oksidasyon halinin tanımlanmasında en sık kullanılan yöntem XRD (X-Ray Diffraction) analizidir (Kielemoes ve diğ., 2002; Ashassi-Sorkhabi ve diğ., 2012; Yang ve diğ., 2013; Sujith ve diğ., 2014; Tran ve diğ., 2018). Ancak; Mn-hidroksioksitlerin amorf yapıda olması, methodun yalnızca iyi şekilde kristalleşmiş ve monofazik örnekler haricinde çoğu Mn-oksit kristali için benzer sonucu vermesi nedeni ile bazı araştırmacılar tarafından kullanışlı bulunmamış ya da başka methodlarla desteklenmesi tavsiye edilmiştir (Post, 1999; Linhardt, 2010). Bu tez çalışmasında XRD analizi yer almaktadır.

Mn-oksitlerin oksidasyon hallerinin en iyi tespit edilebildiği yöntem XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) analizidir (Bargar ve diğ., 2005; Miyata ve diğ., 2007; Droz ve diğ., 2015). Bu yöntem ile model Mn(II), Mn(III) ve Mn(IV) spektrumlarının doğrusal

kombinasyonları kullanılarak eldeki Mn-oksit verisi ile denkleştirilerek sonuca ulaşılır (Tebo ve diğ., 2005).

SEM (Scanning Electron Microscopy - Taramalı Elektron Mikroskobu) ve EDS (Energy Dispersive Spectroscopy - Enerji Dağılım Spektroskopisi) analizleri, metal yüzeyindeki morfolojik değişimlerin ve korozyon ürünlerinin tespit edilebildiği, araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen standart bir yöntemdir (Dickinson ve diğ., 1996; Ginige ve diğ., 2011; Bohu ve diğ., 2015; Liu ve diğ., 2018b). Bu tez çalışmasında SEM analizi yer almaktadır.

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), metal yüzeyinde meydana gelen biyofilmin gelişimi ve yüzey değişimlerini görüntüleme için kullanılan önemli bir araçtır (Rajasekar ve diğ., 2007; Droz ve diğ., 2015). Bu yöntem ile biyofilmde bulunan EPS, kızılötesi spektrumuyla tanımlanır ve özel bir parmak izi yöntemi ile yorumlanır (Schmitt ve Flemming, 1996; Linhardt, 2010).

2.5. HİDROELEKTRİK SANTRAL (HES)

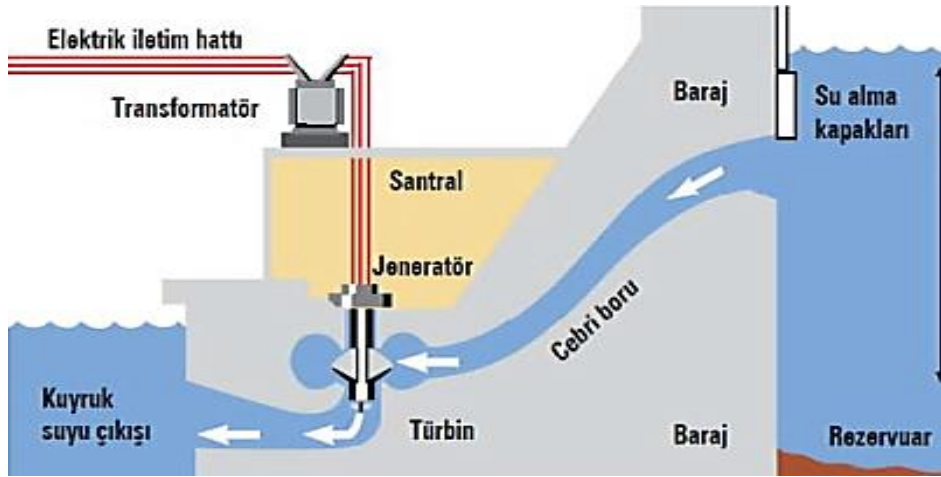
Hidroelektrik santraller (HES), suyun potansiyel ve kinetik enerjisinden faydalanarak elektrik enerjisi elde edilen tesislerdir. Diğer üretim tipleri ile mukayese edildiğinde en düşük işletme maliyetine, en uzun işletme ömrüne ve en yüksek verime sahiptirler. Hidroelektrik enerji, diğer yenilenebilir temiz enerji kaynaklarına göre daha kolay depolanabilip kullanılabilen, çevre dostu ve güvenli bir enerji kaynağıdır (Bozkurt ve Tür, 2015; Oral ve diğ., 2017). Dünya genelinde ciddi ölçüde hidroelektrik potansiyel olmasına karşın günümüzde yalnızca bu enerjinin %35'i kullanılmaktadır. DEK-TMK'nın 2007 yılı raporuna göre; dünya geneli brüt teorik hidroelektrik potansiyeli yaklaşık 40150 TWh/yıl iken teknik olarak uygulanabilir potansiyeli 14060 TWh/yıl; günümüzde ekonomik olarak uygulanabilir hidroelektrik enerji potansiyeli ise 8905 TWh/yıl'dır (DEKTMK, 2007; Gökdemir ve diğ., 2012; Koç ve Şenel, 2013; Bozkurt ve Tür, 2015). 2013 yılı itibarıyla Türkiye'de hidroelektrik enerji potansiyeli %74'e ulaşmış olup (DSİ, 2015; Bozkurt ve Tür, 2015), ülkemizdeki elektrik üretiminin %24.6'sı hidroelektrik enerjiden sağlanmaktadır (TÜİK, 2016).

Suyun potansiyel enerjisinden elde edilen kinetik enerjiye hidrolik enerji adı verilir. Suyun yüksek seviyeden düşük seviyeye inmesiyle meydana gelen enerji, hidrolik türbinler

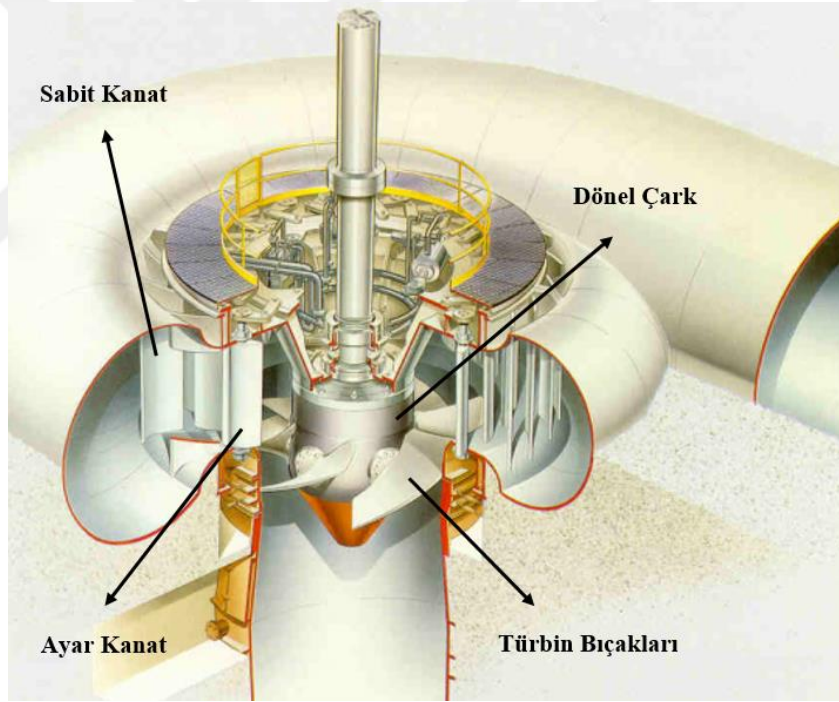
kullanılarak mekanik enerjiye; jeneratör yardımıyla ise elektrik enerjisine dönüştürülür. Ardından, elektrik enerjisi, elektrik iletim hatları kullanılarak son kullanıcıya nakledilir. Hidrolik potansiyel, yağış rejimine bağlıdır. Bir bölgenin su potansiyeli, yağın yağış miktarı ile belirlenir (Oral ve diğ., 2017). Ülkemizin ortalama yükseltisi 1131 metre olup, 1000 m`den yüksek alanlar toplam yüzeyin %55.5`ini kaplamaktadır. Ülkemiz arazisinin %64`ünün eğimi %12`nin üzerindedir. Ortalama yüksekliği bir kilometrenin üstünde olan ülkemizde akarsu eğimleri de fazladır. Bu topoğrafik yapı ve hidrolojik koşullar, Türkiye`yi hidroelektrik enerji üretimi açısından avantajlı kılmaktadır (Yıldız, 2016). DSİ`nin 2016 verilerine göre ülkemizde kurulu olan toplam hidroelektrik santral sayısı 612`dir (DSİ, 2016).

HES`ler kaynak tipine, üretim kapasitelerine, düşüye, santral binasının konumuna ve ulusal elektrik sisteminin yükünü karşılama durumlarına göre sınıflandırılırlar (Tutaşı, 2018). HES`lerin ana bölümleri; baraj seti arkasındaki rezervuar suyu, su giriş kapakları, tüneller, cebri borular, hidrolik türbinler, jeneratörler ve transformatörlerdir. Cebri borular, suyu türbinlere ileten büyük borular ya da tünellerdir. Türbinler, akan suyun hidrolik enerjisini mekanik enerjiye dönüştürürler. Transformatörler, jeneratörler ile üretilen alternatif gerilimi uzak mesafelere iletmek üzere, gerilimi yükseltmek için kullanılırlar (Özbay ve Gençoğlu, 2009) (Şekil 2.12).

Hidrolik türbinler; işleme tarzlarına, yapılış şekillerine, hidrolik düşüye ve hidrolik akımın rotodaki yönüne göre çeşitli şekillerde sınıflandırılır. İki ana türbin grubu, aksiyon türbinleri ve reaksiyon türbinleridir. Aksiyon türbinleri yüksek düşülerde ve düşük akışkan hızlarında tercih edilen türbinlerdir. En yaygın olarak kullanılan aksiyon türbinleri Pelton, Turgo ve Banki türbinleridir. Reaksiyon türbinleri ise küçük düşülerde ve yüksek akışkan hızlarında kullanılan türbinlerdir. Aynı düşü ve debi değerlerinde aksiyon tipi türbinlere göre daha hızlı dönerler. Yaygın olarak kullanılan tipleri Francis, Kaplan ve Uskur türbinleridir (Sarıbuğa, 2018). Bu tez kapsamında, bir hidroelektirik santralin Kaplan tipi türbin (Şekil 2.13) kanatlarından alınan su ve biyofilm örneklerinden MnOB`lerin izolasyonu yapılarak korozyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.12: Hidroelektrik santralin ana bölümleri (Oral ve diğ., 2017).



Şekil 2.13: Kaplan tipi hidrolük türbin ve yapısı (NTNU, 2007).

2.5.1. Korozyona Uğrayan HES Elemanları

HES'lerde görülen korozyonun tipi ve şiddeti; santral ve türbinin çeşidi ile santralin operasyon koşullarına (sudaki koroziyon potansiyel ve taş, çakıl, kum kalıntıları) göre değişiklik

göstermektedir (Höhle ve Nestler, 2011). Genel olarak, hidroelektrik santral elemanlarında görülen korozyon tipleri homojen korozyon, oyuklanma korozyonu, aralık korozyonu, erozyon korozyonu, stres korozyonu ve galvanik korozyondur (Forssander ve diğ., 2012). Özellikle hidrolik türbin kısımlarında meydana gelen korozyon, sektörde konu ile ilgili problemlerin başında gelmektedir. Türbin bıçakları, dönel çark, sabit ve ayar kanatlarda meydana gelen kavitezyon ve oyuklanma korozyonuna bağlı olarak oluşan aşınmalar türbin ömrünü kısaltan en önemli sorunların başında gelmektedir (Goldberg ve Lier 2011; Höhle ve Nestler 2011). Hidroelektrik santraller de dahil olmak üzere elektrik üretim tesislerinde meydana gelen korozyon vakaları endüstrileri her yıl milyonlarca dolar zarara uğratmaktadır. 2001 yılında The U.S. Federal Highway Administration (FHWA) tarafından Amerika`da yürütülen bir araştırmaya göre 1999-2001 yılları arasında metalik korozyonun ülke ekonomisinde yarattığı toplam zarar 276 milyon dolar olmak üzere; zararın 6.9 milyon dolarının elektrik üretim tesislerinde, 0.15 milyon dolarının ise yalnızca hidroelektrik üretim tesislerinde meydana gelen korozyon vakalarından kaynaklandığı açıklanmıştır (Virmani, 2002). Dünya genelinde artan enerji ihtiyacı ve buna bağlı olarak çoğalan üretim tesisi sayısı düşünüldüğünde, günümüzde endüstrilerin korozyon kaynaklı maddi kayıplarının artışta olduğunu öngörmek kaçınılmazdır.

Hidroelektrik endüstrisinde kullanılmak üzere metal korozyonuna karşı birçok yöntem geliştirilmiştir (Goldberg ve Lier, 2011; Höhle ve Nestler, 2011; Forssander ve diğ., 2012). Ancak bu yöntemlerin, MIC üzerine etki göstermediği bazı durumlar araştırmacılar tarafından daha önce rapor edilmiştir (Tyler ve Marshall, 1967; Linhardt ve Nichtawitz, 2003; Marangoni ve diğ., 2013; Linhardt, 2015). Hidroelektrik santraller ile ilgili bildirilen ilk MIC vakası Tazmania`da bulunan bir hidroelektrik santralin boru hattında MnOB`lerin meydana getirdiği metal korozyonudur (Tyler ve Marshall, 1967). Bu yayının ardından 1994 yılına kadar literatürde herhangi bir vaka bildirilmemiştir. 1994 yılında Paul Linhardt tarafından yapılan bildiri, Hollanda`da bir hidroelektrik santralin türbin bıçaklarında biyofilm kaynaklı oyuklanma korozyonu meydana geldiği ve sorumlunun MnOB`ler olduğu açıklanarak ilk kez MnOB`lerin metal yüzeyinde meydana getirdiği korozyonun mekanizmasına dair bir yaklaşımda bulunulmuştur (Linhardt, 1994). İlerleyen yıllarda, bildirilen yeni MIC vakalarına paralel olarak, MnOB`lerin önemi araştırmacılar tarafından farkına varılmış; bu bakterilerin biyojeokimyasal döngülerdeki rolü, metabolizmaları, diğer mikroorganizma türleri ile ilişkileri ve korozyon mekanizmaları hakkında yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

2.5.2. Bir HES Elemanı: AISI 415 Martenzitik Paslanmaz Çelik

Bir metal alaşımı olan paslanmaz çelik, içeriğindeki farklılıktan dolayı sertlik, kaynak kabiliyeti ve yüksek korozyon direncine sahip olduğundan endüstriyel sistemlerde sıkça kullanılan bir malzemedir (Outokumpu Oyj 2013). Paslanmaz çeliğin yüzeyinde oluşan ince fakat yoğun kromoksit tabakası, korozyona karşı yüksek dayanım sağlar ve oksidasyonun daha derine doğru ilerlemesini engellemektedir. Paslanmaz çelik, içerdiği katkı elementlerine göre tamamen östenitik ile tamamen ferritik özellikler aralığında sıralanan 5 türe ayrılmaktadır. Bunlar, temel alaşım elementi krom (Cr) ve nikel (Ni) olan östenitik paslanmaz çelikler; sertleştirilemeyen Fe-Cr alaşımı içeren ferritik paslanmaz çelikler; ferritik paslanmaz çelikler ile benzer kimyasal analize sahip olan ancak daha yüksek karbon ve daha düşük krom içeren martenzitik paslanmaz çelikler; hemen hemen eşit östenit ve ferrit içeren bir mikroyapıya sahip olan çift fazlı paslanmaz çelikler ve alüminyum (Al) gibi katı çözeltiliye girme, yaşlandırma (çökeltme) ısı işlemleri ile çeliğe sertleşebilme olanağı sağlayan alaşım elementlerini içeren çökeltme yoluyla sertleşebilen paslanmaz çeliklerdir (Odabaş, 2017).

Martenzitik paslanmaz çelikler, %11-18 oranında Cr, %1.2'ye kadar C, düşük miktarlarda ise Mn ve Ni içerirler. C oranı ne kadar yüksek olursa martenzitik çeliğin sertlik oranı o derece yüksek olur (Odabaş, 2017). Islah edildiklerinde yüksek çekme mukavemeti kazanabilirler. Ayrıca molibden (Mo) ilavesi ile korozyona karşı dirençleri arttırılmaktadır. Korozyona mukavemeti arttırmak ve çelik yüzeyinin istenilen özellikte olması için asit işlemleri ile temizlemek veya ince bir taşlama yapmak, ardından polisaj ile parlatma yaparak yüzeyi pürüzsüz hale getirmek gerekmektedir (Leflef, 2007).

Bu tez çalışmasında kullanılan AISI 415 kalite martenzitik paslanmaz çelik, kullanım alanı oldukça yaygın olan bir çelik türüdür. Petrokimya endüstrisinde, pompa ve kompresör bileşenlerinde, basınçlı döküm için kullanılan alet ve kalıplarda, nükleer santral şaft millerinde ve hidroelektrik santrallerin türbinlerinde sıkça kullanılmaktadır (Edelstahlwerke, 2007). Türbinlerin bıçak, dönel çark, sabit ve ayar kanat kısımları çoğunlukla martenzitik paslanmaz çelikten meydana gelmektedir. Standartlaştırılmış bu çelik tipi, alaşımında yalnızca %13 Cr ve %4 Ni barındırdığından endüstriyel açıdan düşük maliyetlidir ve manyetik özellikte olduğundan metalin kontrol amaçlı yapılan tahribatsız muayenesini kolaylaştırmaktadır. Ön ısı işlemleri olarak üretilen bu malzeme, iyi bir mekanik dayanıma sahiptir. En yaygın olarak yapılan ısı işlemleri sırasıyla QT650, QT780 ve QT900'dür. Düşük C'lu yapısıyla zor olmadan kaynak

yapılabilmektedir. Ancak kaynak sonrası ısıtıl işlemin yenilenmesi, malzemenin tamamında homojen bir dayanım için tavsiye edilmektedir. Bunun yanı sıra paslanmaz çelik özelliğinde olması korozyona karşı önemli bir direnç sağlamaktadır. Düşük C'lu yapısı, %4 civarında Ni içermesi, %0.6 civarında Mo içermesi sayesinde iyi sayılabilecek bir korozyon dayanımına sahiptir (Birçelik, 2015).



3. MALZEME VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında, Elazığ'ın Palu ilçesinde bulunan bir hidroelektrik santralden örnek alınmasını takiben MnOB izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, mikrobiyolojik korozyon çalışmasına yönelik bazı deneysel koşullar belirlenerek izolasyonu yapılan MnOB türü kültürel ve moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır. Tanımlanan MnOB türü ile mikrobiyolojik korozyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

3.1. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU

3.1.1. Hidroelektrik Santralden Su ve Biyofilm Örneklerinin Alınması

Su ve biyofilm örnekleri Elazığ'ın Palu ilçesinde bulunan Murat Nehri üzerindeki bir hidroelektrik santralden alınmıştır. Su örnekleri, septalı cam serum şişelerinde; santralin göl ve salyangoz suyundan alınmıştır. Martenzitik paslanmaz çelikten üretilen türbinlerin sabit ve ayar kanatlarının yüzeyinde oluşan biyofilm tabakası ise ortam koşullarına bağlı olarak en az 2 farklı alandan 2'şer adet olmak üzere steril eküvyonlar ile toplanmış ve eküvyonlar içerisinde 20 ml steril çeşme suyu bulunan steril falkon tüplere aktarılmıştır. Alınan su ve biyofilm örnekleri laboratuvara getirilir getirilmez analizlere başlanmıştır.

3.1.2. Su ve Biyofilm Örneklerinden MnOB'lerin İzolasyonu

Laboratuvara getirilen su örnekleri, içerisinde 0.22 µm por çaplı naylon membran filtre kağıdı bulunan steril filtre sisteminden geçirilmiştir. Daha sonra her bir filtre kağıdı, içerisinde 50 ml steril çeşme suyu bulunan steril naylon poşetlere konmuştur. Ardından naylon poşetler, 2 dk boyunca stomacher cihazına (IUL Instruments) maruz bırakılarak filtre kağıdına tutunan bakterilerin suya geçmesi sağlanmıştır (Power ve diğ., 2001). Tüm filtrasyon işlemi 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 50 ml konsantre örneklerden, steril çeşme suyu kullanılarak 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır.

Biyofilm örneklerinin toplandığı eküvyonlar ve içerisine daldırıldıkları çeşme suları, steril stomacher poşetlerine aktarıldıktan sonra stomacher cihazında 2 dk tutularak biyofilm homojenatı elde edilmiştir (Gagnon ve diğ., 1999). Bu biyofilm homojenatından, steril çeşme suyu kullanılarak 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır.

MnOB`lerin izolasyonunun gerçekleştirilebilmesi için özellikle tatlı sulardan izolasyonda tercih edildiği belirlenen, Mn içerikli selektif besiyerleri olan LBB, PYG ve MnOB besiyerleri kullanılmıştır (Adams ve Ghiorse, 1986; Zakharova ve Prfenova, 2007; Cerrato, 2010). Su ve biyofilm örneklerinden hazırlanan her bir sulandırmadan 0.1 ml alınarak agarlı LBB, PYG ve MnOB besiyeri içeren Petri kutularına yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekimler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan Petri kutuları 28°C`lik etüvde 3 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, besiyerinin rengini kahvrengeye çeviren veya etrafında kahverengileşme görülen MnOB şüpheli bakteri kolonilerinden öze ile alınarak filtre kağıdı üzerine konmuş, ardından koloni üzerine %0.04`lük Leucoberberlin I (LBB) solüsyonu ile spot test uygulanmış ve MnO_x üretenler tespit edilmiştir. Spot test sonrası oluşan mavi renk, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Krumbein ve Altmann, 1973).

3.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASINA YÖNELİK BAZI DENEYSEL KOŞULLARIN BELİRLENMESİ

MnOB`lerin izolasyonunda LBB, PYG ve MnOB olmak üzere 3 farklı besiyeri kullanıldığından ve izolasyon sonucunda 7 farklı bakteri izolatu elde edildiğinden dolayı korozyon deneylerinde deney ortamı olarak kullanılacak bakteri izolatu ile birlikte besiyerinin seçimi için ön çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, izole edilen 7 adet bakteri izolatu ve bu izolatların elde edildikleri LBB ve MnOB besiyerleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda belirlenen temel hedefler aşağıda belirtildiği gibidir:

- 1- Mikrobiyolojik korozyon deneylerinde kullanılmak üzere izole edilen MnOB izolatları arasından, üreme ve MnO_x üretmesi açısından en aktif bakteri izolatının ve beraberinde bu üreme şekline ortam hazırlayan en uygun besiyerinin belirlenmesi,
- 2- Belirlenen besiyerinin farklı Mn konsantrasyonlarında hazırlanması ve en aktif bakteri izolatının üremesini sınırlamayan en yüksek Mn konsantrasyonunun belirlenerek korozyon deneylerinde kullanılması,
- 3- En aktif bakteri izolatının, bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve moleküler yöntemler ile tür düzeyinde tanımlanması.

3.2.1. Korozyon Çalışmaları İçin Uygun Bakteri İzolatının ve Besiyerinin Seçimi

Korozyon çalışmalarında kullanılacak bakteri izolatının ve deney ortamı olarak kullanılacak olan besiyerinin seçimi için her bir izolatın sıvı LBB ve MnOB besiyerindeki üreme durumları ve Mn oksitleme aktiviteleri birbirleri ile kıyaslanmıştır.

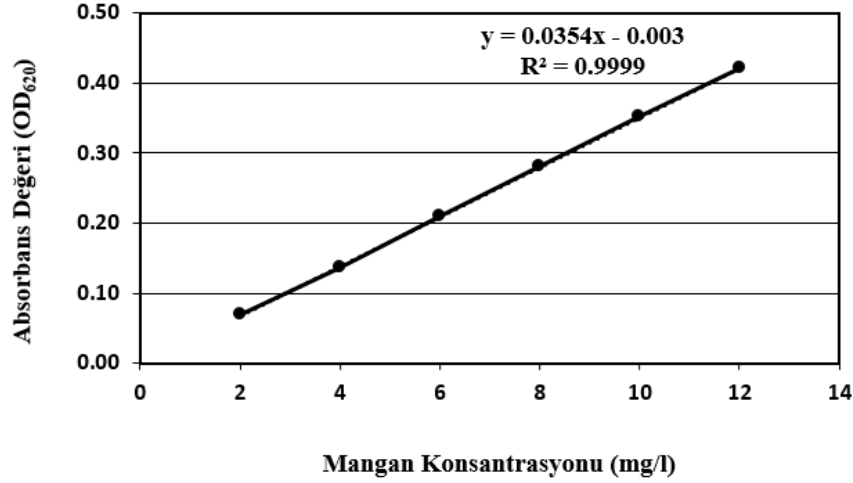
Üreme eğrilerinin ve Mn oksitleme aktivitelerinin belirlenmesinde her bir izolat ve besiyeri için aynı prosedür takip edilmiştir. Öncelikle bakteri izolatının 28°C`de 24 sa`lık katı kültürü elde edilmiş ve bu kültürden bakteri kolonileri öze ile alınarak 15 ml steril sıvı besiyerine (LBB ve MnOB) inoküle edilmiştir. Kültürün bulanıklığı McFarland 1 standart değerine göre ayarlanarak kültürdeki bakteri sayısı yaklaşık olarak 3×10^8 h/ml`ye eşitlenmiştir. Ardından bu kültürün tamamı 165 ml sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve çalkalamalı etüvde, 28°C sıcaklıkta, 110 rpm hızda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 360, 480, 600, 720. sa`larında kültürden; üreme eğrisi için 1 ml, Mn oksitleme aktivesinin ölçümü için ise 0.1 ml örnek alınmıştır. Örnek alımı 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Üreme eğrisi eldesi için her ölçüm saatinde alınan örneğin bulanıklığı 620 nm dalga boyunda spektrometre cihazında (Perkin Elmer, Lambda 35) ölçülmüş ve absorbansı kaydedilmiştir. Kör olarak steril besiyeri kullanılmıştır (Divekar, 2010). Ölçümler çift tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Mn oksitleme aktivitesinin ölçümü için, her ölçüm saatinde alınan 0.1 ml örneğe 0.5 ml %0.04`lük LBB solusyonu eklenmiş ve gerçekleşecek reaksiyonun ışıktan etkilenmemesi için karışım 10 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Ardından spektrometrik ölçümün bakteri bulanıklığından etkilenmemesi için, karışım 10 000 rpm`de 10 dk santrifüj edilerek bakterilerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası, üstte kalan sıvıda bulunan MnO_x `ler ile LBB solusyonunun meydana getirdiği reaksiyon sonucu oluşan mavi rengin koyuluğu 620 nm dalga boyunda spektrometre cihazı ile ölçülmüştür. Kör olarak örnek ile aynı muameleyi görmüş LBB solusyonu içeren steril besiyeri kullanılmıştır. Çizilen aktivasyon eğrisi potasyum permanganat ($KMnO_4$) standart eğrisi ile kıyaslanarak bakterinin ürettiği MnO_x miktarı tespit edilmiştir (Wright ve diğ., 2016).

$KMnO_4$ standart eğrisini oluşturmak için 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l ve 12 mg/l konsantrasyonlarda standart $KMnO_4$ çözeltileri hazırlanmış ve oluşan mavi rengin koyuluğu spektrometre cihazında 620 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Marbaniang, 2012). Kör olarak

distile su kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilmiş ve eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Standart KMnO₄ konsantrasyonları ile hazırlanmış standart eğri ve denklemi.

Deneyler sonucunda elde edilen grafikler değerlendirilmiş, gelişim durumları (bakteri sayısı ve üreme fazları) ile ürettikleri MnO_x miktarı en yüksek olan bakteri izolatu ile bu büyüme şekline en uygun ortamı sağlayan MnOB besiyeri korozyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2.2. Korozyon Çalışmalarında Kullanılacak Besiyeri İçin Maksimum Mn Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Farklı Mn konsantrasyonlarının Bölüm 3.2.1`de seçilen bakteri izolatının büyümesi üzerine etkileri gözlemlenmiş ve böylece bakterinin büyümesini sınırlandırmayan maksimum Mn konsantrasyonu belirlenmiştir. Korozyon deneylerinde kullanılması amacı ile bu kapsamda Bölüm 3.2.1`de seçilen besiyeri, 8 farklı Mn konsantrasyonu (0.15, 0.5, 1, 2, 3, 3.5, 4 ve 4.7 g/L MnSO₄) içerecek şekilde hazırlanmıştır. 3.5, 4 ve 4.7 g/L MnSO₄ içeren MnOB besiyerlerinde kristalleşme görüldüğünden, kristalleşme görülmeyen MnOB besiyerlerine (0.15, 0.5, 1, 2 ve 3 g/L MnSO₄ içeren) Bölüm 3.2.1`de açıklandığı şekilde bakteri ekimi yapılmıştır. İnkübasyonun belirli sürelerinde (2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 360, 480, 600, 720. sa`larında) bakteri kültüründen örnekler alınarak spektrometrik ölçümler ile üreme eğrileri çizilmiştir. Elde edilen grafikler değerlendirilerek bakterinin büyümesini

sınırlandırmayan ve en yüksek bakteri sayısının elde edildiği Mn konsantrasyonu korozyon deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tüm bu deneyler sonrasında, korozyon deneylerinde kullanılmak üzere seçilen izolatu tanımlama çalışmalarına geçilmiştir.

3.3. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİ İZOLATININ TANIMLANMASI

3.3.1. Seçilen Bakteri İzolatının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Korozyon deneylerinde kullanılmak üzere seçilen bakteri izolatının öncelikle morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. İlk olarak, izolat Gram ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiş ve Gram özelliği ile birlikte morfolojisi belirlenmiştir. Ardından faz-kontrast mikroskopunda canlı olarak hareket yeteneği gözlemlenerek fotoğraflandırılmıştır. Ek olarak, izolatın; oksidaz, katalaz, hidrojen sülfür, indol, hareket, sitrat, metil kırmızısı (MR), Voges Proskauer (VP), üç-şekerli demir (TSI), karbonhidrat fermantasyonu; jelatin, kazein ve nişasta hidrolizi, nitrat redüksiyonu testleri ile temel bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. İzolatın Gram özellikleri ve biyokimyasal test sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Buchanan ve Gibbons, 1974) kitabına göre değerlendirilerek bakterinin en yakın cins tayini yapılmıştır. Daha sonra moleküler yöntemler ile izolatın tür tayini gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1. Oksidaz Testi

Petri kutusu içerisine konulan bir adet lam üzerine, tetrametil p-fenilendiamin-dihidroklorid emdirilmiş test şeridi yerleştirilmiş üzerine platin öze ile bakteri izolatının katı kültüründen alınan bir bakteri kolonisi sürülmüştür. 30 s sonra renk değişimi gözlemlenerek mavi renk oluşumu pozitif test sonucu olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.2. Katalaz Testi

Bakteri izolatının sıvı kültüründen platin öze ile örnek alınarak üzerine %3'lük H₂O₂ çözeltisinden ilave edilmiş, oksijen kabarcıklarının çıkması pozitif test sonucu olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.3. Hidrojen Sültür, İndol ve Hareket Testi

Bakteri kültüründen SIM agar besiyerine batırma şeklinde ekim yapılarak 37°C`de 48 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, FeS çökeltisi oluşumuna bağlı olarak besiyerinde ekimin yapıldığı hat boyunca siyah bir çizgi görülmesi ya da besiyeri renginin tamamen siyaha dönmesi pozitif H₂S sonucu olarak kaydedilir. Üremenin ekim çizgisinden uzağa yayılma göstermesi ise bakterinin hareketli oluşunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Besiyerine Kovac`s ayracı ilave edildiğinde oluşan kırmızı renk ise indol üretildiğinin bir göstergesidir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.4. Sitrat Kullanımı

Bakteri kültüründen, Simmon`s sitrat agar besiyerine ekim yapılarak 37°C`de 48 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin maviye dönüşmesi ya da renk değişimi olmaksızın üremenin olması pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.5. Üç-Şekerli Demir (TSI) Testi

Bakteri kültüründen öze ile bir miktar alınarak, Triple-Sugar-Iron agar besiyerinin eğri yüzeyine zikzak çizilerek agara batırılır ve 18-24 sa`lik inkübasyon sonrası sonuçlar değerlendirilir. Dip kısmın sarı, eğri yüzeyin kırmızı olması sadece glukoz fermantasyonunun pozitif olduğunu gösterir. Eğri yüzey, dip kısımda olduğu gibi sarı ise laktoz ve/veya sukroz fermantasyonu pozitif anlamına gelmektedir. Dip kısım ve eğri yüzey turuncu-kırmızı renkte ise şeker fermentasyonu negatif olarak kaydedilir. Agarın siyahlaşması H₂S oluşumu pozitif anlamına gelmekte iken agarın parçalanması veya kabarcık oluşumu gaz oluşumunun pozitif olduğu anlamına gelmektedir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.6. Metil Kırmızısı (MR) ve Voges Proskauer (VP) Testi

Bakteri kültüründen, Clark-Lubs besiyerlerine ekim yapılarak 37°C`de 48 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerinin üzerine metil kırmızısının alkol çözeltisinden bir kaç damla ilave edilmiş oluşan belirgin kırmızı renk MR pozitif; sarı renk MR negatif olarak kaydedilmiştir. VP testi için ise inkübasyon sonrası besiyerinin üzerine %5 oranında Barritt`s ayracı ilave edilmiş, 2 sa süre ise oluşan renk değişimi gözlemlenmiş ve pembe renk oluşumu pozitif test sonucu olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.7. Karbonhidrat Fermentasyonu

Bakteri kültüründen, içine Durham tüpleri yerleştirilmiş glukozlu buyyonları (glukoz, fruktoz, laktoz, sukroz, galaktoz, mannit ve d-xylose ile hazırlanmış) içeren tüplere ekim yapılarak 37°C`de 48 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin sarı olması pozitif; kırmızı renkte kalması ise negatif test sonucu olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.8. Jelatin Hidrolizi

Bakteri izolatının 24-48 sa`lık sıvı kültüründen jelatin besiyerine ekim yapılarak 48 sa oda sıcaklığında bekletilir. Ardından +4°C`de 30 dk tutulur. Besiyerinin sıvı kalması, jelatinin hidroliz edildiğinin bir göstergesidir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.9. Kazein Hidrolizi

Bakteri kültüründen, süt ilave edilmiş nutrient agar içeren besiyerine ekim yapılarak 37°C`de 48 sa inkübe edilmiştir. Proteaz salan bakteri kolonilerinin etrafında proteolizis zon oluşumu pozitif test sonucu olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.10. Nişasta Hidrolizi

Bakteri kültüründen, nişastalı agar içeren besiyerine ekim yapılarak 37°C`de 48 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerine, Petri kutusunun üstünü örtecek şekilde, Gram`ın iyodin çözeltisi dökülmüş ve bakteri kolonileri etrasında şeffaf bir hidroliz zonu gözlenmesi pozitif test sonucu olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.1.11. Nitrat Redüksiyonu

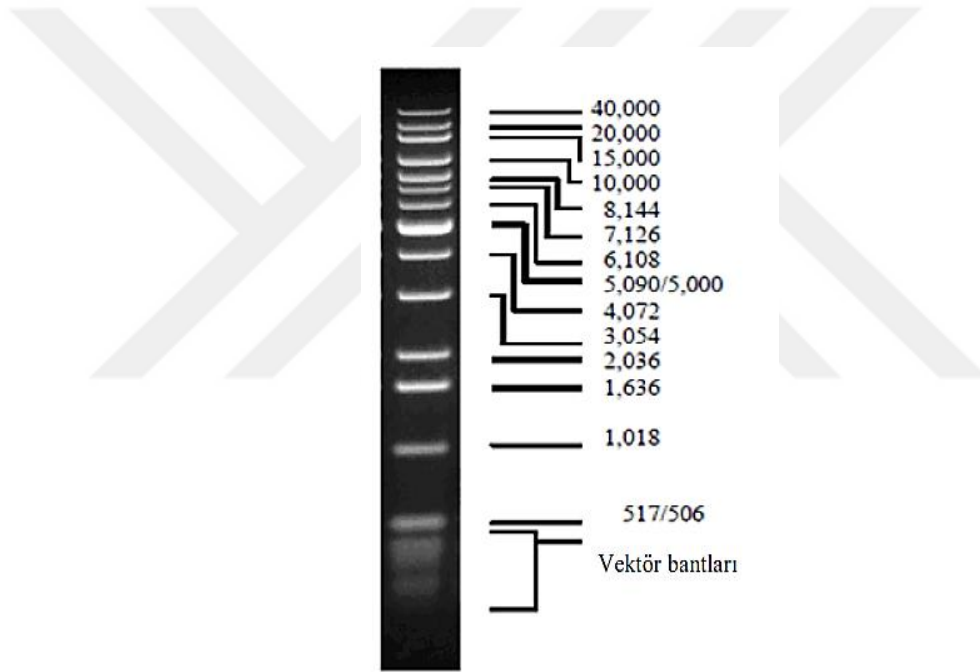
Bakteri kültüründen, sıvı nitrat besiyerine ekim yapılarak 30°C`de 1 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 1 ml α -naftilamin ve 1 ml sulfanilik asit ayıraçlarından ilave edilmiştir. 30s içinde kırmızı rengin oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.3.2. Seçilen Bakteri İzolatının Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

Seçilen bakteri izolatının tür düzeyindeki tanımlaması; DNA izolasyonu, DNA örneklerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması (PZR) ve dizi analizini içeren moleküler yöntemler ile gerçekleştirilmiştir

3.3.2.1. Bakteri İzolatından DNA Eldesi

Bakteri izolatına ait genomik DNA (gDNA), ticari olarak satılan PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.) kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen gDNA örneğinin 5 µl'si, 1 µl 6X BlueJuice jel (Invitrogen) yükleme tamponuyla karıştırılmış, içerisinde 1.5 µl GelRed (Biotium) boyası bulunan %1'lik agaroz jele yüklenerek 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu içerisinde 90 V'de 32 dk boyunca elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez sonunda agaroz jel, görüntüleme sisteminde (Dahian, WGD-30) fotoğraflanmıştır. Elde edilen gDNA miktarı, markırın (1 kb DNA Extension Ladder, Invitrogen) oluşturduğu bantların kalınlığı ve konumu baz alınarak tespit edilmiştir (Şekil 3.2). Ardından gDNA örnekleri bir sonraki kullanıma kadar -20°C'lik dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.2: 1 Kb DNA Extension Ladder markırının (Invitrogen) jeldeki görüntüsü ve bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA büyüklükleri (ng).

3.3.2.2. DNA Örneğinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması ve Dizi Analizi

gDNA örneğinin 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgelerinin çoğaltılması universal bakteri primerleri olan 27F ve 1495R (Tablo 3.1) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primerler.

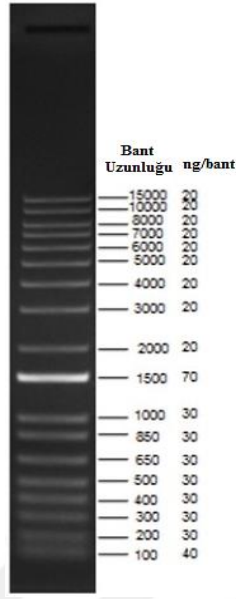
Primer	Primer Dizimi
27F	5`-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3`
1495R	5`- CTACGGCTACCTTGTTACGA-3`

gDNA örneğinin 16S rDNA gen bölgelerinin çoğaltılması için geleneksel PZR yöntemi (BioRad, T100 Thermocycler) uygulanmıştır. Tüm PZR solusyonları laminar flow cihazı içerisinde aseptik koşullar altında hazırlanmıştır. Çoğaltma işlemi için son hacmi 50 µl olan reaksiyon karışımı [1-2.5 µl genomik DNA, 0.76 µl primerler, 23.25 µl RNA içermeyen su (Qiagen) ve 25.0 µl hazır reaksiyon karışımı (Taq master mix, Qiagen)] hazırlanarak, Tablo 3.2'de verilen PZR protokolü uygulanmıştır.

Tablo 3.2: Polimeraz zincir reaksiyonu programı.

Aşama	Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk	1
2	Denatürasyon	95	60 s	34
	Primer bağlanması	59	60 s	
	Zincir uzaması	72	105 s	
3	Son uzama	72	10 dk	1

Elde edilen PZR ürünü, 1.5 µl GelRed (Biotium) boyası içeren %1.5'lik agaroz jele yüklenerek Bölüm 3.3.2.1'de anlatıldığı şekilde görüntülenmiştir. 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) moleküler markır olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3). Ardından PZR ürünü, saflaştırma ve dizi analizi için firmaya (Eurofins, Almanya) gönderilmiştir.



Şekil 3.3: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) moleküler markırının jeldeki görüntüsü ve bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA miktarları ve büyüklükleri.

Elde edilen 16SrDNA gen dizileri ilk olarak Genetik Analiz Sisteminde analiz edilmiştir. Ardından, filogenetik yakınlığın görülebilmesi için, NCBI BLAST araştırma aracı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) kullanılarak genel veritabanında bulunan dizilerle karşılaştırılmış ve filogenetik olarak en yakın tür belirlenmiştir.

3.4. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASI

3.4.1. Martenzitik Paslanmaz Çelik Kuponların Hazırlanması

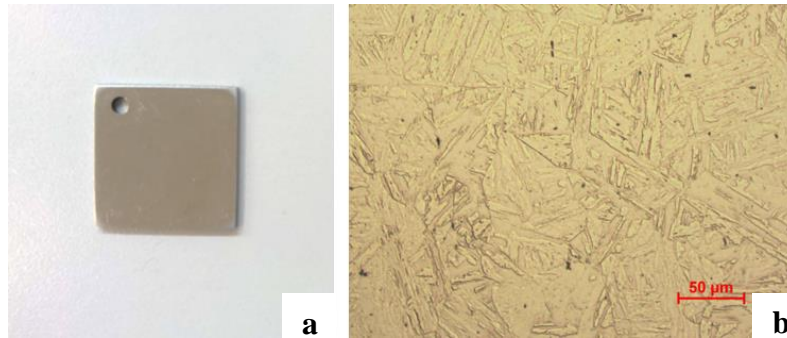
Deney numunesi olarak, hidroelektrik santrallerin türbin bıçakları, dönel çark ve türbin kanatları gibi yapı elemanlarında sıklıkla kullanılan bir malzeme olan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kullanılmıştır. AISI 415 martenzitik paslanmaz çeliğin kimyasal bileşimi Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3: Deneylerde kullanılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çeliğin kimyasal bileşimi.

% C	% Cr	% Ni	% Mo	% Mn	% Si	% P	% S	% Cu
0.048	12.32	3.7	0.705	0.736	0.442	0.36	0.14	0.559

Deneylerde toplam 130 adet kupon kullanılmıştır. Kuponlar; 300 mm uzunluğunda ve 65 mm çapında olan, AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik içi dolu bir çubuktan elde edilmiştir. Öncelikle içi dolu çelik çubuk, 20 mm aralıklarla halkalar halinde; ardından her bir halka yan yatırılarak dikine 1.5 mm aralıklarla kesilmiştir. Elde edilen plakalardan ise 20x20 mm boyutlarında kareler kesilmiş ve böylece boyutları 20x20x1.5 mm olan kuponlar elde edilmiştir. Düzeneklere asabilmek için kuponların bir köşesinden 2.3 mm çapında delik açılmıştır (Şekil 3.4a).

Deney kuponları hazırlanırken öncelikle, malzemenin gerçek yapısını açığa çıkarmak ve standardizasyonu sağlamak amacı ile kuponların her iki yüzeyi de metalografik numune hazırlama prosedürüne uygun olarak, zımparalama ve parlatma aşamalarından geçirilmiştir (Vander Voort ve diğ., 2004). Zımparalama işlemi, döner disk sisteminde (Metkon, Gripo) sırasıyla 180, 240, 320, 400, 600 ve 800, 1000 numaralı zımpara kağıtları kullanılarak yapılmıştır. Kuponlar yıkandıktan ve Pasteur fırınında 70°C’de kurutulduktan sonra parlatma işlemine geçilmiştir. Parlatma işlemi, üzerine 1 µ elmas süspansiyon (Diapat-M, Metkon) dökülmüş keçenin bulunduğu döner disk kullanılarak yapılmıştır. AISI 415 paslanmaz çelik kuponun iç yapısı optik mikroskop (Leica, DFC 280) ile incelenmiştir (Şekil 3.4b).

**Şekil 3.4:** AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kupon; makroskobik görüntüsü (a), optik mikroskop görüntüsü (b).

Parlatma işlemi sonrası kuponlar, distile su ile yıkanıp kurutulmuş ve ardından boyutları ölçülerek, toplam yüzey alanları hesaplanmıştır. Daha sonra aseton ile temizlenen kuponlar, Pasteur fırınında tekrar kurutulmuş ve akabinde ağırlıkları ölçülmüştür. Hazırlıkları tamamlanan kuponlar, deney anına kadar hava almayacak şekilde desikatörde saklanmıştır.

3.4.2. Laboratuvar Ölçekli Deney Düzeneginin Kurulumu, İşletilmesi ve Gerçekleştirilen Analizler

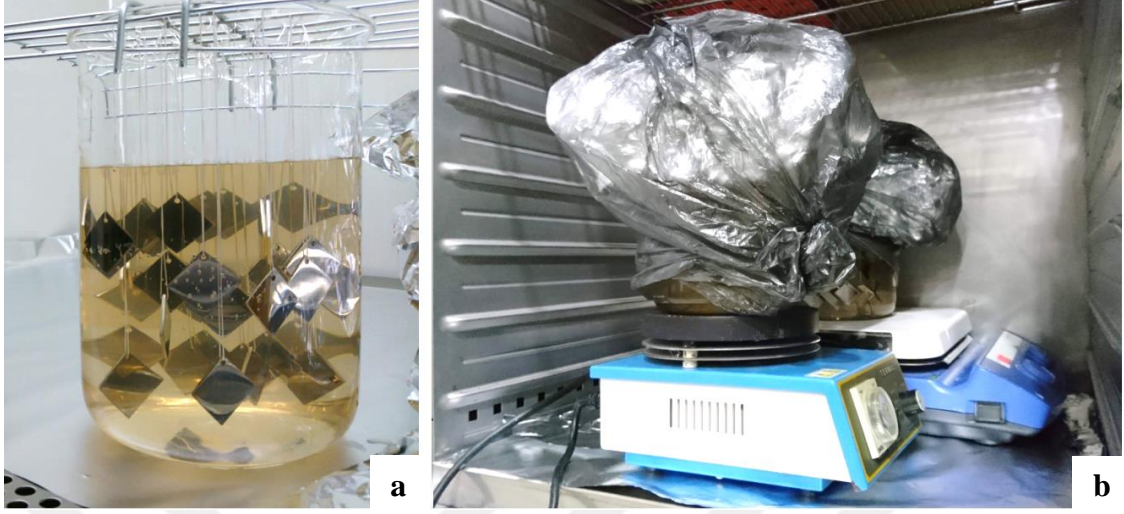
Laboratuvar ölçekli deney düzeneginde, Bölüm 3.3.2`de tanımlanan bakteri suşunun varlığında AISI 415 martenzitik paslanmaz çeliğin mikrobiyolojik korozyon davranışını incelenmiştir.

Laboratuvar ölçekli deney düzenegi, 2 l hacimli cam beher, kupon taşıyıcı, kuponlar ve deney ortamından oluşmaktadır (Şekil 3.4a):

Beher; içerisinde deneyin gerçekleştirildiği 2 l hacimli cam malzemedir. Deney öncesinde Pasteur fırınında 170°C`de 1 sa bekletilmek suretiyle steril edilmiştir.

Kupon taşıyıcı; metal kuponların deney ortamı içerisinde birbirlerine değmeyecek şekilde bulunmasını sağlayan metal bir ızgaradır. Kuponlar, köşelerinde açılan deliklerden geçirilen ipler ile kupon taşıyıcıya asılmaya hazır hale getirilmiştir. Daha sonra kuponların her iki yüzü de 260 nm dalga boyundaki UV ışınlarına 12 sa maruz bırakılmak suretiyle steril edilmiştir. Köşelerinden ip geçirilen kuponlar, steriliteyi bozulmayacak ve birbirlerine değmeyecek şekilde kupon taşıyıcıya asılmıştır. Bu işlemler, laminar flow cihazı içerisinde aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bir deney düzenegine AISI 415 martenzitik paslanmaz çelikten hazırlanan 65 adet kupon yerleştirilmiştir.

Deney ortamı; kuponların maruz bırakıldığı ve deneyin gerçekleştirildiği ortamdır. Deney ortamı olarak, 24 sa`lık bakteri kültürü kullanılmıştır. Bakteri kültürü, laminar flow cihazı içerisinde kuponları içeren steril deney düzenegine eklenmiş ve deney süresince bir manyetik karıştırıcı üzerinde (Thermal, N11150M) 150 rpm hızla karıştırılmış, karıştırıcı ise sıcaklığı 28°C derece olan bir etüvün içine konulmuştur (Şekil 3.5b). Düzenek kurulduktan sonra, kontaminasyonun engellenmesi için üzeri önce steril alüminyum folyo ile sonrasında ise temiz bir poşet ile kapatılmıştır. Deney düzenegi çalışma süresi boyunca (792 sa) etüv içerisinde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5: Deney düzeneği; deney ortamının bulunduğu beher, kupon taşıyıcı ve taşıyıcıya ipler ile bağlanmış kuponların genel görüntüsü (a). Deney düzeneğinin işletilmesi; deney ve kontrol düzeneklerinin karıştırıcı üzerinde ve bir etüv içerisinde, üzerleri steril alüminyum ve poşet ile kapatılmış görünümü (b).

Bakteri kültürünün hazırlanması için steril MnOB besiyeri kullanılmıştır. Laminar flow cihazı içerisindeki 2 l hacimli steril beherdeki 1440 ml steril MnOB besiyerine, %10 oranını sağlayacak şekilde bulanıklığı MF 1'e göre ayarlanmış 24 sa'lık saf bakteri kültüründen 160 ml ekim yapılmıştır ve 28°C'de inkübe edilmiştir. 24 sa'lık inkübasyon sonrasında 25×10^6 h/ml başlangıç konsantrasyonu sağlanmıştır.

Saf bakteri kültürü içeren deney ortamına, AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların daldırılması ile deney düzeneği kurulmuş ve 792 sa süresince işletimi gerçekleştirilmiştir. Bakteriolojik analizler ve korozyon analizleri için 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 300, 360, 456, 624 ve 792. sa'lerde deney düzeneklerinden 4 adet kupon çıkartılmış ve eş zamanlı olarak da 30 ml bakteri kültüründen alınmıştır. Biyofilm tabakasındaki bakteri sayısının, MnO_x miktarının, EPS eldesi ve içeriğindeki toplam karbonhidrat ve protein miktarının tayini için birer adet kupon kullanılmıştır. Deney öncesi ve sonrası yapılan ağırlık ölçümleri ile bu üç kuponun ağırlık kayıpları belirlenmiştir ve kuponların korozyon hızları hesaplanmıştır. Düzenekten çıkarılan dördüncü kupon ise kuponun yüzeyinde oluşan biyofilm ve korozyon ürünlerinin tespiti amacı ile SEM analizi için kullanılmıştır.

Örnekleme saatlerinde deney düzeneğinden alınan bakteri kültüründeki planktonik bakterilerin sayısı ile birlikte MnO_x ve Mn^{+2} miktarı tespit edilmiştir. Ayrıca kültürün Cl ve pH değerleri de saptanmıştır.

Belirli örnekleme saatlerinde, deney ortamının dibine çöken tortulardan örnekler alınarak XRD analizleri için kullanılmıştır.

3.4.2.1. Bakteri Sayısının Tespiti

Kültürdeki planktonik bakterilerin sayımı için öncelikle belirlenen örnekleme saatlerinde deney düzeneğinden alınan bakteri kültüründen, 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır. Hazırlanan sulandırmılardan R2A besiyeri içeren Petri kutularına üç tekrarlı olarak 0.1 ml ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler $28^{\circ}C$ 'lik etüvde 1 hafta bekletilmiştir (Regsoner ve Geldrich, 1985). İnkübasyon süresi sonunda Petri kutularındaki koloniler koloni sayım cihazı (BZG 30, WTW, Germany) üzerinde sayılarak, koloni oluşturan birim (CFU - Colony Forming Unit - ml^{-1}) olarak kaydedilmiştir.

Sesil bakterilerin sayımı için her örnekleme saatinde deney düzeneğinden bir adet kupon çıkartılmıştır. Kupon yüzeyindeki biyofilm tabakası alınmadan önce, yüzeye gevşek tutunmuş bakterilerin uzaklaştırılması için kuponlar birkaç kez dikkatlice steril çeşme suyuna daldırılmıştır. Bu işlem sonrasında, kuponun her iki yüzeyinde de oluşan biyofilm tabakası, steril eküvyon ile toplanmış ve içerisinde 10 ml steril çeşme suyu bulunan santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra en yüksek devirde 120 sn vorteksenerek bakterilerin sıvı besiyerine geçişi sağlanmıştır (Gagnon ve Slawson, 1999). Biyofilm süspansiyonundan, 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır. Hazırlanan sulandırmılardan R2A besiyeri içeren Petri kutularına üç tekrarlı olarak 0.1 ml ekim yapılmıştır. Ekim yapılan Petri kutuları $28^{\circ}C$ 'lik etüvde 1 hafta bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Petri kutularındaki koloniler koloni sayım cihazı üzerinde sayılarak, koloni oluşturan birim (CFU ml^{-1}) olarak kaydedilmiştir.

Deneyin son 2 ölçüm saatinde, biyofilmden alınan örneklerde LIVE/DEAD Backlight L-7012 (Invitrogen) test kiti kullanılarak ölü-canlı bakteri tespiti yapılmıştır. Bu teknik kapsamında, üreticinin el kitabında yer alan prosedüre göre örnekler SYTO 9 ve propidyum iyodür boyaları eklenmiştir. Ardından örnekler, faz-kontrast mikroskobu altında incelenmiştir. Tüm bakterilerin membranından geçebilme özelliğinde olan SYTO 9, bakteri hücrelerini yeşil renge boyamaktadır. Propidyum iyodür ise yalnızca hücre membranı zarar görmüş bakteri

hücrelerinin içine girerek hücreleri kırmızı renge boyamaktadır. Dolayısıyla florasan ışık altında canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı renkte görülmektedir.

3.4.2.2. EPS Eldesi ve İçeriğindeki Toplam Karbonhidrat ile Protein Miktarının Tayini

Biyofilmden EPS eldesi için her örnekleme saatinde deney düzeneğinden bir adet kupon çıkartılmıştır. Kuponların yüzeyindeki biyofilm tabakası alınmadan önce, planktonik veya yüzeye gevşek tutunmuş bakterilerin uzaklaştırılması için kupon birkaç kez steril distile suya daldırılmıştır. EPS eldesi yıkama, ayırma, ekstraksiyon ve filtrasyon olmak üzere dört aşamada gerçekleştirilmiştir (Zhang ve diğ., 1999):

Yıkama işleminde, kuponun her iki yüzeyindeki biyofilm tabakası steril eküvyon ile toplanmış ve içerisinde 10 ml steril distile su bulunan santrifüj tüpünde süspansiyon edilmiştir. Biyofilm süspansiyonu 6000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant başka bir steril santrifüj tüpüne aktararak saklanmıştır.

Ayırma aşamasında, yıkama işleminden geriye kalan biyofilm peleti üzerine 10 ml %8.5 NaCl ve %0.22 formaldehit içeren çözeltilerden eklenmiş ve en yüksek devirde 1 dk vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra ilk iki aşamadaki örnekler steril bir santrifüj tüpünde birleştirilmiştir (toplam hacim 20 ml).

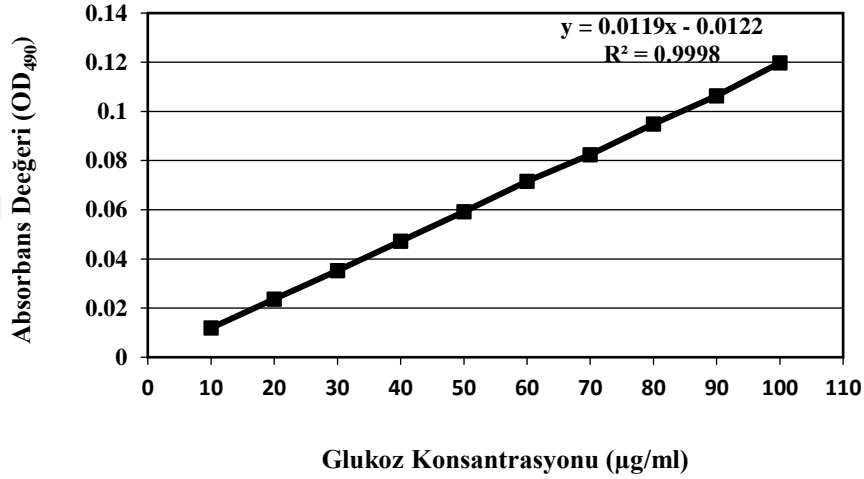
Ekstraksiyon aşamasında, toplam hacmi 20 ml olan birleştirilmiş örnek kombinasyonu 11227 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir.

Filtrasyon işleminin yapıldığı son aşamada ise üçüncü aşamadaki santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatant, 0.22 µm por çaplı steril membran filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmiştir.

EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarının tayini, fenol sülfürik asit yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Dubois ve diğ., 1956). Bu amaçla; geniş çaplı (18x20 mm) deney tüplerine aktarılan 1 ml EPS solüsyonu üzerine, polisakkaritleri dimerlerine ayırmak için 1 ml %5'lik fenol çözeltisi eklenmiş ve hemen ardından 5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilerek 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonucu yükselen sıcaklığın düşürülmesi ve oluşan reaksiyonun durdurulması amacıyla tüpler, 25-30°C'lik su banyosunda 10-20 dk soğumaya bırakılmıştır. Gerçekleşen reaksiyon sonucunda, sarı-turuncu renk oluşumu gözlemlenmiş ve rengin koyuluğu spektrofotometre

cihazında (Thermo Scientific, Multitaskan GO) 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Toplam karbonhidrat miktarı, spektrofotometredeki ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerinin, standart eğriye ait denklemde yerine koyulması ile hesaplanmıştır. Ölçümler 4 tekrarlı yapılmıştır.

Standart eğriyi oluşturmak için öncelikle 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 90 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda standart glukoz çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilere fenol sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Kör referans olarak distile su kullanılmıştır. Her bir konsantrasyona ait absorbans değerleri ile standart grafik çizilmiş ve eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.6). Kontrol amacıyla 10 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlardaki standart glukoz çözeltileri deneylerle eş zamanlı olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.6: Standart glukoz konsantrasyonları ile hazırlanmış standart eğri ve denklemi.

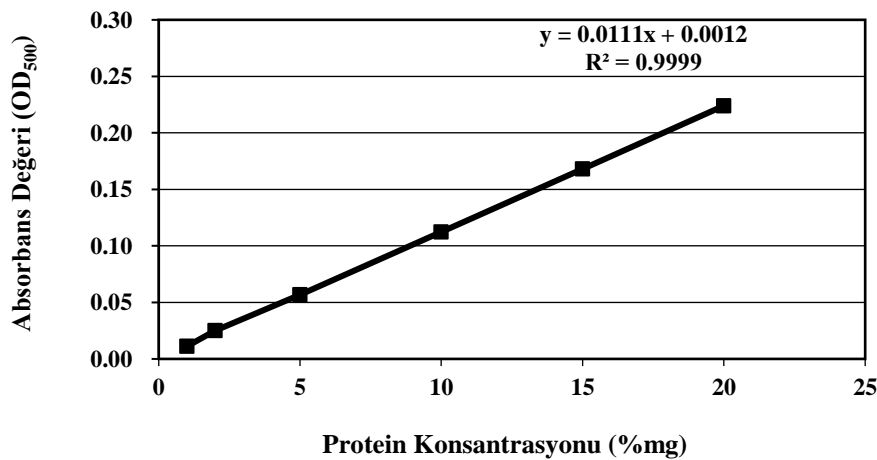
EPS içeriğindeki toplam protein miktarının tayini, EPS solüsyonlarındaki tuzların uzaklaştırılması amacı ile diyaliz işleminin uygulanmasının ardından Lowry yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Lowry ve diğ., 1951).

Diyaliz işlemi öncesinde, kullanılacak diyaliz tüpü (MW:6000-8000, Spectra/Por) 30 dk boyunca distile suda bekletilerek yumuşatılmıştır. Ardından tüpün bir ucu kıvrılarak ip ile bağlanmış ve ucuna diyaliz klipsi takılarak kapatılmıştır. Diyalizi yapılacak EPS solüsyonundan 5 ml alınarak, tüpe eklendikten sonra, tüpün açık olan ucu da aynı şekilde ip ile

bağlanıp, diyaliz klipsi ile kapatılmıştır. Daha sonra diyaliz tüpü, 150 rpm hızla karıştırılan distile su içerisinde 24 sa süresince bekletilmiş ve içinde bulunduğu su 4 sa'da bir değiştirilerek taze distile su ile yenilenmiştir (Temizkan ve Arda, 2007).

Protein analizi için, diyalizi yapılan EPS solüsyonundan 0.5 ml alınarak geniş çaplı (18x20 mm) bir deney tüpüne aktarılmış ve üzerine 2.5 ml C reaktifi (A reaktifi + B reaktifi) eklendikten sonra vortekslenmiş ve oda ısısında 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda solüsyona, 0.25 ml folin (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Merck) eklenmiş ve solüsyon vortekslenildikten sonra, oda ısısında 30 dk bekletilmiştir. Bu süre boyunca, proteinlerin yapısındaki aromatik halka içeren amino asitler, alkali ortam ve bakır varlığında folin reaktifinde bulunan fosfomolibdotungustik asiti indirgeyerek mavi renkli bir kompleks oluştururlar. Reaksiyon sonucunda oluşan mavi rengin koyuluğu spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific, Multitaskan GO) 500 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Toplam protein miktarı, spektrofotometrede ölçülen absorbans değerinin, standart eğriye ait denklemde yerine koyulması ile hesaplanmıştır. Ölçümler 4 tekrarlı yapılmıştır.

Standart eğriyi oluşturmak için öncelikle 100 mg sığır serum albuminin (BSA), %0.9'luk fizyolojik tuzlu su (FTS) ile 100 ml'ye tamamlanması ile stok bir çözelti hazırlanmıştır. Bu stoktan seyreltmeler yapılarak %1, %2.5, %5, %10, %15 ve %20'lik standart protein çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilere Lowry yöntemi uygulanmıştır. Kör referans olarak %0.9'luk FTS kullanılmıştır. Her bir konsantrasyona ait absorbans değerleri ile standart grafik çizilmiş ve eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Standart protein konsantrasyonları ile hazırlanmış standart eğri ve denklemi.

3.4.2.3. *MnO_x Miktarının Tespiti*

Kültürde bulunan MnO_x miktarının tespiti için her örnekleme saatinde deney düzeneğinden alınan bakteri kültürüne, 1:5 oranında (bakteri kültürü:solüsyon) %0.04'lük LBB solüsyonu eklenerek vortekslenmiş, ardından 10 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Sonrasında bakterilerin ve bakteriyel ürünlerin ölçümü etkilememesi için kültür-LBB solüsyon karışımı 10.000 rpm`de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvının renk koyuluğu UV spektrometre cihazında 620 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kör referans olarak, 1:5 oranında LBB solüsyonu eklenmiş steril MnOB besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin abiyotik oksidasyonu da göz önünde bulundurularak, korozyon deney düzeneğinin işletilmeye başlandığı saatten itibaren, ölçümlerde kör referans olarak kullanılacak MnOB besiyeri de kültür ile aynı koşullarda bekletilmiştir. Tüm spektrometrik ölçümler 2 tekrarlı yapılmıştır. MnO_x miktarı, spektrofotometrede ölçülen absorbans değerinin, KMnO₄ standart eğrisine ait denklemde yerine konulması ile hesaplanmıştır.

Kupon yüzeyinde biriken MnO_x miktarının tespiti için ise kuponun her iki yüzeyinde oluşan biyofilm tabakası steril eküvyon ile toplanarak içerisinde steril 10 ml distile su bulunan santrifüj tüpüne alınmış ve 60 sn vortekslenmiştir. Daha sonra bu solüsyondan alınan örnek ile LBB solüsyonu kullanılarak yukarıda anlatıldığı şekilde spektrometrik ölçümler yapılmış ve MnO_x miktarı tespit edilmiştir. Kültür ile aynı koşullarda inkübe edilen steril MnOB besiyeri ise kör referans olarak kullanılmıştır.

3.4.2.4. *Mn⁺², Cl⁻ ve pH Parametrelerinin Tespiti*

Deney düzeneğindeki bakteri kültüründe bulunan Mn⁺² ve Cl⁻ miktarı, fotometre cihazı (Lovibond, MD600) ile ölçülmüştür.

Deney düzeneğindeki bakteri kültürünün pH değeri, pH metre cihazı (Denver Instrument, Meridian MR-10) ile ölçülmüştür.

3.4.2.5. *Korozyon Hızı Hesabı*

Martenzitik paslanmaz çelik kuponların korozyon hızı, deney öncesi ve sonrası ölçülen ağırlık farkı ile hesaplanmıştır. Deney süresince her örnekleme saatinde düzenekten çıkarılan 3 adet kuponun yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakası ve korozyon ürünleri eküvyon ile alınarak bakteri sayımı, EPS eldesi ve MnO_x miktarının tespiti amacı ile kullanılmıştır. Daha sonra kuponlar, HNO₃ çözeltisi (1 hacim %67'lik HNO₃ + 3 hacim distile su) içeren beher içine

konularak ultrasonik su banyosunda (Alex) 220 V`de 2-5 dk bekletilmek suretiyle temizlenmiş, distile su ile yıkanmış ve %100`lük etanol ile muamele edildikten sonra Pasteur fırınında 70°C`de kurutulmuştur (Sheng ve diğ., 2007). Deney öncesi ve sonrası elde edilen ağırlık değerleri arasındaki fark, ağırlık kaybı olarak not edilmiştir. Korozyon hızı, Denklem 3.1`de belirtilen formül kullanılarak hesaplanmıştır (ASTM G1-90, 1999).

$$\text{Korozyon hızı (mm/yr)} = (K \times W) / (A \times t \times d)$$

$$\text{mm/yr} = \text{mm/yıl}$$

$$K = 8.76$$

$$W = \text{ağırlık kaybı (mg)}$$

$$A = \text{alan (cm}^2\text{)}$$

$$t = \text{deney süresi (sa)}$$

$$d = 7.87 \text{ g/cm}^3$$

(3.1)

3.4.2.6. SEM Analizleri

Kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm ve korozyon ürünleri SEM analizi ile incelenmiştir. Bu amaç ile SEM analizi için düzeneden çıkarılan kuponlar, öncelikle +4°C`de %2.5 glutaraldehit çözeltisinde 1 sa bekletilerek fikse edilmiştir. Daha sonra birkaç kez steril bidistile suya daldırılmış ve ardından suyun uzaklaştırılması için etanol serisi (%30, %50, %80 ve %95) içerisinde 10`ar dk bekletilmişlerdir. Bekleme süresi sonunda kuponlar, havada kurumaya bırakılmıştır (Campanac ve diğ., 2002). İnceleme öncesi kuponların yüzeyi 15 nm kalınlıkta altın-palladyum (Ø57mm x 0.1mm) ile kaplanmış ve örnekler SEM cihazında (FEI Quanta FEG 450) incelenmiştir.

3.4.2.7. XRD Analizleri

XRD analizlerinde kullanılmak üzere, 240 ve 792. sa`larda deney düzeneğinin dibine çöken tortulardan örnekler alınmıştır. Deney sonunda bu örnekler Pasteur fırınında 60° derecede kurutulmuş, elde edilen toz numuneler XRD analizine gönderilmiştir. Toz örneklere ait fazların yapısı, PANalytical X-Pert PRO` marka XRD cihazında karakterize edilmiştir. Analiz çalışması; Cu K - alfa radyasyonunda, 2 teta açısında, 45 kV gerilim, 40 mA akım, 1°/dk`lık tarama hızında ve 18-100° tarama aralığında yürütülmüştür.

3.4.3. Laboratuvar Ölçekli Kontrol Düzeneginin Kurulumu, İşletilmesi ve Gerçekleştirilen Analizler

MnOB besiyerinin, AISI 415 martenzitik paslanmaz çeliğin korozyonuna etkisi laboratuvar ölçekli steril kontrol düzeneginde incelenmiştir. Kontrol düzenegi, Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi laboratuvar ölçekli deney düzenegine benzer şekilde 2 l hacimli steril cam beher, kupon taşıyıcı ve kuponlar ile birlikte deney ortamından oluşmaktadır. Bununla birlikte, laboratuvar ölçekli deney düzeneginden farklı şekilde, deney ortamı olarak steril MnOB besiyeri içermektedir.

Kuponların MnOB besiyeri ile temas ettiği an, deney süresi olarak başlatılmıştır. Düzenek kurulduktan sonra, üzeri steril alüminyum folyo ile kapatılmış ve manyetik bir karıştırıcı (IKA, C-Mag HS 10) üzerine konmuştur. Ardından karıştırıcı, sıcaklığı 28°C derece olan bir etüvün içine konmuş ve deney süresince deney ortamı 150 rpm hızla karıştırılmıştır.

Kontrol düzeneginin işletimi, deney düzenegi ile eş zamanlı olarak 792 sa süresince gerçekleştirilmiştir. Düzeneginin sterilitesini kontrol etmek amacı ile deney süresince her hafta R2A besiyerine ekim yapılmıştır. Korozyon analizleri için 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 300, 360, 456, 624 ve 792. sa’larda kontrol düzeneginden 4 adet kupon çıkartılmıştır. Kontrol düzeneginden çıkarılan 3 adet kuponun yüzeyi Bölüm 3.4.2.5’de anlatıldığı şekilde temizlenmiş, deney öncesi ve sonrası ağırlık ölçümleri ile bu 3 kuponun ağırlık kayıpları ve korozyon hızları hesaplanmıştır. Dördüncü kupon ise korozyon ürünlerinin tespiti amacıyla XRD analizi için ayrılmıştır. Aynı örnekleme saatlerinde, kontrol düzeneginden alınan deney ortamının Mn^{+2} , Cl^- ve pH değerlerine ek olarak MnO_x miktarı da tespit edilmiştir.

3.4.3.1. MnO_x Miktarının Tespiti

Deney ortamı olan steril MnOB besiyerindeki MnO_x miktarı, bölüm 3.4.2.3’de anlatılan prosedüre uygun olarak tespit edilmiştir.

3.4.3.2. Mn^{+2} , Cl^- ve pH Parametrelerinin Tespiti

Kontrol düzenegindeki deney ortamının Mn^{+2} , Cl^- ve pH değerleri, Bölüm 3.4.2.4’de anlatıldığı şekilde tespit edilmiştir. Ek olarak, düzenegine yerleştirilen metal kuponlarının besiyerinin pH değerine etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla, kupon içermeyen besiyeri kontrol düzenegi ile aynı koşullarda tutularak deney süresince pH değerleri ölçülmüştür.

3.4.3.3. Korozyon Hızı Hesabı

Deney süresince belirli saatlerde, kontrol düzeneğinden çıkartılan 3 adet kuponun deney öncesi ve sonrası ağırlık kayıpları belirlenerek korozyon hızları hesaplanmıştır. Kupon temizliği ve korozyon hızı hesabı bölüm 3.4.2.5’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.4.3.4. SEM Analizi

Kontrol düzeneğindeki kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm ve korozyon ürünleri SEM analizi ile incelenmiştir. Bu amaç ile her ölçüm saatinde düzeneden çıkarılan kuponlar, Bölüm 3.4.2.8`de anlatıldığı şekilde hazırlanarak analiz edilmiştir.

3.4.3.5. XRD Analizi

XRD analizinde kullanılmak üzere, son ölçüm saatinde kontrol düzeneğinden çıkarılan ve yüzeyinde tabakalaşma gözlemlenen bir adet kupon, XRD analizi için kullanılmıştır. Kupon yüzeyindeki ince tabakaya ait fazların yapısı, Bölüm 3.4.2.8`de anlatıldığı şekilde karakterize edilmiştir.

3.5. İSTATİKSEL ANALİZ

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen istatistiksel analizlerde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır.

Bakteri sayıları, EPS’deki toplam karbonhidrat ve toplam protein miktarları, MnO_x miktarı; Mn^{+2} , Cl^- ve pH parametreleri ile AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponlara ait ağırlık kaybı ve korozyon hızı değerleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon katsayısı testi ile gösterilmiştir. Deney ve kontrol düzeneklerindeki verilerin ortalamalar açısından farkının değerlendirilmesi ise Mann-Whitney U testine göre yapılmıştır.

3.6. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.6.1. MnOB Besiyeri

Amonum sülfat $((NH_4)SO_4)$

0.5 g

Sodyum nitrat (NaNO_3)	0.5 g
Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4)	0.5 g
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
Manganez sülfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	3 g
Sitrik asit	10 g
Sükroz	2 g
Tripton	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

pH = 6.8 (10 N NaOH ile ayarlanır), 121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

Bu besiyerindeki yaklaşık Mn(II) konsantrasyonu 975.15 mg/l'dir.

3.6.2. LBB Besiyeri

Maya özütü	0.5 g
Pepton	2 g
Demir sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.001 g
Manganez sülfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.15 g
0.1 M Hapes	100 ml
Agar	15 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

pH = 7.2 (10 N NaOH ile ayarlanır), 121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.3. PYG Besiyeri

Pepton	0.25 g
Maya özütü	0.25 g
Glukoz	0.25 g
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.6 g
Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.07 g
Mangan sülfat pentahidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.1 g
Agar	15 g

Distile su 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.4. LB Besiyeri

Maya özütü	5 g
Tripton	10 g
NaCl	10 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.5. R2A Besiyeri

Maya özütü	0.5 g
Pepton	0.5 g
Kazein hidrolizatı	0.5 g
Glukoz (C ₆ H ₁₂ O ₆)	0.5 g
Nişasta	0.5 g
Pirüvik asit (C ₃ H ₃ O ₃ Na)	0.3 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	0.3 g
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.05 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.6. Nitrat Oluşum Besiyeri

Sodyum nitrit (NaNO ₂)	1 g
Dipotasyum fosfat (K ₂ HPO ₄)	1 g
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	0.3 g
Sodum karbonat (Na ₂ CO ₃)	1 g

Demir sülfat (FeSO ₄)	0.4 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Bu besiyerinin steril edilmesine gerek yoktur.

3.6.7. Oksidasyon-Fermentasyon Besiyeri

Pepton	2 g
D-Glikoz	10 g
Brom timol mavisi	0.03 g
Agar	2.5 g
Sodyum diklorid (NaClO ₂)	5 g
Dipotasyum fosfat (K ₂ HPO ₄)	0.3 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.8. Triple-Sugar-Iron Agar

Et Özütü	3 g
Maya Özütü	3 g
Pepton	15 g
Proteaz pepton	5 g
Laktoz	10 g
Sakkaroz	10 g
Dekstroz	1 g
Ferro sülfat (FeSO ₄)	2 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.9. Simmons's Sitrat Besiyeri

Amonyum dihidrojen fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1 g
Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4)	1 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Sodyum sitrat	2 g
Magnezyum sülfat (MgSO_4)	0.2 g
Agar	15 g
Brom timol mavisi	0.08 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.10. Clark-Lubs Besiyeri

Pepton	7 g
Laktoz	10 g
Sodyum desoxycholate	1 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.11. Glukozlu Buyyon

Nutrient broth	100 ml
Glukoz	0.5 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121°C'de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.12. Jelatin Besiyeri

Nutrient Broth	100 ml
Jelatin	4 g

Distile su 1000 ml`ye tamamlanmıştır.

121°C`de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.13. Nişastalı Agar

Pepton	5 g
Et özütü	3 g
Nişasta	2 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml`ye tamamlanmıştır.

121°C`de ve 1 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir.

3.6.14. Kovac`s Ayıracı

Amil Alkol	150 ml
<i>p</i> -dimetilaminbenzaldehit	10 g
Konsantre hidroklorit asit	50 ml

p-dimetilaminbenzaldehit, amil olkol içerisinde çözülür ve ardından hidroklorit asit eklenir.

3.6.15. Protein Tayininde Kullanılan Reaktifler

3.6.15.1. A Reaktifi: %2 Na₂CO₃ (0.1 N NaOH içerisinde)

0.1 N NaOH;

NaOH	4 g
Bidistile Su	100 ml`ye tamamlanmıştır.

%2 Na₂CO₃;

Na ₂ CO ₃	2 g
0.1 N NaOH çözeltisi	100 ml`ye tamamlanmıştır.

3.6.15.2. B Reaktifi: %0.5 CuSO₄.5H₂O (%1 Dipotasyum Tartarat İçerisinde)**%1 dipotasyum tartarat;**

Dipotasyum tartarat	1 g
Bidistile su	100 ml`ye tamamlanmıştır.

%0.5 CuSO₄.5H₂O (Bu çözelti her gün taze olarak hazırlanmıştır);

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05 g
%1 dipotasyum tartarat çözeltisi	10 ml`ye tamamlanmıştır.

3.6.15.3. C Reaktifi (Alkali Bakır Çözeltisi)

A reaktifi	50 ml
B reaktifi	1 ml

Bu çözelti kullanımından hemen önce, taze olarak hazırlanmıştır.

3.6.16. %0.04`lük LBB Solüsyonu

Leucoberbelin Blue I	0.1 g
45 mM/l Asetik asit	250 ml

3.6.17. 3N Ayarlı Nitrik Asit Çözeltisi

HNO ₃	207.73 ml
Distile su	1000 ml`ye tamamlanmıştır.

3.6.18. 10N Ayarlı NaOH Çözeltisi

NaOH	40 g
Distile su	250 ml`ye tamamlanmıştır.

3.6.19. Fenolftalein İndikatör Çözeltisi

Fenolftalein	0.5 g
%95 Etil alkol	50 ml
Distile su	50 ml

3.6.20. Korozyon Analizinde Kullanılan Asit Çözeltisi%67'lik HNO₃

1 hacim

Distile su

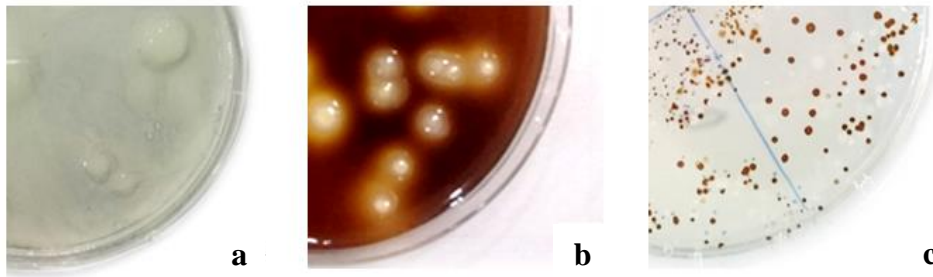
3 hacim



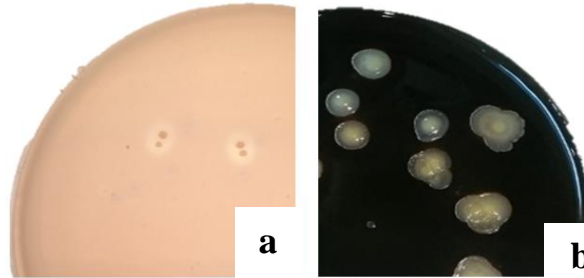
4. BULGULAR

4.1. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU

MnOB'lerin izolasyonu için LBB, MnOB ve PYG olmak üzere 3 farklı besiyeri kullanılmıştır. Hem su hem de biyofilm örneklerinin ekildiği bu 3 farklı besiyerinde de üreme gözlenmekle birlikte, besiyerlerinde oluşan koloni morfolojilerinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). PYG ve MnOB besiyerlerinde oluşan kolonilerin boyutlarının benzerlik gösterdiği; beyaz renkte ve visköz yapıda morfolojiye sahip oldukları; ancak MnOB besiyerinde PYG'den farklı olarak besiyeri renginin 3 haftalık inkübasyon sonunda tamamen kahverengi-siyah renge döndüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). LBB besiyerinde ise diğer 2 besiyerinden farklı olarak bakteri kolonilerinin 0.3-0.5 cm boyutlarında, yumuşak ve kahverengi morfolojiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

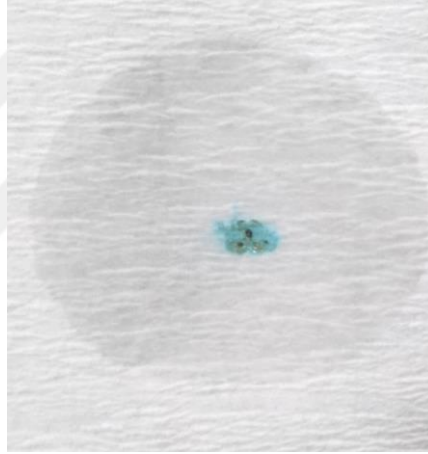


Şekil 4.1: PYG (a), MnOB (b) ve LBB (c) besiyerinde MnOB şüpheli bakteri kolonilerinin morfolojileri.



Şekil 4.2: MnOB besiyerinde oluşan kolonilerin a) dört günlük ve b) üç haftalık inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü.

Besiyerlerinde oluşan kolonilerin MnOB olup olmadığı, filtre kağıdı üzerinde LBB spot test ile saptanmıştır. Renksiz olan LBB solusyonu, MnOB şüpheli kahverengi koloniler ile tepkime verir vermez mavi renge dönüşmüştür (Şekil 4.3). Mavi renk alan koloniler, MnOB olarak kaydedilmiştir. LBB spot test sonucunda, LBB ve MnOB besiyerlerinde oluşan bakteri kolonilerinin PYG'dekilere kıyasla çok daha belirgin şekilde pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu durum, bu bakterilerin daha fazla miktarda MnO_x ürettiğine dolayısıyla da MnO_x üretme açısından daha aktif olduklarına işaret etmektedir. Bu doğrultuda MnOB besiyerinden 3 (İzolat 1, İzolat 2, İzolat 3); LBB besiyerinden ise 4 (İzolat 4, İzolat 5, İzolat 6, İzolat 7) farklı olmak üzere toplamda 7 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. MnOB olarak tespit edilen 7 adet bakteri izolatının tamamı hidroelektrik santralden alınan su örneklerinden izole edilmiştir.



Şekil 4.3: MnOB şüpheli bakteri kolonisine ait pozitif LBB spot test görüntüsü.

4.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASINA YÖNELİK BELİRLENEN DENEYSEL KOŞULLAR

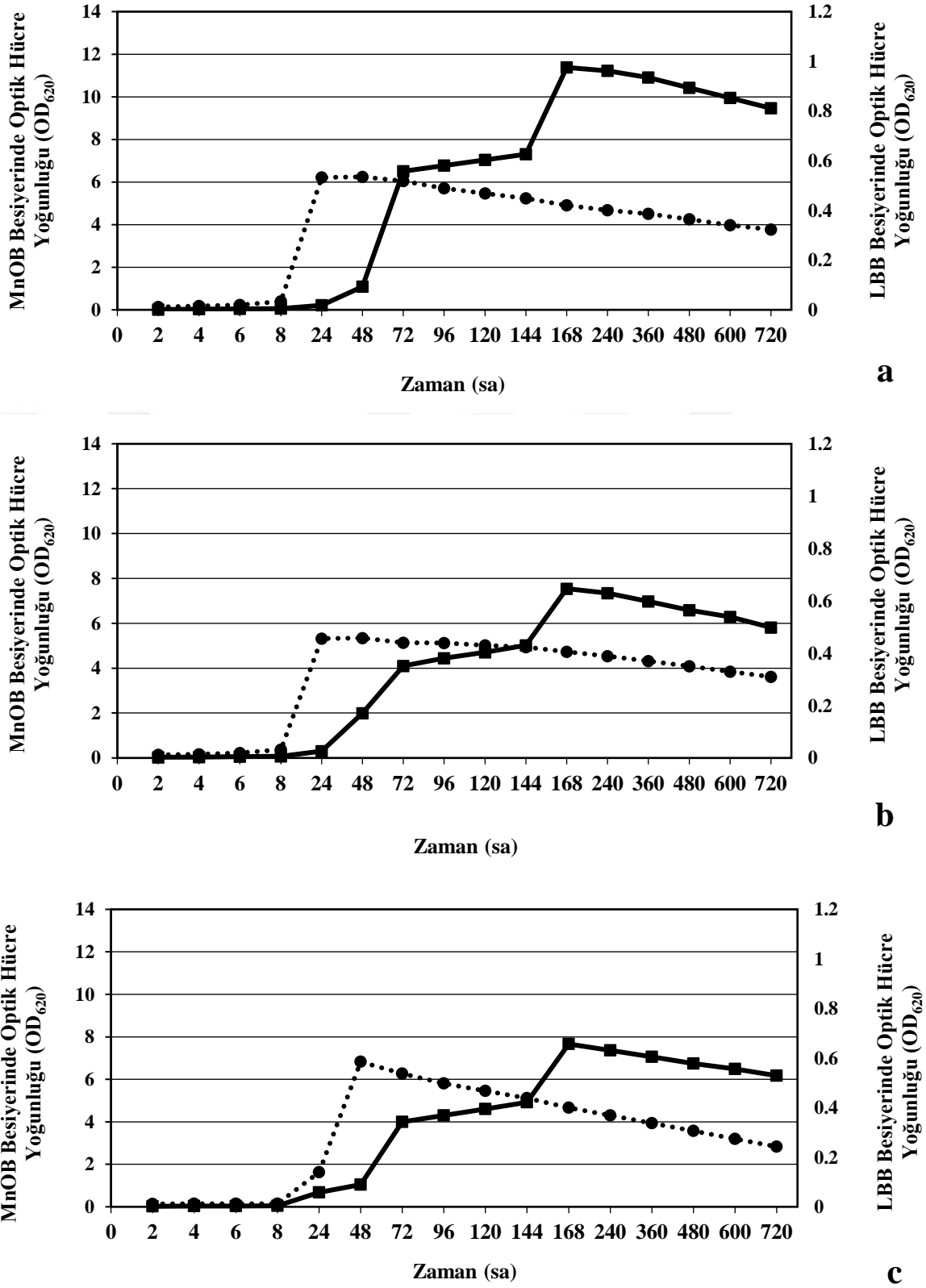
4.2.1. Korozyon Çalışmaları İçin Uygun Bakteri İzolatının ve Besiyerinin Seçimi

Korozyon çalışmalarında deney ortamı olarak kullanılacak besiyerinin ve beraberinde bakteri izolatının seçimi için izole edilen 7 bakteri izolatının sıvı LBB ve MnOB besiyerlerindeki üreme durumları ve beraberinde bu besiyerlerindeki Mn oksitleme aktiviteleri belirlenmiştir.

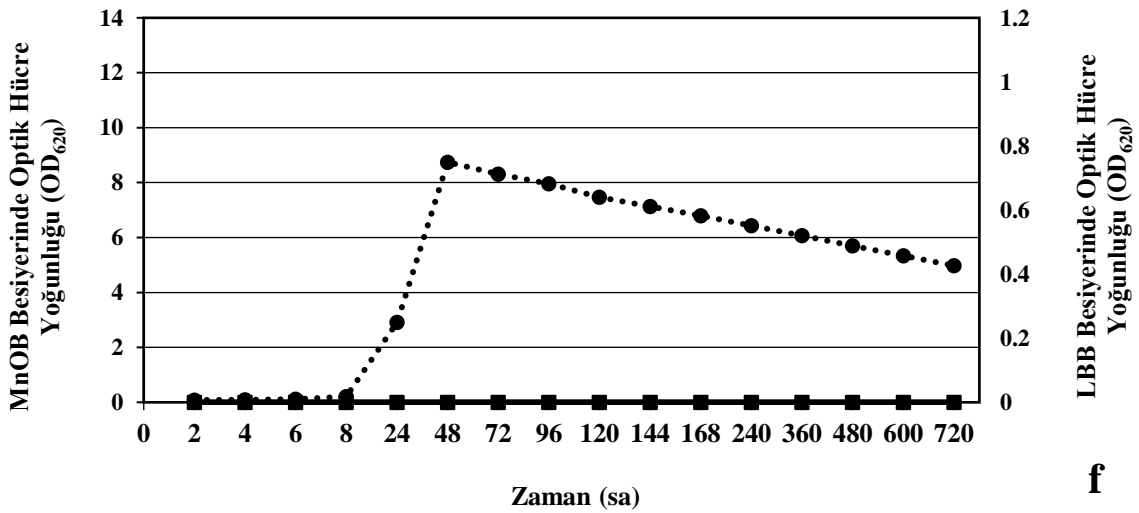
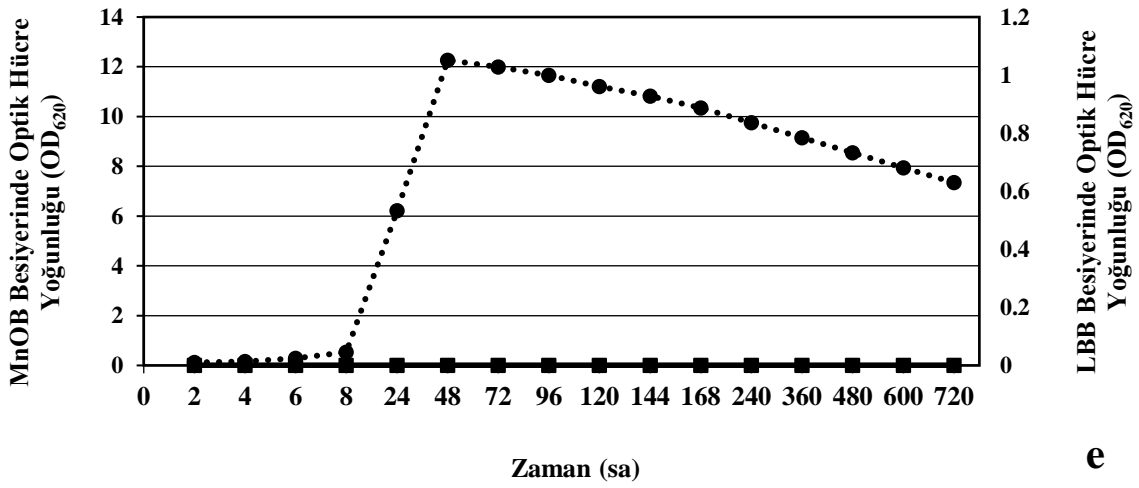
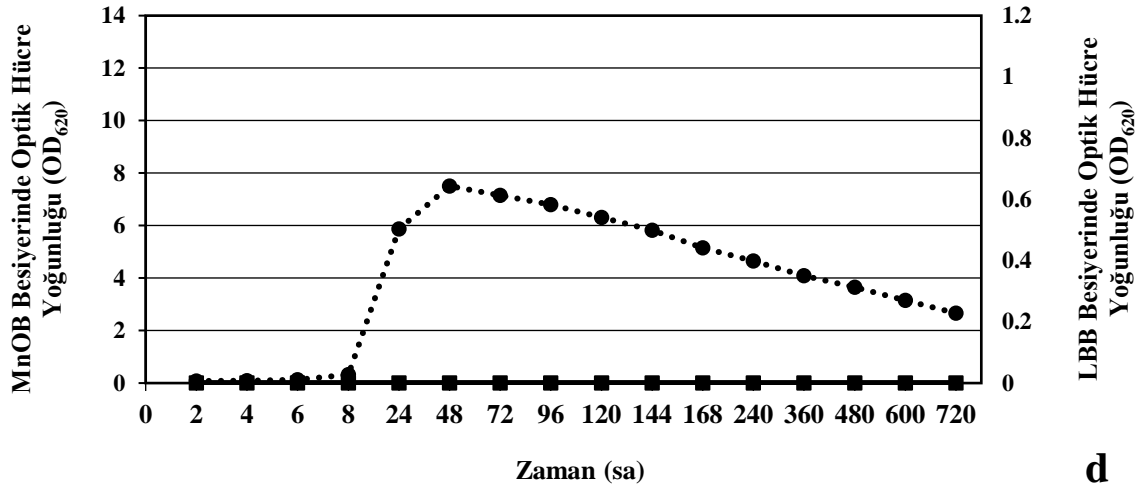
Bakteri izolatlarının MnOB ve LBB besiyerlerindeki üreme eğrileri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. LBB besiyerinde tüm izolatların ürettiği ve üreme eğrilerinin de genel itibari ile benzerlik gösterdiği söylenebilir. Tüm izolatların lag fazının, genel olarak inkübasyonun ilk 8 saati boyunca sürdüğü, sadece İzolat 7'nin 24. sa'te kadar devam ettiği saptanmıştır. İzolat 1 ve İzolat 2, log fazına 24. sa'da girerken, diğer izolatlar aynı faza 48. sa'da girmiştir. İzolatların logaritmik fazlarının minimum 16 sa, maksimum 40 sa sürdüğü; durgun fazlarının ise izolata göre değişiklik gösterdiği, hatta bazı izolatların (İzolat 3, 4, 5, 6 ve 7) belirgin bir durgun faz geçirmediği gözlemlenmiştir. 720 sa'lık inkübasyon sonunda en yüksek bakteri yoğunluğuna (0.62 OD) İzolat 1'in ulaştığı tespit edilmiştir.

MnOB besiyerinde üreyebilme yeteneğinde olan bakterilerin, bu besiyerinden izole edilen İzolat 1, İzolat 2 ve İzolat 3 ile birlikte LBB besiyerinden izole edilen İzolat 7 olduğu tespit edilmiştir. LBB besiyerinden izole edilen diğer bakterilerin (İzolat 4, İzolat 5 ve İzolat 6), MnOB besiyerinde üremedikleri saptanmıştır. İzolat 7'nin, LBB besiyerindekinden farklı olarak, MnOB besiyerindeki lag fazının oldukça uzun olduğu ve 168. sa'ya kadar sürdüğü tespit edilmiştir. İzolat 1, İzolat 2 ve İzolat 3'ün de LBB besiyerindeki üreme şekillerinin aksine MnOB besiyerinde difazik bir üreme şekli gösterdikleri belirlenmiştir. Bu üreme şekline göre de 24-72. sa'ları ile 144-168. sa'ları arasında 2 adet log fazına sahip oldukları gözlemlenmiştir. 720 sa'lık inkübasyon sonunda en yüksek bakteri yoğunluğuna (9.46 OD) İzolat 1'in ulaştığı belirlenmiştir.

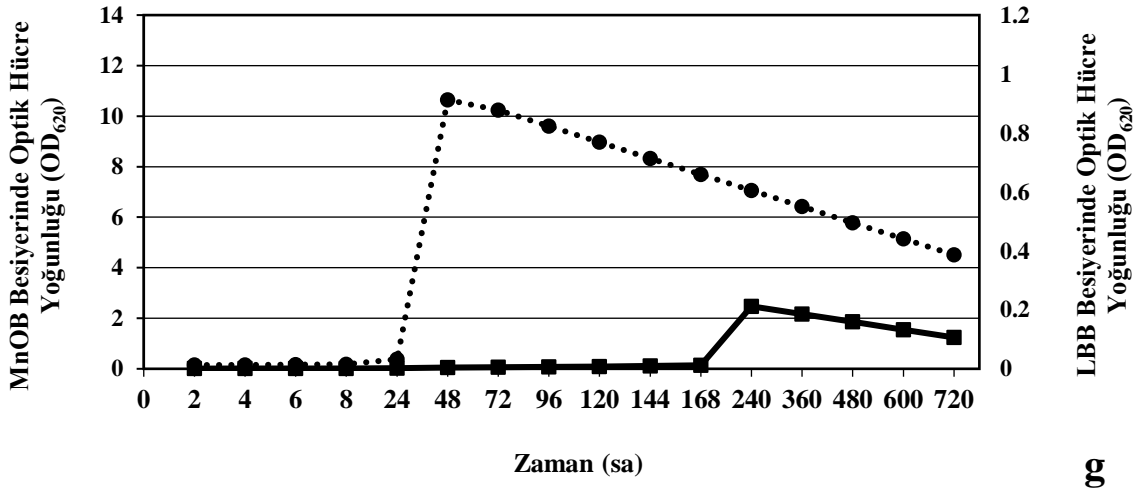
LBB besiyerindeki optik hücre yoğunluğu minimum 0.22, maksimum 0.62 OD; MnOB besiyerinde ise minimum 1.24, maksimum 9.46 OD olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler, izolatların MnOB besiyerindeki üremelerinin LBB'deki üremelerine göre çok daha yoğun olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.4: İzolat 1 (a), İzolat 2 (b), İzolat 3 (c), İzolat 4 (d), İzolat 5 (e), İzolat 6 (f) ve İzolat 7 (g) 'nin LBB (●●●●) ve MnOB (■■■■) besiyerindeki üreme eğrileri (OD₆₂₀).



Şekil 4.4 (devam): İzolat 1 (a), İzolat 2 (b), İzolat 3 (c), İzolat 4 (d), İzolat 5 (e), İzolat 6 (f) ve İzolat 7 (g) nin LBB ($\cdots\bullet\cdots$) ve MnOB ($\text{---}\blacksquare\text{---}$) besiyerindeki üreme eğrileri (OD_{620}).



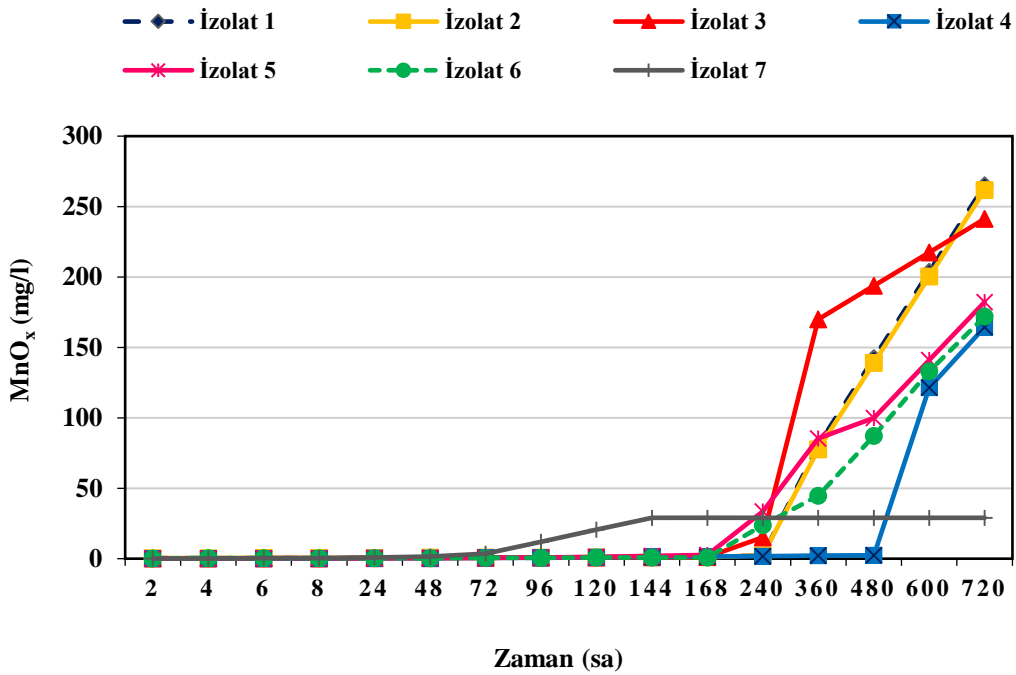
Şekil 4.4 (devam): İzolat 1 (a), İzolat 2 (b), İzolat 3 (c), İzolat 4 (d), İzolat 5 (e), İzolat 6 (f) ve İzolat 7 (g)'nin LBB (●●●●●) ve MnOB (■—■) besiyerindeki üreme eğrileri (OD₆₂₀).

İzole edilen 7 bakteri izolatının, Mn oksitleme yetenekleri hem MnOB hem de LBB besiyerinde spektrometrik olarak LBB solusyonu kullanılarak belirlenmiştir. Ancak MnOB kültürlerinden 24 sa sonunda ölçüm alınabilmesi için 10^{-274} a ulaşan sulandırım serilerinin yapılması gerekmiş ve elde edilen sonuçlar $KMnO_4$ standartına göre tutarsız sonuçlar vermiştir. Bu nedenle, MnOB besiyerinden elde edilen sonuçlar değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Yedi izolatın, LBB besiyerinde oluşturdukları MnO_x miktarlarının zamana bağlı değişimleri ise Şekil 4.5'te verilmiştir. Her bir bakteri izolatının farklı zamanlarda farklı miktarlarda MnO_x oluşturduğu saptanmıştır. İzolat 7'nin, Mn oksidasyonuna diğer izolatlarla göre daha erken başladığı (72. sa), ancak diğer izolatlarla kıyasla ürettiği MnO_x miktarının oldukça düşük olduğu ve 144. sa'dan itibaren de MnO_x üretiminin durağan olduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatlarla kıyasla, Mn oksidasyonuna en geç İzolat 4 başlamış ve 480. sa'da ürettiği MnO_x miktarı 2.44 mg/l olarak belirlenmiştir. 720. sa'lık inkübasyon sonrasında ise İzolat 4 tarafından üretilen MnO_x miktarı 164.42 mg/l olarak saptanmıştır. İzolat 5 ve İzolat 6, Mn oksidasyonuna 168. sa'da başlamış olup, son örnekleme saatinde MnO_x konsantrasyonları sırasıyla 182.27 mg/l ile 171.92 mg/l olarak tespit edilmiştir. İzolat 1, İzolat 2 ve İzolat 3 ise Mn oksidasyonuna diğer izolatlarla kıyasla (İzolat 4 hariç) daha geç (240. sa) başlamalarına rağmen diğer izolatlardan daha yüksek miktarda MnO_x ürettikleri, dolayısıyla da daha fazla Mn oksitleme aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. İzolat 1 ve İzolat 2'nin 720. sa'lık inkübasyonun sonunda birbirlerine yakın miktarda MnO_x ürettiği belirlenmiştir (sırasıyla 265.16 mg/l ve 261.69 mg/l).

İzolat 3`ün ise 360. sa`da MnO_x üretiminde bir kırılma yaşamasına rağmen, 720. sa`nın sonunda İzolat 1 ve İzolat 2`ye yakın miktarda MnO_x ürettiği (241.33 mg/l) tespit edilmiştir.

MnOB izolatlarının LBB ve MnOB besiyerindeki üreme eğrileri ile birlikte LBB besiyerinde oluşturdukları MnO_x miktarları göz önüne alınarak, en aktif MnOB izolatının İzolat 1 olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, korozyon deneylerinde bu bakteri izolatının kullanılmasına ve deney ortamı olarak da bu izolatın üremesini en fazla destekleyen MnOB besiyerinin seçilmesine karar verilmiştir.

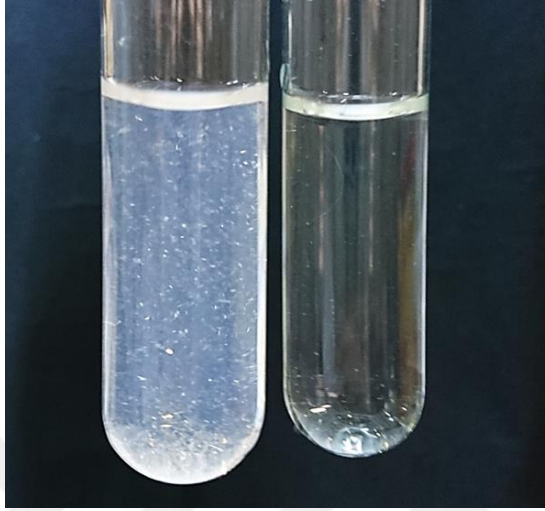


Şekil 4.5: MnOB izolatları tarafından LBB besiyerinde üretilen MnO_x miktarlarının zamana bağlı değişimi.

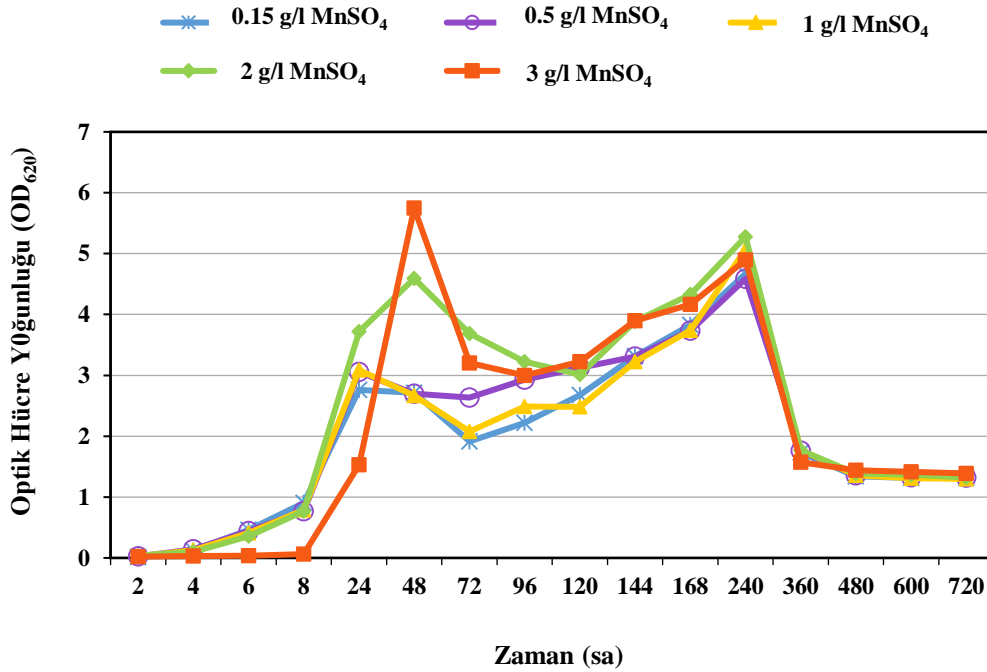
4.2.2. Korozyon Çalışmalarında Kullanılacak Besiyeri İçin Maksimum Mn Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Korozyon deneylerinde kullanılmak üzere; MnOB besiyeri, farklı Mn konsantrasyonlarında hazırlanarak İzolat 1`in büyümesini sınırlandırmayan ve maksimum üremenin gözlemlendiği konsantrasyon belirlenmiştir. Bu amaç ile MnOB besiyeri, 8 farklı Mn konsantrasyonu içerecek şekilde; 0.15, 0.5, 1, 2, 3, 3.5, 4 ve 4.7 g/l $MnSO_4$ ile hazırlanmıştır. Besiyeri hazırlığı sırasında 3.5, 4 ve 4.7 g/l $MnSO_4$ içeren MnOB besiyerlerinde kristalleşme görülmüştür (Şekil 4.6). Bu

nedene İzolat 1, kristalleşme gözlenmeyen 0.15, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l $MnSO_4$ içerikli MnOB besiyerlerine ekilerek 720 sa süresince üreme durumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6: 4.7 g/l $MnSO_4$ içeren (solda) ve 3 g/l $MnSO_4$ içeren (sağda) MnOB besiyeri.



Şekil 4.7: İzolat 1'in beş farklı $MnSO_4$ konsantrasyonu (0.15, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) ile hazırlanmış MnOB besiyerlerindeki üreme eğrileri.

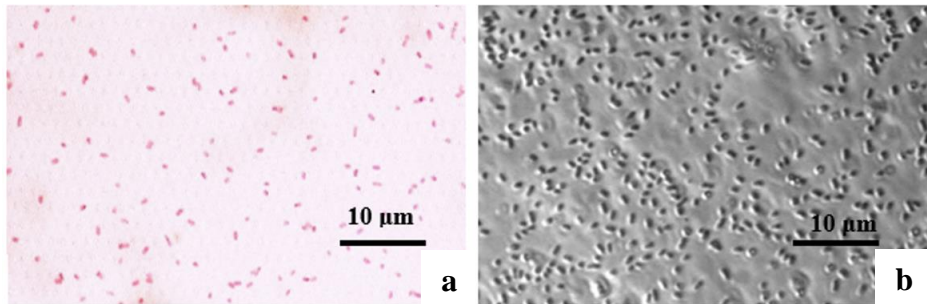
İzolat 1'in tüm Mn konsantrasyonlarında birbirine benzer şekilde difazik üreme gösterdiği, bunun yanı sıra farklı Mn konsantrasyonlarının difazik üreme şekline etki etmemekle birlikte üreme fazlarının sürelerinde kaymaya neden olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; 0.15, 0.5, 1 ve 2 g/l MnSO₄ içeren MnOB besiyerlerinde bakterinin 1. lag fazının 8. sa`ya kadar devam ettiği, ardından 8-24. sa`lar arasında bakterinin 1. log fazına geçtiği ve 24-120. sa`lar arasında ise 2. lag fazına girdiği görülmektedir. 3 g/l MnSO₄ içeren MnOB besiyerinde ise diğer konsantrasyonlardan farklı olarak, bakterinin 1. lag fazının 24. sa`ya kadar devam ettiği, 1. log fazının 24-48. sa`lar arasında sürdüğü ve ardından bakterinin 48-120. sa`lar arasında 2. lag fazını geçirdiği görülmektedir. 2. log fazı ile ölüm fazının ise tüm konsantrasyonlar için aynı zaman aralıklarında (sırasıyla 48-120. sa ve 120-240. sa`lar arası) olduğu tespit edilmiştir. En yüksek bakteri yoğunluğuna (5.74 OD) 3 g/l MnSO₄ içeren MnOB besiyerinde 48. sa`da ulaşılmıştır.

İzolat 1'in en fazla yoğunlukta üremesini sağlayan 3 g/l MnSO₄ içerikli MnOB besiyerinin, korozyon deneylerinde deney ortamı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3. MNOB İZOLATININ TANIMLANMASI

4.3.1. Seçilen Bakteri İzolatının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolat 1'in tanımlanması için öncelikle bakteri, Gram boyama yöntemi ile boyanmış ve Gram (-) çomak olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8a). Ardından faz-kontrast mikroskobunda canlı olarak incelenerek, hareket yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8b).



Şekil 4.8: İzolat 1'in ışık (a) ve faz kontrast (b) mikroskobundaki görüntüsü.

İzolat 1'e ait biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabına göre değerlendirilmiş ve izolatın Enterobacteriaceae ailesine dahil olduğu belirlenmiştir. Bu aileye ait bakteri türleri; su, toprak ve bitkilerden insan bağırsağına kadar doğada yaygın olarak görülmektedirler. Genel olarak bu türler, hem oksijenli (aerop) hem de oksijensiz (anaerop) ortamda yaşayabilen, flagellaya sahip, hareketli, 2-3 µm boyutunda, çomak şekilli, Gram negatif ve spor oluşturmeyen özelliktedirler (Buchanan ve Gibbons, 1974).

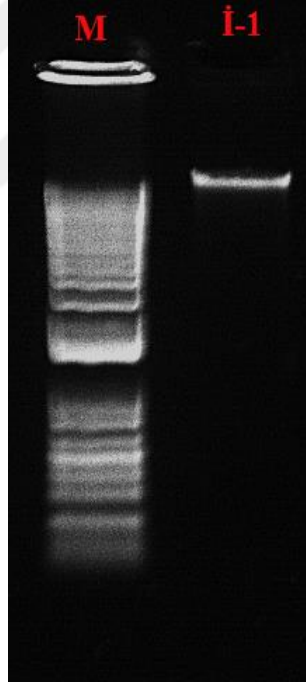
Tablo 4.1: İzolat 1'e ait morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

Testler	Test Sonucu
Hücre Morfolojisi	
Gram Özelliği	-
Hücre Şekli	Çomak
Biyokimyasal Testler	
Oksidaz	-
Katalaz	+
Hidrojen Sülfür	+
İndol	-
Hareket	-
Sitrat	-
Üç-Şekerli Demir (TSI)	+
Metil Red (MR)	-
Voges Proskauer (VP)	+
Glikoz ve fruktoz fermantasyonu	- Gaz oluşumu (+)
Laktoz, sukroz, galaktoz, mannit ve d-xylose fermentasyonu	+
	Gaz oluşumu (+)
Jelatin	-
Kazein	+
Nişasta Hidrolizi	+
Nitrat Redüksiyon	+

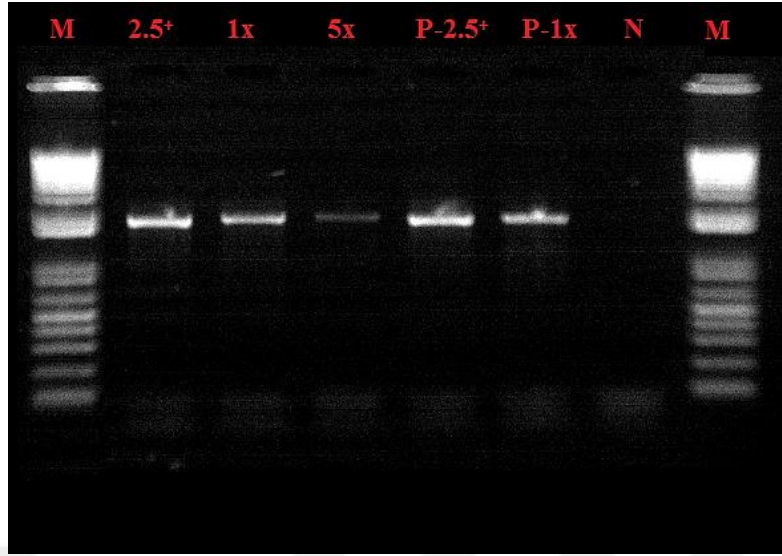
“+” pozitif, “-” negatif test sonucunu göstermektedir.

4.3.2. Seçilen Bakteri İzolatının Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

İzolat 1'in moleküler yöntemler ile tanısı için öncelikle genomik DNA'sı izole edilmiş ve elde edilen genomik DNA'nın jeldeki görünümü Şekil 4.9'da verilmiştir. Daha sonra, genomik DNA örneğine PZR yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen PZR ürünlerindeki DNA büyüklüğünün yaklaşık 1500 bp olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Ardından, elde edilen PZR ürünü, saflaştırma ve çift yönlü dizi analizi için Eurofins (Almanya) firmasına gönderilmiştir. Belirlenen dizinin kromatogramı, genel veritabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) bulunan dizilerle karşılaştırılarak filogenetik olarak en yakın tür seçilmiştir. Sonuç olarak İzolat 1, %98 benzerlik oranı ile *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 olarak belirlenmiştir. *Enterobacter* cinsinin bu bakteri türü, dahil olduğu Enterobacteriaceae ailesinin genel özelliklerini taşımaktadır (Duan ve diğ., 2015).



Şekil 4.9: İzolat 1'e ait genomik DNA örneğinin jeldeki görünümü (M: Markır).



Şekil 4.10: İzolat 1'e ait PZR örneklerinin jeldeki görünümü (M: Markır, P: Pozitif, N: Negatif).

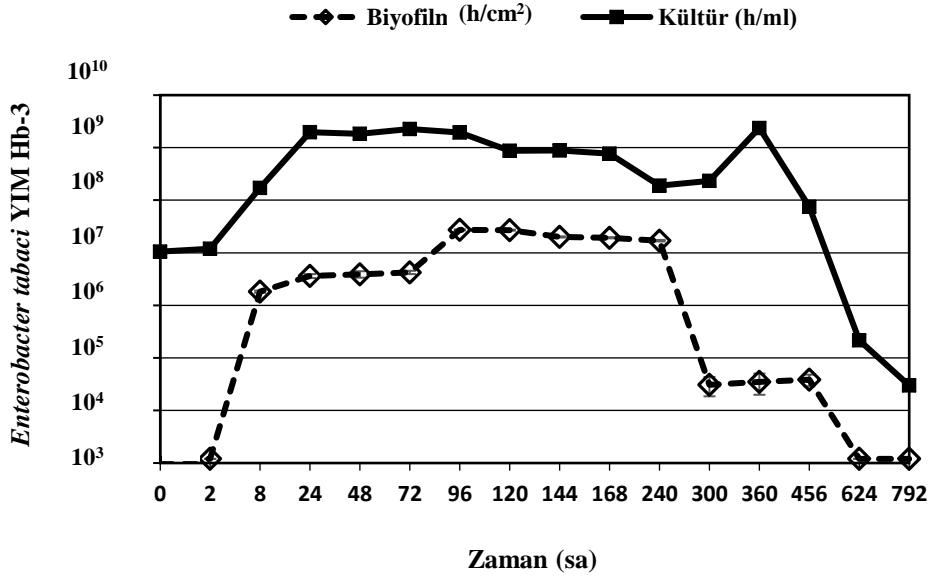
4.4. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON ÇALIŞMASI

4.3.1. Kültürdeki ve Biyofilmdeki Bakteri Sayıları

Deney süresince inkübasyonun belirli saatlerinde (2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 300, 360, 456, 624 ve 792. sa) martenzitik paslanmaz çelik kuponların yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakasından ve eş zamanlı olarak deney ortamı olan *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 kültüründen bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Biyofilmdeki ve kültürdeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakteri sayıları Şekil 4.11'de verilmiştir. Hem biyofilm hem de kültürdeki bakterilerin difazik üreme gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum, bakterilerin heterotrofik büyümenin ardından ölüm fazına girmediğine; bakterilerin Mn⁺ oksitleyerek kemolitotrofik olarak üremeye devam ettiğine işaret etmektedir.

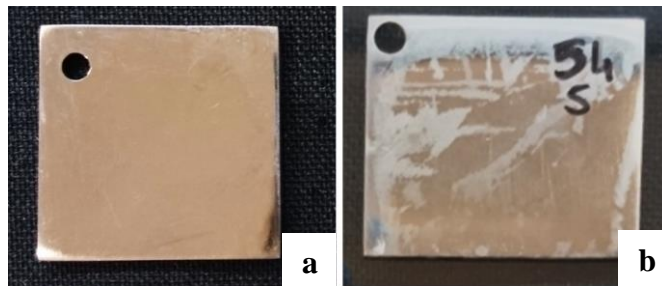
Deneyin başlatıldığı 0. sa'da kültürde $1.06 \times 10^7 \pm 4.32 \times 10^5$ h/ml olarak tespit edilen *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 sayısının 24. sa'da difazik üremenin 1. log fazı sonunda $1.96 \times 10^9 \pm 7.21 \times 10^7$ h/ml'ye ulaştığı saptanmıştır. Daha sonra, kademeli olarak 120 ve 240. sa'larda bakteri sayısında bir miktar azalma gözlenmekle birlikte, bunun akabinde bakterinin üremenin 2. log fazına girdiği ve bu fazın 360. sa'ya kadar devam ettiği, bakteri sayısının ise $2.4 \times 10^9 \pm 1.34 \times 10^8$ h/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Sonrasında ise bakteri ölüm

fazına girmiş ve son ölçüm saatinde (792. sa) bakteri sayısı $2.99 \times 10^4 \pm 6.43 \times 10^2$ h/ml olarak saptanmıştır.

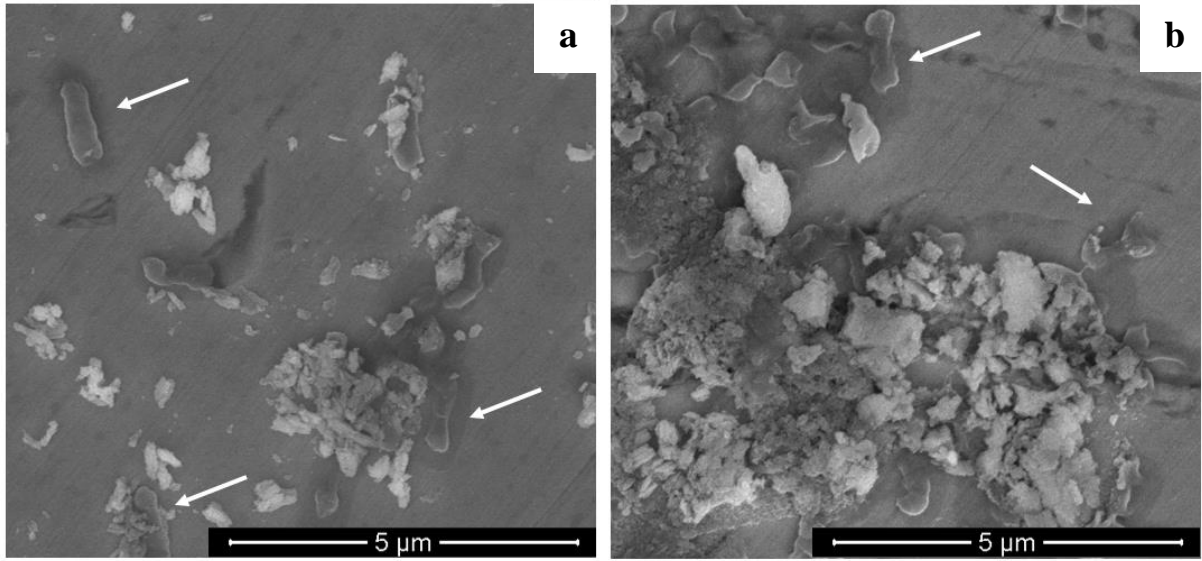


Şekil 4.11: Deney süresince kültürdeki ve biyofilimdeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin üreme eğrisi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Enterobacter tabaci YIM Hb-3 kültürüne maruz bırakılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde, deneyin 8. sa`dan itibaren gözle görülebilen ve yüzeyden kolayca alınabilen bir biyofilm tabakası oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12). SEM fotoğrafları da, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterilerinin paslanmaz çelik kuponların yüzeyine tutunabildiklerini ve kolonize olabildiklerini göstermektedir (Şekil 4.13).

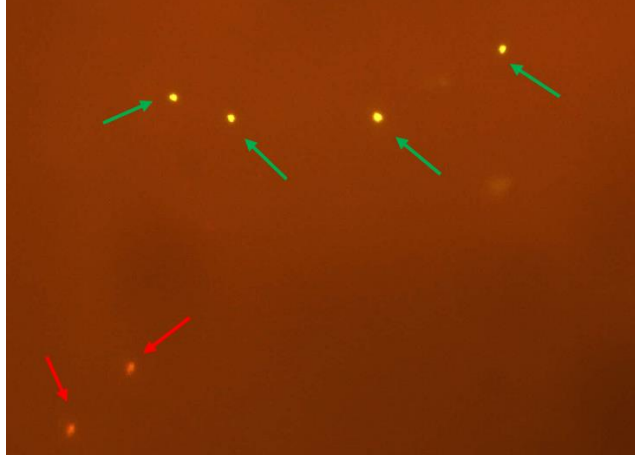


Şekil 4.12: AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponun deney öncesi (a) ve 8 sa`lık maruziyet sonrası (b) makroskobik görüntüsü.



Şekil 4.13: *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 kültürüne maruz bırakılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasının SEM görüntüleri; (a) 240. sa ve (b) 792. sa.

Örneklemenin 2. sa`tinde, biyofilmde hiç bakteri tespit edilmemekle birlikte, sonrasında bakterilerin 8. sa`ya kadar logaritmik fazda ürediği gözlemlenmiş ve bakteri sayısı $1.82 \times 10^6 \pm 8.65 \times 10^4$ h/ml olarak tespit edilmiştir. Sonrasında bakteriler 72. sa`ya kadar durgun fazda kalmıştır. Daha sonra ise bakteri sayısı artış göstererek $2.73.1 \times 10^7 \pm 5.89 \times 10^5$ h/ml ve 240. sa`ya kadar da anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 300. sa`da bakteri sayısında anlamlı bir düşüş olmuş ve $3.1 \times 10^5 \pm 9.64 \times 10^3$ h/ml olarak saptanmıştır. Ardından, 456. sa`ya kadar tekrar bakteri sayısında anlamlı bir değişiklik gözlenmez iken, kalan son iki örnekleme saatinde ise kültürel yöntemle bakteri tespit edilmemiştir. Ancak, son iki örnekleme saatine ait örneklere LIVE/DEAD kit uygulaması yapıldığında, canlı bakteri hücrelerinin var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: LIVE/DEAD kit uygulaması sonucunda, 624. sa biyofilm örneğinde bulunan canlı (yeşil) ve ölü (kırmızı) hücreler.

Kültürdeki ve biyofilmdeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 sayıları arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki olduğu ve kültürdeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 sayılarının, biyofilmdekilerden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $r = 0.628$, $p < 0.01$ ve $p < 0.01$).

Kontrol düzeneğindeki besiyerinin sterilitesini kontrol etmek amacı ile deney süresince her hafta yapılan ekimler sonucunda, Petri kutularında herhangi bir üreme gözlenmemiş olup, bu durum deney süresince kontrol düzeneğinin sterilitesinin korunduğunu göstermektedir.

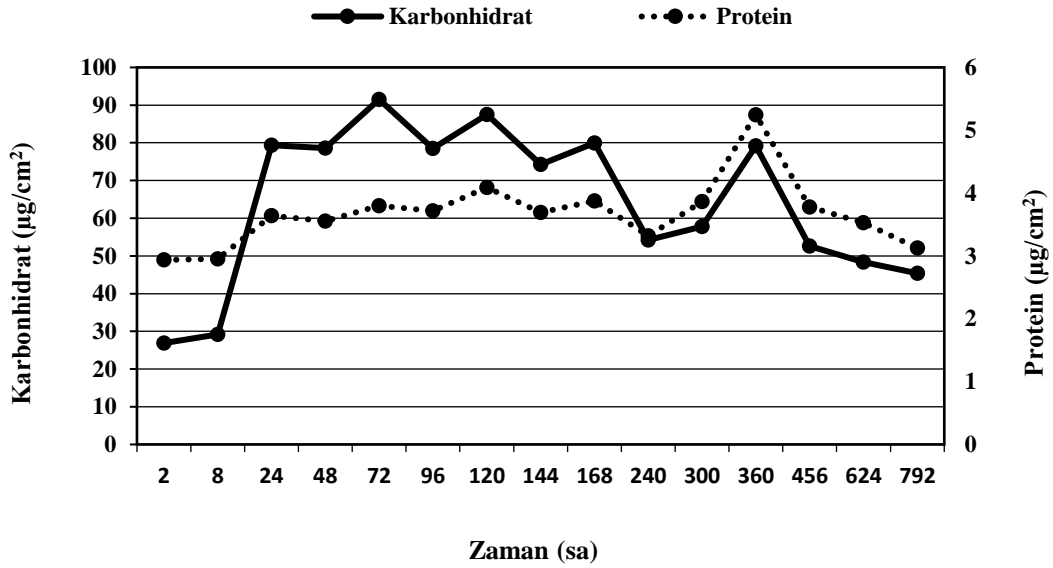
4.3.2. Biyofilmdeki Toplam Karbonhidrat ve Protein Miktarı

Deney düzeneğinden çıkartılan kuponların yüzeyindeki biyofilm tabakalarından elde edilen EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat ve protein miktarlarında zamana bağlı değişimler gözlemlenmiş olup, değişimler Şekil 4.15`te verilmiştir.

En yüksek karbonhidrat miktarı 72. sa`da $91.51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak tespit edilmiştir. Bu ölçüm saati sonrasında artış ve azalışlar gösteren karbonhidrat miktarı, 240. sa`da $54.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a kadar düşüş göstermiş, fakat ardından 360. sa`ya kadar yeniden artarak $79.22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ye ulaşmıştır. Sonrasında ise yeniden düşüşe geçerek son örnekleme saatinde $45.43 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak tespit edilmiştir.

Toplam protein miktarı 240. sa`ya kadar düşük bir seyirde artış ve azalışlar göstermiş; bu ölçüm saatinde $3.32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak tespit edilmiştir. 240-360. sa arasında yeniden artışa geçen protein miktarı 360. sa`de en yüksek değere ulaşarak $5.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak saptanmıştır.

EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat ve protein miktarları arasında anlamlı derecede fark olduğu ($p<0.01$) ve toplam karbonhidrat miktarının proteininkinden daha yüksek değerlerde olduğu saptanmıştır.



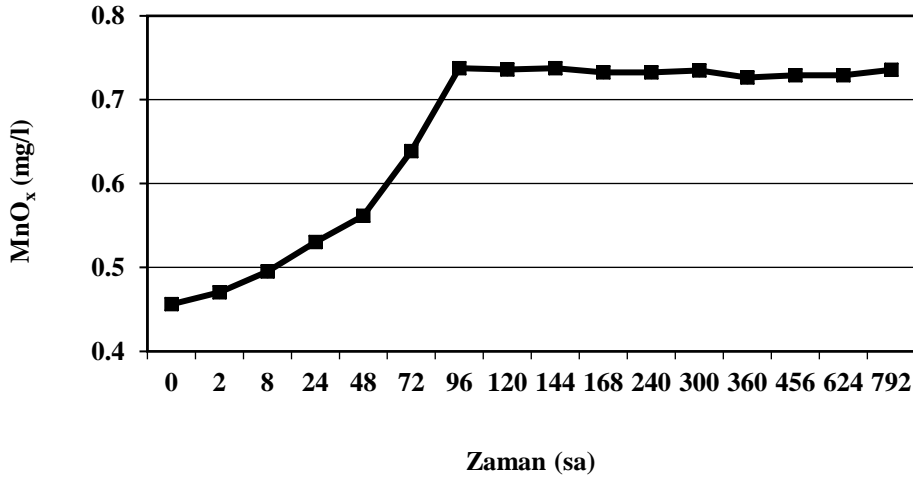
Şekil 4.15: Biyofilmdeki karbonhidrat ve protein miktarlarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

4.3.3. MnO_x Miktarı

Tüm örnekleme saatlerinde, deney düzeneğindeki kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasından ve deney ortamı olan bakteri kültüründen MnO_x ölçümleri için örnekler alınmıştır. Ancak, yapılan tüm sulandırmalara rağmen hiçbir örnekleme saatinde alınan örneğin rengi LBB boyası ile muamelede mavi renk oluşumu göstermemiştir. Bu nedenle test düzeneğinden MnO_x ölçümü gerçekleştirilememiştir.

Kontrol düzeneğinden ise steril MnOB besiyerinden deney düzeneği ile aynı örnekleme saatlerinde MnO_x ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Steril MnOB besiyerinin MnO_x miktarındaki

değişimler Şekil 4.16`da verilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. sa`da 0.45 mg/l olarak tespit edilen MnO_x miktarının 96. sa`da sabitlenerek 0.73 mg/l konsantrasyona ulaştığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.16: Kontrol düzeneğindeki steril MnOB besiyerinin MnO_x içeriğinin zamana bağlı değişimi.

4.3.4. Mn^{+2} , Cl^- ve pH Parametreleri

Deney süresince, deney düzeneğinden alınan *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 kültürünün ve kontrol düzeneğinden alınan steril MnOB besiyerinin Mn^{+2} ve Cl^- içerikleri ile pH değerleri ölçülmüştür.

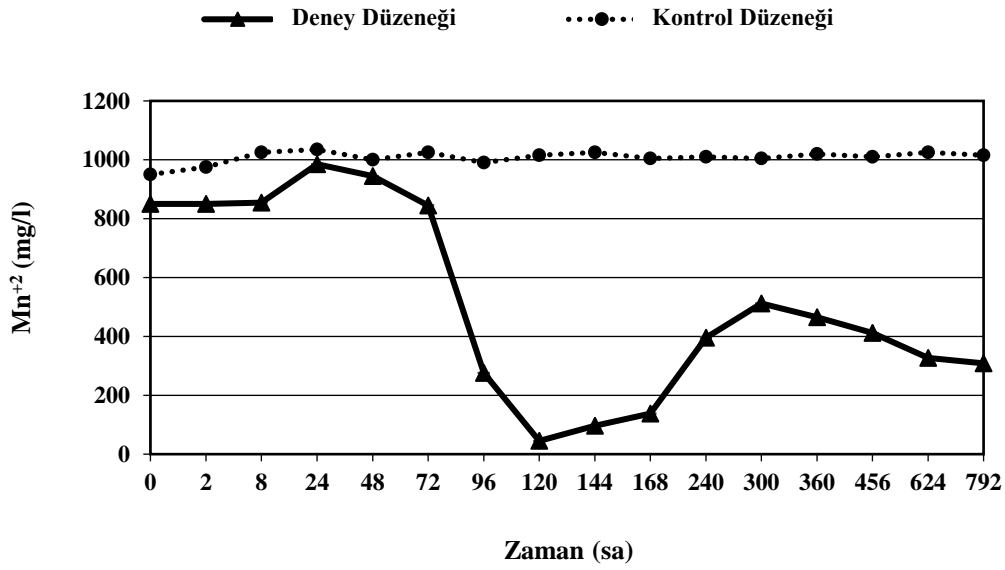
Deney ve kontrol düzeneklerinden elde edilen Mn^{+2} değerleri Tablo 4.2`de; Mn^{+2} değerlerinin değişim grafiği ise Şekil 4.17`de verilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. sa`da, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 kültüründeki Mn^{+2} konsantrasyonu 850 ± 0.01 mg/l olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bakteri kültüründeki Mn^{+2} konsantrasyonunun zamanla azaldığı belirlenmiştir ($r = -0.564$, $p < 0.05$). Mn^{+2} konsantrasyonundaki anlamlı düşüşün, özellikle 96. sa`dan itibaren gerçekleştiği ve en fazla düşüşün 120. sa`da yaşandığı gözlemlenmiştir. 120-300. sa`lar arasında yeniden artış gösteren Mn^{+2} , 300. sa`nın sonunda 512 ± 0.01 mg/l değere ulaşmıştır. Bu ölçüm saatinden itibaren tekrar düşüş gösteren Mn^{+2} 'nin, 792. sa`da ulaştığı konsantrasyon değeri 309 ± 0.01 mg/l olarak ölçülmüştür. Kontrol düzeneğinde ise deneyin başlatıldığı 0. sa`da 950 ± 0.01 mg/l olan Mn^{+2} konsantrasyonu, 8. ölçüm saatinde 1025 ± 0.01 mg/l değerine ulaştıktan sonra anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Deney ortamındaki Mn^{+2}

değerlerinin kontrol ortamındaki değerlerden anlamlı derecede daha düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Tablo 4.2: Deney süresince deney ve kontrol düzeneğindeki Mn^{+2} değerleri.

Saatler	Mn^{+2} miktarı, deney (mg/l)	Mn^{+2} miktarı, kontrol (mg/l)
0	850 ± 0.01	950 ± 0.01
2	850 ± 0.00	975 ± 0.00
8	855 ± 0.01	1025 ± 0.01
24	985 ± 0.01	1035 ± 0.01
48	945 ± 0.02	1000 ± 0.01
72	845 ± 0.01	1025 ± 0.01
96	276 ± 0.03	990 ± 0.02
120	45 ± 0.02	1015 ± 0.01
144	96 ± 0.01	1025 ± 0.01
168	138 ± 0.04	1005 ± 0.01
240	396 ± 0.01	1010 ± 0.01
300	512 ± 0.11	1005 ± 0.02
360	465 ± 0.01	1020 ± 0.01
456	412 ± 0.11	1010 ± 0.01
624	327 ± 0.01	1025 ± 0.01
792	309 ± 0.01	1015 ± 0.01

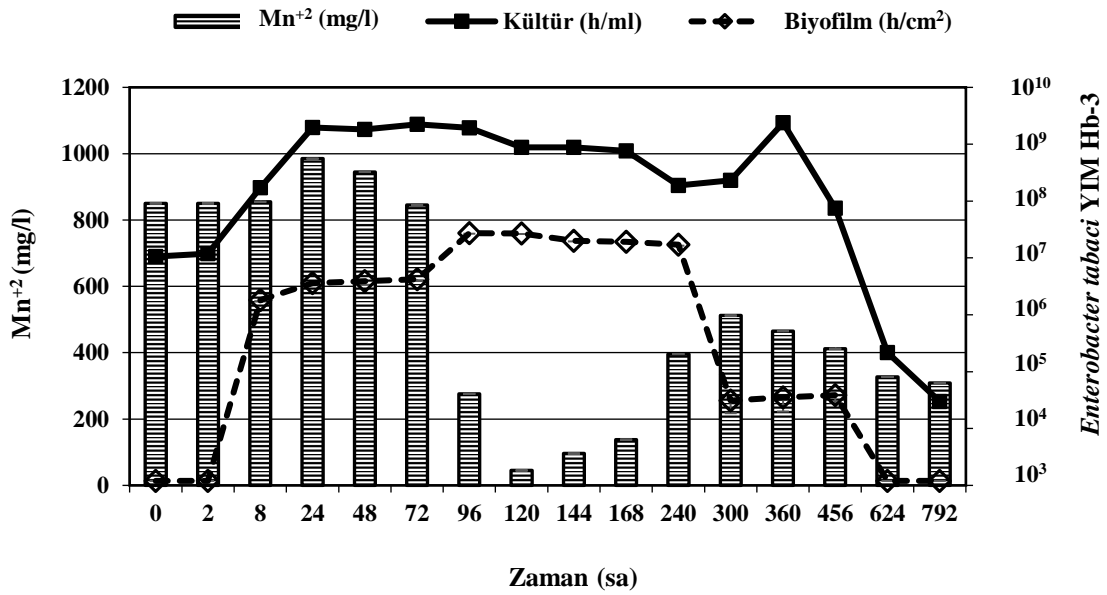
± Standart sapma



Şekil 4.17: Deney ve kontrol ortamlarındaki Mn^{+2} miktarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Kültür ve biyofilmdeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 sayıları ile kültürdeki Mn^{+2} değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Şekil 4.18). Bununla birlikte, deney süresince, Mn^{+2} miktarında bakterinin geçirdiği difazik üremenin özellikle 2. fazına benzer şekilde azalış ve artışlar olduğu gözlemlenmiştir.

Deney süresince, deney düzeneğinden alınan *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 kültürünün ve kontrol düzeneğinden alınan steril MnOB besiyerinin Cl^- miktarları ölçülmüştür. Ölçümler yalnızca deneyin 0., 2. ve 8. ölçüm saatlerinde gerçekleştirilmiş, sonraki saatlerde ölçüm değerleri tutarsızlaştığından ölçüme devam edilmemiştir. Deneyin 0., 2. ve 8. sa'larında sırasıyla deney düzeneğinden elde edilen edilen Cl^- miktarları 30.8 ± 0.02 , 28.3 ± 0.007 ve 4.8 ± 0.01 mg/l; kontrol düzeneğinden elde edilen edilen Cl^- miktarları ise 31.1 ± 0.007 , 29.5 ± 0.007 ve 26 ± 0.02 mg/l olarak ölçülmüştür.



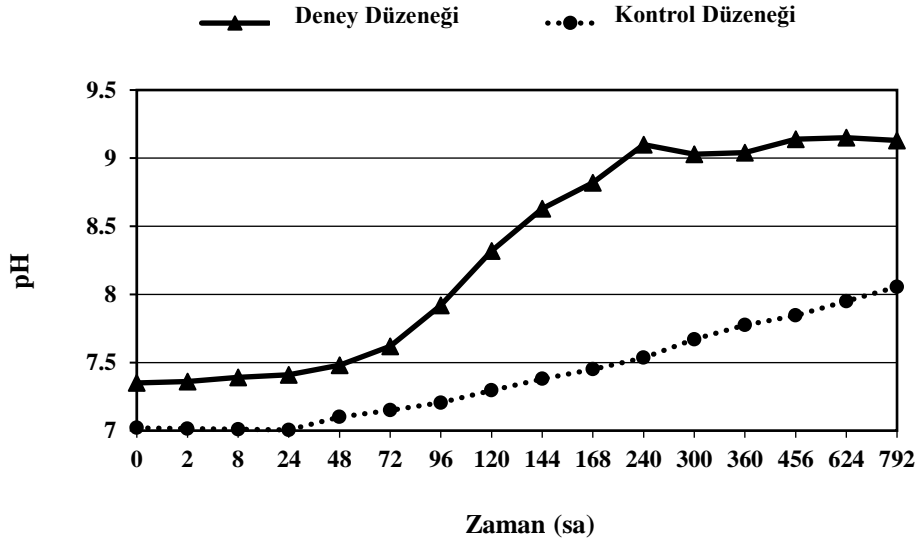
Şekil 4.18: Kültür ve biyofilmdeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 sayıları ile Mn²⁺ miktarlarının zamana bağlı değişimleri. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Deney ve kontrol düzeneklerinden elde edilen pH değerleri Tablo 4.3`de; pH değerlerinin değişim grafiği ise Şekil 4.19`da verilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. sa`da, deney düzeneğinde, 7.35 ± 0.02 olarak ölçülen pH değeri zamanla artış göstererek 240. sa`da 9.10 ± 0.00 değere ulaşmıştır ($r = 982$, $p < 0.01$). Sonrasında bakteri kültürünün pH değerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş olup, 792. sa`da 9.13 ± 0.03 olarak tespit edilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. sa`da, kontrol düzeneğinin pH`ı 7.02 ± 0.01 değerinde tespit edilmiş olup, zamanla artış göstermiştir ($r = 673$, $p < 0.01$). Son örneklem saatinde ise 8.06 ± 0.03 olarak ölçülmüştür. Deney ve kontrol ortamlarındaki pH değerleri arasında anlamlı derecede fark olduğu ($p < 0.01$) ve deney ortamındaki pH değerlerinin kontrol ortamındaki değerlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

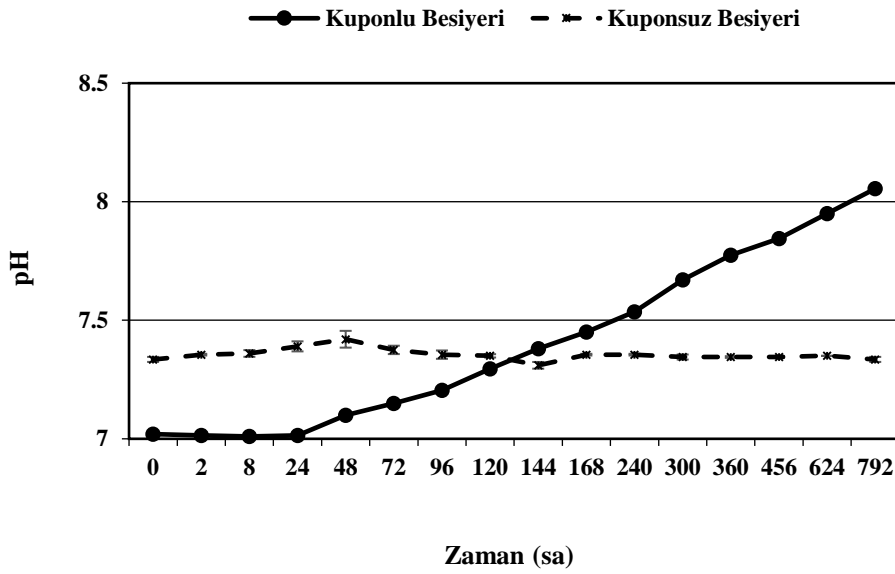
Tablo 4.3: Deney süresince deney ve kontrol düzeneğindeki pH değerleri.

Saatler	pH, deney	pH, kontrol
0	7.35 ± 0.02	7.02 ± 0.01
2	7.36 ± 0.01	7.02 ± 0.02
8	7.39 ± 0.02	7.01 ± 0.01
24	7.41 ± 0.00	7.05 ± 0.00
48	7.48 ± 0.00	7.10 ± 0.01
72	7.62 ± 0.01	7.15 ± 0.02
96	7.92 ± 0.02	7.22 ± 0.04
120	8.32 ± 0.04	7.30 ± 0.02
144	8.63 ± 0.02	7.38 ± 0.01
168	8.83 ± 0.01	7.45 ± 0.04
240	9.10 ± 0.10	7.54 ± 0.02
300	9.03 ± 0.01	7.67 ± 0.03
360	9.04 ± 0.02	7.78 ± 0.01
456	9.14 ± 0.03	7.84 ± 0.02
624	9.15 ± 0.04	7.95 ± 0.04
792	9.13 ± 0.03	8.06 ± 0.03

± Standart sapma

**Şekil 4.19:** Deney düzeneğindeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 kültürünün ve kontrol düzeneğindeki steril MnOB besiyerinin pH değerlerinin zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Düzeneğe yerleştirilen metal kuponlarının besiyerinin pH'ına etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla steril ve kupon içermeyen MnOB besiyerinin deney süresince pH değerleri ölçülmüştür. Kuponsuz MnOB besiyerinin pH değerlerinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.20`de verilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. sa`da metal kuponlarını içermeyen besiyerinin pH'ı 7.35 ± 0.01 mg/l olarak ölçülmüş ve deney süresince de pH değeri sabit kalarak son ölçüm saatinde 7.33 ± 0.01 mg/l olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.20: AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponlarını içeren ve içermeyen MnOB besiyerinin pH değerlerinin zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

4.3.5. Ağırlık Kaybı ve Korozyon Hızı Verileri

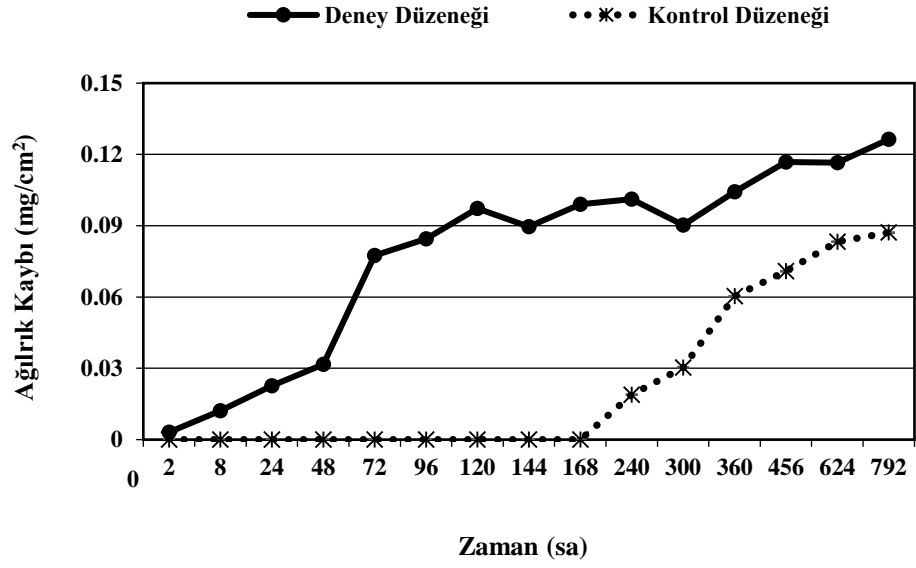
Deney ve kontrol düzeneklerinde deney ortamlarına maruz bırakılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların, deney süresince ağırlık kayıpları ve korozyon hızları Tablo 4.4`de verilmiş olup, ağırlık kayıplarındaki değişimler Şekil 4.21`de; korozyon hızlarındaki değişimler ise Şekil 4.22`de gösterilmiştir. Deney düzeneğindeki martenzitik paslanmaz çelik kuponların ağırlık kayıplarının zamanla arttığı ($r = 0.760$, $p < 0.01$) belirlenmiş olup, en yüksek değer 792. sa`da 0.12636 ± 0.00007 mg/cm² olarak tespit edilmiştir. Kuponların korozyon hızlarının ise zamanla azaldığı ($r = -0.800$, $p < 0.01$); ilk ölçüm saatinde 1.72376 µm/yr olarak belirlenen korozyon hızının azalarak son örnekleme saatinde 0.17759 µm/yr değerine düştüğü tespit

edilmiştir. Kontrol düzeneğindeki martenzitik paslanmaz çelik kuponlarda 168. sa`ya kadar ağırlık kaybı gözlenmemiş olup 168. sa`den itibaren meydana gelen ağırlık kayıplarında azalma gözlemlenmiş ve son ölçüm saatinde 0.08711 ± 0.00007 mg/cm² olarak saptanmıştır. Kuponların korozyon hızı ise zamanla azalmış ($r = -0.236$) ve 792. sa sonunda 0.12243 µm/yr olarak tespit edilmiştir. Deney düzeneği ağırlık kayıpları ve korozyon hızlarının, kontrol düzeneği ağırlık kayıpları ve korozyon hızlarından anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

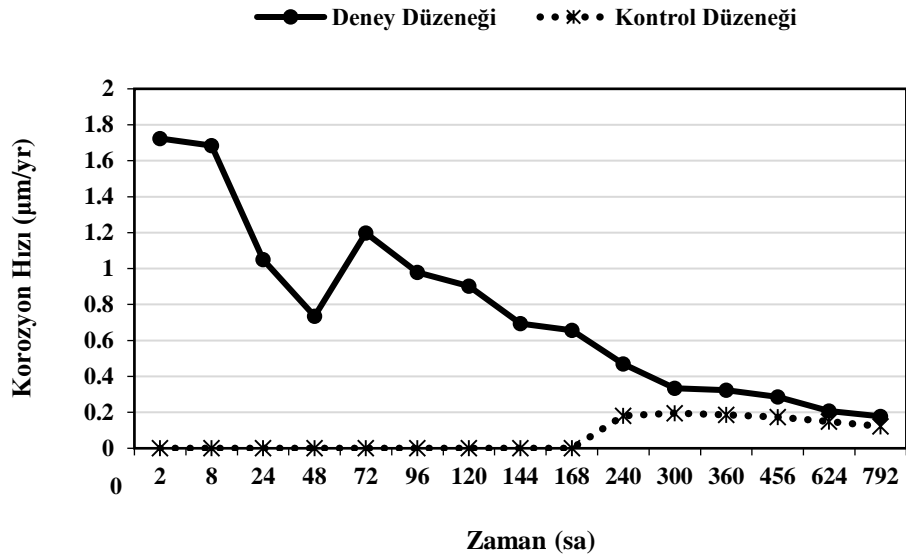
Tablo 4.4: Deney süresince deney ve kontrol düzeneklerindeki AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızı verileri.

Ölçüm Saati	Ağırlık kaybı, deney (mg/cm ²)	Ağırlık kaybı, kontrol (mg/cm ²)	Korozyon hızı, deney (µm/yr)	Korozyon hızı, kontrol (µm/yr)	Oran (Deney/Kontrol)
2	0.00310 ± 0.00005	0	1.72376	0	-
8	0.01210 ± 0.00008	0	1.68330	0	-
24	0.02263 ± 0.00005	0	1.04935	0	-
48	0.03165 ± 0.00005	0	0.73403	0	-
72	0.07751 ± 0.00005	0	1.19832	0	-
96	0.08446 ± 0.00014	0	0.97930	0	-
120	0.09724 ± 0.00007	0	0.90196	0	-
144	0.08965 ± 0.00007	0	0.69296	0	-
168	0.09899 ± 0.00007	0	0.65583	0	-
240	0.10112 ± 0.00005	0.01893 ± 0.00006	0.46900	0.18054	2.59778
300	0.09022 ± 0.00007	0.03039 ± 0.00006	0.33476	0.19565	1.71102
360	0.10430 ± 0.00005	0.06031 ± 0.00007	0.32250	0.18648	1.72936
456	0.11682 ± 0.00005	0.07081 ± 0.00000	0.28515	0.17285	1.64974
624	0.11660 ± 0.00011	0.08329 ± 0.00000	0.20799	0.14858	1.39987
792	0.12636 ± 0.00007	0.08711 ± 0.00007	0.17759	0.12243	1.45050

±Standart sapma

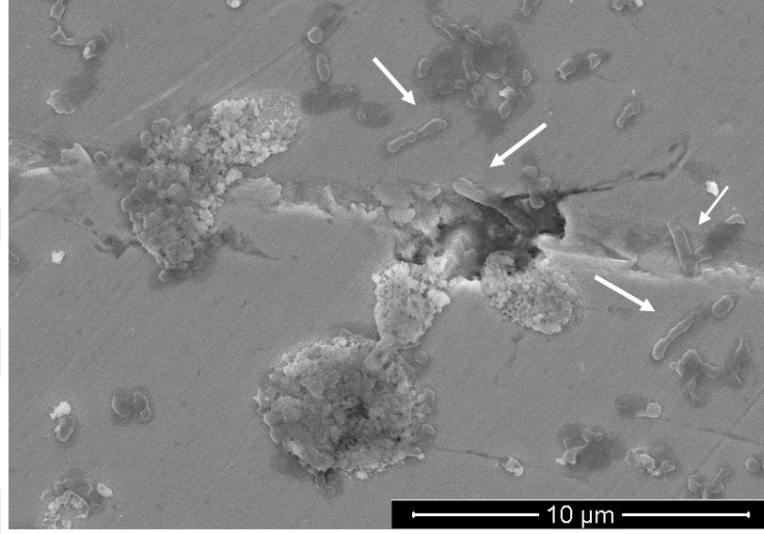


Şekil 4.21: Deney ve kontrol düzeneğindeki AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların ağırlık kayıplarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

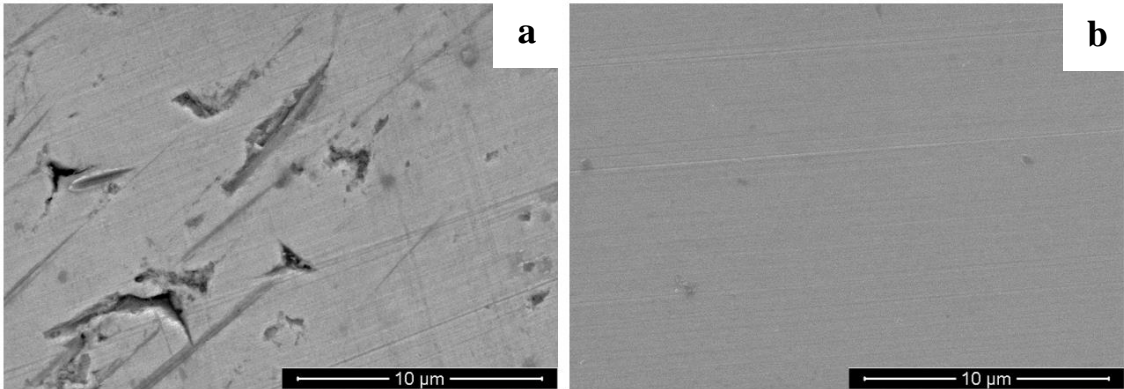


Şekil 4.22: Deney ve kontrol düzeneğindeki AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların korozyon hızlarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Enterobacter tabaci YIM Hb-3 kültürüne maruz bırakılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların SEM fotoğrafları, kuponların yüzeyinde biyofilm tabakası oluştuğunu ve korozyona bağlı oyukların meydana geldiği göstermekte ve dolayısıyla *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin martenzitik paslanmaz çeliği mikrobiyolojik olarak korozyona uğrattığına işaret etmektedir (Şekil 4.23 ve 4.24).



Şekil 4.23: Deney düzeneğinden 792. sa`da çıkarılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponun temizlenmemiş yüzeyinin SEM görüntüsü.

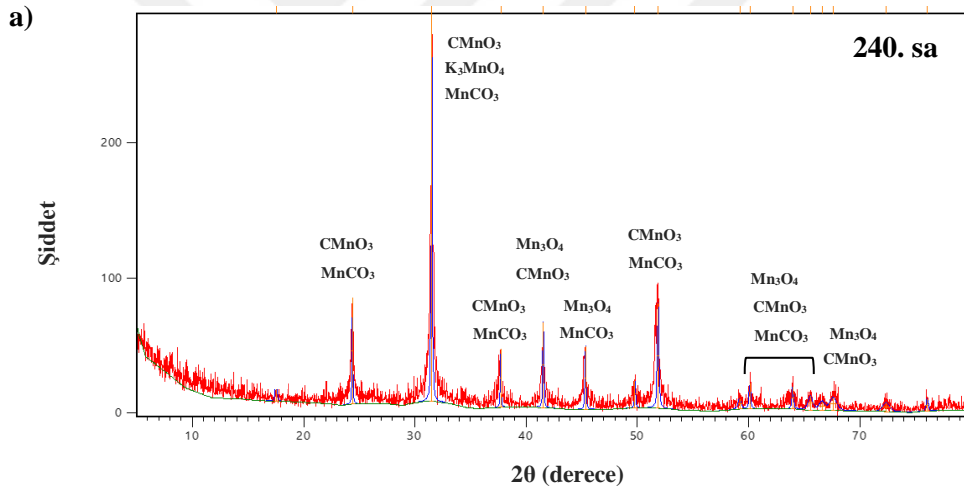


Şekil 4.24: Deney düzeneğinden (a) ve kontrol düzeneğinden (b) 792. sa`da çıkarılan AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların temizlenmiş yüzeylerinin SEM görüntüleri.

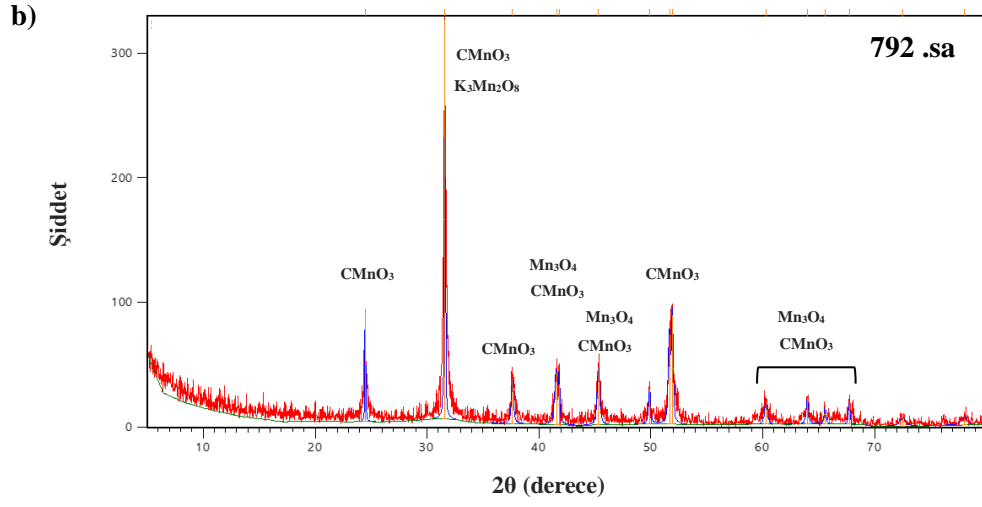
4.3.6. XRD Analiz Sonuçları

Deney düzeneğinin işletimi sırasında düzeneğin dibine çöken tortulardan örnekler alınarak XRD analizi yapılmıştır. Deneyin 240 ve 792. sa'larında deney düzeneğinden alınan tortu örneklerine ait XRD grafikleri Şekil 4.25`de verilmiştir. XRD analiz sonuçlarına göre, deney düzeneğinden çıkarılan tüm örneklerde CMnO_3 ve bir Mn oksit bileşiği olan Mn_3O_4 (hausmannite) tespit edilmiştir. Ek olarak, 240. sa`da K_3MnO_4 ile MnCO_3 bileşikleri bulunmakla birlikte, 792. sa`da $\text{K}_3\text{Mn}_2\text{O}_8$ bileşiği tespit edilmiştir.

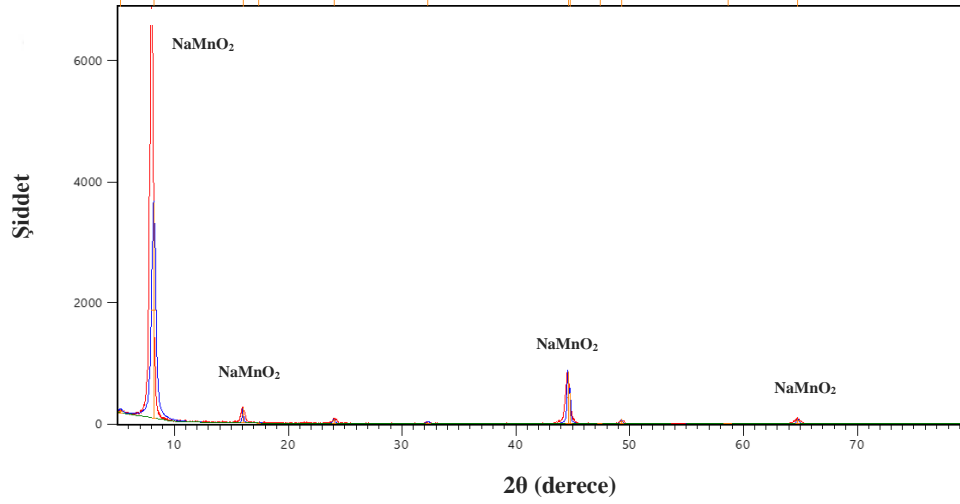
Kontrol düzeneğinden deneyin son ölçüm saatinde (792. sa) çıkarılan kuponun yüzeyinden XRD analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, kupon yüzeyinde NaMnO_2 bileşiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.25: Deney düzeneğinden 240. sa`da (a) ve 792. sa`da (b) alınan tortu örneklerine ait XRD analizi sonuçları.



Şekil 4.25 (devam): Deney düzeneğinden 240. sa`da (a) ve 792. sa`da (b) alınan tortu örneklerine ait XRD analizi sonuçları.



Şekil 4.26: Kontrol düzeneğinden 792. sa`da çıkarılan kuponun yüzeyine ait XRD analizi sonucu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, Elazığ'ın Palu ilçesinde bulunan bir hidroelektrik santralden örnek alınmasına takiben MnOB izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, mikrobiyolojik korozyon çalışmasına yönelik bazı deneysel koşullar belirlenerek, izolasyonu yapılan MnOB türü kültürel ve moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır. Tanımlanan MnOB türü ile mikrobiyolojik korozyon çalışması gerçekleştirilmiştir

MnOB'lerin izolasyonu için LBB, MnOB ve PYG olmak üzere üç farklı spesifik besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerleri daha önce farklı araştırmacılar tarafından kullanılan ve MnOB izole edilebildiği rapor edilen besiyerleridir (Zakharova ve Prfenova, 2007; Cerrato ve diğ., 2010; Bohu ve diğ., 2015). Farklı besiyerlerinin kullanımı ile olabildiğince farklı türde MnOB izolasyonu amaçlanmıştır. Nitekim, bu tez çalışmasında PYG besiyerinden MnOB izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Çünkü, PYG besiyerine yapılan ekimler sonucunda, MnOB'ler için ayırt edici bir özellik olduğu açıklanan kahverengi kolonilere (Krumbein ve Altmann, 1973; Rosson ve Nealson, 1982) PYG besiyerinde rastlanılamamıştır. Diğer besiyerlerinden ise 7 bakteri izolatu elde edilmiş olup; izolatların 3'ü MnOB besiyerinden, 4'ü LBB besiyerinden izole edilmiştir. Bu bulgular, MnOB'lerin izolasyonu için tek başına bir besiyerinin kullanılmasının gerçek sonuçları yansıtmayacağı ve hatta mevcut tüm MnOB'lerin izolasyonu için birden fazla besiyeri çeşidinin kullanılması gerektiğine işaret etmektedir.

MnOB ile LBB besiyerinde üreyen bakterilerin morfolojilerinin oldukça farklı olduğu gözlemlenmiştir. MnOB besiyerinden izole edilen bakteriler; besiyeri üzerinde 0.5-1 cm boyutlarında, damla şeklinde, beyaz ve visköz yapıda koloniler oluşturmuş olup, besiyeri rengini tamamen kahverengiye; inkübasyonun ilerleyen zamanlarında ise siyaha döndürmüşlerdir. LBB besiyerinden izole edilen bakteriler ise besiyerinde 0.3-0.5 cm boyutlarında, yumuşak ve kahverengi renkte koloniler meydana getirmişlerdir. MnOB besiyerinde LBB'den farklı morfoloji ve büyüklükte kolonilerin oluşması ile kahverengileşme miktarının daha fazla olması, MnOB besiyerindeki mineral çeşitliliğinin ve Mn miktarının daha yüksek oluşuna bağlı olarak bakteri aktivitesinin daha yüksek oluşuna bağlanabilir.

Korozyon deneylerinde deney ortamı olarak kullanılacak bakteri türü ve besiyerinin seçiminde, üreme ve Mn-oksit üretme açısından hem en aktif bakteri izolatının hem de bu üreme şekline en uygun besiyerinin seçimi amaçlanmıştır. Bu nedenle 7 izolatın eş zamanlı olarak hem LBB

hem de MnOB besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sürecinde, MnOB besiyerinden elde edilen izolatların (İzolat 1, İzolat 2 ve İzolat 3) LBB besiyerinde üredikleri gözlemlenirken, LBB besiyerinden elde edilen 4 izolattan 3'nün (İzolat 4, İzolat 5 ve İzolat 6) MnOB besiyerinde üremedikleri gözlemlenmiştir. Bu bulgu, çevresel bir örnekteki mevcut tüm MnOB'lerin tespit edilebilmesi için izolasyonda birden fazla spesifik besiyerinin kullanılması gerektiği görüşünü desteklemektedir.

İzolatların üreme eğrileri değerlendirildiğinde ise her iki besiyerinde de üreme yeteneğine sahip olan bakterilerin (İzolat 1, İzolat 2, İzolat 3 ve İzolat 7) farklı besiyerlerinde birbirinden oldukça farklı üreme şekli gösterdiği görülmüştür. Bu bakteri izolatlarından İzolat 1, İzolat 2 ve İzolat 3, LBB besiyerinde tek fazlı bir üreme şekli gösterirken, MnOB besiyerinde difazik bir üreme şekli gösterdiği gözlemlenmiştir. Difazik üremede iki adet log fazı bulunmasının nedeni olarak; ilk log fazında bakterinin besiyerinde bulunan karbon kaynaklarını tükettiği, bu besinlerin tükenmesi üzerine de yeniden bir hazırlık evresi geçirerek yaşamın devamı için Mn'ı tüketmeye başladıkları ve ikinci log fazına girdikleri söylenebilir. İzolat 7'nin ise yalnızca LBB besiyerinde üreyebilen izolatlara benzer şekilde ve LBB besiyerindeki üreme şekline paralel olarak, MnOB besiyerinde oldukça uzun bir lag fazına sahip ve tek fazlı bir üreme şekli gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Mn'ı okside ettiği bilinen bazı bakteri türlerinin neden difazik üreme şekli göstermediği henüz literatürde aydınlatılamamıştır.

İzolatların Mn oksitleme aktiviteleri, LBB kolorimetrik boyası kullanılarak yapılmıştır. LBB besiyerinden yapılan ölçümlerde tutarlı sonuçlar elde edilmiş ve her türün farklı zaman aralıklarında farklı miktarlarda Mn-oksit meydana getirdiği tespit edilmiştir. En yüksek Mn oksitleme aktivitesine, MnOB besiyerinde difazik üreme şekli gösteren İzolat 1'in sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, LBB besiyerinin aksine, MnOB besiyerinde yapılan Mn oksitleme aktivitelerinin ölçümünde LBB kolorimetrik boyası ile başarıya ulaşılamamıştır. Spektrometrik ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan mavi renk ancak kültürün 10^{-274} 'a varan sulandırımı ile mümkün olmuş, elde edilen veriler sulandırım oranları ile çarpılarak standart grafik ile kıyaslandığında ise anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bunun sebebi olarak, MnOB besiyerinde bakteri aktivitesine bağlı olarak meydana gelen bazı kimyasal bileşiklerin LBB boyasının çalışmasını gölgeleyebileceği düşünülmüştür.

Korozyon deneyleri için MnOB besiyerinde difazik bir üreme şekli gösteren ve aynı zamanda LBB besiyerinde diğer izolatlara kıyasla en fazla Mn-oksit üreten İzolat 1 seçilmiştir. Besiyeri

olarak ise difazik üreme şekline ortam hazırlayan ve LBB'ye kıyasla çok daha yüksek bakteri sayısına ulaşılan MnOB besiyeri seçilmiştir. Korozyon deneylerinde amaç, en yüksek aktiviteye sahip olan bakteri izolatının, en yüksek aktivite göstereceği ortamı hazırlayarak göstereceği davranışın martenzitik paslanmaz çelik kuponlara etkisini tespit etmek olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, izolatın üreteceği Mn-oksit miktarının tespiti amaçlanmadığından LBB kolorimetrik boyası ile ölçüm yapılamayan MnOB besiyerinin kullanılması bir sorun teşkil etmemiştir. Korozyon deneylerinde bakterinin Mn oksitleme aktivitesi, deney ortamında bulunan Mn^{+2} 'nin tüketiminin tespiti ile gösterilmiştir.

Korozyon deneyleri için, İzolat 1'in en yüksek aktivite göstereceği ortamın hazırlanması amacı ile MnOB besiyeri farklı Mn konsantrasyonlarında hazırlanarak Mn konsantrasyonun bakterinin büyümesine olan etkisi belirlenmiştir. Bu amaç ile 0.15, 0.5, 1, 2, 3, 3.5, 4 ve 4.7 g/l $MnSO_4$ içeren 8 farklı MnOB besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri hazırlığı sırasında, tüm besiyerleri aynı koşullarda (pH, sıcaklık vb.) hazırlanmasına rağmen, 3.5, 4 ve 4.7 g/l $MnSO_4$ içeren besiyerlerinde kristalleşme görülmüştür. Bunun sebebi olarak, 3.5 g/l $MnSO_4$ ve üzeri konsantrasyonlarda bazı kimyasalların tepkiye girme olasılığı düşünülmüştür. Bu nedenle İzolat 1, kristalleşme gözlenmeyen (0.15, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l $MnSO_4$) MnOB besiyerlerine ekilerek üreme eğrileri elde edilmiştir. Çalışma sonunda, üreme eğrileri içinde en büyük farklılığı gösteren konsantrasyonun 3 g/l $MnSO_4$ olduğu görülmüştür. Bu konsantrasyonda bakterinin 8. sa`ya kadar uzun bir hazırlık süreci geçirdiği görülmektedir. Dolayısıyla 1. lag ve 1. log fazlarının zaman aralığı diğer konsantrasyonlara göre farklılık göstermektedir. Ayrıca bakteri sayısı, diğer konsantrasyonlara göre en yüksek miktara ulaşmıştır. Tüm konsantrasyonların ortak özelliği, bakterinin 2 adet log fazına sahip olması ve difazik üreme şekli göstermesidir. Bu durum Mn konsantrasyonunun difazik üremeye bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Yapılan deneylerde hiçbir konsantrasyon için 2. lag fazı tespit edilememiştir. Bu durumun, 2. lag fazının ölçüm saatleri dışında gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmüş ve korozyon deneyi ölçüm saatleri buna göre belirlenmiştir. Konsantrasyonların diğer bir ortak özelliği ise hepsinde bakterinin ölüm fazına aynı zaman dilinde girmesidir. Tüm veriler tek bir grafikte incelendiğinde görülmektedir ki; MnOB besiyerinde farklı Mn konsantrasyonları İzolat 1'in üreme fazlarını kaydırmakta ve konsantrasyon arttıkça bakteri sayısı artış göstermektedir. Deney sonucunda, korozyon deneylerinde kullanılmak üzere MnOB besiyeri için bakterinin en yüksek sayıya ulaştığı 3 g/l $MnSO_4$ konsantrasyonu seçilmiştir.

Korozyon deneylerinde, deney ortamı olarak kullanılacak bakteri türü (İzolat 1) ile birlikte seçilen besiyeri (MnOB besiyeri) için maksimum Mn konsantrasyonunun da (3 g/l MnSO₄) belirlenmesinin ardından İzolat 1, çeşitli biyokimyasal testler ve moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlar, Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology (Buchanan ve Gibbons, 1974) kitabına göre değerlendirildiğinde İzolat 1`in, Enterobacteriaceae ailesinin ayırt edici özelliklerinden olan çomak şekilli, Gram negatif özelliği ve oksidaz negatif sonucuna sahip olduğu belirlenmiştir (Farmer ve diğ., 2010). Moleküler yöntemlerle gerçekleştirilen tanı yöntemi ile de Bergey`s Manual`e göre yapılan tanı uyumluluk göstermiş ve izolatın %98 oranla Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olan *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakteri türüne ait olduğu belirlenmiştir.

Korozyon çalışmaları laboratuvar ölçekli deney ve kontrol düzeneklerinde gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneği için deney ortamı olarak MnOB besiyerindeki *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakteri kültürü kullanılmıştır. Kontrol düzeneği için deney ortamı olarak ise steril MnOB besiyeri kullanılmıştır.

Korozyon deneylerinde, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin AISI 415 martenzitik paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde gözle görülebilen, ince ve yüzeyden kolayca alınabilen bir biyofilm tabakası oluşturduğu gözlemlenmiştir. SEM fotoğrafları da *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin martenzitik paslanmaz çelik yüzeyinde kolonize olabildiğini doğrulamıştır.

Planktonik ve sesil bakteri sayısının tespitinde, yüksek miktarda besin ve Mn içeren bir ortamdan alınan bakterileri minimum düzeyde strese sokabilecek bir ortamın sağlanması amacı ile Mn içermeyen ve düşük besin içerikli R2A besiyeri kullanılmıştır.

Biyofilmden kültürel yöntem ile gerçekleştirilen bakteri sayımında, 624 ve 792. sa`larda bakteri üremesi gözlenmemiştir. Ancak, bu ölçüm saatlerinde alınan biyofilm örneklerine LIVE/DEAD kit kullanılarak yapılan muamelede canlı bakteri hücreleri bulunmuştur. Bu durum bakterilerin canlı ama kültüre edilemeyen (VBNC-Viable But Not Culturable) bir forma geçtiklerinin göstergesidir. VBNC formu, olumsuz çevresel koşullara (pH, sıcaklık, toksik bileşiklerin varlığı vb.) maruz kalan bakteriyel hücrelerin hayatta kalma stratejisi olarak kabul edilmektedir. Bu forma giren bakteriler, kültüre edilemeseler de membran bütünlüklerini koruyarak metabolik aktivitelere devam edebilir ve gen transkripsiyonunu gerçekleştirebilirler (Pinto ve

diğ., 2013). Daha önce *Enterobacter tabaci* gibi Enterobacteriaceae ailesinin üyelerinden olan *Enterobacter aerogenes* (Oliver, 2005), *Enterobacter cloacae* (Oliver 2005) ve *Enterobacter agglomerans* 'ın (Rowan, 2004) VBNC moduna girebilen bakterilerden olduğu rapor edilmiştir. Deney düzeneğinde, sesil *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterilerinin 624 ve 792. sa`larda VBNC formuna girmesinin nedeni, düzenekte artan Mn oksit miktarının bakteriler üzerine toksik etki göstermiş olması olabilir.

Planktonik *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 sayılarının, biyofilmdekilerden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Daha önce literatürde; planktonik bakterilerin sesil bakterilerden daha yüksek olduğu rapor edilmekle birlikte (Ilhan-Sungur ve diğ., 2007), sesil bakteri sayısının planktonik bakteri sayısından fazla olduğu (Singh ve diğ., 2011) ya da her iki formda da bakteri sayılarının birbirine oldukça yakın olarak rapor edildiği (Lata ve diğ., 2012) farklı çalışmalar da yer almaktadır. Planktonik ve sesil bakteri sayılarındaki farklılıklar, kullanılan bakteri türü ya da deney koşullarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

Planktonik ve sesil *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 sayıları arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($r = 0.628$, $p < 0.01$). Daha önce farklı bakteri türleri ile yapılan çalışmalarda kültür ve biyofilmdeki bakteri sayıları arasında benzer sonuçlar araştırmacılar tarafından rapor edilmiş olup (Beech ve diğ., 1994; Ilhan-Sungur ve Cotuk, 2010, Ozuolmez ve Cotuk, 2011); bu durum, bakterilerin biyofilmdeki gelişim döngüsü esnasında sesil ve planktonik form arasında devamlı bir geçiş halinde olduklarının bir göstergesidir. Nitekim, planktonik ve sesil bakterilerin üreme grafiğine bakıldığında (Şekil 4.11), üreme fazındaki bakterilerin bir kısmının 8. sa`dan itibaren kültür ortamından kaçarak kuponlara tutunduğu görülmektedir. Ayrıca planktonik bakterilerin 24-72. sa`lar arası duraklama fazından sonra 72. sa`dan itibaren ölüm fazına geçtiği, sesil bakterilerin ise aynı saatte artışa geçtiği görülmektedir. Bu durum, biyofilmde bulunan bakterilerin ürediğini ya da ölüm fazına geçmeye hazırlanan planktonik bakterilerin yaşamın devamı için biyofilme kaçış gerçekleştirdiğine işaret etmektedir. 72-96. sa`lar arasında biyofilmde görülen bu artışın düşük ivmeye sahip olması biyofilm ortamında hazır besin olmaması ve enerji azlığı ile açıklanabilmektedir. Ayrıca bu durum, neden biyofilmde bulunan bakterilerin 96-240. sa`lar arasında üremeyi devam ettiremeyerek durgun faza geçtiğini, sahip oldukları kısıtlı enerjiyi yalnızca yaşamlarını devam ettirebilmek için kullandıklarını da göstermektedir. 240. sa`dan itibaren, biyofilmdeki bakterilerin sayısındaki düşüşe karşılık kültürdeki bakterilerde yeniden artış olduğu görülmektedir. Bu

durum biyofilmden kültüre bir kaçış olduğu düşündürmekte olup kupon yüzeyinde biriken Mn-oksitlerin toksik bir etki yaratarak bu duruma sebep olup olmadığı tartışılmaktadır. Bunun yanı sıra, sayıdaki artışın bir nedeni olarak kültürde bulunan bakterilerin ortama yeniden adapte olarak Mn^{+2} 'yi kullanması ve elde ettikleri enerji ile yeniden üreme fazına geçtikleri de düşünülmektedir.

Korozyon deneyleri öncesinde, kuponsuz MnOB besiyeri ortamında *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 suşunun difazik üreme şekli gösterdiği bilindiğinden aynı üreme şeklinin korozyon deney düzeneğinde de görülmesi beklenmiştir. Nitekim, deney düzeneğinde hem sesil hem de planktonik formdaki bakterilerin difazik üreme gösterdiği tespit edilmiştir. Kültürde bulunan planktonik bakterilerde, 2-24. sa`lar ve 240-360. sa`lar arasında olmak üzere 2 adet log faz tespit edilmiştir. Elde edilen bu eğri, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3`nin kuponsuz MnOB besiyerinde çizilen üreme eğrisi ile kıyaslandığında, üreme fazlarının değiştiği görülmektedir. Kuponsuz MnOB besiyerindeki üreme eğrisine göre (Şekil 4.7), 1.log fazının 8-48. sa`lar; 2.log fazının ise 96-240. sa`lar arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca, 2.lag fazı ölçüm aralıklarının genişliğinden dolayı yakalanamamıştır. Bu sebeple korozyon deneylerinde ölçüm aralıkları sıklaştırılmış, ancak yine de kültürde 2. lag fazı tespit edilememiştir (Şekil 4.11). Üreme fazları arasındaki bu farklılığın her iki deneyde kullanılan besiyerinin hacminden ve çelik kuponlarının varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, kupon içermeyen MnOB besiyeri ile yapılan deneyde, inkübasyon koşulları ve süresi ile besiyerinin içerdiği $MnSO_4$ miktarı korozyon deneyi ile aynı olmasına rağmen kullanılan besiyerinin hacmi deney düzeneğine göre 9 kat daha azdır. Ayrıca ortamın iyon dengesini değiştirebilecek çelik kuponları da içermemektedir.

Enterobacter tabaci YIM Hb-3`nin, ürettiği EPS`deki protein ve karbonhidrat miktarlarında zaman içerisinde artışlar ve azalışlar tespit edilmiştir. EPS`deki karbonhidrat ve protein miktarlarındaki azalma, bakteriler tarafından üretilen EPS`nin tüketildiğine işaret edebilir. Bakterilerin açlık fazına girdikleri zaman kendi ürettikleri EPS`yi kullanabildikleri gerek karışık kültürlerde (Boyd ve Chakrabarty, 1994; Zhang ve Bishop, 2003); gerekse de saf kültürlerde (Ilhan-Sungur ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2007; Muhammadi ve Afzal, 2014) saptanmıştır. Bunun yanı sıra; *Enterobacter tabaci* gibi, Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olan *Enterobacter cloacae`nin* de besin yokluğuna bağlı olarak ürettiği EPS`yi kullandığı rapor edilmiştir (Azari ve diğ., 2017).

Deney ve kontrol düzeneklerindeki Mn-oksit ölçümleri LBB kolorimetrik boyası ile yapılmıştır. Korozyon deneylerinden önce, kuponsuz MnOB besiyeri ile gerçekleştirilen deneylerde MnO_x miktarının tespitinde sonuç alınabilmesi için yüksek sulandırımına ihtiyaç duyulmuştur. Bunun sebebi olarak, MnOB besiyerindeki bakteri aktivitesi sonucu meydana gelen kimyasal reaksiyonların LBB boyasının çalışmasını engellediği görüşü üzerinde durulmuştur. Korozyon deneylerinde ise deney düzeneğinden alınan hiçbir örneğin sulandırımından LBB boyası kullanılarak MnO_x miktarı belirlenememiştir. Bu noktada, bakteri aktivitesine ek olarak, bakteri kültürü ile metal kuponları arasındaki etkileşimin LBB boyasının çalışmasını engelleyebileceği düşünülmektedir. Deney düzeneğinin aksine, bakteri içermeyen kontrol düzeneğinde ise MnO_x miktarı tespit edilebilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. sa`da 0.45 mg/l olarak tespit edilen MnO_x miktarının 96. sa`da sabitlenerek 0.73 mg/l konsantrasyona ulaştığı saptanmıştır. MnO_x miktarının spektrometrik olarak tespitinde, kör referans olarak kullanılacak kuponsuz ve steril MnOB besiyeri, deneyin başlatıldığı saatten itibaren düzenekler ile aynı koşullarda bekletilmiştir. Bunun sebebi, daha önce yapılan çalışmalarda steril MnOB besiyerinde bulunan Mn`nın zamanla abiyotik oksidasyona uğrayarak spektrometrik ölçümlerde farklılar yarattığının tespit edilmesidir.

Korozyon deneylerinde, deney ve kontrol düzeneklerindeki deney ortamlarının Mn içerikleri MD600 Lovibond fotometre cihazı kullanılarak üreticinin el kitabında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Ancak el kitabına göre yapılan ön denemelerde, ölçüm için kullanılan tabletlerin solüsyon içerisinde tam olarak çözünmediği ve tutarsız sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu sebeple el kitabından bağımsız olarak, yapılan her işlem arasında vorteksleme işlemi yapılmış ve oldukça tutarlı sonuçlar alınarak standart sapma değerleri düşürülmüştür.

Deneylerde kullanılan MnOB besiyerinin içerisindeki Mn^{+2} miktarının yaklaşık olarak 975.15 mg/l olduğu hesaplanmıştır. Bununla birlikte, deney ve kontrol düzeneği ortamlarından 0. sa`da alınan örneklerden gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, Mn^{+2} miktarının daha az değerlerde olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla 850 ± 0.01 mg/l, 950 ± 0.01 mg/l). Miktaradaki bu azalmanın, deney ve kontrol düzeneklerinde bulunan çelik kuponların etkisi ile farklı Mn bileşiklerinin oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, kuponsuz ve kuponlu MnOB besiyerinde yapılan pH ölçümleri, kupon varlığında besiyeri ortamının kimyasal özelliğinin değiştiğini göstermektedir. Kuponsuz MnOB besiyerinde pH sabit kalırken, kuponlu besiyerinde devamlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.20).

Deney düzeneği ortamındaki Mn^{+2} konsantrasyonunda planktonik bakterilerin difazik üremesine benzer şekilde azalış ve artışlar görülmüştür. Özellikle 96. sa`dan itibaren Mn^{+2} miktarında görülen anlamlı düşüş, ortamdaki hazır besinin tükenmesine bağlı olarak bakterilerin yaşamlarını devam ettirebilmek için Mn `ı metabolize etmeye başladıklarının bir göstergesi olabilir. Kontrol düzeneği ortamında ise deneyin başlatıldığı 0. sa`da 950 ± 0.01 mg/l olan Mn^{+2} konsantrasyonunun, 8. ölçüm saatinde 1025 ± 0.01 mg/l değerine ulaşarak sonrasında ise sabitlendiği belirlenmiştir. Deney düzeneğindeki Mn^{+2} konsantrasyonunun zamanla azaldığı ($r = -564$, $p < 0.05$) ve deney ortamındaki Mn^{+2} değerlerinin kontrol ortamındaki Mn^{+2} değerlerinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Deney süresince, Cl^- ölçümleri MD600 Lovibond fotometre cihazı kullanılarak üreticinin el kitabında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Cl^- konsantrasyonu, deneyin başlatıldığı 0. sa`da deney düzeneğinde 30.8 ± 0.02 mg/l; kontrol düzeneğinde ise 31.1 ± 0.007 mg/l olarak tespit edilmiştir. Ancak 8. sa`dan itibaren alınan sonuçlar tutarsızlaştığından ölçümlere devam edilmemiştir.

Hem deney hem de kontrol düzeneklerinde pH`ın zamanla arttığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, deney ortamındaki pH değerlerinin kontrol ortamındaki değerlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterilerinin varlığının ve çoğaldıklarının bir göstergesidir. Çevresel koşullara göre bakterilerin, büyümelerine yararlı veya zararlı etkisi olabilecek şekilde ortamın pH`ını değiştirebildikleri bilinmektedir. Mikrobiyal büyüme, ortamın pH`ını arttırabileceği gibi aynı zamanda azaltabilmektedir. Bu değişimlerin kaynağı, bakterilerin yaşamsal faaliyetleri sonucu meydana gelen metabolitlerdir (Ratzke ve Gore, 2018). Örneğin; anaerobik bir bakteri türü olan *Lactobacillus plantarum*`un meydana getirdiği metabolik ürün olan laktik asit, ortamın pH`ını düşürür (Fu ve Mathews, 1999). *Corynebacterium ammoniagenes*`in üreyi amonyağa parçalayan üreaz enzimini meydana getirmesi ile ise ortamın pH`ı artar (Collins, 1987).

Martenzitik paslanmaz çelik kuponların, besiyerinin pH`sına bir etkisinin olup olmadığının gözlemlenebilmesi için de kupon içermeyen steril MnOB besiyeri, kontrol düzeneği ile aynı koşullarda tutularak deney süresince pH değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, kontrol düzeneğinde metal kuponlarını içeren steril MnOB besiyeri ile kupon içermeyen steril MnOB besiyerinin pH değerleri arasında anlamlı derecede fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). Kuponsuz besiyerinin pH değerleri deney süresince sabit kalırken, kuponlu besiyerinin pH

değeri 24. sa`dan itibaren deney sonuna kadar devamlı bir artış göstermiştir. Bu sonuç, metal kuponlarının steril MnOB besiyeri ile girdiği reaksiyonlar neticesinde pH`da artışa sebep olabileceğini göstermektedir.

Deney düzeneğindeki martenzitik paslanmaz çelik kuponların ağırlık kayıplarının zamanla arttığı ($r = 0.760$, $p < 0.01$) belirlenmiş olup, korozyon hızlarının ise zamanla azaldığı ($r = -0.800$, $p < 0.01$) tespit edilmiştir. Kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızları arasında ters yönde anlamlı bir ilişki bulunduğu saptanmıştır ($r = -0.845$, $p < 0.01$). Ağırlık kayıpları ve korozyon hızları arasında ters yönde bir ilişki saptanması beklenen bir durum olmak ile birlikte bu durumun sebebi ağırlık kayıpları kullanılarak yapılan formül hesaplamasıdır. Bu formül ile yapılan hesaplamalara göre, artan ağırlık kaybı azalan korozyon hızını ifade eder.

Deney düzeneği ağırlık kayıpları ve korozyon hızlarının, kontrol düzeneği ağırlık kayıpları ve korozyon hızlarından anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Elde edilen bu veri ile ilk kez *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin AISI 415 martenzitik paslanmaz çeliği mikrobiyolojik olarak korozyona uğrattığı rapor edilmektedir. SEM görüntüleri de bu görüşü doğrular niteliktedir. Ayrıca, XRD analizleri sonucunda da deney düzeneğinden alınan tüm örneklerde bir Mn oksit türü olan Mn_3O_4 'ün (hausmannite) tespit edilmesi, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin bulunduğu düzenekte Mn oksidasyonunu gerçekleştirdiği göstermektedir. Nitekim, bir MnOB türü olduğu bilinen *Bacillus* sp. SG-1'in Mn`ı okside ederek Mn_3O_4 meydana getirdiği daha önce rapor edilmiştir (Mann ve diğ., 1988).

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular doğrultusunda aşağıda belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Bu tez çalışmasında ilk kez, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin martenzitik paslanmaz çeliği mikrobiyolojik olarak korozyona uğrattığı rapor edilmektedir.
2. Bu tez çalışması ile ilk kez, *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin, Mn`ı oksitleme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir. Sesil ve planktonik *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterilerinin difazik bir üreme şekli göstermesi ile 96. sa`dan itibaren Mn^{+2} miktarında görülen anlamlı düşüş, ortamdaki hazır besinin tükenmesine bağlı olarak bakterilerin heterotrofik büyümenin ardından yaşamlarını devam ettirebilmek için Mn`ı metabolize ederek kemolitotrofik olarak üremeye devam ettiklerine işaret etmektedir.

3. *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisi, MnOB besiyerinde difazik üreme şekli göstermektedir.
4. MnOB besiyerinde, farklı Mn konsantrasyonları *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin difazik üreme şekline etki etmemekle birlikte, üreme fazlarının kaymasına sebep olmaktadır.
5. *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisi, uygun olmayan ortam koşullarında VBNC faza girebilmektedir.
6. *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3 bakterisinin, kendi ürettiği EPS'yi kullanabildiği belirlenmiştir.
7. Çevresel bir örnekteki mevcut tüm MnOB'lerin tespiti için izolasyonda birden fazla spesifik besiyerinin kullanılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, L.F. and Ghiorse, W.C., 1986, Physiology and ultrastructure of *Leptothrix discophora* SS-I, *Archives of Microbiology*, 145, 126–135.
- Adams, L.F. and Ghiorse, W.C., 1987, Characterization of an extracellular Mn^{2+} oxidizing activity and isolation of Mn^{2+} oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1, *Journal of Bacteriology*, 169, 1279–85.
- Adams, L.F. and Ghiorse, W.C., 1988, Oxidation state of Mn in the Mn oxide produced by *Leptothrix discophora* SS-1, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52, 2073–2076.
- Aguilar, C. and Neelson, K. H., 1998, Biogeochemical cycling of manganese in Oneida Lake, New York: Whole lake studies of manganese, *Journal of Great Lakes Research*, 24(1), 93-104.
- Allison, D.G., 2003, The biofilm matrix, *Biofouling*, 19, 139-150.
- Anandkumar, B. and Maruthamuthu, S., 2008, Current Science Association Molecular identification and corrosion behaviour of manganese oxidizers on orthodontic wires, *Current Science*, 94(7), 891–896.
- Anandkumar, B., George, R.P., Tamilvani, S., Padhy, N. and Kamachi, M. U., 2011, Studies on microbiologically influenced corrosion of SS304 by a novel manganese oxidizer, *Bacillus flexus*, *Biofouling*, 27(6), 675–83.
- Anwar, H., Strap, J.L. and Costerton, J.W., 1992, Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(7), 1347-1351.
- Archibald, F.S. and Fridovich, I., 1981a, Manganese and defenses against oxygen-toxicity in *Lactobacillus plantarum*, *Journal of Bacteriology*, 145, 442–451.
- Archibald, F.S. and Fridovich, I., 1981b, Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria, *Journal of Bacteriology*, 146, 928–936.
- Ashassi-Sorkhabi, H., Moradi-Haghighi, M. and Zarrini, G., 2012, The effect of *Pseudoxanthomonas* sp. as manganese oxidizing bacterium on the corrosion behavior of carbon steel, *Materials Science and Engineering C*, 32(2), 303–309.
- ASTM G1-90, *Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluation Corrosion Test Specimens*, West Conshohocken, PA, 1999.
- Azari, S., Amir, S. and Radi, M., 2017, Evaluating the Production Yield of an Exopolysaccharide Produced by *Enterobacter cloacae* subsp. *Dissolvens* in Seawater, *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(2), 9-18.

- Banh, A., Chaves, V., Doi, J., Nguyen, A., Hernandez, S., Ha, V., Jimenes, P., Espinoza, F. and Johnson, H., A., 2013. Manganese (Mn) Oxidation Increases Intracellular Mn in *Pseudomonas putida* GB-1. *PLoS ONE*, 8(10), pp.1–8.
- Barboza, N.R., Amorim, S.S., Santos, P.A., Reis, F.D., Cordeiro, M.M., Guerra-Sá, R., and Leão, V.A., 2015, Indirect manganese removal by *Stenotrophomonas* sp. and *Lysinibacillus* sp. isolated from Brazilian mine water, *BioMed Research International*, 18–20.
- Bargar, J. R., Webb, S. M., and Tebo, B. M., 2005, EXAFS, XANES and insitu SR-XRD characterization of biogenic manganese oxides produced in sea water, *Physica Scripta*, 115, 888–890.
- Bargar, J.R., Tebo, B.M., Bergmann, U., Webb, S. M., Glatzel P., Chiu, V.Q. and Villalobos, M., 2005, Biotic and abiotic products of Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1, *American Mineralogist*, 90(1), 143–154.
- Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R. and Chamberlain, A.H.L., 1999, Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(10), 4543-4548.
- Beech, I.B. and Gaylarde, C.C., 1991, Microbial polysaccharides and corrosion, *International biodeterioration*, 27, 95–107.
- Beech, I.B., Cheung, C.W.S., Chan, C.S.P., Hill, M.A., Franco, R., Lino, A.R., 1994, Study of parameters implicated in the biodeterioration of mild steel in the presence of different species of sulphate-reducing bacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 34, 289-303.
- Bermont-Bouis, D., Janvier, M., Grimont, P.A.D., Dupont, I. and Vallaey, T., 2007, Both sulfate-reducing bacteria and *Enterobacteriaceae* take part in marine biocorrosion of carbon steel, *Journal Applied Microbiology*, 102, 161–168.
- Beukes, L.S. and Schmidt, S., 2012, Isolation and characterization of a manganese-oxidizing bacterium from a biofiltration system for the treatment of borehole water in KwaZulu-Natal (South Africa), *Engineering in Life Sciences*, 12(5), 544–552.
- Beveridge, T.J., 1989, Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, *Annual Review of Microbiology*, 43, 147–71.
- Birçelik, 2015, *1.4313 Paslanmaz Çelik*, <https://b?rcel?k.com/tr/kategor?/1-4313>, [Ziyaret tarihi: 17 Aralık 2018].
- Bohu, T., Akob, D.M., Abratis, M. and Lazar, C. S., 2016, Biological Low-pH Mn(II) Oxidation in a Manganese Deposit, *Applied and Environmental Microbiology*, 82(10), 3009–3021.
- Bohu, T., Santelli, C.M., Akob, D.M., Neu, T.R., Ciobota, V., Rösch, P., Popp, J., Nietzsche, S. and Küsel, K., 2015, Characterization of pH dependent Mn(II) oxidation strategies and formation of a bixbyite-like phase by *Mesorhizobium australicum* T-G1, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–15.

- Boogerd, F.C. and de Vrind, J.P.M., 1987, Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*, *Journal of Bacteriology*, 169, 489–94.
- Boyd, A., Chakrabarty, A.M., 1994, Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7), 2355-2359.
- Bozkurt, S. ve Tür, R., 2015, Dünyada ve Türkiye`de Hidroelektrik Enerji, Gelişimi ve Genel Değerlendirme, 4. *Su Yapıları Sempozyumu*, 19-20 Aralık 2015, Antalya, Türkiye, 322–330.
- Brouwers, G.J., Corstjens, P., de Vrind, J.P.M, Verkamman, A., de Kuyper, M. and de Vrind-de Jong, E.W., 2000a, Stimulation of Mn^{2+} oxidation in *Leptothrix discophora* SS-1 by Cu^{2+} and sequence analysis of the region flanking the gene encoding putative multicopper oxidase MofA, *Geomicrobiology Journal*, 17, 25–33.
- Brouwers, G.J., de Vrind, J.P., Corstjens, P.L., Cornelis, P. and Baysse, C., 1999, CumA, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn^{2+} oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1762–1768.
- Brouwers, G.J., de Vrind-de Jong, E.W., Corstjens, P. and Jong, E.W.V., 1998, Involvement of genes of the two step protein secretion pathway in the transport of the manganese-oxidizing factor across the outer membrane of *Pseudomonas putida* strain GB-I, *Am. Mineral*, 83, 1573–1582.
- Brouwers, G.J., Vijgenboom, E., Corstjens, P.L.A.M., Vrind, J.P.M. and De Vrind, W.E., 2000b, Bacterial Mn Oxidizing Systems and Multicopper Oxidases : An Overview of Mechanisms and Functions, *Geomicrobiology Journal*, 17, 1–24.
- Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., 1974, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Publishers, Baltimore, ISBN: 9780683011173.
- Bulut, S., 2012, *Endüstriyel Atık Sulardan İzole Edilen Çinko ve Mangan Dirençli Bakterilerin Tanımlanması Ve Moleküler Karakterizasyonu.*, Tez (Yüksek Lisans), Kırıkkale Üniversitesi.
- Camara, M., 2007, *Quorum sensing: A cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioural changes in bacterial populations*, <http://wmc7.liacs.nl/proceedings/WMC7Camara.pdf>, [Ziyaret tarihi: 16 Mayıs 2019].
- Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G., Roques, C., 2002, Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1469-1474.
- Casale, R.J., LeChevallier, M.W. and Pontius, F.W., 2002, *Manganese Control and Related Issues*, American Water Works Association, Denver, ISBN: 1-58321212-4.
- Caspi, R., 1996, *Molecular biological studies of manganese oxidizing bacteria*, Tez (Doktora), University of California, San Diego.

- Caspi, R., Tebo, B.M. and Haygood, M.G., 1998, C-type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3549–3555.
- Cerrato, J.M., 2010, *Biogeochemical Cycling of Manganese in Drinking Water Systems*, Tez (Doktora), Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Chapnick, S.D., Moore W.S., and Nealson K.H., 1982, Microbially Mediated Manganese Oxidation in a Fresh-Water Lake, *Limnology and Oceanography*, 27(6), 1004-1014.
- Characklis, W.G., 1981, Fouling biofilm development: A process analysis, *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1923-1960.
- Choudhary, S.G., 1998, Emerging microbial control issues in cooling water systems, *Hydrocarbon processing*, 77 (5), 91-102.
- Clement, B.G., 2006, *Biological Mn(II) oxidation in freshwater and marine systems : new perspectives on reactants, mechanisms and microbial catalysts of Mn cycling in the environment*, Tez (Doktora), University of California, San Diego.
- Coetser, S.E. and Cloete, T.E., 2005, Biofouling and biocorrosion in industrial water systems, *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 213-232.
- Collins, M., 1987, Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37, 442–443.
- Corstjens, P., de Vrind, J.P.M., Goosen, T. and de Vrind-de Jong, E.W., 1997, Identification and molecular analysis of the *Leptothrix discophora* SS-1 mofA gene, a gene putatively encoding a manganese oxidizing protein with copper domains, *Geomicrobiology Journal*, 14, 91–108.
- Costerton, J.W., Irwin, R.T. and Cheng, K.J., 1981b, The role of bacterial surface structures in pathogenesis, *Critical reviews in microbiology*, 8, 303–338.
- Costerton, J.W., Irwin, R.T. and Cheng, K.J., 1981a, The bacterial glycocalyx in nature and disease, *Annual review of microbiology*, 35, 299–324.
- Costerton, J.W., Nickel, J.C. and Ladd, T.I., 1986, *Bacteria in nature*, Plenum Publishing Corporation, New York, ISBN: 0-30643173-4.
- Cowen, J. P., Massoth, G. J., and Feely, R.A., 1990, Scavenging Rates of Dissolved Manganese in a Hydrothermal Vent Plume, *Deep Sea Research*, 37(10), 1619-1637.
- Çotuk, A. ve İlhan-Sungur, E., 2014, *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, ISBN: 9786053350828.
- Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Venkateswaran, A., Hess, M., Omelchenko, M.V., Kostandarithes, H.M., Makarova, K.S., Wackett, L.P.,

- Fredrickson, J.K. and Ghosal, D., 2004, Accumulation of Mn(II) in, *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance, *Science*, 306, 1025–1028
- Das, A.P., Sukla, L.B., Pradhan, N. and Nayak, S., 2011, Manganese biomineralization: A review, *Bioresource Technology*, 102(16), 7381–7387.
- Davies, S.H.R. and Morgan, J.J., 1989, Manganese(II) Oxidation Kinetics on Metal Oxide Surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 129(1), 11–18.
- de Vrind, J., de Groot, A., Brouwers, G.J., Tommassen, J. and de Vrind-de Jong, E., 2003, Identification of a novel Gsp-related pathway required for secretion of the manganese-oxidizing factor of *Pseudomonas putida* strain GB-1, *Molecular Microbiology*, 47, 993–1006.
- de Vrind, J.P., Brouwers, G.J., Corstjens, P., Den Dulk J. and de Vrind-de Jong, E.W., 1998, The cytochrome c maturation operon is involved in manganese oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3556–3562.
- de Vrind, J.P.M., de Vrind-de Jong, E.W., de Voogt J, W.H., Westbroek, P., Boogerd, F.C. and Rosson, R.A., 1986, Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine *Bacillus* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 1096–1100.
- DEKTMK (Dünya Enerji Konseyi Türk Milli Komitesi), 2007, *Hidrolik Enerji Alt Çalışma Grubu Raporu*, Hidrolik Yenilenebilir Enerji Çalışma Grubu, Ankara.
- Dick, G. J., Torpey, J. W., Beveridge, T. J., and Tebo, B. M., 2008, Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1527–1534.
- Dick, G.J., Lee, Y.E. and Tebo, B.M., 2006, Manganese(II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas basin hydrothermal sediments and plumes, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3184–3190.
- Dickinson, W.H. and Lewandowski, Z., 1996, Manganese biofouling and the corrosion behavior of stainless steel, *Biofouling*, 10(1–3), 79–93.
- Dickinson, W.H. and Wiatr, C.L., 2013, Manganese Related Corrosion and Fouling In Water Systems, *The Analyst*, 20, 1-30.
- Dickinson, W.H., Caccavo, F. and Lewandowski, Z., 1996, The ennoblement of stainless steel by manganic oxide biofouling, *Corrosion Science*, 38(8), 1407–1422.
- Divekar, M., 2010, *Isolation and characterization of a manganese oxidizing bacterium from the Mediterranean marine sponge *Suberites domuncula**, Tez (Doktora), der Johannes Gutenberg-Universität.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W., 2002, Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology*, 15(2), 167-193.

- Douka, C., 1980, Kinetics of manganese oxidation by cell-free extracts of bacteria isolated from manganese concretions from soil, *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 74–80.
- Droz, B., Dumas, N., Duckworth, O.W., Jasquelin, P., 2015, A comparison of the sorption reactivity of bacteriogenic and mycogenic Mn oxide nanoparticles, *Environmental Science and Technology*, 49(7), 4200–4208.
- DSİ (Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü), 2015, *Faaliyet Raporu*, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Ankara.
- Duan, Y., Zhou, X., Yan, L., Li, Q., Dang, L., Zhang, L., Qiu, L., Nimaichand, S. and Li, W., 2015, *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem, *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(5), 1161–1169.
- Edelstahlwerke, D., 2007, *Chromium nickel martensitic stainless steel with molybdenum addition*, <https://www.dew-stahl.com>, [Ziyaret tarihi: 17 Aralık 2018].
- Ehrlich, H.L., 1968, Bacteriology of manganese nodules II. Manganese oxidation by cell-free extract from a manganese nodule bacterium, *Journal of Applied Microbiology*, 16, 197–202.
- Ehrlich, H.L., 1983, Manganese oxidizing bacteria from a hydrothermally active area on the Galapagos Rift, *Ecological Bulletins*, 35, 357–366.
- Emde, K.M.E., Smith, D.W. and Facey, R., 1992, Initial investigation of microbially influenced corrosion (MIC) in a low temperature water distribution system, *Water Research*, 26(2), pp.169–175.
- Emerson, S., Kalthorn S., Jacobs, L., Tebo, B. M., Nealson, K. H., and Rosson, R. A., 1982, Environmental oxidation rate of manganese(II): bacterial catalysis, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46(6), 1073-1079.
- Emmerich, M., 2010, *Isolation of Mn(II)-oxidizing Bacteria*, https://web.stanford.edu/class/Mn_oxidizers, [Ziyaret tarihi: 2 Ekim 2019].
- Estes, E., R., Andeer, P., F., Nordlund, D., Wankel, S., D. and Hansel, C., M., 2017, Biogenic manganese oxides as reservoirs of organic carbon and proteins in terrestrial and marine environments, *Gebiology*, 15(1), 158-172.
- Farmer, J.J., Farmer, M.K. and Holmes, B., 2010, *The Enterobacteriaceae: general characteristics*, Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, John Wiley & Sons, Ltd., ISBN: 9780470688618.
- Federle, M.J. and Bassler, B.L., 2003, Interspecies communication in bacteria, *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1291-9.
- Feigl, F., 1958, *Spot tests in inorganic analysis*, Elsevier, Amsterdam, ISBN: 9780444597984.
- Ford, T. and Mitchell, R., 1990, The ecology of microbial corrosion, *Advances in Microbial Ecology*, 11, 231-262.

- Forssander, M, Carlsson, R., Edwardson, W. and Persson, C., 2012, *Protective coating recommendations in hydro power stations*, Elforsk rapport 14:16, Stockholm.
- Francis, C.A. and Tebo, B.M., 2001, Diversity of cumA multicopper oxidase genes from Mn(II)- oxidizing and non-oxidizing Pseudomonas strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4272– 4278.
- Francis, C.A. and Tebo, B.M., 2002, Enzymatic manganese(II) oxidation by metabolically dormant spores of diverse Bacillus species, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 874–880.
- Francis, C.A., Casciotti, K.L., Tebo, B.M., 2002, Localization of Mn(II)-oxidizing activity and the putative multicopper oxidase, MnxG, to the exosporium of the marine Bacillus sp. strain SG-1, *Archives of Microbiology*, 178, 450–456.
- Fu, W. and Mathews, A.,P., 1999, Lactic acid production from lactose by Lactobacillus plantarum: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen, *Biochemical Engineering Journal*, 3, 163–170.
- Gagnon, G.A. and Slawson, R.M., 1999, An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *Journal of microbiological methods*, 34, 203-214.
- Garcia, F., Lopez, A.L.R., Guillén, J.C., Sandoval, L.H., González, C.R. and Castaño, V., 2012, Corrosion inhibition in copper by isolated bacteria, *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 59(1), pp.10–17.
- Gezvain, K., Butterfield, C.N., Davis, R.E., Madison, A.S., Lee, S., Parker, D.L., Soldatova, A.V., Spiro, T.G., Luther, G.W. and Tebo, B.M., 2012, The molecular biogeochemistry of manganese(II) oxidation, *Biochemical Society Transactions*, 40, 1244–1248.
- Ghiorse, W.C. and Hirsch, P., 1979, An ultrastructural study of iron manganese deposition associated with extracellular polymers of Pedomicrobium-like bacteria, *Archives of Microbiology*, 123, 213–226.
- Ghiorse, W.C., 1984, Biology of iron and manganese depositing bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 38, 515–550.
- Ghosal, D., Omelchenko, M.V., Gaidamakova, E.K, Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Venkateswaran, A., Zhai, M., Kostandarithes, H.M., Brim, H., Makarova, K.S., Wackett, L.P., Fredrickson, J.K. and Daly, M.J., 2005, How radiation kills cells: survival of Deinococcus radiodurans and Shewanella oneidensis under oxidative stress, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 361–375.
- Ginige, M.P., Wylie, J. and Plumb, J., 2011, Influence of biofilms on iron and manganese deposition in drinking water distribution systems, *Biofouling*, 27(2), 151–63.
- Goldberg, J. ve Lier, O.E., 2011, *Rehabilitation of Hydropower - An introduction to economic and technical issues*, Water Papers 71728, Washington.

- Gopal, J., Muraleedharan, P., Sarvamangala, H., George, R., P., Dayal, R., K., Tata, B., V., R., Khatak, H., S. and Natarajan, K., A., 2008, Biomineralisation of manganese on titanium surfaces exposed to seawater, *Biofouling*, 24(4), 275–282.
- Gökdemir, M., Kömürcü, M.İ. ve Evcimen, T.U., 2012, *Türkiye’de Hidroelektrik Enerji ve HES Uygulamalarına Genel Bakış*, İMO Su Yapıları Kurulu, http://www.imo.org.tr/resimler/dosya_ekler/d8c5e9986a1c41b_ek.pdf?dergi=260, [Ziyaret tarihi: 17 Aralık 2018].
- Grandbois, R., Yeager, C., Tani, Y., Xu, C., Zhang, S., Beaver, M., Schwehr, K., Kaplan, D. and Santschi, P., 2018, Biogenic Manganese Oxides Facilitate Iodide Oxidation at $\text{pH} \leq 5$, *Geomicrobiology Journal*, 35(3), 167–173.
- Gün, İ. ve Ekinçi, F.Y., 2009, Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam, *Gıda*, 34(3), 165–173.
- Hadla, M. and Halabi, M.A., 2018, Effect of Quorum Sensing, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 81, 95-112.
- Hadley, R.F., 1948, *Corrosion by micro-organisms in aqueous and soil environments*, Corrosion handbook, In: Uhlig, H.H. (ed), John Wiley & Sons, USA, 471895628, 466-470.
- Hakkarainen, T.J., 2003, Microbiologically influenced corrosion of stainless steels – What is required for pitting?, *Materials and Corrosion*, 509, 503–509.
- Hamilton, W.A., 1985, Sulphate reducing bacteria and anaerobic corrosion, *Annual Review of Microbiology*, 39, 195-217.
- Hansel, C. M., Zeiner, C. A., Santelli, C. M., and Webb, S. M., 2012, Mn(II) oxidation by an ascomycete fungus is linked to superoxide production during asexual reproduction, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 12621–12625.
- Harvey, J. W. and Fuller, C. C., 1998, Effect of enhanced manganese oxidation in the hyporheic zone on basin-scale geochemical mass balance, *Water Resources Research*, 34(4), 623-636.
- Hofer, C. and Schlosser, D., 1999, Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase, *FEBS Letters*, 451, 186–190.
- Holt J. G., 1989, *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, vol 3, Williams and Wilkins Publishers, Baltimore, ISBN: 0-683-07908-5.
- Holt J. G., Kreig N.R., Sneath P. H. A. and Stanely J. T., 1994, *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins Publishers, Maryland, ISBN: 0-683-00603-7.
- Hoyland, V. W., Knocke, W. R., Falkinham III, J. O., Pruden, A., and Singh, G., 2014, Effect of drinking water treatment process parameters on biological removal of manganese from surface water., *Water Research*, 66, 31-39.

- Höhle, H.M. and Nestler, M.C., 2011. Surfaces for longer life and higher energy efficiency, *Sulzer Technical Review*, 26–30.
- Hsieh, K.M., Lion, L.W. and Shuler, M.L., 1985, Bioreactor for the study of defined interactions of toxic metals and biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 1155-61.
- Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I., 2001, CotA of *Bacillus subtilis* is a copper dependent laccase, *Journal of Bacteriology*, 183, 5426–30.
- Ilhan-Sungur and Cotuk, A., 2010, Microbial corrosion of galvanized steel in a simulated recirculating cooling tower system, *Corrosion Science*, 52, 161-171.
- Ilhan-Sungur, E., Cansever, N. and Cotuk, A., 2007, Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp.), *Corrosion Science*, 49, 1097-1109.
- İşdaş, O., 2010, Elektrokimyasal Korozyon İlkeleri, *Metallurji*, 155, 45-48.
- Jamal, M. et al., 2018, Bacterial biofilm and associated infections, *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11.
- Johnson, D. and Chiswell, B., 1993, A new method for the evaluation of the oxidizing equivalent of manganese in surface freshwaters, *Talanta*, 40(4), 533–540.
- Jung, W.K., Schweisfurth, R., 1979, Manganese oxidation by an intracellular protein of a *Pseudomonas* species, *Z Allg Mikrobiologie*, 19, 107–15.
- Junta, J. and Hochella, M.F., 1994, Manganese (II) oxidation at mineral surfaces: A microscopic and spectroscopic study, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(22), 4985-4999.
- Junta-Rosso, J.L., Hochella, J.M.F. and Donald Rimstidt, J., 1997, Linking microscopic and macroscopic data for heterogeneous reactions illustrated by the oxidation of manganese (II) at mineral surfaces, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(1), 149-159.
- Kan, J., Chellamuthu, P., Obraztsova, A., Moore, J.E. and Nealon, K.H., 2011, Diverse bacterial groups are associated with corrosive lesions at a Granite Mountain Record Vault (GMRV), *Journal of Applied Microbiology*, 111(2), 329-337.
- Katsoyiannis, I.A. and Zouboulis, A.I., 2004, Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: Kinetic considerations and product characterization, *Water Research*, 38(7), 1922–1932.
- Kessick, M.A. and Morgan, J.J., 1975, Mechanism of Autoxidation of Manganese in Aqueous Solution, *Environmental Science and Technology*, 9(2), 157–159.
- Kessick, M.A., Vuceta, J. and Morgan, J.J., 1972, Spectrophotometric Determination of Oxidized Manganese with Leuco Crystal Violet, *Environmental Science and Technology*, 6(7), 642–644.

- Khedr, F.G., Shaaban, K.A., Ezzat, S.M. and Maher, M., 2016. Efficiency of the biological system for iron and manganese removals from water, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 6, 1–9.
- Kielemees, J., Bultinck, I., Storms, H., Boon, N. and Verstraete, W., 2002, Occurrence of manganese-oxidizing microorganisms and manganese deposition during biofilm formation on stainless steel in a brackish surface water, *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 41–55.
- Kip, N. and A van Veen, J., 2015, The dual role of microbes in corrosion, *The ISME Journal*, 9(3), 542–551.
- Knocke, W.R., van Benschoten, J.E., Keanny, M.J., Soborski, A.W. and Reckhow, D.A., 1991, Kinetics of manganese and iron oxidation by potassium permanganate and chlorine dioxide, *Journal American Water Works Association*, 83(7), 80–87.
- Koç, E. ve Şenel, M.C., 2013, Dünyada ve Türkiye’de Enerji Durumu - Genel Değerlendirme. *Mühendis ve Makina*, 54(639), 1–4.
- Kohl, P., and Medlar, S., 2006, *Occurrence of manganese in drinking water and manganese control*, USA: American Water Works Association, Colorado, ISBN-13: 978-1583215043.
- Krumbein, W.E. and Altmann, H.J., 1973, A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms, *Helgolander wiss. Meeresunters*, 356(25), 347–356.
- Larrondo, L. F., Salas, L., Melo, F., Vicuña, R., and Cullen, D., 2003, A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6257–6263.
- Larsen, E.I., Sly, L.I. and McEwan, A.G., 1999, Manganese(II) adsorption and oxidation by whole cells and a membrane fraction of *Pedomicrobium* sp., *Archives of Microbiology*, 171, 257–64.
- Lata, S., Sharma, C., Singh, A., 2012, Microbial influenced corrosion by thermophilic bacteria, *Central European Journal of Engineering*, 2(1), 113-122.
- Learman, D. R., Voelker, B. M., Vazquez-Rodriguez, A. I., and Hansel, C. M., 2011, Formation of manganese oxides by bacterially generated superoxide, *Nature Geoscience*, 4, 95–98.
- Lee, J.S., McBeth, J.M., Ray, R.I., Little, B.J. and Emerson, D., 2013, Iron cycling at corroding carbon steel surfaces, *Biofouling*, 29, 1243–1252.
- Lee, R.H., 2015, *Investigating the Stability of Aqueous Mn(III) in the Presence of Humic Substances and Measuring Manganese Speciation With Alpha, Beta, Gamma, Delta-Tetrakis (4-Carboxyphenyl)Porphine*, Tez (Yüksek Lisans), Colorado School of Mines.
- Leflef, U., 2007, *Asal Çelik Paslanmaz – Özellikleri*, Euro Inox, İstanbul, ISBN 978-2-87997-256-5.

- Licina, G., J. and Cubicciotti, D., 1989, Microbial-Induced Corrosion in Nuclear Power Plant Materials, *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, 41(12), 23–27.
- Lin, J. and Ballim, R., 2012, Biocorrosion control: current strategies and promising alternatives, *African Journal of Biotechnology*, 11(91), 15736–15747.
- Lindsay, D. and Von Holy, A., 2006, Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know, *Journal of Hospital Infection*, 64, 313-325.
- Linhardt, P. and Nichtawitz, A., 2003, Mic in Hydroelectric Powerplants, *Corrosion 2003*, 16-20 March, San Diego, California, 1–8.
- Linhardt, P., 1994, Manganese-oxidizing Bacteria and Pitting of Turbine Components Made of CrNi Steel in a Hydroelectric Power Plant, *Werkst. Korr*, 45, 79-83.
- Linhardt, P., 2004, Microbially influenced corrosion of stainless steel by manganese oxidizing microorganisms, *Materials and Corrosion*, 55(3), 158–163.
- Linhardt, P., 2010, Twenty years of experience with corrosion failures caused by manganese oxidizing microorganisms, *Materials and Corrosion*, 61(12), 1034–1039.
- Linhardt, P., 2015, Unusual corrosion of nickel-aluminium bronze in a hydroelectric power plant, *Materials and Corrosion*, 66(12), 1536–1541.
- Little, B., Staehle, R. and Davis, R., 2001, Fungal influenced corrosion of post-tensioned cables, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47, 71–77.
- Liu, H. *et al.*, 2018b, Microbiologically influenced corrosion of 316L stainless steel in the presence of *Chlorella vulgaris*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 129, 209–216.
- Liu, X., Cai, H., Zou, J., Pang, Z., Yuan, B., Zhou, Z. and Cheng Q., 2018a, Spectrophotometric determination of trace permanganate in water with N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD), *Chemosphere*, 212, 604-610.
- Liu, Y.G., Zhou, M., Zeng, G.M., Wang, X., Li, X., Fan, T. and Xu, W.H., 2008, Bioleaching of heavy metals from mine tailings by indigenous sulfur-oxidizing bacteria: effects of substrate concentration, *Bioresource Technology*, 99, 4124–4129.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265- 275.
- Luis, A. *et al.*, 2018, What are the advantages of living in a community ? A microbial biofilm perspective!, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(9), 1–7.
- Lutey, R.W. and Richardson, G.M., 2002, Procedure Used For Root Cause Analysis: Pitting in Stainless Steel Tubes Associated with MnO₂ Deposition, *Corrosion 2002*, 7-11 April, Denver, Colorado, 1–17.

- Macaskie, L.E. and Dean, A.C.R., 1987, Use of immobilized biofilm of *Citrobacter* sp. for the removal of uranium and lead from aqueous flows, *Enzyme Microbial Technology*, 9, 2-4.
- Maly, J. and Fadrus, H., 1974, Photometric determination of manganese in water by using o-tolidine, *The Analyst*, 99, 128–136.
- Mandernack, K.W. and Tebo, B.M., 1993, Manganese Scavenging and Oxidation at Hydrothermal Vents and in Vent Plumes, *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 57(16), 3907-3923.
- Mann, S., Sparks, N., H., C, Scott, G., H., E, and de Vrind-de Jong, E., W., 1988., Oxidation of manganese and formation of Mn₃O₄ (hausmannite) by spore coats of a marine *Bacillus* sp., *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2140–2143.
- Marangoni, P.R.D., Robl, D., Berton, M.A.C., Garcia, C.M., Bozza, A., Porsani, M.V., Dalzoto, P.R., Vicente, V.A. and Pimentel, I.C., 2013, Occurrence of Sulphate Reducing Bacteria (SRB) associated with biocorrosion on metallic surfaces in a hydroelectric power station in Ibirama (SC)-Brazil, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(5), 801–809.
- Marbaniang, D.G., 2012, Spectrophotometric Determination of Manganese in Ground Water in Shillong City Using Bismuthate Oxidation Method, *International Journal of Environmental Protection*, 2(5), 22–26.
- Marble J. C., Corley T. L., Conklin M. H., and Fuller C. C., 1999, Environmental factors affecting oxidation of manganese in Pinal Creek, Arizona, *Water-Resour. Invest. Rep.* 173-83.
- Marcus, D.N. *et al.*, 2017, Diverse manganese(II)-oxidizing bacteria are prevalent in drinking water systems, *Environmental Microbiology Reports*, 9(2), 120–128.
- Melo, L.F. and Bott, T.R., 1997, Biofouling in water systems, *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14, 375-381.
- Mench, M.J., Didier, V.L., Loffler, M., Gomez, A. and Masson, P., 1994, A mimicked in situ remediation study of metal-contaminated soils with emphasis on cadmium lead, *Journal of Environmental Quality*, 23, 58–63.
- Miyata, N., Tani, Y., Iwahori, K. and Soma, M., 2004, Enzymatic formation of manganese oxides by an Acremonium-like hyphomycete fungus, strain KR21-2, *FEMS Microbiology Ecology*, 47, 101-109.
- Miyata, N., Tani, Y., Sakata, M. and Iwahori, K., 2007, Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 1–8.
- Morgan, J. J. and Stumm, W., 1965, Analytical Chemistry of Aqueous Manganese, *American Water Works Association*, 57, 107–119.
- Morgan, J.J., 2005, Kinetics of reaction between O₂ and Mn(II) species in aqueous solutions, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(1), 35–48.

- Morin, E., Kohler, A., Baker, A.R., Foulongne-Oriol, M., Lombard, V., Nagye, L. G., *et al.*, 2012, Genomesequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 17501–17506.
- Mousavi, S., R., Shahsavari, M. and Rezaei, M., 2011, A General Overview On Manganese (Mn) Importance For Crops Production, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9), 1799-1803.
- Muhammadi, M. and Afzal, M., 2014, Optimization of water absorbing exopolysaccharide production on local cheap substrates by *Bacillus* strain CMG1403 using one variable at a time approach, *Journal of Microbiology*, 52, 44–52.
- Murray, J.W., Balistriero, L.S. and Paul, B., 1984, The Oxidation State of Manganese in Marine Sediments and Ferromanganese Nodules, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48, 1237–1247.
- Murray, K.J., Mozafarzadeh, M.L. and Tebo, B.M., 2005, Cr(III) oxidation and Cr toxicity in cultures of the manganese(II)-oxidizing *Pseudomonas putida* strain GB-1, *Geomicrobiology Journal*, 22(3–4), 151–159.
- Nakano, S., Nozawa, M. and Yanagawa, M., 1992, Flow-injection determination of subnanogram amounts of manganese by catalysis of the oxidative coupling of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine with m-phenylenediamine, *Analytica Chimica Acta*, 261(1–2), 183–188.
- Natarajan, K.A., 2013, Biofouling and Microbially Influenced Corrosion of Stainless Steels, *Advanced Materials Research*, 794, 539–551.
- Nealson, K.H. and Saffarini, D., 1994, Iron and Manganese in Anaerobic Respiration: Environmental Significance, Physiology, and Regulation, *Annual Review of Microbiology*, 48, 311–343.
- Nealson, K.H. and Tebo, B., 1980, Structural features of manganese precipitating bacteria, *Origins of Life*, 10, 117–126.
- Neria-González, I., Wang, E., T., Ramirez, F., Romero, J M., Hernandez-Rodriguez, C., 2006, Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico, *Anaerobe*, 12(3), 122–133.
- Nikolaychuk, P., A., 2015, The Potential – pH Diagram For Mn – H₂O System, *Фундаментальные и прикладные исследования в области химии и экологии*, 23-26 September, At Kursk, Russia, 120-123.
- O’Toole, G., Heidi, B., Kaplan, H.B. and Kolter, R., 2000, Biofilm formation as microbial development, *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- Odabaş, C., 2017, *Paslanmaz Çeliklerin Kaynağı*, İstanbul, http://www.askaynak.com.tr/contents/34/20110704120329_paslanmaz-celikler.pdf, [Ziyaret tarihi: 17 Aralık 2018].

- Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y. and Iwamoto, K. *et al*, 1997, Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4793–4799.
- Oliver, J.D., 2005, The viable but nonculturable state in bacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 93–100.
- Onat, A., 2015, *Korozyon Ders Notu*, <https://docplayer.biz.tr/9053613-Sakarya-meslek-yuksekokulu-makina-ve-metal-teknolojileri-bolumu-metalurji-2-0-programi-korozyon-ders-notu.html>, [Ziyaret tarihi: 17 Aralık 2018].
- Oral, F., Behçet, R. and Aykut, K., 2017, Hidroelektrik Santral Rezervuar Verilerinin Enerji Üretimi Amaçlı Değerlendirilmesi, *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 29–38.
- Outokumpu Oyj, 2013, *Handbook of Stainless Steel*, <https://www.outokumpu.com/choose-stainless/stainless-basics/handbooks>, [Ziyaret tarihi: 17 Aralık 2018].
- Ozuolmez, D., Cotuk, A., 2011, Biofilm formation on galvanized steel by SRB isolate obtained from cooling tower water, *IUFS Journal of Biology*, 70(2), 35-42.
- Özbay, E. ve Gençoğlu, M.T., 2009, Hidroelektrik Santrallerin Modellenmesi, *V. Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu*, 19-20-21 Haziran 2009, Diyarbakır, 108–115.
- Pinto, D., Santos, M., A and Chambel, L., 2013, Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms, *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 61-76.
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Dordet-Frisoni, E., Bellon-Fontaine, M.N., Leroy, S., Labadie, J., Hébraudi, M. and Talon, R., 2006, Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosum*, *International Journal of Food Microbiology*, 109, 88–96.
- Pontefract, R.D., 1991, Bacterial adherence: its consequences in food processing, *Canadian institute of food science and technology*, 24, 113-117.
- Post, J.E., 1999, Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmental significance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3447–3454.
- Power, M.E., Van Der Meer, J.R., Harms, H. and Wanner, O., 2001, Colonization of aerobic biofilms by sulfate-reducing bacteria, *Biofouling*, 17, 275- 288.
- Priya, C., Aravind, G. and Thilagaraj, W.R., 2017, Prevalence of Bacillus sp. among the biofilm forming community on Ti surface in marine environment, *Acta Oceanologica Sinica*, 36(6), 89–94.
- Queiroz, P., S., Barboza, N., R., Cordeiro, M., M., Leao, V., A. and Guerra-Sa, R., 2018, Rich growth medium promotes an increased on Mn(II) removal and manganese oxide production by *Serratia marcescens* strains isolates from wastewater, *Biochemical Engineering Journal*, 140, 148-156.

- Rajasekar, A. and Anandkumar, B., 2010, Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines, *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 1175–1188.
- Rajasekar, A., Ganesh Babu, T, Karutha Pandian, S., Maruthamuthu, S., Palaniswamy, N. and Rajendran, A., 2007, Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer *Bacillus cereus* ACE4 in diesel transporting pipeline, *Corrosion Science*, 49, 2694–2710.
- Rao, T.S., Sairam, T.N., Viswanathan, B. and Nair, K.V.K., 2000, Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system, *Corrosion science*, 42, 1417-1431.
- Ratzke, C. and Gore, J., 2018, Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions, *PLOS Biology*, 6(3):, 1-20.
- Reasoner, D., J. and Geldrich, E., E., 1985, A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, F1-7.
- Ren, F., Zhang, L., Song, L., Xu, S., Xi, L., Huang, L., Huang, Y and Dai, X., 2014, Fulvimarina manganoxydans sp. nov., isolated from a deep-sea hydrothermal plume in the south-west Indian Ocean, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64, 2920-2925.
- Revie, R.W. and Uhlig, H.H., 2008, *Corrosion and corrosion control: An introduction to corrosion science and engineering*, 4th ed., John Wiley&Sons Inc., Hoboken New Jersey, ISBN-13: 978-0471732792.
- Richardson, L.L., Aguilar, C. and Nealson, K.H., 1988, Manganese oxidation in pH and O₂ microenvironments produced by phytoplankton, *Limnology and Oceanography*, 33, 352–363.
- Rosson, R., A. and Nealson, K., H., 1982, Manganese Binding and Oxidation by Spores of a Marine Bacillus, *Journal of Bacteriology*, 151(2), 1027–1034.
- Rowan, N. J., 2004, Viable but nonculturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis?, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 462–7.
- Santelli, C., M., Pfister, D., H., Lazarus, D., Sun, L., Burhos, W., D. and Hansel, C., M., 2010, Promotion of Mn(II) oxidation and remediation of coal mine drainage in passive treatment systems by diverse fungal and bacterial communities, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4871–4875.
- Santos, A., L. S. D., Galdino, A., C., M., Mello, T.,P., et al., 2018, What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(9).
- Sarıbuğa, Y.E., 2018, *Hidroelektrik Santrallerde Kullanılan Türbin Tipleri*, Elektroport, www.elektrikport.com/universite/hidroelektrik-santrallerde-kullanilan-turbintipleri/11544#ad-image-0, [Ziyaret tarihi: 16 Aralık 2018].

- Schlosser, D. and Hofer, C., 2002, Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3514–3521.
- Schmitt, J. and Flemming, H., 1996, FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 1–11.
- Sheng, X., Ting, Y.P., Pehkonen, S.O., 2007, The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316, *Corrosion Science*, 49(5), 2159–2176.
- Singh, A., Sharma, C., Lata, S., 2011, Microbial influenced corrosion due to *Desulfovibrio desulfuricans*, *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 58(6), 315–322.
- Sleytr, U.B., 1997, Basic and applied S-layer research: an overview, *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 5–12.
- Smythe, W.F., 2017, Morphological Characterization of Bacteriogenic Manganese Oxides From Three Model Manganese (II/III) Oxidizing Bacterial Species, *PostDoc Journal*, 5(3), 7–13.
- Soldatova, A.V., Butterfield, C., Oyerinde, O.F., Tebo, B.M., and Spiro, T.G., 2012, Multicopper oxidase involvement in both Mn(II) and Mn(III) oxidation during bacterial formation of MnO_2 , *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17, 1151–1158.
- Spratt, H.G., Siekmann, E.C. and Hodson, R.E., 1994, Microbial manganese oxidation in saltmarsh surface sediments using a leuco crystal violet manganese oxide detection technique, *Coastal and Shelf Science*, 38, 91–112.
- Stumm, W. and Morgan, J.J., 1996, *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*, Wiley, New York, ISBN: 978-0-471-51185-4.
- Sujith, P.P., Mouryaa, B.S., Krishnamurthi S., Meenaa, R.M. and Loka Bharathi, P.A., 2014, Mobilization of manganese by basalt associated Mn(II)-oxidizing bacteria from the Indian Ridge System, *Chemosphere*, 95, 486–495.
- Sunda, W.G. and Kieber, D.J., 1994, Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low molecular weight organic substrates, *Nature*, 367, 62–64.
- Sutherland, I.W., 2001, The biofilm matrix an immobilised but dynamic microbial environment, *Trends in microbiology*, 9(5), 222 - 227.
- Sutherland, K., M., Wankel, S., D. and Hansel, C. M., 2018, Oxygen isotope analysis of bacterial and fungal manganese oxidation, *Gebiology*, 16(4), 1-13.
- Tebo, B.M., 1991, Manganese(II) Oxidation in the Suboxic Zone of the Black Sea, *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers*, 38, 883-905.

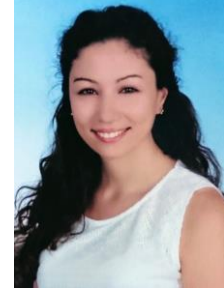
- Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D., Verity, R., Webb, S.M., 2004, Biogenic Manganese Oxides: Properties and Mechanisms of Formation, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 32(1), 287–328.
- Tebo, B.M., Ghiorse, W.C., van Waasbergen, L.G., Siering, P.L. and Caspi, R., 1997, Bacterially mediated mineral formation: insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 35(1), 225-266.
- Tebo, B.M., Johnson, H.A., McCarthy, J.K. and Templeton, A.S., 2005, Geomicrobiology of manganese(II) oxidation, *Trends in Microbiology*, 13(9), 421–428.
- Tekerlekopoulou, A.G., Pavlou, S. and Vayenas, D.V., 2013, Removal of ammonium, iron and manganese from potable water in biofiltration units: a review, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(5),751-773.
- Temizkan, G., Arda, N., 2007, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 9789754205831.
- Thomas, R.J., 2002, *Biological Corrosion Failures. Failure Analysis and Prevention*, ASM Handbook, ASM International, Ohio, USA, ISBN-10: 0871707047.
- Thyssen, C., Holuscha, D., Kuhn, J., Walter, F., Fürbeth, W. and Sand, W., 2015, Biofilm Formation and Stainless Steel Corrosion Analysis of *Leptothrix discophora*, *Advanced Materials Research*, 1130, 79–82.
- Tournassat, C., Charlet, L., Bosbach, D. and Manceau, A., 2002, Arsenic (III) Oxidation by Birnessite and Precipitation of Manganese (II) Arsenate, *Environmental Science & Technology*, 36, 493–500.
- Trachoo, N., 2003, Biofilms and the food industry, *Journal of Science and Technology*, 25(6), 807-815.
- Tran, T.N., Kim, D.G. and Ko, S.O., 2018, Synergistic effects of biogenic manganese oxide and Mn(II)-oxidizing bacterium *Pseudomonas putida* strain MnB1 on the degradation of 17 A-ethinylestradiol, *Journal of Hazardous Materials*, 344, 350–359.
- Tutaşı, C.C., 2018, *Hidroelektrik Santraller ve Çeşitleri - Yenilebilir Enerji Sektörü Üzerine Yazılarım*, <https://tutasi.com/2012/11/26/95>, [Erişim tarihi: 16 Aralık 2018].
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu), Enerji Kaynaklarına Göre Elektrik Enerjisi Üretimi ve Payları, Temel İstatistikler, 2016, Ankara.
- Tyler, P.A. and Marshall, K.C., 1967, Microbial oxidation of manganese in hydro-electric pipeline, *Antonie van Leeuwenhoek*, 33(1), 171–183.
- van Veen, W.L., Mulder, E.G. and Deinema, M.H., 1978, The *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria, *Microbiology Reviews*, 42, 329–356.

- van Waasbergen, L.G., Hildebrand, M. and Tebo, B.M., 1996, Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1, *Journal of Bacteriology*, 178, 3517–3530.
- van Waasbergen, L.G., Hoch, J.A. and Tebo, B.M., 1993, Genetic analysis of the marine manganese-oxidizing *Bacillus* sp. strain SG-1: Protoplast transformation, Tn917 mutagenesis and identification of chromosomal loci involved in manganese oxidation, *Journal of Bacteriology*, 175, 7594–7603.
- Vander Voort, G.F., Lucas, G.M. and Manilova, E.P., 2004, *Metallography and Microstructures of Stainless Steels and Maraging Steels*, Metallography and Microstructures, Vol 9, ASM Handbook, ASM International, 670-700.
- Videla, H.A. and Herrera, L.K., 2005, Microbiologically influenced corrosion: looking to the future, *International Microbiology*, 8(3), 169–180.
- Videla, H.A. and Herrera, L.K., 2009, Understanding microbial inhibition of corrosion: a comprehensive overview, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 896–900.
- Videla, H.A., 1996, *Manual of biocorrosion*, CRC Press, UK, ISBN: 9780873717267.
- Villalobos, M., Toner, B., Bargar, J. and Sposito, G., 2003, Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 2649–2662.
- Virmani P., 2002, *Corrosion Costs And Preventive Strategies In The United States*, <http://impact.nace.org/documents/ccsupp.pdf>, [Erişim tarihi: 16 Aralık 2018].
- Wang, ZW., Liu, Y. and Tay, JH, 2007, Biodegradability of extracellular polymeric substances produced by aerobic granules, *Applied Microbiology Biotechnology*, 74(2), 462-466.
- Wiatr, C.L., 2008, Biocorrosion in the Pulp and Paper Industry, *2008 PAPERCON Conference Proceedings*, 4-7 May 2008, Dallas, Texas, ISBN: 1-59510-172-1.
- Wilkie, A.C., 2005, Anaerobic digestion: biology and benefits, *Dairy Manure Management Conference*, 15-17 March 2005, New York, USA, 63-72.
- World Health Organization, 2001, *Manganese*, In Air Quality Guidelines, Chapter 6.8, 2nd ed., WHO Regional Publications, Copenhagen, Denmark, ISBN: 92-890-1358-3.
- Wright, M.H., Farooqui, S.M., White, A.R. and Greene, A.C., 2016, Production of manganese oxide nanoparticles by *Shewanella* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5402–5409.
- Wright, M.H., Geszvain, K., Oldham, V.E., Luther, G.W. and Tebo, B.M., 2018, Oxidative formation and removal of complexed Mn(III) by *Pseudomonas* species, *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–11.

- Yang, W., Zhang, Z., Zhang, Z., Chen, H., Liu, J., Ali, M., Liu, F. and Lin, L., 2013, Population Structure of Manganese-Oxidizing Bacteria in Stratified Soils and Properties of Manganese Oxide Aggregates under Manganese – Complex Medium Enrichment, *Plos One*, 8(9), 1-13.
- Yao, W. and Millero, F. J., 1996, Adsorption of Phosphate on Manganese Dioxide in Seawater, *Environmental Science and Technology*, 30(2), 536-541.
- Yıldız, D., 2016, *Suyla Gelen Enerji: Hidroelektrikte son durum*, <http://www.hidropolitikakademi.org/wp-content/uploads/2016/07/Suyla-Gelen-Enerji-HIDROELEKTRİK.pdf>, [Erişim tarihi: 16 Aralık 2018].
- Yuen, S.H., 1958, Determination of traces of manganese with leucomalachite green, *Analyst*, 83(13), 3238–3243.
- Zakharova, I. R. and Prfenova, V., V., 2007, A method for cultivation of microorganisms oxidizing iron and manganese in bottom sediments of Lake Baikal, *Izvestiia Akademii nauk*, 34(3), 290–295.
- Zhang, X. and Bishop, L.P., 2003, Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, 50(1), 63-69.
- Zhang, X., Bishop, P.L. and Kinkle, B.K., 1999, Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms, *Water Science and Technology*, 39(7), 211-218.
- Zottola, E.A., 1991, Characterization of the attachment matrix of *Pseudomonas fragi* attached to non-porous surfaces, *Biofouling*, 5, 125-148.
- Zuo, R., 2007, Biofilms : strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1245–1253.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Polen Yılmaz
Doğum Yeri	Çankaya
Doğum Tarihi	18.06.1993
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0541 621 97 51
E-Posta Adresi	yilmazpolen@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	31.12.2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Makale ve Bildiriler	
<p>Yılmaz, P., Cansever, N., Ilhan-Sungur, E., 2019, Corrosion Behavior of 1.4313 Steel in The Presence of Manganese Oxidizing Bacterium Isolated from Murat River (Turkey), <i>Eurocorr 2019</i>, 9-13 September, Sevilla, Spain.</p>	
<p>Yılmaz, P., Ilhan-Sungur, E., Cansever, N., 2018, Microbiologically Induced Corrosion by Manganese Oxidizing Bacteria, <i>XV. International Corrosion Symposium</i>, 26-28 September, Hatay, Turkey.</p>	