



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SOĞUTMA KULE SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ANAEROP
BAKTERİ İZOLATININ KOROZİF ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Derya ÖZTÜRK

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK

Aralık, 2009

İSTANBUL

Bu çalışma 03/12/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Aşın ÇOTUK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

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

Doç. Dr. Ayten ERDEM
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Nurver ÜLGER
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Yard. Doç. Dr. Esra SUNGUR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Bu alışma İstabul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin Yeni Fen kod T-18/15122006 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca rehberliği, değerli yardımları, hiç eksilmeyen desteği, değerli görüş ve önerileriyle tezime ve bundan sonraki kariyer hayatıma önemli katkılarda bulunan Sayın Hocam *Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK*'a,

Tezime katkıda bulunan ve yararlı fikirleriyle beni yönlendiren Sayın *Prof. Dr. Nurhan CANSEVER*'e,

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve gerek İstanbul'daki gerekse yurtdışındaki çalışmalarım esnasında değerli fikirleri ve laboratuvar çalışmalarına yaptığı katkılarından dolayı Sayın *Yard. Doç. Dr. Esra İLHAN SUNGUR*'a,

Tezim dahilindeki moleküler analizleri gerçekleştirmem için laboratuvarında çalışma imkanı veren ve değerli fikir ve önerileriyle, bu alandaki ilk adımlarımı atmamı sağlayan Sayın *Doç. Dr. Gerard MUYZER*'e,

Değerli fikirleri, katkıları ve manevi yardımlarıyla her an yanımda olan Sayın *Araş. Gör. Dr. Nihal DOĞRUÖZ*, Sayın *Yard. Doç. Dr. Zuhul ZEYBEK* ve Sayın *Yard. Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN*'e,

Teknik yardım aldığım *Çetin ÇELİK, KERİM ÇELİK MAMÜLLERİ İMALAT VE TİCARET A.Ş.*'ye,

Manevi destekleklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım *Süleyman HOCA, Ersan ERİKLİ, Araş. Gör. Duygu GÖKSAY, Duygu BAŞ, Bihter MİNNOŞ, Araş. Gör. Miray ÜSTÜNTÜRK*'e,

Eşine az rastlanır bir sabır, hoşgörü ve sevgiyle daima yanımda olan çok değerli arkadaşım, nişanlım *Kıvanç ÖZÜÖLMEZ*'e,

Hayatıma en değerli katkılarda bulunan, her zaman her konuda yanımda olup mutluluğum için ellerinden gelenin en iyisi yapan sevgili annem *Gönül ÖZTÜRK*, babam *Özdemir ÖZTÜRK* ve abilerim *Devrim ÖZTÜRK* ve *Devran ÖZTÜRK*'e,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Derya ÖZTÜRK

Aralık, 2009

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ.....	5
2. GENEL KISIMLAR	8
2.1. SOĞUTMA KULESİ.....	8
2.2. BİYOFİLM	10
2.3. SOĞUTMA KULESİNDE BULUNAN MİKROORGANİZMALAR.....	11
2.3.1. Sülfat İndirgeyen Bakteriler	12
2.3.2. <i>Clostridium</i>	13
2.4. KOROZYON	15
2.5. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON.....	16
2.5.1. MIC Oluşumu.....	16
2.5.2. MIC'e Yol Açan Bakteriler	17
2.5.3. SRB'nin Korozyon Mekanizmaları.....	18
2.6. GALVANİZLİ ÇELİK VE KOROZYON.....	20
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	21
3.1. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER.....	21

3.1.1. Kule Suyundan Anaerop Bakteri İzolasyonu.....	21
3.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON DENEYİ	22
3.2.1. Kupon Temizliği.....	22
3.2.2. Deney Düzenegi	23
3.2.3. Bakteriyolojik Analiz.....	24
3.2.3.1. Kültürden Sülfat İndirgeyen Bakterilerin İzolasyonu ve Sayımı.....	24
3.2.3.2. Kuponlarda Oluşan Biyofilmdeki Sülfat İndirgeyen Bakterilerin İzolasyonu ve Sayımı.....	25
3.2.4. EPS Eldesi ve Karbonhidrat Tayini.....	25
3.2.5. Düzenekteki Kültürün Fiziksel ve Kimyasal Parametrelerinin Analizi	27
3.2.5.1. Sülfat (SO_4^{-2}).....	27
3.2.5.2. Hidrojen sülfür (H_2S).....	28
3.2.5.3. Klorür (Cl).....	29
3.2.5.4. pH.....	29
3.2.6. Korozyon Analizi.....	29
3.2.7. Kontrol Düzenegi	30
3.2.7.1. Kontrol Düzenegi Besiyerinin Fiziksel ve Kimyasal Parametreleri	30
3.2.7.2. Korozyon Analizi.....	31
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	31
3.4. MOLEKÜLER ANALİZLER.....	31
3.4.1. DNA Eldesi.....	31
3.4.2. 16S rDNA Genlerinin PCR ile Çoğaltılması.....	32
3.4.3. 16S rDNA Genlerinin Denatüran Gradyan Jel Elektforezi (DGGE)	33
3.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER	34
3.5.1. Postgate B Besiyeri.....	34
3.5.2. Postgate C Besiyeri.....	34
3.5.3. % 5 Malaşit Yeşili	35

3.5.4. 5 mmol/l Bakır Sülfat Solüsyonu	35
3.5.5. 50 mmol/l Hidroklorik Asit	35
3.5.6. Ayarlama Çözeltisi.....	35
3.5.7. Dikromat (Bikromat) Eriyiği	36
3.5.8. 1x Tris-Asetat-EDTA (TAE)	36
3.5.9. 10mM Tris Tampon Çözeltisi	36
3.5.10. % 0.8 Agaroz Jel	36
3.5.11. SYBR Safe Boya Solüsyonu	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER.....	37
4.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON DENEYİ	41
4.2.1. Deney Düzeniği	41
4.2.2. Kontrol Düzeniği	45
4.2.3. Korozyon.....	46
4.3. MOLEKÜLER ANALİZLER.....	48
5. TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1** : Direk temaslı soğutma kulesi şeması9
- Şekil 2.2** : Morfolojileri farklı bazı SRB'lerin faz kontrast mikroskopundaki görünümleri; (A) *Desulfovibrio desulfuricans*, (B) *Desulfobacter latus*, (C) *Desulfococcus multivorans*, (D) *Desulfonema limicola*, bar = 10 µm (Holt ve diğ., 1994) 12
- Şekil 2.3** : Farklı *Clostridium* türlerinin mikroskop görüntüleri; (A) *Clostridium botulinum*'un Gram boyalı preparatının ışık mikroskobu görüntüsü (Center For Disease Control and Prevention), (B) *Clostridium perfringens*'in SEM fotoğrafı, (DENNIS KUNKEL MICROSCOPY, INC.) 14
- Şekil 2.4** : Sülfat indirgeyen bakterilerin varlığında demirin anaerobik korozyonu. 19
- Şekil 3.1** : Deney düzeneği 24
- Şekil 3.2** : Toplam karbonhidrat miktarının tayini için fenol sülfürik asit yöntemi ile standart glukoz konsantrasyonlarından hazırlanmış olan standart eğri..... 27
- Şekil 3.3** : Sülfat miktarının tayini için turbidimetrik yöntem ile standart sülfat konsantrasyonlarından hazırlanmış olan standart eğri. 28
- Şekil 3.4** : Hidrojen sülfür miktarının tayini için Cord-Ruwisch yöntemi ile standart hidrojen sülfür konsantrasyonlarından hazırlanmış olan standart eğri. 29
- Şekil 3.5** : SmartLadder moleküler markırın, jel üzerindeki bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA miktarları..... 33
- Şekil 4.1** : Bakteri izolasyonunda kullanılan Postgate B besiyerleri; (a ve b) SRB pozitif, (c) ekim yapılmamış besiyeri..... 37
- Şekil 4.2** : Yarı-katı Postgate C besiyerindeki H₂S üreten bakterilerin koloni morfolojilerinin görünümü..... 38
- Şekil 4.3** : Yarı-katı Postgate C besiyerinde üreyen farklı şekil ve renklerdeki bakteri kolonilerinin mikroskop görüntüleri. 38
- Şekil 4.4** : H₂S üreten kültürün faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsü (A ve B)..... 39
- Şekil 4.5** : H₂S üreten kültürün Gram boyalı preparatının ışık mikroskopundaki görüntüsü..... 40
- Şekil 4.6** : H₂S üreten kültürün endospor boyalı preparatının ışık mikroskopundaki görüntüsü..... 40
- Şekil 4.7** : Deney ve kontrol düzeneklerindeki SO₄⁻² konsantrasyonlarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir. 42
- Şekil 4.8** : Deney düzeneği kültüründeki SO₄⁻² ve H₂S konsantrasyonlarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir. 43
- Şekil 4.9** : Deney düzeneğine yerleştirilen galvanizli çelik kuponların yüzeyinde oluşan biyofilmdeki karbonhidrat miktarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir..... 44
- Şekil 4.10** : Deney düzeneği kültüründeki ve galvanizli çelik kuponların yüzeyindeki SRB sayıları. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir..... 45
- Şekil 4.11** : Deney ve kontrol düzeneklerine yerleştirilen galvanizli çelik kuponların korozyon hızları. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir..... 48
- Şekil 4.12** : PCR'la çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerinin agaroz jeldeki görüntüsü; M : Markır, İ: İzolat. 49
- Şekil 4.13** : H₂S üreten SRB içeren anaerobik bakteri kültürünün 16S rDNA gen

fragmentlerinin oluşturduğu DGGE profili; M : Markır, İ: İzolat.50

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Soğutma kulesi suyu için önerilen bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametre değerleri (Electric Power Research Institute, 2003)	9
Tablo 3.1 : Galvanizli çelik kuponların kimyasal içeriği	22
Tablo 4.1 : Saatlere göre deney düzeneğindeki besiyerinin SO_4^{-2} , Cl^- , H_2S ve pH değerleri.....	41
Tablo 4.2 : Saatlere göre kontrol düzeneğindeki besiyerinin SO_4^{-2} , Cl^- , H_2S ve pH değerleri.....	46
Tablo 4.3 : Deney ve kontrol düzeneğine yerleştirilen galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızlarının oranı.....	47
Tablo 5.1 : <i>Desulfosporosinus</i> ve <i>Clostridium</i> cinslerinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri.....	59

SEMBOL LİSTESİ

g	: gram
mg	: miligram
µg	: mikrogram
cm	: santimetre
mm	: milimetre
µm	: mikrometre
cm²	: santimetrekare
m²	: metrekare
l	: litre
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
µS	: mikrosiemens
dk	: dakika
sn	: saniye
mdd	: mg/dm ² .gün
°C	: santigrat derece
kob/ml	: mililitrede koloni oluşturan birim
DNA	: deoksiribonükleik asit
rDNA	: ribozomal DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DGGE	: Denatüran Gradyan Jel Elektroforezi
TÇM	: Toplam çözünmüş madde
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit

ÖZET

SOĞUTMA KULE SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ANAEROP BAKTERİ İZOLATININ KORUZİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mikroorganizmalar tarafından başlatılan veya hızlandırılan korozyon, “Mikrobiyolojik Korozyon” (MIC) veya “Biyokorozyon” olarak tanımlanmaktadır. Korozyondan en çok etkilenen endüstriyel yapılar elektrik güç santralleri, su boruları, su depoları ve soğutma kuleleridir.

Soğutma kulelerinin iç yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakası, mikrobiyolojik korozyona neden olan anaerobik sülfat indirgeyen bakterilerin (SRB) bulunabilmesine olanak sağlamaktadır.

Galvanizli çelik sac, biyofaulinge ve korozyona dirençli olması ve paslanmaz çeliklere göre nispeten ucuz olması nedeni ile su depoları ve soğutma kulelerinde sıklıkla tercih edilen bir malzemedir.

Bu projedeki amacımız, bir soğutma kulesi suyundan izole edilen SRB içeren ve H₂S üreten anaerobik bakteri kültürünün, kurulan laboratuvar ölçekli deney düzeneğinde, galvanizli çelik kuponlar üzerine koruzif etkisinin incelenmesi, korozyon hızının belirlenmesi, ayrıca bu anaerop bakteri kültürünün moleküler tanısının yapılmasıdır.

Deney, düzeneğe yerleştirilen galvanizli çelik kuponların 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 360 ve 744. saatlerde çıkarılarak kupon yüzeyindeki (sesil) SRB sayılarının ve aynı saatlerde düzenek kültüründeki serbest (planktonik) SRB sayılarının belirlenmesi, metalin korozyon hızının saptanması, bakterilerin hücre dışı polimerik maddelerinin (Extracellular Polymeric Substances-EPS) içerdiği karbonhidrat miktarlarının ölçümü ve kültürün içerdiği bakteri türlerinin moleküler yöntemlerle tanısının yapılması şeklinde planlanmıştır.

Çalışmamız sonucunda, deney düzeneğinde denenen SRB içeren anaerop bakteri kültürünün galvanizli çelik kupon yüzeylerinde tutunarak biyofilm oluşturduğu ve korozyona neden olduğu, ancak kontrol düzeneğindeki kuponların korozyon hızıyla

karşılaştırıldığında bu hızın çok yüksek olmadığı gözlemlenmiştir. Tez kapsamındaki molekler analizler Hollanda Delft Teknoloji Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, incelediğimiz anaerob bakteri kültürünün bir SRB türü olan *Desulfosporosinus* sp. ve anaerob H₂S üreten *Clostridium* sp. türünden oluştuğu belirlenmiştir.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE CORROSIVE EFFECTS OF ANAEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM A COOLING TOWER WATER

Corrosion which is initiated or promoted by microorganisms is called as “Microbiologically Influenced Corrosion (MIC)” or “Biocorrosion”. Corrosion mostly affects structures like; electrical power plants, water pipelines, water tanks and cooling towers.

The biofilm layer which forms on cooling towers inner surfaces allows sulfate-reducing bacteria (SRB) to live in which cause MIC.

Galvanized steel is commonly used as a construction material in building water tanks and cooling towers, because of its resistance to biofouling and biocorrosion and relatively cheap cost compared to stainless steel.

The aims of our study were to investigate the corrosive effects of the anaerobic bacteria isolate that contains SRB and produces H_2S , which was isolated from a cooling towers’ water, on galvanized steel coupons by using a laboratory scaled experimental setup, to determine the corrosion rate, and also to perform molecular identification of this anaerobic bacteria culture.

The experiment was planned as taking the galvanized steel coupons out of the setup at hours 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 360 and 744, determining the planktonic and sessil SRB numbers, estimating the corrosion rate of the metal coupons, measurement of the carbohydrate amount of extracellular polymeric substances and determining the bacterial species present in the experimental setup culture by molecular analysis.

It was determined at the end of this study that anaerobic bacteria culture in the experimental setup could form biofilm on galvanized steel coupons, but it was observed that there wasn’t marked difference between them in terms of corrosion rate when compared to the control coupons. Molecular analysis were carried out at Delft University of Technology, Department of Biotechnology. The result of these analyses

showed that the anaerobic bacteria culture was consisted of *Desulfosporosinus* sp. (99%), an SRB species, and an anaerobic sulfidogenic bacterium *Clostridium* sp (99%).

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar doğal, endüstriyel ve medikal ortamlardaki katı yüzeylere tutunup çoğalarak mikrobiyal korozyon (MIC) ve fouling gibi azımsanmayacak sorunlara sebep olmaktadır (Costerton ve diğ., 1995). Malzemeler üzerinde mikroorganizma gelişimi, liman donanımları, deniz taşımacılığı, madencilik endüstrisi, enerji üretimi, gıda endüstrisi, atık su arıtımı, su soğutma sistemleri, su dağıtımı, halk sağlığı ve biyomalzemeler gibi birçok teknolojik alanı etkilemektedir (Borenstein, 1994; Morton ve diğ., 1998).

Soğutma kuleleri, ideal bir ortam ve elverişli bir besin dengesi sağlayarak mikroorganizmaların gelişimini destekleyen tipik ekosistemlerdir (Choudhary, 1998). Sudan veya suyla temas halindeki havadan sisteme giren bakteri, mantar ve algler, soğutma kulelerinin iç yüzeylerinde bir biyofilm tabakasının oluşumuna neden olmaktadır. Böylece bu biyofilm tabakası, soğutma kulelerinde mikrobiyolojik korozyona (MIC) neden olan anaerobik bakterilerin bulunabilmesine olanak sağlamaktadır. Mikroorganizmaların varlığı veya aktiviteleri sonucunda meydana gelen mikrobiyolojik korozyon önemli ölçüde ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Thierry ve Sand, 2002). Su soğutma sistemlerinde, pahalı ekipmanların tahribatında en sık karşılaşılan sorun olan korozyon ve mikrobiyal fouling, üretim düşüşüne, bakım masraflarının artmasına, ısı tranfer veriminin azalmasına ve enerji kaybına yol açmaktadır (Satpathy, 1999). Bu sebeple son yıllarda mikroorganizmaların su soğutma sistemlerindeki aktivitelerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır.

Yapılan saha çalışmaları, biyofilm içinde bazı potansiyel patojenlerin (Drake ve diğ., 2003) yanısıra, anaerobik sülfat indirgeyen bakterilerin (SRB) de bulunduğunu ortaya koymuştur (Beech, 1999; Beech ve Gaylarde, 1999; Geesey ve Suci, 2000). Sülfat indirgeyen bakteriler, soğutma sistemleri malzemelerinin korozyonuna neden olan başlıca bakteri gruplarından biri olarak kabul edilmektedir (Hamilton, 1985; Little ve diğ., 1991; Papapetropoulou, 1997; Rao ve Satpathy, 1999). SRB, anaerobik ortamlarda gelişmekte ve biyofilmdeki karbon kaynaklarını kullanarak sülfatı (SO_4^{2-}) hidrojen

sülfüre (H₂S) indirgemektedirler (Lee ve diğ., 1995). Oluşan H₂S, çelik, paslanmaz çelik, galvanizli çelik gibi metalleri ciddi şekilde korozyona uğratmaktadır (De Bruyn, 1992; John ve diğ., 1994; Jayaraman ve diğ., 1999; Rao ve diğ., 2000). İlhan-Sungur ve Çotuk'un (2005) yapmış oldukları bir çalışmada İstanbul civarındaki otel ve işyerlerinden oluşan 30 farklı binanın soğutma kulesi suları, sülfat indirgeyen bakterilerin dağılımı bakımından incelenmiş ve incelenen binaların %50'sinin soğutma kulesi suyunda SRB'nin varlığı tespit edilmiştir.

Soğutma kulesi yapı malzemesi olarak, korozyona ve biyofaulinge direncinden dolayı genellikle galvanizli çelik kullanılmaktadır (Zhang, 1996; Kazanç, 1992). Yapılan literatür çalışmalarında sulu ortamlarda SRB'in galvanizli çelik üzerine korozif etkisi ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. İlhan-Sungur ve diğ. (2007) laboratuvar koşulları altında saf *Desulfovibrio sp.* ile yapmış oldukları çalışmada SRB'nin galvanizli çeliği korozyona uğratabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca İlhan-Sungur ve Çotuk (2010) model bir su sisteminde gerçekleştirdikleri çalışmalarında galvanizli çeliğin mikrobiyolojik olarak korozyona uğrayabildiğini tespit etmişlerdir.

MIC'in mekanizmasını anlamak için, her ne kadar doğadan izole edilmiş saf kültürlerle laboratuvar çalışması yapmak gerekliyse de, mikroorganizmalar, doğada neredeyse hiçbir zaman saf türler halinde bulunmazlar, dolayısıyla mikrobiyal birlikteliklerin rolü üzerine yapılan araştırmalar artarak devam etmektedir. Soracco ve diğ. (1988), asit üreten bakteriler (APB) tarafından üretilen asitin, SRB ve metanojenler tarafından besin olarak kullanıldığını ve SRB'nin korozyona uğrayan bölgelerde APB'nin aktivitelerinden dolayı çoğaldığını ileri sürmüşlerdir. Mikroorganizma türleri arasındaki etkileşimlerin karmaşıklığını gösteren bir başka çalışma da Gaylarde ve Johnston (1986) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmaları sonucunda, çeliğin anaerobik korozyonunun, anaerobik *Desulfovibrio vulgaris*'in saf kültürlerinde arttığını, bir fakültatif anaerop olan *Vibrio anguillarum* türünün saf kültüründe kontrol seviyelerinin altına düştüğünü; her iki türün varlığında ise en yüksek korozyon oranlarının görüldüğünü bildirmişlerdir.

Bu nedenle, bu tez projesi kapsamında, soğutma kulesinden izole edilen SRB içeren ve H₂S üreten anaerop bakteri kültürünün galvanizli çelik sac üzerine korozif etkisinin olup olmadığının, kurulan laboratuvar ölçekli deney düzeneğinde incelenmesi, korozyon hızının belirlenmesi ve bu kültürün moleküler tanısının yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca SRB sayısı, ve EPS ve H₂S gibi biyolojik parametrelerin mikrobiyolojik korozyona etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SOĞUTMA KULESİ

Soğutma kuleleri, endüstriyel sistemlerin çalışması esnasında oluşan atık ısının sistemden uzaklaştırılması için kullanılan yapılardır (Choudhary, 1998; Kazanç, 1992). Petrol rafinerileri, kimya fabrikaları ve enerji santrallerinde kullanılan suyun soğutulmasında sıklıkla tercih edilmektedirler. Kulelerin boyutu sisteme ve amaca göre farklı ölçülerde olabilmektedir. Kule malzemesi olarak başlıca galvanizli çelik olmak üzere ağaç, plastik, beton, taş tuğla vb. kullanılmaktadır (Kazanç, 1992).

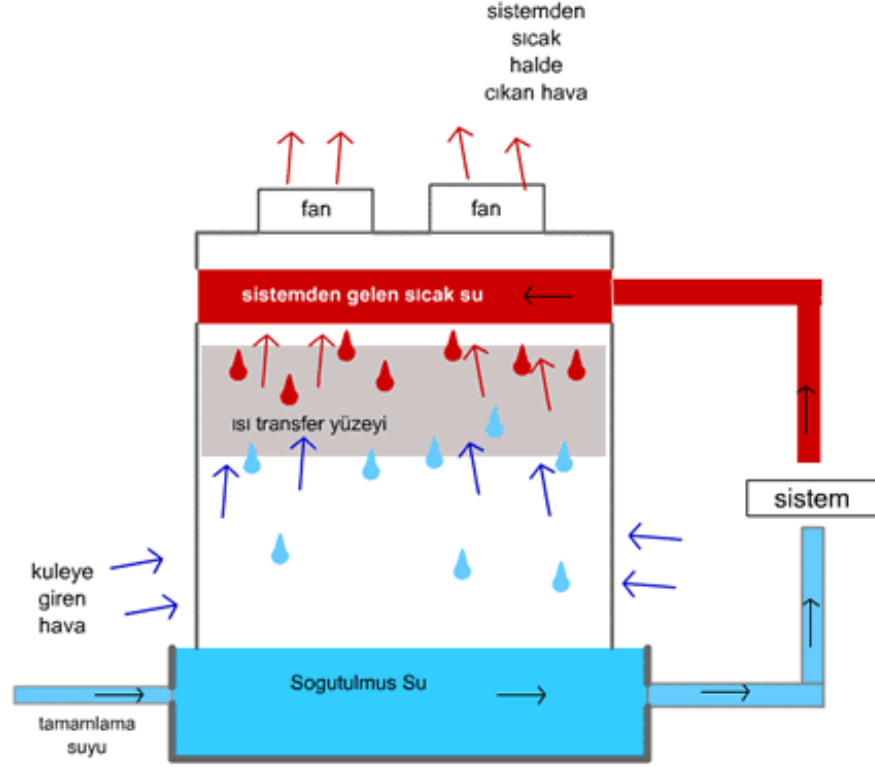
İki tip soğutma kulesi bulunmaktadır (Kazanç, 1992):

1) İndirek temaslı (kapalı sistem) soğutma kulesi

Sıcak su, soğutma kulesinde bir boru içerisinde hareket etmekte ve suyun sıcaklığı borunun dışındaki dış çevrim suyu ve hava akışı yolu ile düşürülmektedir. İç çevrimdeki su, atmosferle direk olarak temas etmemektedir (British Association For Chemical Specialities, 1989; Kazanç, 1992). Kapalı sistemlerde faaliyet süresince su kaybı ve kazanımı olmamaktadır (Herro ve Port, 1993).

2) Direk temaslı (açık sistem) soğutma kulesi

Açık sistem soğutma kulelerinde, su direk olarak açık havaya maruz kalmakta ve suyun buharlaşması ile sıcaklık havaya transfer olmaktadır (Şekil 2.1). Uygun sıcaklık, pH ve iyi havalandırma koşullarına sahip olmalarının yanısıra, tamamlama suyundan ve havadan gelen çeşitli mikroorganizmalar, kule iç yüzeylerinde biyofilm tabakası oluşumuna neden olmaktadır (Choudhary, 1998). Buharlaşma dolayısıyla sudaki çözülmüş madde miktarı artmaktadır. Çözülmüş madde miktarındaki artış, sistemdeki sıcaklık değişimleri ve suyun sistem metalleri üzerindeki etkisiyle bir araya geldiği zaman, birçok probleme neden olmaktadır. Bu durumu engellemek için, soğutma kulesinden düzenli olarak su boşaltılmakta ve kuleye, buharlaşma ve boşaltım sonucunda eksilen su miktarıyla eşdeğer oranda su eklenmektedir. Nitekim, kule suyunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametrelerinin belirli değerler (Tablo 2.1) dahilinde olması önerilmektedir (de Almeida ve diğ., 1997; Electric Power Research Institute, 2003; Lane ve Peck, 2003; Aqua Correct, 2008).



Şekil 2.1 : Direk temaslı soğutma kulesi şeması

Tablo 2.1 : Soğutma kulesi suyu için önerilen bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametre değerleri (Electric Power Research Institute, 2003)

Parametre	Birim	Değer
Toplam Alkalinite	mg/l	200 – 400
Sülfat	mg/l	< 707
Klor	mg/l	< 900
Demir	mg/l	< 0.3
pH		6.5 - 8.5
İletkenlik	$\mu\text{S}/\text{cm}$	<1200
TÇM	mg/l	<500
Bakteri sayısı:		
Heterotrof bakteriler	kob/ml	<1000
SRB	hücre/ml	Sıfır

Kob: Koloni oluşturan birim

2.2. BİYOFİLM

Sudaki bakteriler ya su içinde serbest halde dağılmış (planktonik) ya da bir yüzeye tutunmuş (sesil) halde bulunurlar. Sesil olanlar yavaş gelişirken, planktonik bakterilerin hızlı çoğalma gösterdikleri ve yeni alanlara yayıldıkları bilinmektedir. Kendi ürettikleri matriks içine gömülü, birbirlerine ve/veya bir yüzeye yapışmış mikroorganizmalar topluluğuna biyofilm denmektedir. Biyofilmler, suyla temas eden bütün yüzeylerde meydana gelebilmektedir. Sudaki bakterilerin % 99'u biyofilm içinde, yani sesil formda yaşamaktadırlar (Costerton ve diğ., 1986). Biyofilm heterojenik bir yapıya sahiptir ve içeriği de çevresel koşullara ve varolan mikroorganizmalara bağlı olarak değişmektedir (Videla, 1996; Beech ve diğ., 2000).

Biyofilm oluşumu kompleks dinamik bir süreçtir (Costerton ve diğ., 1987). Yüzeyler üzerinde su, lipitler, albumin, hücre dışı polimerik matriks (EPS) veya çevreden gelen diğer besinlerle doğal bir film tabakası oluşur (Dunne, 2002). Bakteriler bu yüzeylere öncelikle geri-dönüşümlü halde yapışırlar, ardından geri-dönüşümsüz olarak bağlanırlar ve sonuçta yapısal olarak gelişmiş bir biyofilm halini alırlar (Costerton ve diğ., 1995; Davey ve O'Toole, 2000; Stoodley ve diğ., 2002).

Su, biyofilmin en önemli bileşenidir ve toplam matriksin % 97'sini teşkil etmektedir. Su, EPS içinde bağlanabilmekte veya bir çözücü olarak varolabilmektedir (Sutherland, 2001; Allison, 2003). Bu nedenle biyofilmle kaplı yüzey jelatinimsi ve kaygan bir yapıya sahiptir (Dreeszen, 2003). EPS'de en fazla miktarda karbonhidratlar bulunmakta olup, EPS'in % 65'ini teşkil etmektedirler. Fakat bu makromoleküllerin EPS'deki miktarları bakterilerin türüne ve büyüme koşullarına bağlı olarak değişir (Zhang ve diğ., 1999). Polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler, lipitler ve diğer maddelerden oluşan bu hücre dışı matriksin, bakteriyel hücreleri biyofilm tabakası içinde birarada tutmak, biyofilmin büyümesi için gerekli besinleri yakalamak ve hücreleri kurumadan ve antimikrobiyal ajanların etkilerinden korumak gibi çok önemli görevleri olduğu kabul edilmektedir (Sutherland, 1985; Beech ve Cheung, 1995; Zhang ve diğ., 1999; Pace ve diğ., 2006). EPS'nin bir diğer önemli özelliği de metal iyonları ile kompleks oluşturma yeteneğidir (Mittleman ve Geesey, 1985; Beech ve Cheung, 1995).

Bir biyofilm tabakası içinde birçok mikrohabitat bulunmakta ve bunlar besin, pH, oksidasyon potansiyeli (redoks) gibi lokal farklılıklara bağlı olarak değişik özellikler göstermektedirler. Mikrokoloninin yüzeyine yakın hücreler, yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalırken, merkezdeki oksijen seviyesi bakterilerin solunum yapmasıyla hızlı bir şekilde azalarak anaerobik seviyelere yaklaşır ve biyofilm içerisinde bir oksijen derecelenmesi meydana gelir. Bu biyofilm tabakası 10-25 µm kalınlığa ulaştığı zaman, alt kısımlarında anaerobik koşullar oluşur. Böylece biyofilm, yüksek miktarda tür çeşitliliğine sahip olgunlaşma durumuna yaklaşır (Hamilton, 1985; de Beer ve diğ., 1994; Stoodley ve diğ., 2002).

2.3. SOĞUTMA KULESİNDE BULUNAN MİKROORGANİZMALAR

Kule sularında MIC'e neden olan başlıca mikroorganizmalar, anaerobik sülfat indirgeyen bakteriler, *Thiobacillus spp.* ve *Nitrobacter spp.* gibi aerobik asit üreten bakteriler, *Clostridium spp.* gibi anaerobik H₂S ve asit üreten bakteriler, *Gallionella spp.* gibi demir bakterileri ve *Pseudomonas spp.* gibi mukus-oluşturan bakterilerdir (Tatnall, 1981; Pope ve diğ., 1988; Choudhary, 1998). Algler de su soğutma sistemlerinde sıcaklık transfer verimini düşürerek birçok probleme neden olmaktadır (McCoy, 1980). Soğutma sistemlerinde baskın olarak bulunan alg grubunun mavi-yeşil algler olduğu rapor edilmiştir (McCoy, 1980).

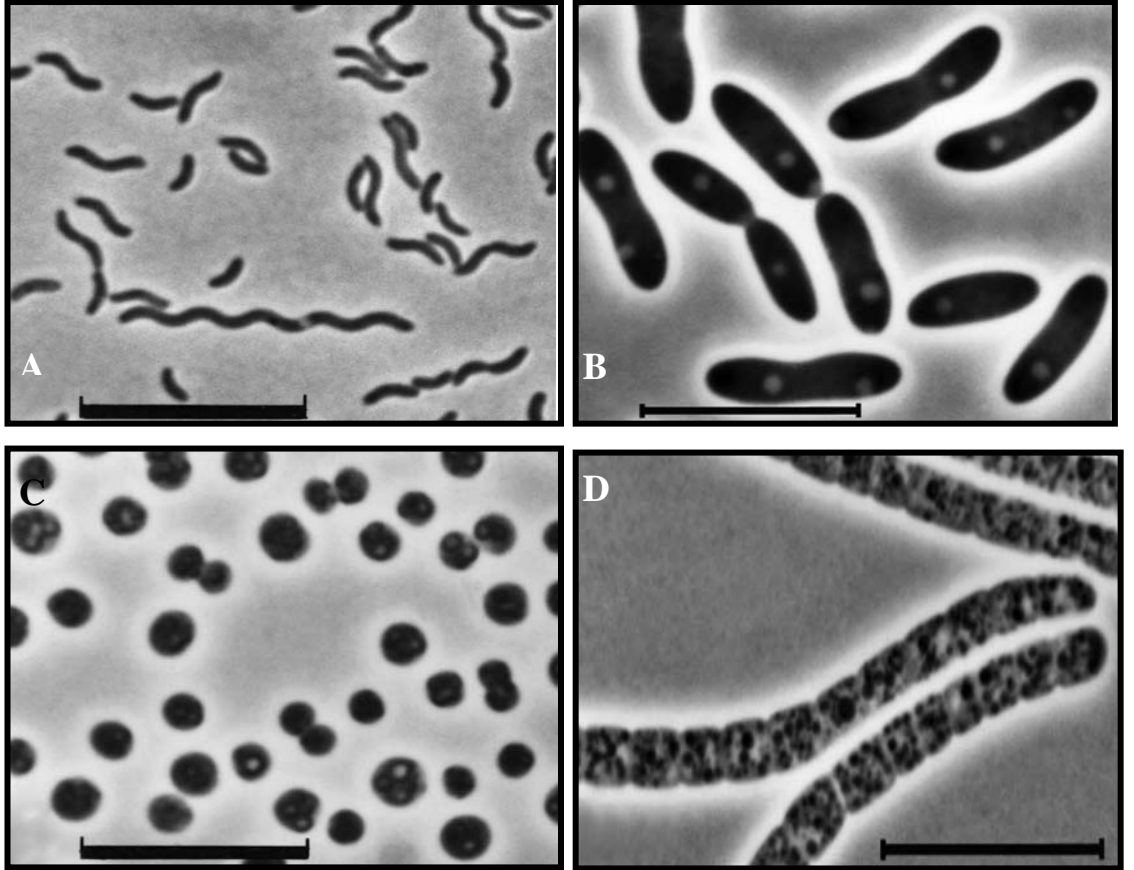
SRB'nin neden olduğu biyokorozyon, soğutma sistemlerinde ciddi bir problem olarak tanımlanmaktadır (Hamilton, 1985; Iverson, 1987; Rao ve diğ., 1997). SRB'nin, soğutma sistemine giriş suyunda bulunması ve çıkış suyundaki sayılarının giriş suyundakinden fazla olması dikkate değer bir durumdur (Rao ve Nair, 1998). SRB'nin meydana getirdiği korozyondan özellikle soğutma kulesi sistemlerinin zarar gördüğü belirtilmektedir (Puckorius, 1999).

2.3.1. Sülfat İndirgeyen Bakteriler

Sülfat indirgeyen bakteriler, zorunlu anaerop bakteriler olarak bilinmekle birlikte bazı türlerinin oksijeni tolere edebildiği ve düşük oksijen konsantrasyonlarında üreyebildiği rapor edilmiştir (Beech ve diğ., 2000).

Birçok cinsi Gram negatif ve filamentlidir. Spor oluşturan formları Gram pozitif olabilir. Çok az bir türü gaz vakuölü içerir. Bu bakteriler hareketli veya hareketsiz olup hareketleri taşıdıkları flagelladan kaynaklanmaktadır (Widdel ve Pfennig, 1984).

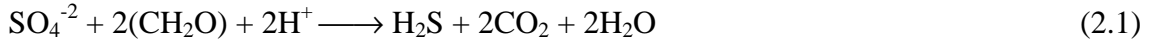
SRB yuvarlak, oval, kok, spiral, virgül şeklinde, düz veya kıvrık çomak gibi farklı şekillerde görülebilirler (Şekil 2.2). Çapları 0.4-3 µm ve uzunlukları 3.0-5.0 µm'dir (Videla, 1996; Dworkin ve diğ., 2006). Genel olarak 4-9.5 pH aralığında yaşamaktadırlar ve bazı türleri 500 atmosfer basınca kadar toleranslıdırlar (Javaherdashti, 2008).



Şekil 2.2 : Morfolojileri farklı bazı SRB'lerin faz kontrast mikroskopundaki görünüşleri; (A) *Desulfovibrio desulfuricans*, (B) *Desulfobacter latus*, (C) *Desulfococcus multivorans*, (D) *Desulfonema limicola*, bar = 10 µm (Holt ve diğ., 1994)

Deniz, nehir veya göl sedimentleri bu bakterilerin tipik habitatları olup çeltik tarlaları, petrol yatakları, yanardağ ağzı, çok tuzlu bölgeler, derin yeraltı tabakası, atık arıtma tesisleri, soğutma kuleleri gibi tarımsal ve endüstriyel su sistemlerinden de sıklıkla izole edilmişlerdir (Widdel ve Phennig, 1984; Tardy-Jacquenod ve Caumette, 1996; Ilhan-Sungur ve Çotuk, 2005; Muyzer ve Stams, 2008). Aynı zamanda insanların, ağız ve bağırsaklarında da yaşayabildikleri rapor edilmiştir (McDougall ve diğ., 1997; Willis ve diğ., 1999; Langendijk ve diğ., 1999).

SRB, hücre sentezi ve gelişimi için gereken enerjiyi, organik bileşikleri ve moleküler hidrojeni (H_2) oksitleyerek ve son elektron alıcısı olarak sülfatın (SO_4^{-2}) yanısıra, sülfiti (H_2SO_3), tiosülfatı (S_2O_3), diğer kükürt bileşiklerini ve nitratı (NO_3^-), asidik ve toksik bir ürün olan hidrojen sülfüre (H_2S , HS^-) (Denklem 2.1) ve amonyuma (NH_4^+) (Denklem 2.2) indirgeyerek sağlamaktadırlar (Dworkin ve diğ., 2006; Javaherdashti, 2008).



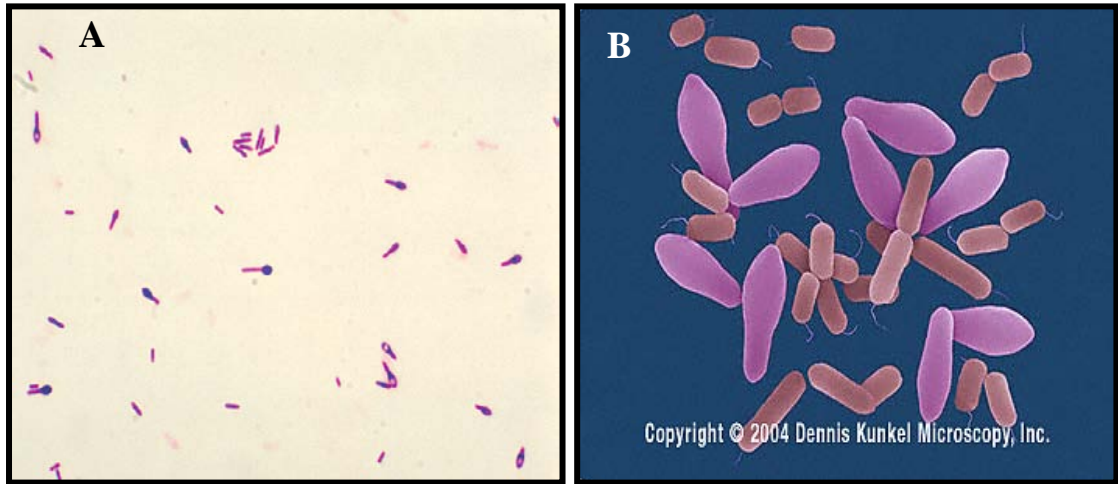
H_2S , paslanmaz çelik, galvanizli çelik vb. metallerde ciddi korozyon hasarlarına sebep olmakta ve ayrıca toksik etkisi çalışanların sağlığı ve güvenliği açısından da büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Jayaraman ve diğ., 1999; Rao ve diğ., 2000). Bu nedenle, soğutma kulesinde bulunan SRB sayısının mililitrede 100'den az olması gerektiği belirtilmektedir (Lu ve diğ., 1989).

2.3.2. *Clostridium*

Clostridium cinsinden ilk kez 1880 yılında Prazmowski tarafından bahsedilmiştir. Firmicutes şubesinin *Bacillus/Clostridium* altgrubuna dahil bir cinstir. Bir mikroorganizmanın *Clostridium* olarak sınıflandırılabilmesi için dört kriter gerekmektedir: (1) endospor oluşturabilme yeteneği, (2) anaerobik, fermentatif enerji metabolizmasına sahip olması, (3) sülfat indirgeme yeteneğinin olmayışı, ve (4) Gram

negatif olarak davranabilen Gram pozitif hücre duvarının varlığı (Minton ve Clarke, 1989).

Clostridium cinsi bakteriler çomak şeklinde, 0.3-2.0 µm çapında, 1.5-20.0 µm uzunluğunda ve genellikle çiftler veya kısa zincirler şeklinde bulunurlar (Şekil 2.3). Taze kültürleri genellikle Gram pozitif boyanma özelliği gösterirken, durgun fazdaki kültürleri Gram negatif boyanabilmektedir. Peritrik flagellalarıyla hareket ederler. Karbonhidrat veya peptonlardan organik asit ve alkol karışımları üretirler (Minton ve Clarke, 1989; Holt ve diğ., 1994). Hücrelerin şişmesine neden olan oval veya küresel formda endospor oluştururlar (Holt ve diğ., 1994). Endosporları onlara, buzullar, çöller, asidik sıcak su kaynakları gibi ekstrem koşullara sahip bölgeler ile toprak, nehir, göl suları ve sedimentleri, ve hayvanların bağırsakları gibi çok geniş çevre ağında yaşabilmelerine imkan tanır (Dworkin ve diğ., 2006).



Şekil 2.3 : Farklı *Clostridium* türlerinin mikroskop görüntüleri; (A) *Clostridium botulinum*'un Gram boyalı preparatının ışık mikroskobu görüntüsü (Center For Disease Control and Prevention), (B) *Clostridium perfringens*'in SEM fotoğrafı, (DENNIS KUNKEL MICROSCOPY, INC.)

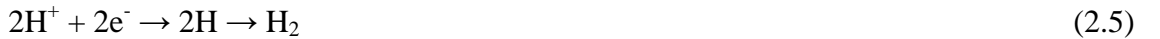
2.4. KOROZYON

Korozyon, metalik bir malzeme ve onun çevresi arasında gerçekleşen ve madde kaybıyla sonuçlanan kimyasal bir etkileşimdir. Birçok durumda bu, elektronların bir seri redoks reaksiyonuyla metal yüzeyden son elektron alıcısına transfer edildiği elektrokimyasal bir işlemdir. Elektron alıcısı genellikle oksijendir. Elektron alıcısının redüklenmesi, metalin oksitlenmesiyle eş zamanlı gerçekleşir ki, bu da metalin bozunmasına yol açar (Barton ve Hamilton, 2007).

Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları metal yüzeyin farklı bölgelerinde gerçekleşir. Metal atomlarının çözeltiliye metal iyonları olarak girmesiyle metal kaybının gerçekleştiği oksidasyon reaksiyonu, anodik bölgede meydana gelir (Barton ve Hamilton, 2007). Hem oksijenli hem de oksijensiz çözeltilerde, anodik reaksiyon her zaman metalin bozunmasıdır. Denklem (2.3) (Hamilton, 1985).



Katodik bölgede, elektronlar yüzeye yakın kimyasalların redüksiyonuyla tüketilir (Barton ve Hamilton, 2007). Korozyonda, hakim olan redüksiyon reaksiyonları oksijenin veya protonların redüklenmesidir. Denklem (2.4, 2.5) (Hamilton, 1985).



Anot ve katotta gerçekleşen işlemlerin ürünleri, genellikle korozyon ürünleri oluşturmak üzere reaksiyona girerler ve korozyon ürünü olarak beyaz renkteki demir(II) hidroksit $[\text{Fe}(\text{OH})_2]$ çökeltisi oluşur. Denklem (2.6) (Iverson, 1987).



$\text{Fe}(\text{OH})_2$, oksijen varlığında pasın bir diğer formu olan demir (III) hidroksite $[\text{Fe}(\text{OH})_3]$ dönüşmektedir. Denklem (2.7) (Iverson, 1987).



Elektronötrallığı sağlayabilmek için anodik ve katodik reaksiyonların dengede olması gerekmektedir (Thierry ve Sand, 2002).

2.5. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON

Mikrobiyolojik korozyon, mikroorganizmaların varlığına bağlı olarak veya aktiviteleri sonucunda oluşan korozyondur (Thierry ve Sand, 2002).

Mikroorganizmalarla ilişkili tipik bir korozyon olayı ilk kez, 1840 yılında, Seine Nehri (Fransa) tabanında bulunan bir demirin anaerobik koşullar altında aşınmaya uğradığı görüldüğünde farkedilmiş ve hidrojen sülfür içeren korozyon ürünleri belirlenmiştir. Ancak MIC, 1891 yılında ilk kez Garret tarafından tanımlanmış ve bakterilere ait metabolizma ürünlerinin korozyonda rol oynadığı saptanmıştır (Garrett, 1891).

2.5.1. MIC Oluşumu

Mikroorganizmalar fizyolojik özelliklerine bağlı olarak aşağıda bahsedilen faktörlerin biri veya daha fazlası ile korozyona yol açabilmektedirler (Hadley, 1948; Videla, 1996).

Korozyonu başlatan veya hızlandıran mikrobiyal oluşumlar;

- 1) Asidik metabolitlerin üretimi (Ör: Kükürt okside eden bakteriler (*Thiobacillus thiooxidans*) tarafından sülfürik asit (H_2SO_4) üretimi)
- 2) Metalin kaynak yapılmış bölgelerine bakterilerin seçici saldırısı (Ör: Demir okside eden *Gallionella* cinsi bakterilerin çift fazlı ferrit-ostenit kaynaklara tercihli saldırısı)
- 3) Mikrobiyal yapışmanın etkisiyle oyuklanma korozyonunun başlamasının kolaylaştırılması (Ör: Alüminyum alaşımlarında *Hormoconis resinae* mantar misellerinin tutunma noktalarında oyuklanmayı başlatması)

- 4) Korozyon frenleyicilerinin mikrobiyal tüketimi (Ör: Benzin/su sistemlerinde *H. resinae* mantarları tarafından alüminyum korozyon inhibitörü olan nitratların tüketimi)
- 5) Koruyucu kaplamaların mikrobiyal yıkımı (Ör: Benzin depolama tanklarındaki koruyucu kaplamanın mantarlar tarafından bozulması)
- 6) Metal yüzeylerden koruyucu filmin çözülmesi (Ör: Denizdeki *Vibrio* cinsi bakterilerin çözünmeyen inorganik korozyon ürünlerini oluşturan Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyerek çözünen bileşikleri oluşturması)

Metal yüzeyler üzerinde gelişen biyofilmleri oluşturan bakterilerin metabolik ürünleri, biyofilm-metal arayüzünde gerçekleşen işlemleri değiştirerek genellikle oyuklanma formunda korozyona yol açmaktadırlar (Barton ve Hamilton, 2007). Ekzoenzimler, organik ve inorganik asitler, amonyum gibi uçucu bileşikler, veya SRB varlığında hidrojen sülfür ve diğer metal sülfürleri de içeren EPS, temasta olduğu yüzeydeki metal atomlarının stabilitesini etkilemekte ve bunun sonucunda korozyona yol açabilmektedir (Barton ve Hamilton, 2007). EPS'de bulunan asidik polimerler korozyonu arttırıcı bir etki göstermektedir (Beech ve Gaylarde, 1999).

MIC'ten en çok etkilenen endüstri alanları açık veya kapalı soğutma kuleleri, filtrasyon sistemleri, kağıt endüstrisi, petrol boruları, atık arıtım tesisleri, su taşıma, depolama ve dağıtım sistemleridir (Al-Darbi ve diğ., 2005; Little ve Lee, 2007; Javaherdashti, 2008).

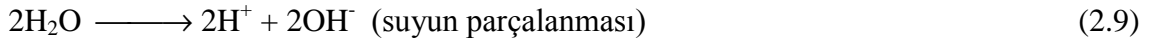
2.5.2. MIC'e Yol Açan Bakteriler

Mikrobiyolojik korozyon araştırmalarının büyük çoğunluğunda, demir, bakır, alüminyum ve onların alaşımları üzerinde meydana gelen biyofilmlerin etkisinden bahsedilir (Beech ve Gaylarde, 1999). Karasal ve sucul habitatlarda, metallerin korozyonuna yol açan başlıca mikroorganizmalar; sülfat indirgeyen bakteriler, kükürt oksitleyen bakteriler, demir oksitleyen/redükleyen bakteriler, hidrojen üreten/tüketen bakteriler, mangan oksitleyen bakteriler, organik asit ve mukus salgılayan bakteriler, algler ve mantarlardır (Beech ve Gaylarde, 1999).

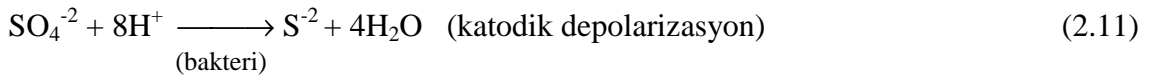
2.5.3. SRB'nin Korozyon Mekanizmaları

Sülfat indirgeyen bakteriler, MIC'e neden olan en önemli bakteriler olarak tanımlanmışlardır (Coetser ve Cloete, 2005). SRB'nin karasal ekosistemlerde olduğu gibi, oksik ve anoksik sucul ortamlarda da demir ve alaşımlarını oyuklanma şeklinde korozyona uğrattıkları birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. SRB'nin sadece farklı cinsleri değil, aynı cinse dahil farklı türleri bile metal bozunumunu etkileme yetenekleri açısından oldukça değişiklik göstermektedir (Barton ve Hamilton, 2007).

Von Wolzogen Kühr ve Van der Vlugt, 1934'te SRB'nin aktivitesinin anaerobik korozyona yol açtığını kanıtlamışlar ve bunun sebebi olarak 'katodik depolarizasyon teorisi'ni sunmuşlardır. Bu mekanizmaya göre SRB'nin metalleri korozyona uğratmadaki başlıca etkisi, hidrojenaz enzimi vasıtasıyla katodik yüzeyden hidrojeni uzaklaştırması, böylece katodu depolarize etmesidir (Coetser ve Cloete, 2005; Barton ve Hamilton, 2007; Javaherdashti, 2008). Katodik depolarizasyon teorisi aşağıdaki denklemlerle özetlenmiştir (Javaherdashti, 2008).



Bakteriyel etkileşim (Denklem 2.11):



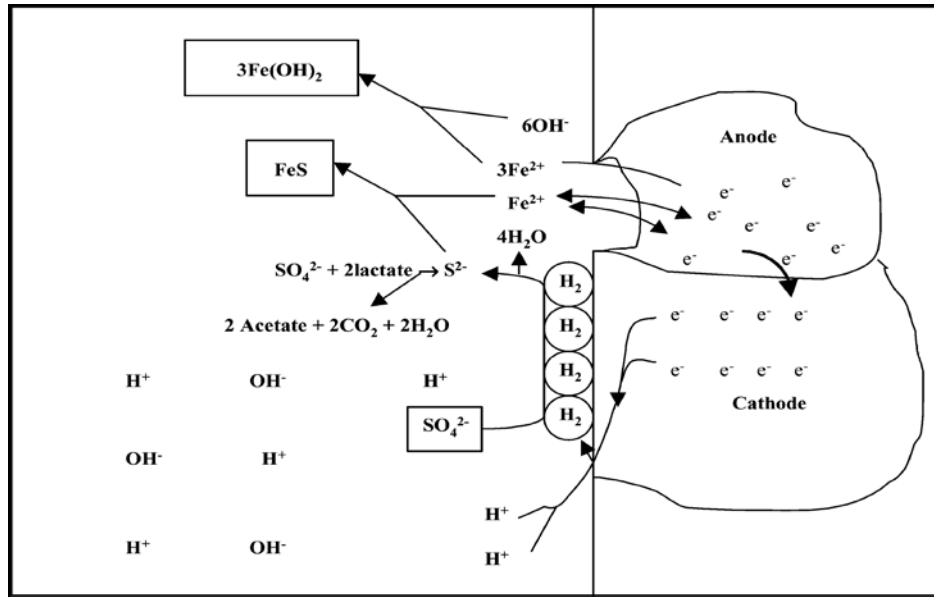
Korozyon ürünleri (Denklem 2.12 ve 2.13):



Toplam reaksiyon (Denklem 2.14):



Hidrojenaz enziminin aktivitesi ya direk olarak metal yüzeyden katodik hidrojeni depolarize etmekle veya indirek olarak metabolik son ürünlerin üretimiyle ilgili olabilmekte ve böylece anaerobik korozyonda önemli bir rol oynamaktadır (Bryant ve Laishley, 1990; Ford ve Mitchell, 1990) (Şekil 2.4). Sülfatın hidrojen sülfüre redüksiyonu ve hidroksit iyonlarının üretilmesi işlemlerinin aynı anda gerçekleşmesi, demir sülfür ve demir hidroksit ürünlerinin oluşumuna yol açabilmektedir. Bu katalitik etki, anotta daha fazla demirin çözünmesine neden olacak ortamı yaratmaktadır (Barton ve Hamilton, 2007).



Şekil 2.4 : Sülfat indirgeyen bakterilerin varlığında demirin anaerobik korozyonu.

Bu reaksiyonlar sonucu açığa çıkan FeS metali depolarize edebilir ve H₂S ve onun oksidasyon ürünleri kimyasal olarak demir ve çeliği korozyona uğratabilir (De Bruyn, 1992).

Demirin korozyonu üzerine SRB'nin etkisinin incelendiği 1934 yılından beri, bu bakterilerin çeşitli metal (paslanmaz çelik, galvanizli çelik vb.) ve alaşımları üzerinde oyuklanma şeklinde korozyona neden oldukları çeşitli makalelerde rapor edilmiştir (Rao ve diğ., 2000; Karr ve diğ., 2005; İlhan-Sungur ve diğ., 2007). Bugüne kadar SRB

kaynaklı korozyonla ilgili birçok mekanizma ileri sürülmüştür. Bu mekanizmaların hepsi de sülfat indirgenme aktivitesi içermektedir (Lee ve diğ., 1995; Hamilton, 1998).

2.6. GALVANİZLİ ÇELİK VE KOROZYON

Demir ve çeliği katodik olarak korozyona karşı korumak üzere, kaplama malzemeyi olarak korozyon direnci yüksek olan çinko kullanılmaktadır. Çinko ile kaplanmış olan çeliklere galvanizli çelik denmektedir. Galvanizli çelikten yapılmış tanklar sıcak suyu depolamak üzere geniş çapta kullanılmaktadır ve bu tankların dayanıklılığının 30-40 yıl olduğu bildirilmektedir (Zhang, 1996).

Çinko ve alaşımları korozyona dirençte oldukça önemlidir. Doğal çevresine bağlı olarak yarı-iletken çinko oksit ve hidroksit içeren koruyucu tabaka oluşturabilme yeteneği, çinkoya korozyona karşı direnç özelliği kazandırmaktadır (Zhang, 1996).

Çinkonun korozyona karşı direncini etkileyen birçok faktör arasında en önemlileri sıcaklık, ortamdaki çözünmüş gazlar (oksijen ve karbondioksit) ve pH değeridir (Zhang, 1996). Sulu ortamlarda bulunan çinkonun korozyona uğrama hızı, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karbondioksit miktarı, ve akış hızıyla orantılı olarak artmaktadır (Zhang, 1996). Ayrıca çinko için yumuşak sular sert sulara oranla daha zarar vericidir. pH'sı 6-12 arasında değişen sularda çinkonun korozyona uğrama hızının en düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. Bu durum, 6-12 pH aralığında çinko yüzeyinde pasif korozyon ürünlerinin oluşumuna bağlanmaktadır. Alkalinitesi yüksek olan sularda oksijenin çözünebilirliği düştüğünden dolayı çinko korozyona uğramaktadır. Korozyon ürünleri olarak çinko karbonat veya diğer temel bileşikler oluşmaktadır (Zhang, 1996).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER

3.1.1. Kule Suyundan Anaerop Bakteri İzolasyonu

Çalışmamızda, İstanbul'da merkezi soğutma sistemine sahip 3 otel ve 2 iş merkezinin açık sistem soğutma kulelerinden alınan kule sularından SRB içeren anaerop bakteri izolatları elde edilmiştir.

Anaerop bakterilerin analizi için soğutma kulesi su örnekleri, 50 ml hacimli kapaklı steril cam kavanozlara, kapları tamamen dolduracak şekilde alınmıştır. Kapakların ağzı sıkıca kapatılmış, ışık girişini engellemek üzere kavanozların etrafı alüminyum folyo ile sarılmıştır. Örnekler en kısa zamanda laboratuvara getirilerek kültürleri yapılmıştır.

SRB içeren anaerop bakteri izolasyonu için kule suyu örneklerinden 1 ml alınarak, içinde 9 ml sıvı Postgate B besiyeri bulunan 20 ml hacimli plastik kapaklı cam şişelere ekim yapılmıştır. Anaerobik ortamı sağlamak üzere, besiyerlerinden saf azot gazı geçirilmiştir. Başlangıçta pembe olan besiyerinin rengi, içerisindeki oksijen alındıktan sonra bu rengi kaybederek tipik krem rengini almıştır. Ekim yapılan tüpler 28°C'lik etüvde 21 gün bekletilmiştir. Postgate B besiyerinin renginin siyahlaşması, sülfat indirgeyen bakterilerin ürediğinin göstergesidir (Postgate, 1984; Feio ve diğ., 1998).

Sülfat indirgeyen bakteri içerdiği düşünülen tüplerden en hızlı ve yoğun üreme özelliği gösteren bir tanesi seçilmiş ve SRB'lerle birlikte, sülfid, tiosülfat ve/veya elementel sülfürü hidrojen sülfüre indirgeyebilen fakültatif anaeroplara elde etmek üzere 2 kez yarı-katı Postgate C besiyerine ekim yapılmıştır. İnokulum miktarları olarak 0.1 ml ve 0.5 ml kullanılmıştır. Ekimler 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. Ekim yapılan Petri kapları anaerop kavanozlar içinde, 28°C'lik etüvde 21 gün bekletilmiştir. SRB'lerle beraber kükürt bileşiklerini indirgeyebilen anaeroplara, demir indikatörü içeren Postgate C besiyerinde siyah renkte koloni oluşturmaktadırlar. Yarı-katı Postgate C besiyerinde üreyen siyah renkli koloniler steril Pasteur pipetiyle alınarak sıvı Postgate B besiyerine

aktarılmıştır (Feio ve diğ., 1998; Hines ve diğ., 2007). Elde edilen SRB içeren ve H₂S üreten anaerop bakteri kültürü, korozyon deneyinde kullanılmıştır.

İzole edilen anaerop bakteri kültürünün morfolojisini saptamak amacıyla Gram boyama yöntemi kullanılmıştır (Holt ve diğ., 1994). İzolatın spor özelliklerinin incelenmesinde endospor boyama yöntemi kullanılmıştır (Çotuk ve Anđ-Küçüker, 1995).

3.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON DENEYİ

Belirli morfolojik özellikleri belirlenen SRB içeren anaerobik bakteri kültürünün galvanizli çelik üzerine korozif etkisi laboratuvar koşulları altında hazırlanan deney düzeneğinde incelenmiştir.

3.2.1. Kupon Temizliği

Deney düzeneğinde korozif etkinin inceleneceği metal olarak, soğutma kulesi malzemesi olan galvanizli çelikten yapılmış kuponlar kullanılmıştır. Galvanizli çelik kuponlar, Kerim Çelik A.Ş firması tarafından yüzeyinde 205 g/m² çinko bulunan ve kalınlığı 1 mm olan galvanizli çelik levhadan 20x20x0.5 mm boyutlarında ASTM G1–72 (American Society for Testing Material, 1975) standartlarına göre kesilerek hazırlanmıştır. Firmadan alınan kuponların kimyasal içeriği ile ilgili bilgiler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 : Galvanizli çelik kuponların kimyasal içeriği

% C	%P	% S	% Si	% Mn	% Al	% Zn	Zn Kaplama Kalınlığı (g/m ²)
0.003	0.006	0.008	0.004	0.131	0.039	99.809	205

Galvanizli çelik kuponların en ve boy ölçüleri alınarak toplam yüzey alanı hesaplanmıştır. Kuponlar aseton ile temizlendikten sonra Pasteur fırınında kurutulmuştur. Kesik kenarlar, korozyona uğramaması için epoksi çinko fosfat primer (Moravia, Türkiye) ile astarlanmış, astar tamamen kuruduktan sonra (24 saat) epoksi

son kaplama (Moravia, Türkiye) ile kaplanmıştır (İlhan-Sungur ve Çotuk, 2010). Kuponlar tekrar aseton ile temizlendikten sonra Pasteur fırınında kurutulmuş ve ağırlıkları ölçülmüştür. Kuponlar, deneyde kullanılana kadar desikatörde saklanarak havayla temas etmesi önlenmiştir.

3.2.2. Deney Düzenegi

Anaerob bakteri kültürünün galvanizli çelik üzerine korozif etkisi, kurulan laboratuvar ölçekli deney düzeneginde incelenmiştir. İçinde deneyin gerçekleştirileceği 1 litrelik cam beher, deney öncesi Pasteur fırınında steril edilmiştir. Deney besiyeri olarak kullanılacak olan 720 ml Postgate C besiyeri de hazırlanarak 121°C’te, 1 atm basınçta 15 dk steril edilmiş ve aseptik koşullarda steril cam beherin içine boşaltılmıştır. Besiyerine, % 10 oranını sağlayacak şekilde 80 ml 24 saatlik anaerobik bakteri kültürünün (2.5×10^7 hücre/ml) ekimi yapıldıktan sonra cam beher anaerobik kavanoz içine yerleştirilmiştir. Kavanoz içerisine anaerobik ortamı sağlaması için 1 adet AnaeroGen (Oxoid) ve ortamın anaerobik olup olmadığının kontrolü için oksijen indikatörü (Oxoid) koyularak kavanozun kapağı hava girmeyecek şekilde kapatılmıştır. Deney düzenegi, ekimi yapılan bakteri kültürünün besiyerinde üreyerek düzeneğe adaptasyonunu sağlamak için manyetik karıştırıcı ile 300 rpm hızla karıştırılarak 28°C’lik etüv içerisinde 2 gün beklemeye bırakılmıştır. SRB’nin üremesi, besiyerinin bulanıklığı göz önüne alınarak belirlenmiştir (İlhan-Sungur ve diğ., 2007).

38 adet kupon, kuponları taşıyacak olan çubuklara dizilmiş ve 260 nm dalga boyundaki UV ışık altında her iki yüzeyleri de 24 saat bekletilerek steril edildikten sonra aseptik koşullarda düzenek besiyeri içine yerleştirilmiştir. Kuponların yerleştirilmesiyle deney süresi başlamıştır. Düzenek, deney süresince 28°C’lik etüv içerisinde muhafaza edilmiş ve manyetik karıştırıcıyla 300 rpm hızla karıştırılmıştır (Şekil 3.1) (Marchal ve diğ., 2001; Padilla-Viveros ve diğ., 2005; Midander ve diğ., 2006).

Deney düzeneginde korozif etkinin inceleneceği örnekleme saatleri 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 360 ve 744 saat olarak belirlenmiştir. Her örnekleme saatinde, düzenekten aseptik koşullar altında üç adet kupon çıkartılmış ve aynı anda 50 ml deşarj karşılığında, düzeneğe 50 ml steril Postgate C besiyeri ilave edilmiştir (Rao ve diğ., 2005). Düzenekten çıkarılan kuponlardan biri SRB izolasyonu ve sayımı, diğeri EPS eldesi ve

karbonhidrat tayini için, üçüncü kupon ise diğer iki kuponla birlikte ağırlık kaybı tayini için kullanılmıştır.

Deney düzeneğindeki kültürün pH, Cl⁻, SO₄⁻² ve H₂S değerleri her örnekleme saatinde ölçülmüştür. Deney öncesi ve sonrası yapılan tartımlar sonucunda kuponlarda meydana gelen ağırlık kayıpları belirlenmiş ve korozyon hızları hesaplanmıştır.



Şekil 3.1 : Deney düzeneği

3.2.3. Bakteriyolojik Analiz

3.2.3.1. Kültürden Sülfat İndirgeyen Bakterilerin İzolasyonu ve Sayımı

Deney düzeneğindeki kültürden SRB'nin izolasyonu ve sayımı amacıyla her örnekleme saatinde 5 ml örnek alınarak 10⁻¹'den 10⁻¹⁰'a kadar sulandırım serileri hazırlanmış ve bu serilerden ekim yapılmıştır.

SRB sayısı çoklu tüp yöntemine (MPN) göre tespit edilmiştir (APHA, 1981). Ekim yapılan tüpler, 28°C'de 21 gün inkübe edilmiş ve besiyerinde görülen siyahlaşma

pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. SRB ekimleri 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Postgate, 1984).

3.2.3.2. *Kuponlarda Oluşan Biyofilmdeki Sülfat İndirgeyen Bakterilerin İzolasyonu ve Sayımı*

Biyofilmdeki bakterilerin izolasyonu ve sayımı için her örnekleme saatinde çıkarılan 1 kupon kullanılmıştır. Yüzeye gevşek tutunmuş bakterileri uzaklaştırmak amacıyla kuponlar, beher içerisine konmuş steril Postgate C besiyerine birkaç kez daldırılıp çıkartıldıktan sonra her iki yüzeyde oluşan biyofilm tabakası steril eküvyon ile toplanmış ve 15 ml Postgate C besiyeri içerisinde 1 dk vortekslenmek suretiyle bakterilerin sıvıya geçişi sağlanmıştır (Gagnon ve Slawson, 1999). Biyofilm süspansiyonundan 10^{-1} 'den 10^{-8} 'ye kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır.

SRB'nin sayımı için her bir sulandırmadan Postgate B besiyeri içeren MPN serilerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüpler 28°C 'de 21 gün bekletilmiştir. Besiyerinde görülen siyahlaşma pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ekimler 2 tekrarlı yapılmıştır (Postgate, 1984).

3.2.4. **EPS Eldesi ve Karbonhidrat Tayini**

Her örnekleme saatinde deney düzeneğinden çıkarılan bir kupon üzerinde oluşmuş biyofilmden EPS elde edilmiş ve karbonhidrat analizi gerçekleştirilmiştir. Kuponlar, yüzeye gevşek tutunmuş bakterileri uzaklaştırmak amacıyla steril Postgate C besiyerine birkaç kez batırılıp çıkartılmıştır. EPS eldesi 4 aşamada gerçekleştirilmiştir (Zhang ve diğ., 1999).

İlk aşamada yıkama işlemi yapılmıştır. Kuponun her iki yüzeyindeki biyofilm tabakası steril eküvyon yardımıyla toplanarak, 10 ml steril bidistile su içerisinde süspansiyon hale getirilmiştir. Biyofilm süspansiyonu $6000\text{g}'de$ 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant steril bir tüp içine aktarılarak muhafaza edilmiştir.

İkinci aşamada, santrifüj tüpünde kalan biyofilm peleti üzerine 10 ml % 8.5 NaCl ve 0.22 ml formaldehit içeren solüsyondan konmuş ve 1 dakika en yüksek devirde

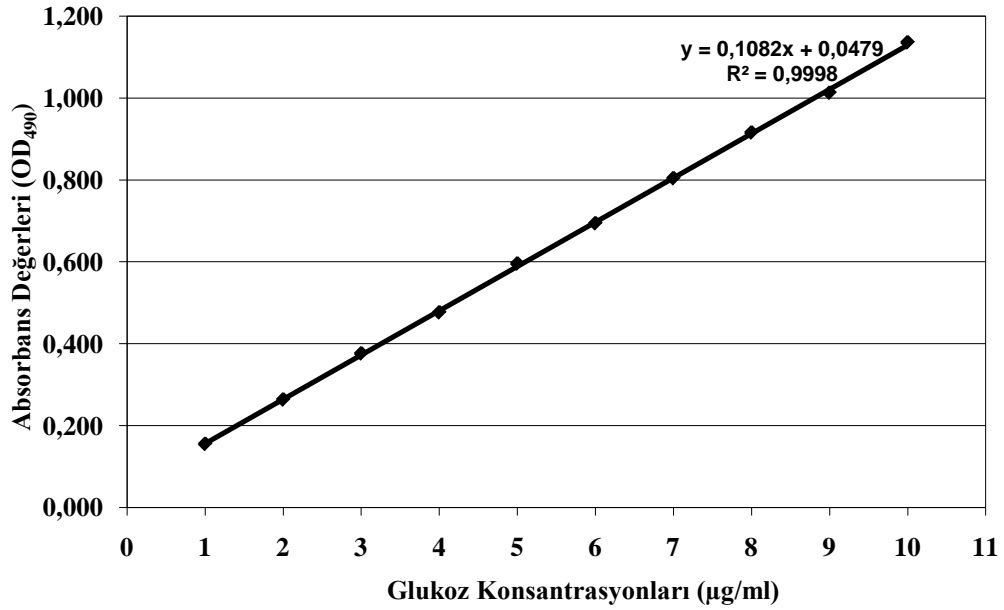
vortekslenmiştir. Ardından ilk iki aşamada elde edilen örnekler steril bir kaptaki birleştirilmiştir.

Üçüncü aşamada ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Bunun için, ikinci aşama sonunda elde edilen ve son hacmi 20 ml olan tüpler 11227g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.

Filtrasyon ve toplama işleminin yapıldığı son aşamada, santrifüj işleminin ardından, süpernatant 0.22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmiştir.

EPS örnekleri elde edildikten sonra karbonhidrat analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için fenol sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır (Dubois ve diğ., 1956). Bu yöntem çerçevesinde, cam tüplere 1 ml EPS örneği konmuş ve bunun üzerine 1 ml % 5'lik fenol çözeltisi eklenmiştir. Son olarak, içinde EPS ve fenol çözeltisi bulunan tüplere 5 ml % 95'lik sülfürik asit konarak 10 dakika beklenmiş ve süre sonunda tüpler vortekslenerek karıştırılmıştır. Tüpler 15-20 dk 25–30°C'lik su banyosunda bekletilerek kimyasal reaksiyon sonucu yükselen sıcaklığın düşmesi sağlanmıştır. Bu reaksiyon sonunda sıvının sarı-turuncu renk aldığı gözlenmiştir. Rengin koyuluğu spektrofotometre cihazında 490 nm dalga boyunda (Shimadzu UV 150–02) ölçülmüştür. Karbonhidrat miktarı, standart eğriye ait denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı yapılmıştır.

Standart eğriyi oluşturmak üzere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/ml konsantrasyonlarında standart glukoz çözeltileri hazırlanmıştır. Fenol sülfürik asit yöntemi uygulanarak her bir konsantrasyona ait absorbans değerleri belirlenmiştir (Dubois ve diğ., 1956). Kör olarak bidistile su kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilmiş ve eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.2). Kontrol amacıyla 10, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlardaki standart glukoz çözeltileri deneylerle eş zamanlı olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.2 : Toplam karbonhidrat miktarının tayini için fenol sülfirik asit yöntemi ile standart glukoz konsantrasyonlarından hazırlanmış olan standart eğri.

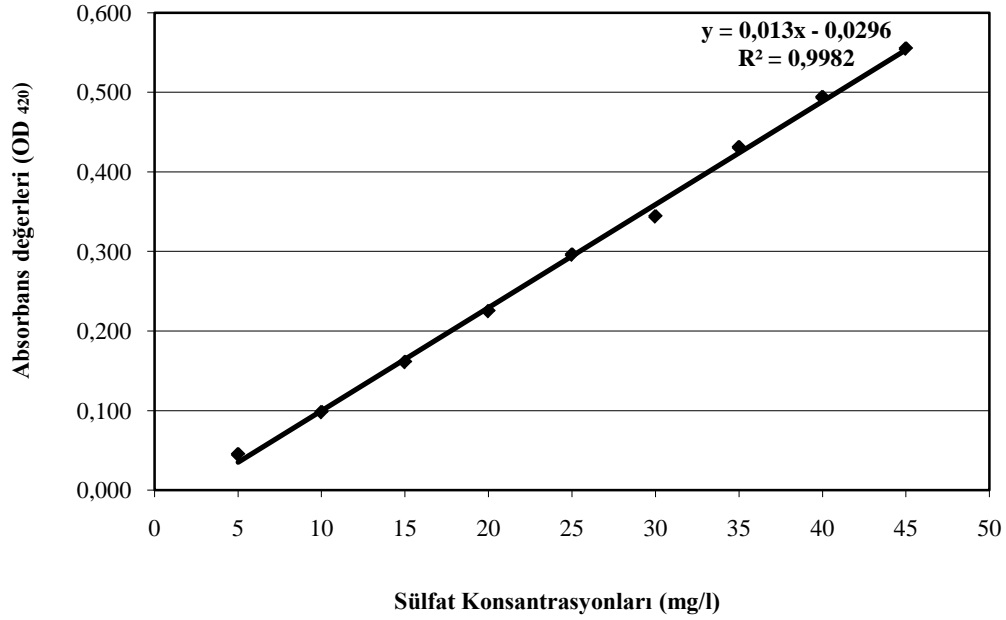
3.2.5. Düzenekteki Kültürün Fiziksel ve Kimyasal Parametrelerinin Analizi

3.2.5.1. Sülfat (SO_4^{-2})

Düzenekteki SO_4^{-2} miktarı turbidimetrik yöntem ile ölçülmüştür (APHA, 1981). 100 ml örnek üzerine 5 ml ayarlama solüsyonundan eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda 1 dk sabit hızla karıştırılmış ve örnek üzerine 0.5 g $BaCl_2$ kristali eklenerek tekrar 1 dk sabit hızla karıştırılmıştır. Süre sonunda oluşan $BaSO_4$ bulanıklığının absorbans değeri spektrofotometrede (Shimadzu UV 150-02) 420 nm dalga boyunda her 30 saniyede bir olmak üzere 4 dk süresince ölçülmüştür. Ölçümler 2 tekrarlı yapılmıştır.

Standart eğriyi oluşturmak için öncelikle 5 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l, 40 mg/l, 45 mg/l konsantrasyonlarında standart Na_2SO_4 çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerle turbidimetrik yöntem uygulanmıştır. Kör olarak bidistile su kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilmiş ve eğri denklemini elde edilmiştir (Şekil 3.3). Kontrol amacıyla 5, 25 ve 45 mg/l

konsantrasyonlardaki standart sülfat çözeltileri deneylerle eş zamanlı olarak ölçülmüştür.



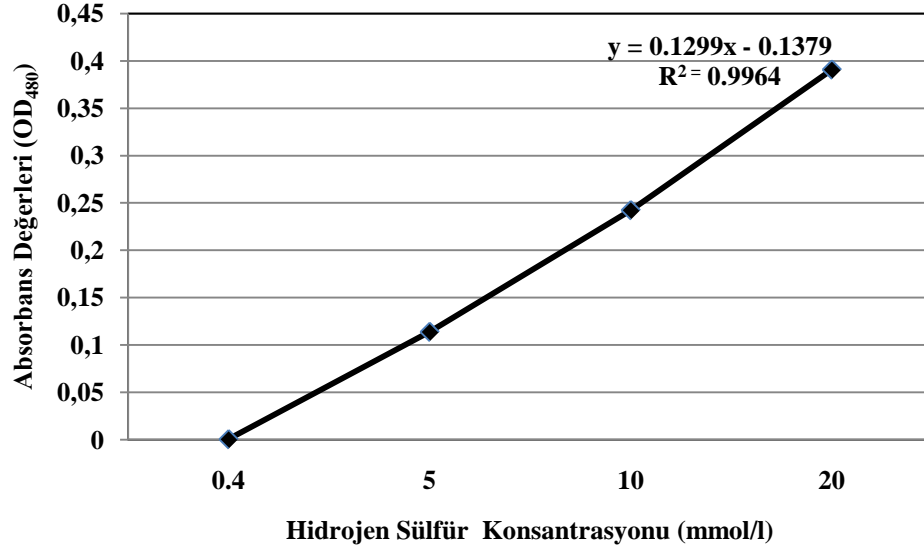
Şekil 3.3 : Sülfat miktarının tayini için turbidimetrik yöntem ile standart sülfat konsantrasyonlarından hazırlanmış olan standart eğri.

3.2.5.2. Hidrojen sülfür (H_2S)

Deney düzeneğindeki kültürün içerdiği hidrojen sülfür miktarı Cord-Ruwish yöntemi ile tayin edilmiştir (Cord-Ruwisch, 1985). Bir miktar besiyeri 0.22 μ m porçaplı filtreye süzülerek Falcon tüpüne aktarılmıştır. 12 ml $CuSO_4$ solüsyonu cam tüpte vortekslenirken, 0.3 ml medyum pipet yardımıyla Falcon tüpünden alınıp hızlıca bakır sülfat solüsyonuna eklenmiştir. 5 saniye karıştırıldıktan hemen sonra, absorbans değeri spektrofotometrede (Shimadzu UV 150-02) 480 nm dalga boyunda ölçülmüştür. 0.3 ml kültür ve 12 ml HCl (50 mmol/l) kör olarak kullanılmıştır (Azabou, 2005; Alvarez ve diğ., 2006).

Standart eğriyi oluşturmak üzere 40 mmol/l konsantrasyonunda standart Na_2S solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon kullanılarak $\frac{1}{2}$ oranında sulandırım serileri hazırlanmış ve bu çözeltilerle Cord-Ruwish yöntemi uygulanmıştır. 0.3 ml Na_2S

solüsyonu ve 12 ml HCl (50 mmol/l) kör olarak kullanılmıştır. Elde edilen absorban değerleri ile standart grafik çizilmiş ve eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 : Hidrojen sülfür miktarının tayini için Cord-Ruwisch yöntemi ile standart hidrojen sülfür konsantrasyonlarından hazırlanmış olan standart eğri.

3.2.5.3. Klorür (Cl⁻)

Deney düzeneğindeki Cl⁻ iyonlarının miktarı, iyonmetre cihazı (Thermo Orion) ile ölçülmüştür.

3.2.5.4. pH

Deney düzeneğinin pH'sı, pH metre cihazı (Thermo Orion) ile ölçülerek saptanmıştır.

3.2.6. Korozyon Analizi

Korozyon hızı ve ağırlık kaybını tayin etmek üzere her örnekleme saati için 3 adet kupon kullanılmıştır. Kuponlar yüzeylerinden biyofilm tabakası alındıktan sonra % 15'lik asetik asit çözeltisinde 2 dakika bekletilerek temizlenmiştir. Süre sonunda kuponlar önce distile suya, ardından % 96'luk etil alkole batırılmış ve sonra Pasteur fırınında 70 °C'de 1 saat kurumaya bırakılmıştır (Anderson ve Rein, 1948). Kuruyan kuponların ağırlık ölçümleri alınmıştır. Deney öncesi ve sonrası ağırlık ölçümleri

arasındaki fark ağırlık kaybı olarak not edilmiştir. Korozyon hızı aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır (ASTM, 1975).

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

$$\mathbf{mdd} = \text{mg/dm}^2 \cdot \text{gün}$$

$$\mathbf{K} = 2.40 \times 10^6 \times d$$

$$\mathbf{W} = \text{ağırlık kaybı (g)}$$

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

$$\mathbf{t} = \text{deney süresi (saat)}$$

$$\mathbf{d} = 7.13 \text{ g/cm}^3$$

3.2.7. Kontrol Düzeneği

Postgate C besiyerinin galvanizli çelik üzerine korozif etkisi, steril kontrol düzeneğinde incelenmiştir. Kontrol düzeneği, deney düzeneği ile aynı işletim koşullarına sahiptir.

35 adet kupon, kupon taşıyıcısına dizilmiş ve UV ışık altında her iki yüzeyleri de 24 saat bekletilerek steril edildikten sonra aseptik koşullarda steril Postgate C içine yerleştirilmiş ve deney süresi başlamıştır. Kontrol düzeneği, deney süresince 28°C'lik etüv içerisinde muhafaza edilmiştir.

Örnekleme, deney düzeneğinde olduğu gibi 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 360 ve 744. saatlerde yapılmıştır. Her örnekleme saatinde, düzenekten aseptik koşullar altında üç adet kupon çıkarılmıştır. Düzenekten çıkarılan kuponların yüzeyleri eküvyonla temizlenerek petri kaplarında muhafaza edilmiştir. Kuponlar asetik asitle temizlendikten sonra ağırlık tayini yapılmıştır.

3.2.7.1. Kontrol Düzeneği Besiyerinin Fiziksel ve Kimyasal Parametreleri

Kontrol düzeneğindeki besiyerinin Cl⁻, H₂S, SO₄⁻² ve pH değerleri, deney düzeneğindeki değerlerin ölçüldüğü bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır (Cord-Ruwish, 1985; APHA, 1981).

3.2.7.2. Korozyon Analizi

Kontrol kuponlarının korozyon hızının ölçümü için 33 adet kupon kullanılmıştır. Kupon temizliği ve korozyon hızı hesabı deney düzeneğinde uygulandığı şekilde gerçekleştirilmiştir (ASTM, 1975; Anderson ve Rein, 1948).

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deney ve kontrol düzeneğindeki pH, klor ve sülfat değerleri, deney düzeneğindeki kuponların ağırlık kaybı, korozyon oranı, biyofilmdeki karbonhidrat miktarı arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayıları testi ile gösterilirken, hidrojen sülfür miktarı, korozyon hızı ve SRB sayıları arasındaki ilişki Spearman korelasyon katsayıları testi kullanılarak gösterilmiştir. Deney ve kontrol düzeneğindeki pH, klor ve sülfat değerlerinin ve kuponların ağırlık kayıplarının ortalamalar açısından farkının bulunmasında t testi kullanılırken, hidrojen sülfür miktarının, deney düzeneğindeki besiyerinde ve biyofilmde bulunan bakterilerin sayısal durumunun ve kuponların korozyon hızının ortalamalar açısından farkının değerlendirilmesi için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bulgular bölümündeki bütün bakteri sayıları logaritma 10 tabanına göre verilmiştir.

3.4. MOLEKÜLER ANALİZLER

Korozif aktivitesi incelenen SRB içeren anaerop bakteri kültürünün hangi bakteri türlerini içerdiğini belirlemek üzere moleküler tanıya gidilmiştir. Moleküler analizler, Hollanda'nın Delft Teknoloji Üniversitesi'nde, Dr. Gerard Muyzer önderliğinde gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. DNA Eldesi

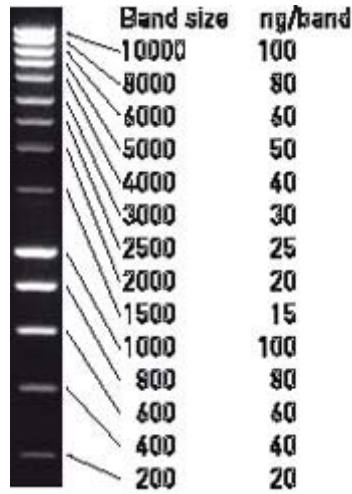
Postgate B besiyerindeki SRB kültüründen 2 ml alınarak Eppendorf tüpe aktarılmış ve 10000 g'de 10 dk santrifüj edilerek yoğun bir bakteri pelleti hazırlanmıştır. Genomik DNA, Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratuvarları) kullanılarak

elde edilmiştir. Elde edilen DNA bir sonraki kullanıma kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. 5 µl nükleik asit eldesi, 1 µl 6X Bluejuice jel yükleme tamponuyla karıştırılarak, % 0.8'lik agaroz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) jele yüklenmiş ve 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu içerisinde 32 dk elektroforeze tabi tutulmuştur. Agaroz jel, elektroforez sonunda 30 dk SYBR® Safe (Invitrogen) boya solüsyonu içerisinde boyanmıştır. Jel, boyanma sonrasında jel görüntüleme sistemine konarak fotoğraflanmıştır. Elde edilen DNA'nın miktar tayini, hem markırların oluşturduğu bantların kalınlığı ve konumu baz alınarak hem de Nanodrop cihazı ile ölçülerek belirlenmiştir

3.4.2. 16S rDNA Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

16S rDNA gen fragmentlerinin çoğaltılması, genel bakteri primerleri olan 341F-GC^a (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ve 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3') kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Muyzer ve diğ., 1993; 1995; 1998). Çoğaltma reaksiyonları için, son hacmi 25 µl olan reaksiyon karışımına, 1.25 µl genomik DNA eklenmiştir. Termal döngü şu aşamalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir: 95°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu, bunu takiben 32 döngü 95°C'de 30 sn denatürasyon, 57°C'de 40 sn bağlanma ve 72°C'de 40 sn uzama. Termal döngü, 72°C'de 30 dk son uzama basamağıyla sonlandırılmıştır (Muyzer ve diğ., 1995). Çoğalma ürünlerinin varlığı ve miktarı agaroz jel elektroforezi (% 1.5) yapılarak belirlenmiştir. SmartLadder (Eurogentec) moleküler markır olarak kullanılmıştır (Şekil 3.5). SYBR®Safe ile boyanan jelin resmi dijital olarak kaydedilmiştir.

^a : GC-dizisi (5'- GCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG - 3')



Şekil 3.5 : SmartLadder moleküler markırın, jel üzerindeki bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA miktarları.

3.4.3. 16S rDNA Genlerinin Denatüran Gradyan Jel Elektrofrez (DGGE)

Denatüran Gradyan Jel Elektrofrez, D-Code sistemi (Bio-Rad, California, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Schäfer and Muyzer, 2001). % 6'lık poliakrilamid jel içinde % 20-70 denatüran gradyan kullanılmıştır. Jel, PCR ürünlerinin denatüran gradyan jel içine girişine olanak tanımak üzere öncelikle 10 Voltta 20 dk ve ardından 100 Voltluk sabit voltajda 16 saat 1X TAE tamponu içinde yürütülmüştür. Elektrofrezin ardından jel, Sybr Green boyası ile 15 dk boyanmış ve dijital olarak fotoğraflanmıştır. Jel mavi ışık üzerine konularak bireysel bantlar steril bistüri ile kesilmiştir. Kesilen bantlar 40 µl 10 mM Tris tamponu içeren PCR tüpçüklerine konmuş ve iki gece 4°C'de muhafaza edilmiştir. 0.5 µl süpernatant, orjinal primer çifti (341F ve 907R) kullanılarak gerçekleştirilen ikinci çoğaltma işlemi için kullanılmıştır. PCR ürünleri, dizi analizi öncesinde Qiaquick PCR Pürifikasyon Kiti (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak saflaştırılmıştır. PCR ürünlerinin dizi analizi MacroGen (Korea) firması tarafından yapılmış ve alınan dizi kromatogramlarının güvenilirliği manuel olarak doğrulanmıştır.

Elde edilen 16S rDNA gen dizileri, 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 türler seçilmiştir.

3.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.5.1. Postgate B Besiyeri

Soğutma kulesi suyundaki sülfat indirgeyen bakterilerin varlığının tespiti için kullanılan Postgate B besiyerinin bileşimi aşağıdaki gibidir (Postgate, 1984):

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	0.5 g
Amonyum klorür (NH_4Cl)	1.0 g
Kalsiyum sülfat (CaSO_4)	1.0 g
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
DL-Laktik asit ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$)	3.5 g
Maya özütü	1.0 g
L-Askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$)	0.1 g
Tiyoglikolik asit ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{SNa}$)	0.1 g
Demir (III) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
Resazurin	0.001 g
Distile su	1000 ml

pH = 7.2 ± 0.2 (% 10 m/V NaOH ile ayarlanır), 121°C 'de 15 dk steril edilir.

3.5.2. Postgate C Besiyeri

Sülfat indirgeyen bakteri şüpheli suşların saflaştırılmasında ve pasajlarında kullanılan Postgate C besiyerinin bileşimi aşağıdaki gibidir (Postgate, 1984):

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	0.5 g
Amonyum klorür (NH_4Cl)	1.0 g
Sodyum sülfat (Na_2SO_4)	4.5 g
Kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	0.06 g
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	0.06 g
DL-Laktik asit ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$)	6 g
Maya özütü	1.0 g
Demir (III) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	0.004 g
Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	0.3 g

Distile su 1000 ml

pH = 7.2 ± 0.2 (% 10 m/V NaOH ile ayarlanır), 121°C 'de 15 dk steril edilir.
Besiyerinin 1 litresine 7 g agar katılarak yarı-katı agar elde edilmiştir.

3.5.3. % 5 Malaşit Yeşili

Malaşit yeşili 5.0 g
Distile su 100 ml

3.5.4. 5 mmol/l Bakır Sülfat Solüsyonu

CuSO₄ 1.248 g
HCl 4.18 ml
Distile su 1000 ml'ye tamamlanır.

3.5.5. 50 mmol/l Hidroklorik Asit

HCl 4.18 ml
Distile su 1000 ml'ye tamamlanır

3.5.6. Ayarlama Çözeltisi

%37'lik HCl 30 ml
Distile su 300 ml
%95 Etil alkol 100 ml
NaCl 7.5 g
Gliserol 50 ml

3.5.7. Dikromat (Bikromat) Eriyiği

Sodyum/Potasyum dikromat	10 g
Sülfürik asit	25 ml
Distile su	75 litre

3.5.8. 1x Tris-Asetat-EDTA (TAE)

50x TAE tamponu (hazır)	1 birim
Distile su	49 birim

3.5.9. 10mM Tris Tampon Çözeltisi

Tris	1.21 gram
Distile su	1000 ml

3.5.10. % 0.8 Agaroz Jel

1x TAE	65 ml
Agaroz	0.5 gram

3.5.11. SYBR Safe Boya Solüsyonu

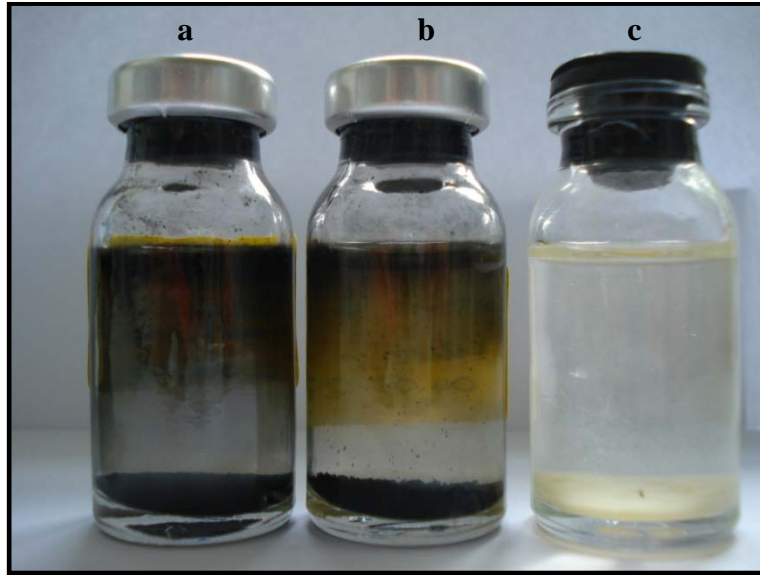
SYBR Safe	50 µl
1x TAE	500 ml

4. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında, 5 farklı soğutma kulesinden su örneği alınmış ve SRB için spesifik olan Postgate B besiyerine ekim yapılmıştır. Elde edilen SRB içeren izolatlar yarı-katı Postgate C besiyerine 2 kez inoküle edilmiş, besiyerinde oluşan siyah koloniler alınıp tekrar Postgate B besiyerine ekilerek SRB içeren H₂S üreten kültür elde edilmiştir. Kurulan laboratuvar ölçekli deney düzeneği ile bu kültürün korozyon aktivitesi test edilmiştir. Ardından bu kültürün içerdiği bakteri türlerini belirlemek üzere moleküler tanıya gidilmiştir.

4.1. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER

Kule suyundan SRB içeren anaerobik bakteri izolatu için SRB'ye özel Postgate B besiyeri kullanılmış ve besiyeri renginin siyaha dönüşmesi SRB pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.1).



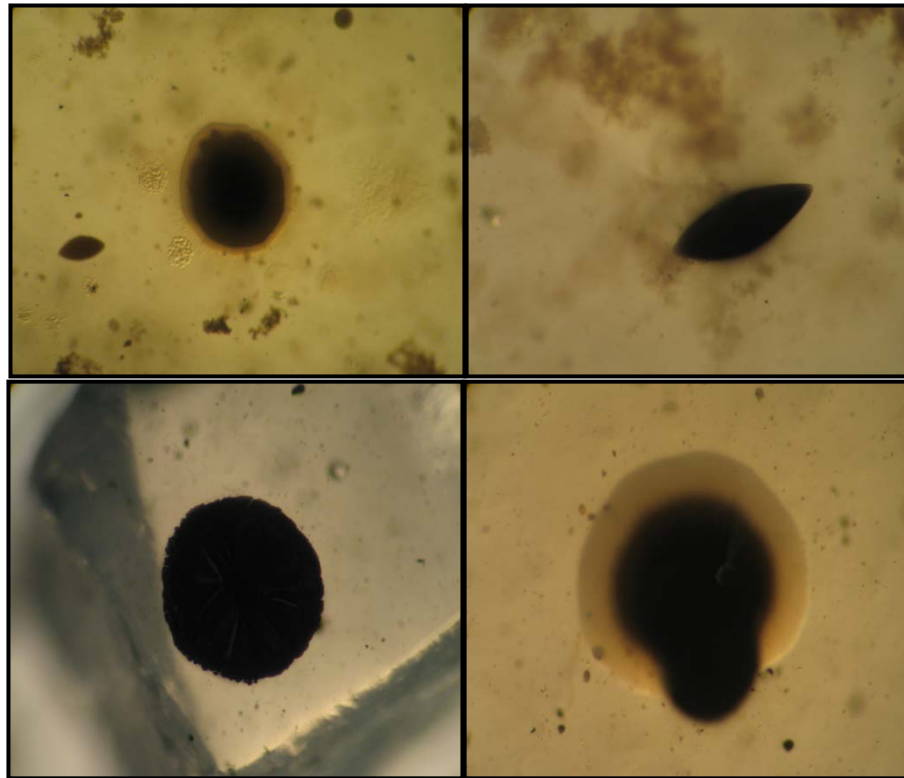
Şekil 4.1 : Bakteri izolasyonunda kullanılan Postgate B besiyerleri; (a ve b) SRB pozitif, (c) ekim yapılmamış besiyeri.

SRB ile birlikte diğer H₂S üreten anaerobik bakterilerin izolasyonu için yoğun üremenin gözlemlendiği tüplerden yarı-katı Postgate C besiyerine ekim yapılmıştır. Besiyerinin üst, orta ve alt kısımlarında, siyah veya kahverengi renkte ve mekik veya yuvarlak formda çeşitli koloniler oluşmuştur (Şekil 4.2 ve 4.3). Bu koloniler alınarak sıvı Postgate B

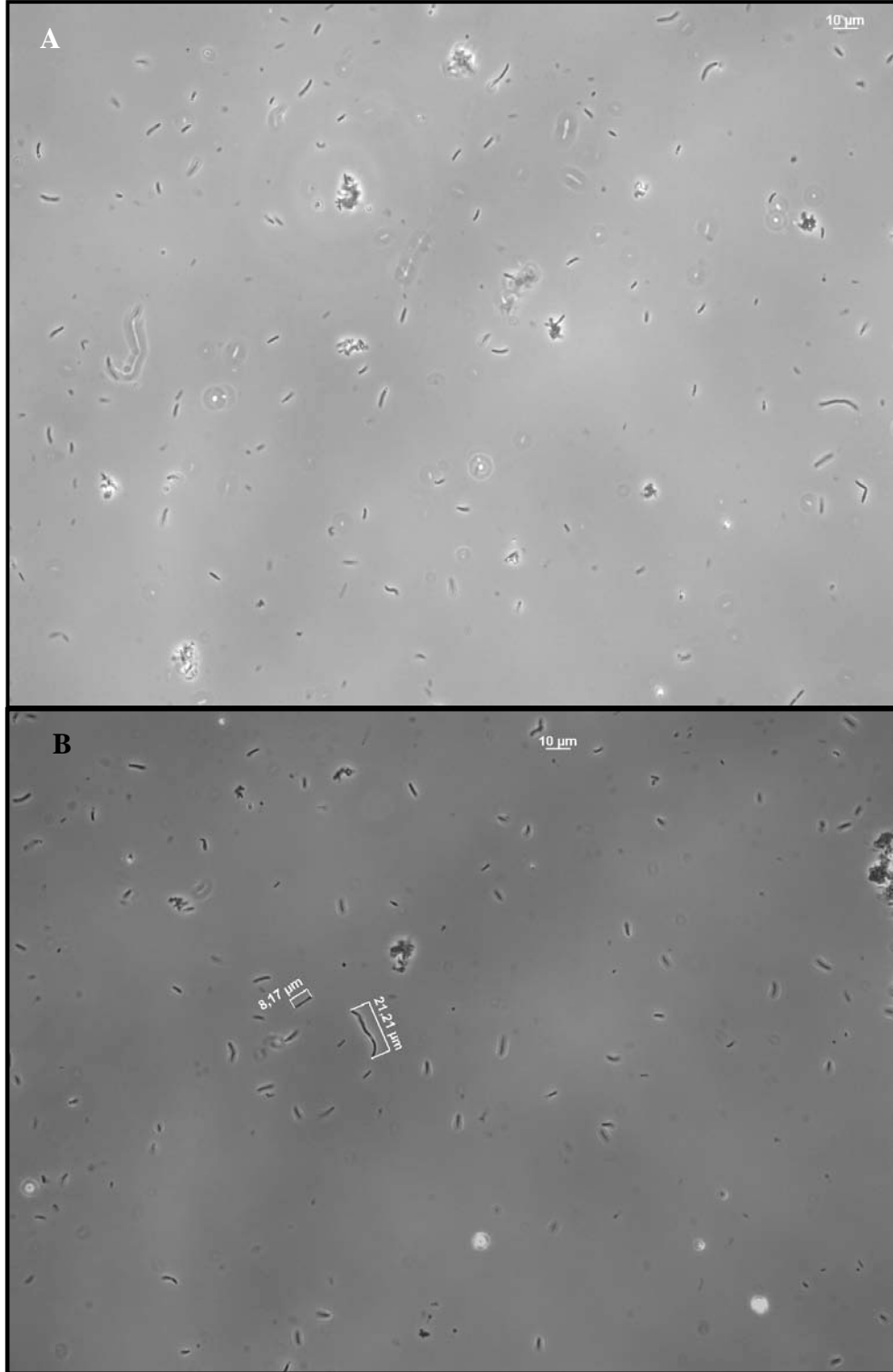
besiyerine inoküle edilmiş ve siyahlaşmanın görüldüğü ilk gün bakteriler faz-kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Bakterilerin faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsünde farklı boyutlarda çomak ve kıvrık çomak formda bakteriler gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.2 : Yarı-katı Postgate C besiyerindeki H₂S üreten bakterilerin koloni morfolojilerinin görünümü.

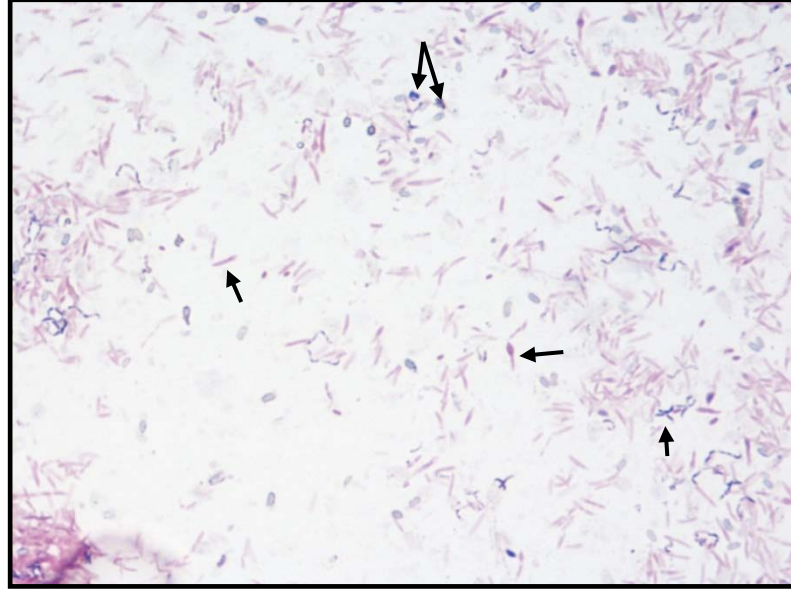


Şekil 4.3 : Yarı-katı Postgate C besiyerinde üreyen farklı şekil ve renklerdeki bakteri kolonilerinin mikroskop görüntüleri.

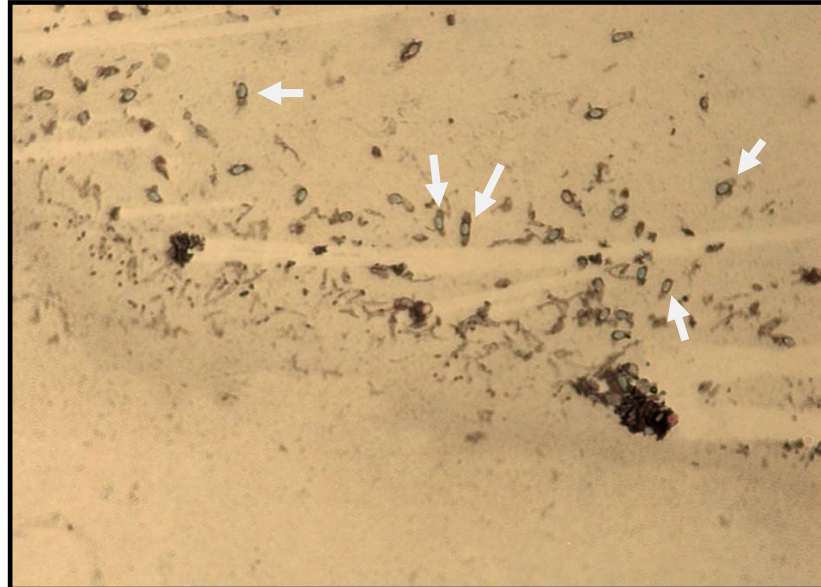


Şekil 4.4 : H₂S üreten kültürün faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsü (A ve B).

Kültürdeki H₂S üreten bakteri türlerinin bazı morfolojik özelliklerini tespit edebilmek amacıyla farklı kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram ve endospor boyama yöntemleriyle boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Yapılan Gram boyama yöntemiyle, kültürün hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif, çomak/kıvrık çomak formunda bakteriler içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 : H₂S üreten kültürün Gram boyalı preparatının ışık mikroskopundaki görüntüsü.



Şekil 4.6 : H₂S üreten kültürün endospor boyalı preparatının ışık mikroskopundaki görüntüsü.

Ayrıca kültürdeki bazı bakterilerin spor içerdiği ve sporlarının terminal veya subterminal olarak konumlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).

4.2. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON DENEYİ

H₂S üreten anaerobik bakteri kültürünün, kurulan laboratuvar ölçekli deney düzeneğinde galvanizli çelik kuponlar üzerine korozyon etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, besiyerinin korozyon etkisini belirlemek için, kurulan kontrol düzeneği deney düzeneği ile eş zamanlı olarak çalıştırılmıştır.

4.2.1. Deney Düzeneği

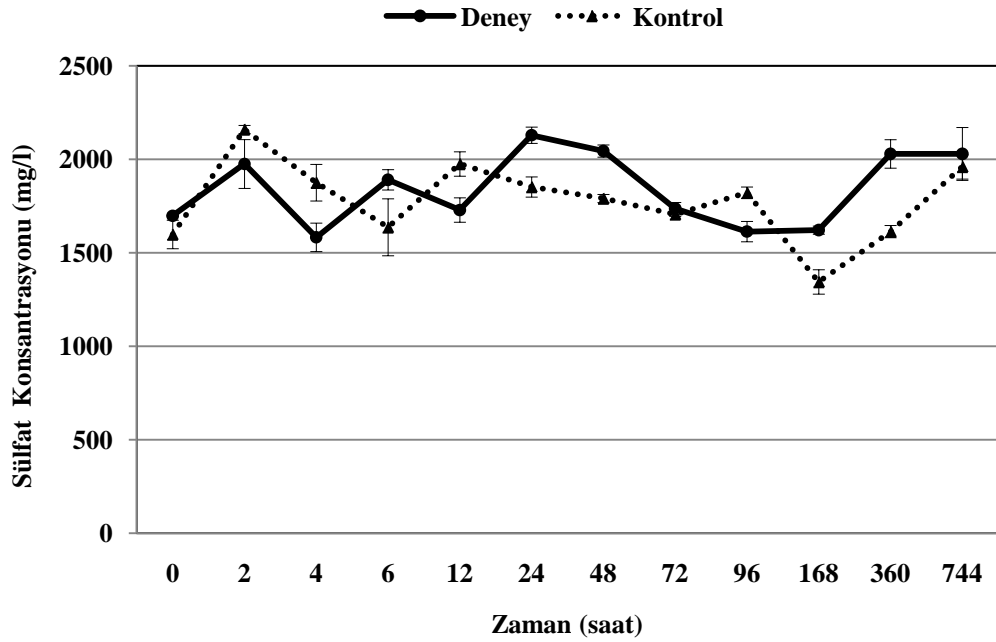
Deney süresince 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 360 ve 744. saatlerde deney düzeneğinden alınan besiyerinin SO₄⁻², Cl⁻, H₂S ve pH değerleri tespit edilmiştir. Belirlenen değerler Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 : Saatlere göre deney düzeneğindeki besiyerinin SO₄⁻², Cl⁻, H₂S ve pH değerleri

Saatler	SO ₄ ⁻² (mg/l)	Cl ⁻ (ppm)	H ₂ S (ppm)	pH
0	1699 ± 0.00	1600	1.0866 ± 0.0027	6.35
2	1975 ± 130.54	1600	0.0559 ± 0.0261	6.62
4	1583 ± 76.15	1500	1.1463 ± 0.0109	6.51
6	1891 ± 54.39	1500	1.0677 ± 0.2220	6.52
12	1729 ± 65.27	1600	1.0808 ± 0.0272	6.52
24	2129 ± 43.51	1500	1.0752 ± 0.0102	6.61
48	2045 ± 32.64	1400	1.0577 ± 0.0139	6.50
72	1737 ± 32.64	1400	1.0577 ± 0.0054	6.40
96	1614 ± 54.40	1400	1.0675 ± 0.0052	6.61
168	1622 ± 21.76	1600	1.0651 ± 0.0016	6.72
360	2029 ± 76.15	1700	1.0534 ± 0.0039	6.89
744	2029 ± 141.42	1400	1.0651 ± 0.0016	7.09

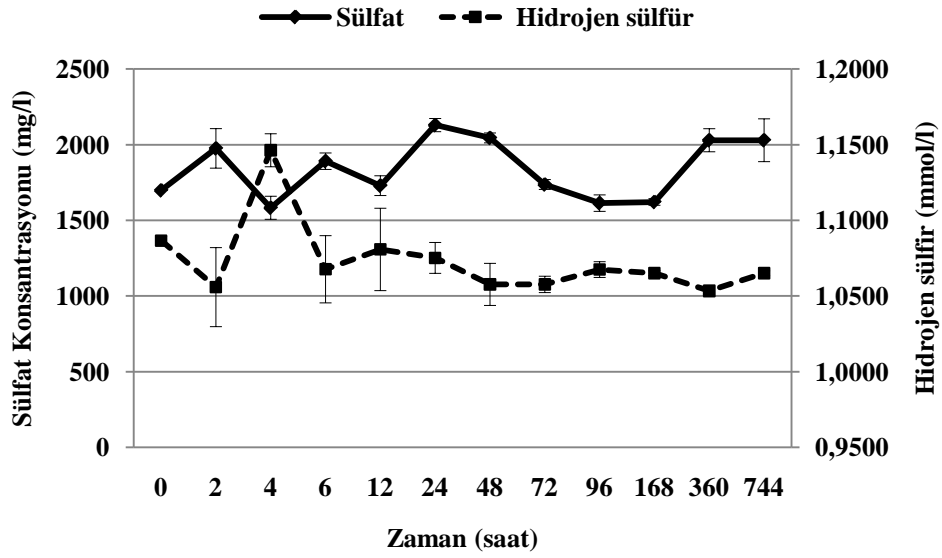
Düzenekteki SO₄⁻² konsantrasyonu, 2. saatte 1975 mg/l’ye yükselmiş ve sonra düşüşe geçerek 4. saatte en düşük miktar olan 1583 mg/l’ye gerilemiştir. Ardından tekrar

artarak 6. saatte 1891 mg/l değerine ulaşmış ve sonrasında azalarak 12. saatte 1729 mg/l'ye düşmüştür. Ardından yine artan SO_4^{-2} konsantrasyonu, 24. saatte maksimum değer olan 2129 mg/l'ye ulaşmıştır. Bu saatten sonra düşüşe geçen SO_4^{-2} miktarı 96. saatte 1614 mg/l'ye gerilemiştir. 96. saatten sonra artan SO_4^{-2} konsantrasyonu deney sonunda 2029 mg/l olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.7). Deney düzeneğindeki pH miktarındaki değişimler de SO_4^{-2} miktarıyla paralel olarak seyretmiştir.



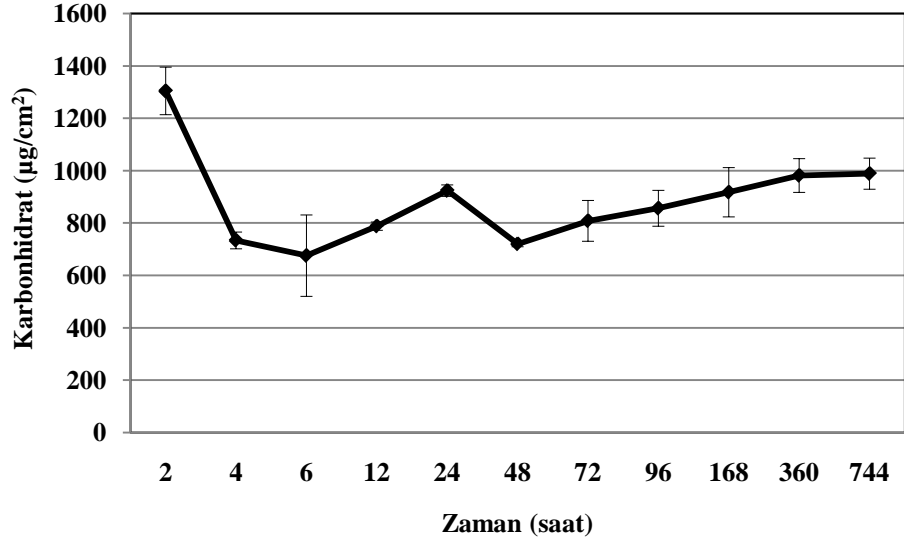
Şekil 4.7 : Deney ve kontrol düzeneklerindeki SO_4^{-2} konsantrasyonlarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Düzenekteki Cl^- miktarında belirgin değişimler gözlenmeyip, deney süresince 1400 ppm ve 1700 ppm değerleri arasında değişiklik göstermiştir. Deney düzeneğindeki H_2S miktarı, 0. saatten 2. saate geçişte düşmüş, ardından yükselerek 4. saatte maksimum değer olan 1.1463 mmol/l'ye ulaşmıştır. 6. saate geçişte düşen H_2S miktarında, deney sonuna dek bir değişiklik gözlenmemiştir. Yapılan Pearson korelasyon katsayıları testine göre, deney düzeneğinin besiyerindeki SO_4^{-2} konsantrasyonu ile H_2S değerleri (Şekil 4.8) ve SRB sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Aynı zamanda H_2S değerleri ve SRB sayısı arasında da anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.



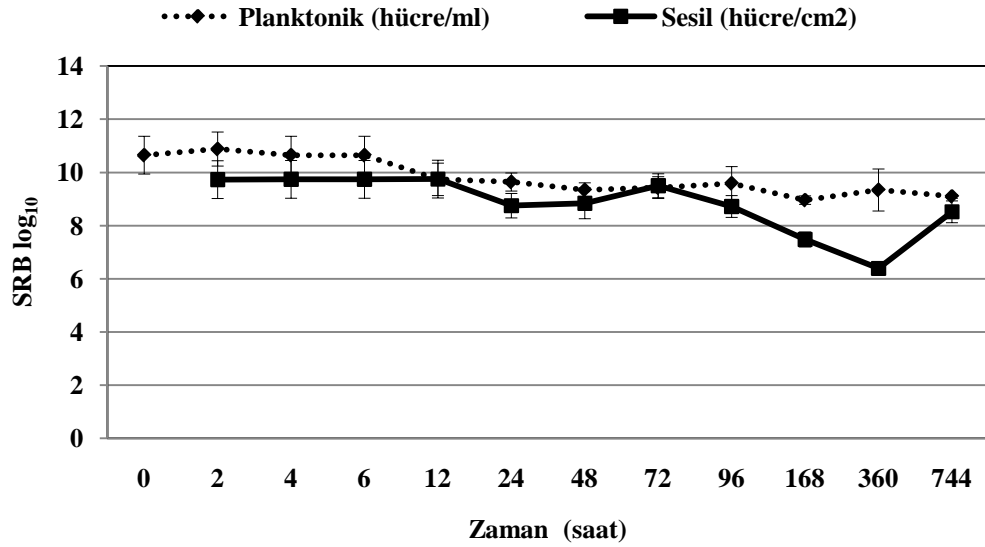
Şekil 4.8 : Deney düzeneği kültüründeki SO_4^{2-} ve H_2S konsantrasyonlarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Kuponların deney düzeneğine yerleştirilmesinden itibaren 6 saatlik süreçte, biyofilmdeki karbonhidrat miktarında belirgin bir azalma görülmüştür; 2. saatte, deney süresince belirlenen maksimum değer olan $1304.512 \pm 90.77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak ölçülen karbonhidrat miktarı, 6. saatte minimum değer olan $675.336 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 55.46$ olarak ölçülmüştür. 24. saate kadar tekrar artış gösteren ve $923.657 \pm 21.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ değerine ulaşan karbonhidrat miktarı, 48. saatte yine düşüş göstererek $720.059 \pm 10.68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'ye gerilemiştir. 48. saatten sonra kademeli olarak artan karbonhidrat miktarı, son örnekleme saati olan 744. saatte $988.412 \pm 59.39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'ye ulaşmıştır (Şekil 4.9). Yapılan Spearman korelasyon testine göre, karbonhidrat miktarıyla ağırlık kaybı, korozyon hızı ve SRB sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.



Şekil 4.9 : Deney düzeneğine yerleştirilen galvanizli çelik kuponların yüzeyinde oluşan biyofilmdeki karbonhidrat miktarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Biyofilmdeki en yüksek SRB sayısı 9.75 hücre/cm² olarak 12. saatte gözlenirken, en düşük sayı 6.39 hücre/cm² olarak 360. saatte belirlenmiştir. Kültürdeki en yüksek planktonik SRB sayısı olan 10.88 hücre/cm² 2. saatte görülürken, en düşük sayı olan 8.96 hücre/cm² 168. saatte gözlenmiştir. Planktonik ve sesil SRB sayısının zamanla azaldığı saptanmıştır (sırasıyla; $r = -0.918$, $P < 0.01$; $r = -0.852$, $P < 0.01$). Spearman korelasyon katsayıları testine göre, planktonik ve sesil SRB sayıları arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($r = 0.796$, $P < 0.01$). Deney düzeneğindeki planktonik ve sesil SRB sayılarının ortalamaları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 : Deney düzeneği kültüründeki ve galvanizli çelik kuponların yüzeyindeki SRB sayıları. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

4.2.2. Kontrol Düzeneği

Kontrol düzeneği besiyerinin, deney süresince belirlenen örnekleme saatlerine ait H₂S, SO₄⁻², Cl⁻ ve pH değerleri Tablo 4.2’te verilmiştir.

Kontrol düzeneğindeki en yüksek SO₄⁻² miktarı, 2160 mg/l olarak 2. saatte, en düşük miktar ise 168. saatte 1345 mg/l olarak saptanmıştır. 0. saatte 1599 mg/l olarak kaydedilen SO₄⁻² miktarı, 2. saate kadar yükselmiş, ardından 6. saatte 1637 mg/l’ye düşmüş ve sonra biraz yükselen SO₄⁻² miktarı 96. saate kadar belirgin bir değişim göstermemiştir. 168. saatte ise keskin bir düşüşle 1345 mg/l’ye gerilemiş ve ardından tekrar artarak deney sonunda 1960 mg/l’ye ulaşmıştır. Düzenekteki pH değeri, 0. saatte 7.01 olarak kaydedilirken, 48. saate kadar belirgin bir düşüş göstererek 6.33 seviyesine gerilemiştir. 168. saate kadar artan pH değeri, bu saatten sonra yine düşüşe geçmiş ve 744. saatte 6.58 olarak ölçülmüştür. Kontrol düzeneği besiyerindeki Cl⁻ miktarı deney başlangıcında 1100 ppm olarak ölçülmüş ve bu değer artarak 24. saatte 1500 ppm’e ulaşmıştır. Daha sonra düşerek 48. saatte 1300 ppm’e gerileyen Cl⁻ konsantrasyonu, 96. saate kadar değerini korumuştur. Bu saatten sonra azalarak 168. saatte 947 ppm olmuş ve ardından artarak deney sonunda 1900 ppm olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.2 : Saatlere göre kontrol düzeneğindeki besiyerinin SO_4^{-2} , Cl^- , H_2S ve pH değerleri

Saatler	SO_4^{-2} (mg/l)	Cl^- (ppm)	H_2S (mmol/l)	pH
0	1599 ± 76.15	1100	1.0539 ± 0.000	7.01
2	2160 ± 21.76	1100	1.0616 ± 0.000	6.77
4	1875 ± 97.91	1000	1.0885 ± 0.005	6.69
6	1637 ± 152.30	1000	1.0385 ± 0.000	6.80
12	1976 ± 65.27	1200	1.0667 ± 0.004	6.66
24	1852 ± 43.51	1500	1.0634 ± 0.008	6.43
48	1791 ± 21.76	1300	1.0616 ± 0.000	6.33
72	1706 ± 10.88	1300	1.0693 ± 0.000	6.57
96	1822 ± 30.77	1300	1.0675 ± 0.003	6.63
168	1345 ± 65.27	947	1.0654 ± 0.005	6.82
360	1614 ± 32.64	1360	1.0693 ± 0.000	6.65
744	1960 ± 65.27	1900	1.0693 ± 0.003	6.58

Düzenekteki H_2S miktarı, ilk 4 saatte artarak 1.0539 mmol/l'den 1.0885 mmol/l'ye yükselmiş, ardından belirgin bir düşüş göstererek 6. saatte 1.0385 mmol/l'ye gerilemiştir. Daha sonra yükselerek 12. saatte 1.0667 mmol/l'ye ulaşan H_2S miktarında deney sonuna dek belirgin bir değişim gözlemlenmemiştir. Yapılan Pearson korelasyon katsayıları testine göre, kontrol düzeneğinin besiyerindeki SO_4^{-2} konsantrasyonu ile H_2S ve pH değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Mann-Whitney U ve T testi analizlerine göre, kontrol ve deney düzeneklerindeki besiyerlerinin SO_4^{-2} , Cl^- , H_2S ve pH değerleri arasında, ortalamalar açısından anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

4.2.3. Korozyon

Deney ve kontrol düzeneğine yerleştirilen galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızlarında meydana gelen değişimler Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Deney düzeneğindeki galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıplarının zamana bağlı olarak arttığı, korozyon hızının ise azaldığı tespit edilmiştir (sırasıyla; $r = 0.907$,

$P < 0.01$; $r = -0.991$, $P < 0.01$) (Şekil 4.11). Deney düzeneğindeki galvanizli çelik kuponlarda en yüksek ağırlık kaybı 0.0068 g/cm^2 olarak 744. saatte kaydedilirken, en düşük ağırlık kaybı 0.0020 g/cm^2 olarak 4. saatte görülmüştür.

Tablo 4.3 : Deney ve kontrol düzeneğine yerleştirilen galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızlarının oranı

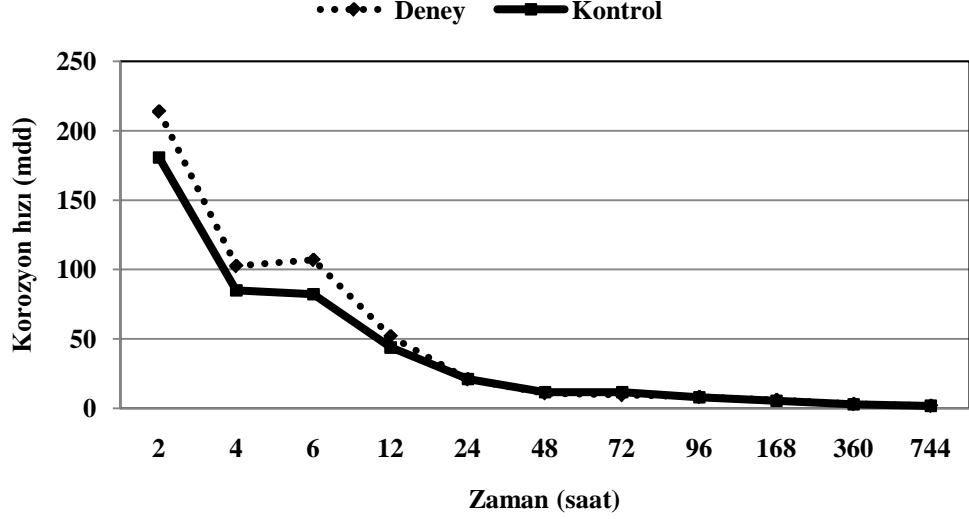
Saatler	Ağırlık kaybı ortalaması (g/cm^2)		Korozyon hızı (mdd)		Oran (deney/kontrol)
	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	
2	0.0021 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0001	213.91	180.7	1.18
4	0.0020 ± 0.0001	0.0020 ± 0.0003	102.54	84.94	1.21
6	0.0033 ± 0.0001	0.0028 ± 0.0004	106.93	82.15	1.30
12	0.0032 ± 0.0001	0.0026 ± 0.0003	51.87	43.83	1.18
24	0.0026 ± 0.0002	0.0025 ± 0.0001	20.97	21.05	1.00
48	0.0027 ± 0.0001	0.0029 ± 0.0002	10.91	11.69	0.93
72	0.0035 ± 0.0001	0.0042 ± 0.0003	9.59	11.59	0.83
96	0.0038 ± 0.0002	0.0039 ± 0.0001	8.17	7.95	1.03
168	0.0051 ± 0.0009	0.0045 ± 0.0001	6.03	5.42	1.11
360	0.0057 ± 0.0001	0.0052 ± 0.0000	3.12	2.86	1.09
744	0.0068 ± 0.0001	0.0066 ± 0.0001	1.81	1.80	1.01

Mdd: $\text{mg/dm}^2 \cdot \text{gün}$; \pm : Standart sapma

Deney düzeneğindeki kuponların ağırlık kaybı ile sesil SRB sayıları arasında ters yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($r = -0.712$, $P < 0.05$). Biyofilmdeki karbonhidrat miktarı ile korozyon hızı ve ağırlık kaybı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ayrıca, yapılan Pearson korelasyon testine göre, deney düzeneğindeki pH miktarı ile kuponların ağırlık kayıpları arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($r = 0.845$; $P < 0.01$).

Kontrol düzeneğindeki galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıpları zamana bağlı olarak artmış ($r = 0.945$, $P < 0.01$) ve maksimum değer olan 0.0073 g/cm^2 744. saatte tespit edilmiştir. Korozyon hızının zamana bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($r = -1.000$,

$P < 0.01$) (Şekil 4.11). Buna karşın, deney ve kontrol düzeneğindeki galvanizli çelik kuponların korozyon hız oranlarının zamana göre değişimiyle ilgili herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir.



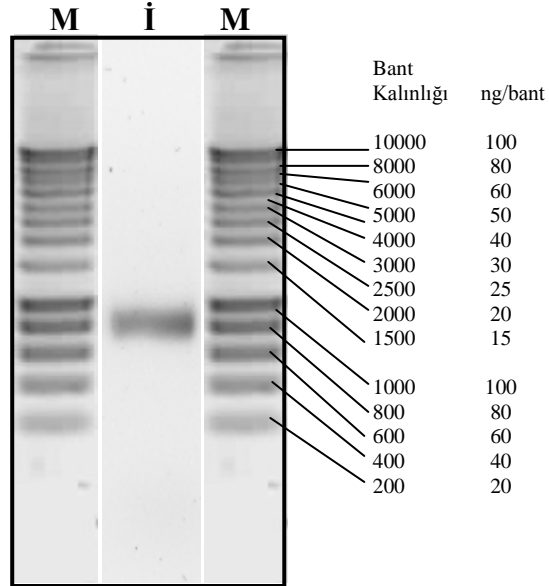
Şekil 4.11 : Deney ve kontrol düzeneğine yerleştirilen galvanizli çelik kuponların korozyon hızları. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Yapılan t testi ve Mann-Whitney U testine göre, deney ve kontrol düzeneğine yerleştirilen kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızları arasında ortalamalar açısından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.

4.3. MOLEKÜLER ANALİZLER

Korozif aktivitesi test edilen SRB içeren anaerob bakteri kültürünün hangi bakteri türlerini içerdiğini belirlemek üzere kültürün moleküler tanısı yapılmıştır. Bunun için öncelikle kültürün DNA'sı, Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen DNA'nın içerdiği kısmi 16S rDNA gen fragmentleri, bakterilere özgü 341F ve 907R primerleri kullanılarak, PCR ile çoğaltılmıştır. PCR sonrası elde edilen gen fragmentlerinin miktarını ve kalitesini tayin etmek üzere agaroz jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 4.12). Jelde oluşan bantın içerdiği DNA miktarı, hem markırların oluşturduğu bantların kalınlığı ve konumu baz alınarak hem de Nanodrop

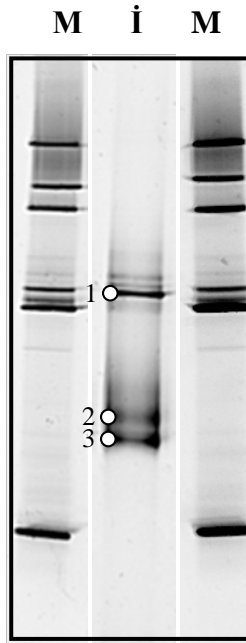
cihazı ile ölçülerek belirlenmiştir. PCR sonrası elde edilen DNA miktarı belirlendikten sonra, kültürün kaç farklı bakteri türünü içerdiğini tespit etmek amacıyla denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE) yapılmıştır.



Şekil 4.12 : PCR'la çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerinin agaroz jeldeki görüntüsü; M : Markır, İ: İzolat.

DGGE, filogenetik olarak birbirinden farklı olan bakteri türlerini, sahip oldukları DNA dizilerine göre birbirinden ayırarak jelin belirli bölgelerinde bantlar halinde konumlanmalarını sağlamaktadır. DGGE boyunca çift iplikli PCR ürünleri, jel içinde, artan denatüran konsantrasyonlarına doğru hareket ederler ve eşik denatüran konsantrasyonuna ulaştıklarında, çift iplikli DNA denatüre olur. Böylece birbirinden farklı DNA dizileri, farklı denatüran konsantrasyonlarında denatüre olarak bantlar oluştururlar. Teorik olarak, her bir bant kominitedeki farklı bir popülasyonu temsil etmektedir (Şekil 4.13). SRB içeren anaerop bakteri kültürünün PCR ürünlerinin yürütüldüğü DGGE jelinde, farklı pozisyonlarda 3 adet baskın bant oluşumu gözlenmiştir. Oluşan bantların her biri steril bir bistüri yardımıyla kesilerek, içlerinde tampon çözelti bulunan PCR tüpçüklerine konmuş ve 2 gece 4 °C'te bekletilerek, DNA fragmentlerinin tampon çözeltiye geçişi sağlanmıştır. Bu tampon çözelti kullanılarak içlerindeki DNA fragmentleri tekrar PCR ile çoğaltılmıştır. Reaksiyonun ardından PCR ürünleri ExoSAP-IT (USB Europe GmbH) ticari ürün ile muamele edilmiş, böylece sıvı

içindeki kullanılmayan primerlerin ve nükleotidlerin elimine edilmesi sağlanmıştır. Saflaştırılan DNA fragmentleri, uygun şekilde hazırlanarak dizi analizinin yapılacağı Macrogen (Kore) firmasına gönderilmiştir. Dizi analizi sonucuna göre; 2 ve 3 numaralı bantların, filogenetik olarak anaerobik sülfat indirgeyen bakteri türü olan *Desulfosporosinus* sp.'ye % 99 ve 1 numaralı bantın ise anaerobik, spor oluşturan ve H₂S üreten *Clostridium* sp.'ye % 99 oranında yakın olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13 : H₂S üreten SRB içeren anaerobik bakteri kültürünün 16S rDNA gen fragmentlerinin oluşturduğu DGGE profili; M : Markır, İ: İzolat.

5. TARTIŞMA

Biyokorozyon, mikroorganizmalar ve onların metabolik aktiviteleri tarafından başlatılan veya arttırılan korozyon çeşitidir. Karasal ve sucul habitatlarda metallerin korozyonuyla ilişkili başlıca bakteri tipleri, sülfat- ve demir-indirgeyen bakteriler ve sülfür-, demir- ve manganez-oksitleyen bakterilerdir (Beech ve Sunner, 2004). Bunlar arasında, sülfat indirgeyen bakteriler anaerobik korozyonla bağlantılı başlıca mikroorganizma grubu olarak tanımlanmaktadır (Beech ve Gaylarde, 1999). Sülfat indirgeyen bakterilerle, ferrik demiri ferröz demire ve sülfat, tiyosülfat ve elementel sülfürü hidrojen sülfüre indirgeyebilen fakültatif anaeroplardan oluşan sinerjistik reaksiyon, ferröz demir ve hidrojen sülfür miktarındaki artışla ve son derece korozif olan demir sülfürlerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (De Bruyn ve Cloete, 1993).

Soğutma kulesi malzemesini korozyona uğratarak büyük ekonomik kayıplara yol açan bu anaerobik, H₂S üreten bakterilerin galvanizli çelik üzerindeki korozif etkisini görmek ve bu bakterilerin tanımını yapmak üzere, çeşitli soğutma kulelerinden su örnekleri alınmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda en hızlı ve yoğun üreyen bir tanesi seçilerek korozif özelliği incelenmiştir.

Çalışmamızda, 5 farklı soğutma kulesinden alınan su örnekleri Postgate B besiyerine inoküle edilerek SRB içeren anaerobik bakteri izolatları elde edilmiştir. Ardından, en hızlı ve yoğun üreme özelliği gösteren izolat seçilerek, yarı-katı Postgate C besiyerine 2 kez ekim yapılmıştır. İki kez ekim yapılmasının amacı, fakültatif anaerob bakterilerin elimine edilmesi, böylece korozyonda büyük rol oynayan H₂S üreten bakteri kolonilerinin elde edilmesidir. H₂S üreten bakteriler, besiyerinde bulunan kükürt bileşiklerini kullanarak H₂S üretmekte ve oluşan hidrojen sülfür, besiyerindeki demirle birleşerek siyah renkteki FeS bileşimini oluşturmaktadır. Postgate C besiyerinde oluşan siyah ve kahverengi bakteri kolonilerinden hazırlanan boyasız preparatlar faz-kontrast mikroskopunda incelendiğinde, 21.21 µm'ye kadar uzayan, farklı büyüklüklerde ve çomak, virgül ve spiral şeklinde hücreler gözlenmiştir.

Bakteri kültürünün Gram özelliğini araştırmak üzere Gram boyama yapılmış ve kültürün hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakteriler içerdiği görülmüştür. Bu

sonuç, kültürün saf olmadığını veya Gram değişken bir bakteri içerdiğinin bir göstergesidir. Ayrıca izolatın Postgate B besiyerindeki kültüründen hazırlanan preparatlara endospor boyama işlemi uygulanmış ve preparatların floresan mikroskopunda incelenmesi sonucunda bakterilerin terminal ve subterminal olarak konumlanan, oval şekilli sporlar taşıdıkları görülmüştür. Zira bazı anaerobik SRB türleri (*Desulfotomaculum* (Campbell ve Postgate, 1965), *Desulfosporosinus* (Stackebrandt ve diğ., 1997), *Desulfosporomusa* (Sass ve diğ., 2004), *Desulfoviregula* (Kaksonen ve diğ., 2007)), yaşadıkları ekstrem koşullara adaptasyonlarını sağlayan sporlar içermektedirler. Spor oluşumu faz-kontrast mikroskopunda incelenen preparatlarda görülmüştür.

Mikroorganizmalar ve/veya onların metabolik aktiviteleri sonucu oluşturdukları ürünler, örneğin enzimler, hücre dışı polimerik maddeler, organik ve inorganik asitler, amonyum veya hidrojen sülfür gibi uçucu bileşikler, metal yüzeydeki katodik ve/veya anodik reaksiyonları etkileyebilmekte ve böylece biyofilm/metal arayüzündeki elektrokimyasal işlemleri değiştirebilmektedirler (Beech, 1999).

Biyofilm tabakası, sadece bakteriler tarafından salınan zararlı metabolitleri hapsedmekle kalmaz, aynı zamanda pH, çözülmüş oksijen ve klor gradyanı oluşturmaktadır. Bu, metali çevreleyen koşulları zaman içinde değiştirmekte ve metalin bölgesel korozyonuna yol açmaktadır (Sheng ve diğ., 2007). pH, klor, sülfat iyonlarının korozyonu artırıcı bir etkiye sahip oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Broo ve diğ., 1997; Broo ve diğ., 1999; Dubuisson ve diğ., 2006). Yapılan t testi analizine göre, deney düzeneğindeki klor miktarının kontrol düzeneğindeki klor miktarından anlamlı olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($t = 3.249$, $P < 0.05$). Bunun nedeni, her örnekleme saatinde deney düzeneğinden 50 ml besiyeri alınarak, bunun yerine 50 ml taze besiyeri eklenmesi olabilir. Yaptığımız istatistiksel analizlere göre, deney düzeneğindeki klor miktarı ile kuponların ağırlık kaybı ve korozyon hızı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Deney düzeneğindeki SO_4^{2-} konsantrasyonlarında ise sürekli bir azalma olmamış, azalmaların ardından artışlar gözlenmiştir. Bunun nedeni de, azalan SO_4^{2-} konsantrasyonlarının, düzeneğe eklenen taze besiyeri ile yeniden artması olabilir. Yaptığımız istatistiksel analizlere göre, deney düzeneğindeki SO_4^{2-}

iyonları ile korozyon hızı ve ağırlık kaybı arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür.

Deney düzeneğindeki pH miktarı ile kuponların ağırlık kaybı arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($r = 0.845$, $P < 0.01$). Bu sonuca göre, deney düzeneğindeki pH değerlerinin kuponların korozyonunda etkili olduğunu söyleyebiliriz. Aynı şekilde, Javaherdashti (2008), klor iyonları varlığında, SRB'nin oluşturduğu biyofilmde pH değerlerinin düşebileceğini, bunun da korozyona öncülük edeceğini bildirmiştir. İlhan-Sungur ve diğ. (2007), kapalı bir laboratuvar düzeneğinde saf SRB suyuyla yaptıkları benzer bir çalışmada, galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıplarının, pH değerleri ile paralel oranda arttığını rapor etmişlerdir. Bunun yanısıra, SRB türlerinin saf ve karışık kültürlerinin metaller üzerindeki koroziif etkilerinin farklılık gösterebileceği çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Gaylarde and Johnston, 1986; Duan ve diğ., 2008).

H₂S ölçümü için Cord-Ruwisch yöntemi kullanılmıştır. Ölçümler sonucunda, gerek deney gerekse kontrol düzeneklerinde H₂S miktarının 1 mmol/l civarında seyrettiği görülmüştür. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, deney düzeneğindeki H₂S miktarı ile kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızı arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Bu da, deney düzeneğindeki bakteriler tarafından üretilen H₂S'in galvanizli çelik kuponların korozyonunda rol oynamadığını göstermektedir. Buna karşın, Mor ve diğ. (1974), çinkonun korozyonunda S⁻² iyonlarının etkisini araştırmış ve yapay deniz suyunda 7.2'den büyük pH değerlerinde, S⁻² varlığında çinkonun korozyonunun arttığını bulmuşlardır. Bu anlamda, kullanılan Cord-Ruwisch yönteminin yeterince hassas bir yöntem olmadığı, H₂S ölçümü için daha hassas bir yöntemin seçilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, hidrojen sülfür konsantrasyonu ile sesil ve planktonik SRB sayısı arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir. Hidrojen sülfür, 6'dan küçük pH değerlerinde çözünmemiş formda (H₂S) bulunmakta, pH değeri yükseldikçe ayrışmaya başlamakta ve pH 7 civarında ortamdaki hidrojen sülfürün yarısı iyonik formda (HS⁻) bulunmaktadır (Aerts, 2009). Ortamın pH değerinin, H₂S'in

toksitesini büyük oranda etkilediği, nötral formdaki H_2S 'in, iyon formundaki HS^- 'e göre hücre zarı boyunca daha kolay difüze olduğu bildirilmiştir (Greben ve diğ., 2005). 6.8 ile 7.2 pH değerleri arasında, SRB'nin inhibisyonunu ortamdaki H_2S konsantrasyonunun belirlediği rapor edilmiştir (O'Flaherty ve diğ., 1998). Buna göre, deney düzeneğindeki pH değerleri 6.35 ile 7.09 arasından seyrettiğinden ve bu değerler arasında düzenekteki H_2S miktarı düşük olduğundan, hidrojen sülfürün SRB üzerine toksik etki göstermediği düşünülmektedir.

Yapılan Mann-Whitney U testine göre, deney düzeneğindeki planktonik SRB sayısı ile sesil SRB sayısı ortalamaları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, deney süresince SRB sayılarında belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Bunun nedeni, her örnekleme saatinde deney düzeneğinden deşarj-make up yapılması olabilir. Bu suretle, planktonik SRB sayılarında belirgin bir değişim olmamış, SRB'ler aktif büyüme fazında kalmışlardır. Spearman korelasyon katsayıları testine göre, sesil SRB sayıları ile planktonik SRB sayıları arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($r = 0.796$; $P < 0.01$). Aynı şekilde, İlhan-Sungur ve Çotuk (2010), model sistemde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, biyofilmdeki ve sudaki SRB sayıları arasında yüksek oranda pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Beech ve diğ. (1994) ve Ellwood ve diğ. (1982) de benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. Bu sonuç, SRB'leri de içeren anaerobik biyofilm bakterilerinin sürekli olarak planktonik faza geçtiklerini ve olgunlaşmış biyofilmlere sonradan yerleşemediklerini göstermektedir. Benzer sonuçlar Power ve diğ. (1999, 2001) tarafından da bildirilmiştir.

Deney düzeneği ve kontrol düzeneğindeki galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıplarının zamana bağlı olarak arttığı tespit edilirken (sırasıyla, $r = 0.907$, $P < 0.01$; $r = 0.954$, $P < 0.01$), korozyon hızının zamanla azaldığı tespit edilmiştir (sırasıyla, $r = -0.991$, $P < 0.01$; $r = -1.000$, $P < 0.01$). Aynı sonuç, İlhan-Sungur ve diğ. (2007) ve Minnoş (2008) tarafından da rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki korozyon hızı sonuçları, İlhan-Sungur ve diğ. (2007)'nin saf SRB suyuyla yaptıkları çalışma sonucunda rapor ettikleri korozyon hız sonuçları ile benzerlik gösterirken, İlhan-Sungur ve Çotuk (2010)'un model bir su sisteminde yaptıkları çalışma sonucunda bildirdikleri korozyon hızlarından oldukça yüksek seviyededir. Bunun nedeni, deneylerin gerçekleştirildiği koşullarının

birbirlerinden farklı olması, doğal ortam koşullarında çeşitli biyotik (EPS, quorum sensing, vb.) ve abiyotik faktörlerin (pH, sıcaklık, vb.) korozyonun gidişatını etkilemesi olabilir.

Yapılan ağırlık kaybı ölçümleri sonucunda, deney kuponlarının korozyon hızının kontrol kuponlarının korozyon hızına oranının zamanla değişmediği belirlenmiştir. Buna karşın, Minnoş (2008) gerçek bir soğutma kulesinde galvanizli çelik kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada, deney/kontrol korozyon hız oranının zamanla azaldığını bildirmiştir. İlhan-Sungur ve diğ.'nin (2007), laboratuvar ortamında, deney düzeneğinde saf SRB suşuyla (*Desulfovibrio* sp.) gerçekleştirdikleri çalışmada, korozyon hız oranının ilk 72 saat arttığını, sonrasında ise azaldığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, korozyon hız oranının 6. saate kadar arttığı, ardından 72. saate kadar azaldığı ve sonra tekrar artarak azaldığı gözlenmiştir. Bu fark, galvanizli çelik kuponlar üzerine korozif etkisini araştırdığımız anaerobik bakteri kültürünün, iki farklı bakteri türü içermesinden kaynaklanmış olabilir. Deney düzeneğindeki kuponların korozyon hızı ile kontrol düzeneğindeki kuponların korozyon hızı incelendiğinde, deney düzeneğindeki kuponların korozyon hızının daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak istatistiksel analiz sonucunda, deney kuponlarının korozyon hızı ile kontrol kuponlarının korozyon hızı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre, deney kuponlarının korozyona uğradığı, ancak oluşan korozyonun çok düşük miktarda olduğunu söyleyebiliriz. Deneyde kullanılan kültürde bulunan *Desulfosporosinus* sp. ve *Clostridium* sp. bakterilerinin galvanizli çelik üzerine korozif etkileri daha önce denenmemiştir, dolayısıyla birlikte buldukları kültürün korozyonu nasıl etkilediğini net olarak ortaya koyabilmek için bu bakterilerin tek tek korozif etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Nitekim, Duan ve diğ. (2008), bir anaerobik sülfat indirgeyen bakteri türü olan *Desulfovibrio caledoniensis* ve *Clostridium* sp. türlerinin karbon çelik üzerine korozif etkilerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmanın sonucunda, *Dsv. caledoniensis*'in korozyonu tetiklediğini, buna karşın *Dsv. caledoniensis* ve *Clostridium* sp.'nin birlikte bulunduğu kültürün korozyonu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Deney düzeneğindeki kuponların ağırlık kaybı ile sesil SRB sayısı arasında ters yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($r = -0.712$; $P < 0.05$). Buradan hareketle,

korozyonun SRB hücre sayısına değil, aynı zamanda bakterinin korozif aktivitesine bağlı olduğu söylenebilir. Beech ve diğ. (1994) ve Angell ve Urbanic (2000) yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, SRB sayısı ile korozyon oranı veya korozyon başlangıcı arasında herhangi bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir. Çeşitli biyotik (EPS, quorum sensing, vb) ve abiyotik (pH, sıcaklık, vb.) faktörler korozyonun gidişatını etkilemektedir.

Biyofilmdeki EPS'de bulunan karbonhidrat miktarında zamana bağlı bir değişim saptanmamıştır. Karbonhidrat miktarında zaman zaman artış ve azalışlar görülmüştür. Bu sonuç, deney düzeneğindeki anaerop bakteri kültürünün, kendi ürettiği hücre dışı karbonhidratı kullandığını göstermektedir. Nitekim, bazı karışık kültürdeki bakterilerin açlık fazına girdiklerinde kendi ürettikleri EPS'yi tükettikleri rapor edilmiştir (Zhang ve Bishop, 2003; İlhan-Sungur ve diğ., 2007; İlhan-Sungur ve Çotuk, 2010). Bununla beraber, yapılmış olan bazı çalışmalarda sülfat indirgeyen bir bakteri türü olan *Desulfovibrio* sp. de dahil olmak üzere çeşitli bakterilerin saf kültürlerinin de kendi ürettikleri EPS'yi kullanabildikleri rapor edilmiştir (İlhan-Sungur ve diğ., 2007; Boyd ve Chakrabarty, 1994).

EPS'deki karbonhidrat miktarı ile deney kuponlarının ağırlık kaybı ve korozyon hızı arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Bu durum, biyofilmdeki bakteriler tarafından üretilen karbonhidratın korozyonda aktif rol oynamadığını göstermektedir. Buna karşın, İlhan-Sungur ve Çotuk (2010), biyofilmdeki karbonhidrat miktarıyla kuponların ağırlık kaybı arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki olduğunu, İlhan-Sungur ve diğ. (2007) ise ters yönde bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bu fark, bizim çalışmamızda kullandığımız anaerop bakteri kültürünün içerdiği bakteri türlerinin oluşturdukları EPS içeriğinin ve EPS'deki karbonhidrat miktarının farklı olmasından, dolayısıyla bunların, metalin korozyonunda farklı etkiler göstermesinden kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızın bir diğer amacı da, bir soğutma kulesinden izole edilerek laboratuvar ortamında korozyon aktivitesini incelediğimiz anaerobik bakteri kültürünün içerdiği bakteri türlerini moleküler tekniklerle araştırmaktır. Bu veri, soğutma kulesinde

korozyona neden olan anerobik bakteri çeşitliliğini daha iyi bir şekilde değerlendirmemizi ve anaerobik bakterilerin korozyon sürecini nasıl etkilediklerini anlamamızı kolaylaştıracaktır.

16S rDNA gen fragmentlerini kullanarak yürüttüğümüz DGGE jelinde oluşan bantların dizi analizi sonucuna göre, kültürün, bir sülfat indirgeyen bakteri türü olan *Desulfosporosinus* sp. (% 99 homoloji) ve demir indirgeme özelliği bulunan anaerobik fermentatif *Clostridium* sp. (% 99 homoloji) türünü içerdiği görülmüştür. Bu türlerin birlikte bulunması galvanizli çeliğin korozyona uğramasında önemli bir role sahip olabilir. Duan ve diğ. (2008), doğal deniz suyuna daldırdıkları çelik yüzeylerde oluşan pas tabakasının altındaki anaerobik biyofilmi mikrobiyolojik ve moleküler tekniklerle analiz etmişler ve biyofilmde bir sülfat indirgeyen bakteri türü olan *Desulfovibrio caledoniensis* ve demir indirgeyen bakteri olarak *Clostridium* sp.'nin birlikte varolduklarını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise Zhang ve Fang (2001), korozif özellikteki bir deniz biyofilminde baskın olan *Desulfovibrio* türlerinin *Clostridium* grubu üyeleriyle yakın bir birliktelik içinde olduğunu rapor etmişlerdir.

Doğal bir habitatta, metal yüzeylerin sadece bir tür korozyona yol açan bakteri tarafından kolonize edilmediği çok açıktır (Licina, 1988; Rao ve diğ., 2000). Bunun aksine, farklı mikroorganizma türleri birbirlerine çok yakın bir şekilde büyüyerek heterojen biyofilmler oluştururlar (Geesey, 1990). Doğal ekosistemlerde, SRB'nin aktivitesi mikrobiyolojik korozyon oluşumu için tek başına bir sebep teşkil etmemektedir (Licina, 1988; Hamilton, 1990). Zorunlu anaerop bir organizma olarak, SRB'nin gelişimi aynı nişteki diğer organizmaların aktiviteleri tarafından etkilenmektedir (Geesey, 1990; Hamilton, 1990). Bazı fermentatif anaerop bakteriler, SRB'nin enerji gereksinimini karşılayan organik elektron vericileri sağlarlar (Geesey, 1990). Dolayısıyla, bir fermentatif anaerop olan *Clostridium* ile anaerop *Desulfosporosinus* gibi iki farklı, biyofilm oluşturan organizmanın birlikte bulunması olası bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır.

Desulfosporosinus cinsi, ilk kez 1997 yılında *Desulfotomaculum orientis* türünü yeni bir taksonomik gruba yerleştirmek üzere önerilmiştir (Stackebrandt ve diğ., 1997). Keşfi 10

yıl kadar kısa bir süre önce olan *Desulfosporosinus* cinsi, Clostridia sınıfının Peptococcaceae ailesine dahil edilmiştir. Başlıca habitatları nemli toprak ve tatlısu sedimentleridir. *Desulfosporosinus*'un filogenetik olarak Gram pozitif bakterilerin *Clostridium-Bacillus* altşubesinde yer alması, *Clostridium* cinsiyle birçok özelliğinin benzeştiğinin ve dolayısıyla birçok ortamda sinerjistik birliktelikler oluşturabileceğinin de bir kanıtıdır. Bu iki cinsin morfolojik ve fizyolojik özellikleri Tablo 5.1'de gösterilmiştir (Dorn ve diğ., 1978; Kenealy ve Waselefsky, 1985; Minton ve Clarke, 1989; Holt ve diğ., 1994; Moat ve diğ., 2002; Bitton, 2005; Ramamoorthy ve diğ., 2006; Spring ve Rosenzweig, 2006; Sallam ve Steinbüchel, 2009).

Desulfosporosinus'un paslanmaz çeliği korozyona uğrattığı Zuo ve Wood (2004) tarafından gösterilmiştir. Booth ve diğ. (1966) bir Gram pozitif SRB olan *Desulfosporosinus orientis*'in, hidrojenaz aktivitesi olduğunu ve diğer SRB'ler gibi çeliği korozyona uğrattığını bulmuşlardır. Tiller ve Booth (1968) da *Desulfosporosinus orientis*'in gelişiminin, alüminyumun korozyonunu stimüle eden demir sülfür presipitasyonuna yol açtığını göstermişlerdir. Buna karşın, yapılan literatür taramalarında *Desulfosporosinus* ve *Clostridium* cinslerini içeren bir kültürün galvanizli çelik üzerine korozyon etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan çalışmamız ayrı bir öneme sahiptir.

Clostridium cinsi bakteriler, metaller üzerinde biyofilm oluşturmaları esnasında asidik hücre dışı polisakkaritler salgırlar ve bu özelliklerinden dolayı asit üreten bakteriler (APB) grubuna dahil edilmektedirler. Metabolik ürün olarak oluşturdukları kısa-zincirli ve düşük moleküler ağırlıklı bütirik asit, asetik asit, formik asit gibi organik asitler metalin korozyonuna neden olmaktadır. *Clostridium*'ların sıklıkla sülfat indirgeyen bakterilerin bulunduğu yerlerde var olduğu ve metabolik ürünlerinin SRB'ler tarafından besin olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Herro ve Port, 1993). Ayrıca, ürettikleri hidrojen sülfür ile korozyonu stimüle etmektedir (Cloete ve De Bruyn, 1995; Beech, 1999). *Clostridium*'ların korozyon mekanizmalarından birisi de [Fe] hidrojenaz 1 enzimi taşımalarıdır. Özellikle *C. pasteurianum* türünün taşıdığı bu enzim, çelik yüzeylerden demir salınımını ve katodik bölgede hidrojen üretimini artırarak korozyona neden olmaktadır (Bryant ve Laishley, 1990).

Tablo 5.1 : *Desulfosporosinus* ve *Clostridium* cinslerinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri

Özellikler	<i>Desulfosporosinus sp.</i>	<i>Clostridium sp.</i>
Gram boyama	Negatif, pozitif veya değişken	Negatif veya pozitif
Morfoloji	Kıvrık çomak, çiftler veya kısa zincirler şeklinde	Çomak, çiftler veya kısa zincirler şeklinde
Hücre çapı (µm)	0.4 - 1.2	0.3 - 2.0
Endosporlar	Elips şeklinde, terminal/subterminal	Oval veya küresel
Hareket	- / +	+
Flagella tipi	Polar, lateral veya peritrik	Peritrik
Büyüme sıcaklığı (°C)		
Optimum	25 - 37	30 - 37
Aralık	5 - 42	-5 - 69
Büyüme için pH		
Optimum	6.4 - 7.0	6.5 - 7.0
Aralık	6.5 - 7.5	5.5 - 12.2
NaCl aralığı (%)	0 - 5	
Laktat varlığında elektron alıcıları		
Sülfat	+	-
Tiyosülfat	+	- / +
Sülfit	- / +	- / +
Kükürt	- / +	- / +
Demir (III)	- / +	+
Etanol	+	+
Sülfat varlığında elektron vericileri		
Format	+	- / +
Asetat	-	- / +
Piruvat	+	- / +
Laktat	+	- / +
Butirat	+	- / +
Propionat	-	- / +
Süksinat	-	- / +
Fumarat	- / +	- / +
Malat	- / +	- / +
H ₂ oksidasyonu (CO ₂ ile)	- / +	+
Laktat varlığında fermentatif büyüme	- / +	+
DNA G+C içeriği (%)	42 - 47	22 - 55

+ : bütün türlerinde görülür, - : hiçbir türde görülmez, - / + : bazı türlerde görülürken, bazılarında görülmez.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar;

Desulfosporosinus sp. ve *Clostridium* sp.'nin galvanizli çelik yüzeylerde ürediği, pH'nın korozyonda rol oynadığı, deney ve kontrol düzeneğindeki galvanizli çelik kuponların ağırlık kayıplarının zamana bağlı olarak arttığı şeklinde özetlenebilir.

Sonuç olarak, *Desulfosporosinus* sp. ve *Clostridium* sp.'nin birlikte bulunduğu kültürün, galvanizli çeliği korozyona uğrattığı, fakat korozyon hızının, kontrol düzeneğindeki kuponların korozyon hızıyla karşılaştırıldığında çok yüksek olmadığını söyleyebiliriz. Bir sonraki çalışmamızın amacı, saf olarak elde ettiğimiz *Desulfosporosinus* sp. suşunun galvanizli çelik üzerindeki korozif aktivitesini benzer koşullardaki deney düzeneğinde inceleyerek, *Clostridium* sp. türüyle birlikteyken yarattığı etkiyle karşılaştırmak ve bu türlerin saf ve karışık kültürlerinin korozif etkileri hakkında daha net bir bilgiye sahip olmak olacaktır.

KAYNAKLAR

AERTS, S., 2009, Effect of Geochemical Conditions on Bacterial activity, *external report of the belgian nuclear research center*, ISSN:1782-2335.

AL-DARBI, M.M., AGHA, K., ISLAM, M.R., 2005, Comprehensive Modelling of the Pitting Biocorrosion of Steel, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 83, 872-881.

ALLISON, D.G., 2003, The biofilm matrix, *Biofouling*, 19, 139-150.

ALVAREZ, M.T., CRESPO, C., MATTIASSON, B., 2006, Precipitation of Zn(II), Cu(II) and Pb(II) at bench-scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids, *Chemosphere*, 66 (9), 1677-1683.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL (ASTM), 1975, *Standard recommend practice for preparing, cleaning and evaluating corrosion test specimens*, In: Annual book of ASTM standarts, Designation:G1-72, American Society for Testing Materials, Philadelphia, 0300137510, pp.626-629.

ANDERSON, E.A., REIN, HARD, C.E., 1948, *Zinc*. In: UHLIG, H.H. (ed), *Corrosion Handbook*, 331-347, John Wiley & Sons, USA, 0471895628.

ANGELL, P., URBANIC, K., 2000, Sulphate-reducing bacterial activity as a parameter to predict localized corrosion of stainless alloys, *Corros. Sci.* 42, 897-912.

APHA, 1981, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, American Public Health Association, Washington DC, 0-87553-091-5.

AQUA CORRECT, *Physical Water Conditioning Technic*, <http://www.aqua-correct.dk/dk1skw/uk-koelinstruktion.html>, Ziyaret tarihi: 27.07.2009.

AZABOU, S., MECHICHI, T., SAYADI, S., 2005, Sulfate reduction from phosphogypsum using a mixed culture of sulfate-reducing bacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56, 236-242.

BARTON, L.L., HAMILTON, W.A., 2007, *Sulphate-reducing Bacteria, Environmental and Engineered Systems*, Cambridge University Press, New York, 978-0-521-85485-6.

BEECH, I.B., SUNNY CHEUNG, C.W., PATRICK CHAN, C.S., 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, *Int. Biodeter. Biodegr.* 34, 289-303

BEECH, I.B., CHEUNG, C.W.S., 1995, Interactions and of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metal ions, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35, 59-72.

BEECH, I.B., 1999, Modern techniques for studying biofilms and their role in biodeterioration. *Proceedings 2nd International Congress in Environmental Microbiology*, Santa Fe de Bogota, Colombia, 20–24 May, p. 17– 24.

BEECH, I.B., GAYLARDE, C.C., 1999, Recent Advances in the Study of Biocorrosion-An Overview, *Revista de Microbiologia*, 30, 177-190.

BEECH, I.B., BERGEL, A., MOLLICA, A., FLEMMING, H.C., SCOTTO, V., SAND, W., 2000, Simple methods for the investigation of the role of biofilms in corrosion, *Biocorrosion* 00-02.

BEECH, I.B., SUNNER, J., 2004, Biocorrosion, towards understanding interactions between biofilms and metals, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 181–186.

BITTION, G., 2005, *Wastewater Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 0-471-65071-4.

BOOTH, G.H., COOPER, P.M., WAKERLEY, D.S., 1966, Corrosion of mild steel by actively growing cultures of sulphate-reducing bacteria-The influence of ferrous iron, *Br Corros J*, 1, 345–349.

BORENSTEIN, S.W., 1994, *Microbiologically influenced corrosion handbook*, Woodhead, Cambridge, England.

BOYD, A., CHAKRABARTY, A.M., 1994, Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Environmental Microbiology*, 60, 2355–2359.

BRYANT, R.D., LAISHLEY, E.J., 1990, The role of hydrogenase in anaerobic biocorrosion, *Can J Microbiol*, 36:259–64.

BRITISH ASSOCIATION FOR CHEMICAL SPECIALITIES, 1989, The Control of *Legionella* by the safe and effective operation of cooling systems.

BROO, A.E., BERGHULT, B., HEDBERG, T., 1997, Copper corrosion in drinking water distribution systems — the influence of water quality, *Corrosion Science*, 39 (6), 1119-1132.

BROO, A.E., BERGHULT, B., HEDBERG, T., 1999, Drinking water distribution-the effect of natural organic matter (NOM) on the corrosion of iron and copper, *Water Science Technology*, 40 (9), 17-24.

BRYANT, R.D. LAISHLEY, E.J., 1990, The role of hydrogenase in anaerobic biocorrosion. *Canadian Journal of Microbiology*, 36, 259–264.

CAMPBELL, L.L, POSTGATE, J.R., 1965, Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria, *Bacteriol Rev.*, 29(3), 359–363.

CHARACKLIS, W.G., 1990, *Microbial fouling and microbial fouling control*, In: Characklis W.G., Marshall K.C. (ed), *Biofilms*, John Wiley, p. 523–633.

CHOUDHARY, S.G., 1998, Emerging microbial control issues in cooling water systems, *Hydrocarbon Processing*, 77 (5), 91-102.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, *Public Health Image Library (PHIL)*, <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>, Ziyaret tarihi: 05.11.2009.

CLOETE, T.E., DE BRUYN, E.E., 1995, *The dominant sulphide-producing bacteria, isolated from industrial cooling-water systems*, In *Biodeterioration and Biodegradation*, eds A. Boucher, M. Chandra and E. Edyvean, pp. 507-511, Institution of Chemical Engineers, Warwickshire.

COETSER, S.E., CLOETE, T.E., 2005, Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems, *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 213-232.

CORD-RUWISCH, R., 1985, A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, 4, 33-36.

COSTERTON J.W., NICKEL, J.C., LADD, T.I., 1986, *Bacteria in nature*, Plenum Publishing Corp., New York, 0-30643173-4.

COSTERTON J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J., 1987, Bacterial biofilms in nature and disease, *Annual Review of Microbiology*, 41, 435-464.

COSTERTON J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M., 1995, Microbial biofilms, *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.

ÇOTUK, A., ANĞ-KÜÇÜKER, M., 1995, *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

DAVEY, M.E., O'TOOLE, G.A., 2000, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 847,867.

DE ALMEIDA, L.F.S., DE MATOS BELEZA, V., PEREIRA, I.M.B., 1997, Contribution of air pollution to the fouling of heat exchangers in cooling water circuits, *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14, 438-441.

DE BEER, D., SRINIVASAN, R., STEWART, P.S., 1994, Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (12), 4334-4339.

DE BRUYN, E., 1992, Microbial ecology of sulphide-producing bacteria in water cooling systems, PhD Thesis, University of Pretoria.

DE BRUYN, E.E. ve CLOETE, T.E., 1993, Media for the detection of sulphide producing bacteria in industrial water systems, *J. Microbiol Methods*, 17, 261-271.

DENNIS KUNKEL MICROSCOPY, INC., Science Stock Photography, http://www.denniskunkel.com/product_info.php?products_id=681, Ziyaret tarihi: 05.11.2009.

DORN, M., ANDREESEN, J.R., GOTTSCHALK, G., 1978, Fermentation of Fumarate and L-Malate by *Clostridium formicoaceticum*, *Journal of Bacteriology*, 133 (1), 26-32.

DRAKE, L.A., BAIER, R.E., DOBBS, F.C., DOBLIN, M.A., FORSBERG, R.L., HEINEMANN, S., 2003, Potential invasion of microorganisms and pathogens via 'interior hull fouling': biofilms inside ballast water tanks. *Proceedings of the Third International Conference on Marine Bioinvasions*, La Jolla, California, March 16–19, p. 35.

DREESZEN, P.H., 2003, *BIOFILM: The key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking Water Systems*, 2nd ed., Edstrom Industries Inc., 4230-DS3100 10/03 IH.

DUAN, J., WU, S., ZHANG, X., HUANG, G., DU, M., HOU, B., 2008, Corrosion of carbon steel influenced by anaerobic biofilm in natural seawater, *Electrochimica Acta*, 54, 22–28.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

DUBUISSON, E., LAVIE, P., DALARD, F., CAIRE, J.-P., SZUNERITS, S., 2007, Corrosion of galvanised steel under an electrolytic drop, *Corrosion Science*, 49, 910–919.

DUNNE, W.M., 2002, Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155–166.

DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.H., STACKEBRANDT, E., 2006, *The Prokaryotes*, 3rd ed., Springer, New York, 9780387254920.

ELECTRIC POWER RESEARCH INSTITUTE, 2003, Use of degraded water sources as cooling water in power plants, Consultant Report, P500-03-110.

ELLWOOD, D.C., KEEVIL, C.W., MARSH, P.D., BROWN, C.M., WARDELL, J.N., 1982, Surface-associated growth, *Philos. T. Roy. Soc. B.* 297, 517–532.

FEIO, M.J., BEECH, I.B., CAREPO, M., LOPES, J.M., CHEUNG, C.W.S., FRANCO, R., GUEZENNEC, J., SMITH, J.R., MITCHELL, J.I., MOURA, J.J.G., LINO, A.R.,

1998, Isolation and characterization of a novel sulphate reducing bacterium of the *Desulfovibrio* genus, *Anaerobe*, 4, 117-130.

FORD, T., MITCHELL, R., 1990, The ecology of microbial corrosion, *Advances in Microbial Ecology*, 11, 231–262.

GAGNON, G.A., SLAWSON, R.M., 1999, An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *Journal of Microbiological Methods*, 34, 203-214.

GARRETT, J.H., 1891, *The Action of Water on Lead*. H.K. Lewis, London, England.

GAYLARDE, C.C., JOHNSTON, J.M., 1986, Anaerobic metal corrosion in cultures of bacteria from estuarine sediments. In: S.C. Dexter (ed), *Biologically Induced Corrosion, NACE-8*, Houston, TX, 137-143.

GEESEY, G.G., 1990, What is biocorrosion? *International workshop on industrial biofouling and biocorrosion*, Stuttgart, Germany, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 155–164.

GEESEY, G.G., SUCI, P.A., 2000, *Monitoring biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy*. In: Evans LV, editor, *Biofilms: recent advances in their study and control*. Chur, Switzerland 7 Harwood Academic Publishers, p. 253–77.

GREBEN, H.A., MAREE, J.P., ELOFF, E., MURRAY K., 2005, Improved sulphate removal rates at increased sulphide concentration in the sulphidogenic bioreactor, *Water SA*, 31(3), 351-358.

HADLEY, R.F., 1948, *Corrosion by microorganisms in aqueous and soil environments*. In: UHLIG, H.H. (ed), *The Corrosion Handbook*, John Wiley & Sons Inc., USA, 0471895628, pp. 466-470.

HAMILTON, W.A., 1985, Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion, *Annual Review of Microbiology*, 39, 195-217.

HAMILTON, W.A., 1990, Sulphate-reducing bacteria and their role in biocorrosion. *International workshop on industrial biofouling and biocorrosion*, Stuttgart, Germany, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 187–193.

HAMILTON, W.A., 1998, Sulfate-reducing bacteria: physiology determines their environmental impact, *Geomicrobiology Journal*, 15, 19-28.

HERRO, H.M., PORT, R.D., 1993, *The Nalco guide to cooling water system failure analysis*, Nalco Chemical Company, Mc-Graw-Hill, Inc., USA, 0-07-028400-8.

HINES, M.E., VISSCHER, P.T., TESKE, A., DEVEREUX, R., 2007, *Sulfur Cycling*, In: Hurst C.J. (ed), *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington, D.C., 978-1-55581-379-6, pp. 497-510.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. ve WILLIAMS, S.T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 0683006037.

IVERSON, W.P., 1987, Microbial corrosion of metals, *Advances in Applied Microbiology*, 32, 1-36.

İLHAN-SUNGUR, E., ÇOTUK, A., 2005, Characterization of sulfate reducing bacteria isolated from cooling towers, *Environmental Monitoring and Assessment*, 104, 211-219.

İLHAN-SUNGUR, E., CANSEVER, N., ÇOTUK, A., 2007, Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp.), *Corrosion Science*, 49, 1097-1109.

İLHAN-SUNGUR, E., ÇOTUK, A., 2010, Microbial corrosion of galvanized steel in a simulated recirculating cooling tower system, *Corrosion Science*.

JAVAHERDASHTI, R., 2008, *Microbially Influenced Corrosion : An Engineering Insight*, Springer, London, 9781848000735.

JAYARAMAN, A., HALLOCK, P.J., CARSON, R.M., LEE, C.C., MANSFELD, F.B., WOOD, T.K., 1999, Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52 (2), 267-275.

JOHN, G.H., NOEL, R.K., PETER, H.A.S., JAMES, T.S., STANLEY, T.W., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 0-683-00603-7.

KAKSONEN, A.H., SPRING, S., SCHUMANN, P., KROPPENSTEDT, R.M., PUHAKKA, J.A., 2007, *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1089-1094.

KARR, E.A., SATTLEY, W.M., RICE, M.R., JUNG, D.O., MADIGAN, M.T., ACHENBACH, L.A., 2005, Diversity and Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in Permanently Frozen Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6353-6359.

KAZANÇ, A., 1992, *Soğutma kuleleri*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.

KENEALY, W.R., WASELEFSKY, D.M., 1985, Studies on the substrate range of *Clostridium kluyveri*; the use of propanol and succinate, *Arch Microbiol*, 141, 187-194.

LANE, J., PECK, D., 2003, Condenser water treatment using pulsed power, *Cooling Technology Institute Annual Conference*, February 10-13, San Antonio, Texas Cooling Technology Institute, pp.1-16.

LANGENDIJK, P.S., HAGEMANN, J., VAN DER HOEVEN, J.S., 1999, Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and in healthy oral sites, *Journal of Clinical Periodontology*, 26, 596-599.

LEE, W., LEWANDOWSKI, Z., NIELSEN, P.H., HAMILTON, W.A., 1995, Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: A review, *Biofouling*, 8, 165-194.

LICINA, G.J., 1988, Sourcebook for microbiologically influenced corrosion in nuclear power plants RP2812-2. *Electric Power Research Institute*, Palo Alto, Calif.

LITTLE, B.J., WAGNER, P.A., MANSFELD, F., 1991, Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys, *International Materials Reviews*, 36 (6), 253-272.

LITTLE, B.J., LEE, J.S., 2007, *Microbiologically Induced Corrosion*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 978-0-471-77276-7.

LU, R.H., LIU, Q., ZHANG, Y.H., XIAO, C.S., 1989, Studies on harmful microbes in recirculating cooling tower water system of oil refinery, *Wei sheng wu hsueh pao*, 29 (3), 204-215.

MARCHAL, R., CHAUSSEPIED, B., WARZYWODA, M., 2001, Effects of ferrous ion availability on growth of a corroding sulfate-reducing bacterium, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47, 125-131.

McCOY, J.W., 1980, *Microbiology of Cooling Water*, Chemical Publishing Company, New York, 978-0820602530.

McDOUGALL, R., ROBSON, J., PATERSON, D., TEE, W., 1997, Bacteriemia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species, *Journal of Clinical Microbiology*, 1805-1808.

MIDANDER, K., PAN, J., LEYGRAF, C., 2006, Elaboration of test method for the study of metal release from stainless steel particles in artificial biological media, *Corrosion Science*, 48, 2855-2866.

MİNNOŞ, B., 2008, *Soğutma kulesinde sülfat indirgeyen bakterilerin galvanizli çelik üzerine korozif etkisinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.

MINTON, N.P. ve CLARKE, D.J., 1989, *CLOSTRIDIA Biotechnology Handbooks 3*, Plenum Press, New York, 0306432617.

MITTLEMAN, M.W., GEESSEY, G.G., 1985, Copper-binding characteristics of exopolymers, from a fresh water-sediment bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 846-851.

MOAT, A.G., FOSTER, J.W., SPECTOR, M.P., 2002, *Microbial Physiology*, 4th ed., Wiley-Liss, Inc., New York, 0-471-39483-1.

MOR, E.D., BECCARIA, A.M., POGGI, G., 1974, Behaviour of zinc in seawater in the presence of sulphides, *Br. Corros. J. (Quarterly)*, 1, 53–56.

MORTON, L.H.G., GREENAWAY, D.L.A., GAYLARDE, C.C., SURMAN, S.B., 1998, Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides, *International Biodeterioration Biodegradation*, 41, 247–259.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3), 695-700.

MUYZER, G., TESKE, A., WIRSEN, C.O., JANNASCH, H.W., 1995, Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments, *Archives of Microbiology*, 164, 165-172.

MUYZER, G., BRINKHOFF, T., NÜBEL, U., SANTEGOEDS, C., SCHÄFER, H., WAWER, C., 1998, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In *Molecular microbial ecology manual*. Akkermans, A.D.L., Elsas, J.D.v., and Bruijn, F.J.d. (eds), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-27.

MUYZER, G., STAMS, A.J.M., 2008, The Ecology and Biotechnology of Sulphate-reducing Bacteria, *Nature Reviews*, 6, 441-454.

O'FLAHERTY, V., MAHONY, T., O'KENNEDY, R., COLLERAN, E., 1998, Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria, *Process Biochemistry*, 33(5), 555-569.

PACE, J.L., RUPP, M.E., FINCH, R.G., 2006, *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*, CRC Press, USA, 0-8247-2643-X.

PADILLA-VIVEROS, A., GARCIA-OCHOA, E., ALAZARD, D., 2005, Comparative electrochemical noise study of the corrosion process of carbon steel by the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio alaskensis* under nutritionally rich and oligotrophic culture conditions, *Electrochimica Acta*, 51, 3841-3847.

PAPAPETROPOULOU, M., 1997, Anaerobes in water, *Anaerobe*, 3, 111-115.

POPE, D.H., ZINTEL, T.P., KURUVILLA, A.K. VE SIEBERT, O.W., 1988, Organic acid corrosion of carbon steel: A mechanism of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion '88*, National Association of Corrosion Engineers, St. Louis, March 21-25, Paper no. 79.

POSTGATE, J.R., 1984, *The sulphate reducing bacteria*, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 0521257913.

POWER, M.E., ARAUJO, J.C., VAN DER MEER, J.R., HARMS, H., WANNER, O., 1999, Monitoring sulfate-reducing bacteria in heterotrophic biofilms, *Water Science and Technology*, 39, 49-56.

POWER, M.E., VAN DER MEER, J.R., HARMS, H., WANNER, O., 2001, Colonization of aerobic biofilms by sulfate-reducing bacteria, *Biofouling*, 17, 275-288.

PRAZMOWSKI, A., Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung, einiger Bakterien-Arten. Inaug. Diss. Hugo Voigt, Leipzig, pp. 1-58.

PUCKORIUS, P.R., 1999, Water corrosion mechanisms, *Ashrae Journal*, 41 (5), 57-61.

RAMAMOORTHY, S., SASS, H., LANGNER, H., SCHUMANN, P., KROPPESTEDT, R. M., SPRING, S., OVERMANN, J., ROSENZWEIG, R. F., 2006, *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments, *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 2729–2736.

RAO, T.S., GEORGE, R.P., VENUGOPALAN, V.P., NAIR, K.V.K., 1997, Biofilm formation in a freshwater reservoir under experimental photic and aphotic conditions, *Biofouling*, 11, 252-285.

RAO, T.S., NAIR, K.V.K., 1998, Microbiologically influenced stress corrosion cracking failure of admiralty brass condenser tubes in a nuclear power plant cooled by freshwater, *Corrosion Science*, 40 (11), 1821-1836.

RAO, T.S., SATPATHY, K.K., 1999, *Studies on pitting of stainless steel (SS-304) by a marine strain of sulphate reducing bacteria (Desulfovibrio sp.)*, in: C.A.C. Sequeira (Ed.), Proceedings of 4th European Federal Workshop on Microbial Corrosion, The Institute of Metals, London, UK, pp. 79–84.

RAO, T.S., SAIRAM, T.N., VISWANATHAN, B., NAIR, K.V.K., 2000, Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system, *Corrosion Science*, 42 (8), 1417-1431.

RAO, T.S., KORA, A.J., ANUPKUMAR, B., NARASIMHAN, S.V., FESER, R., 2005, Pitting corrosion of titanium by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio vulgaris*), *Corrosion Science*, 47, 1071-1084.

SALLAM, A., STEINBUCHER, A., 2009, *Clostridium sulfidigenes* sp. nov., a mesophilic, proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from pond sediment, *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, 1661-1665.

SASS, H., OVERMANN, J., RÜTTERS, H., BABENZIEN, H.-D., CYPIONKA, H., 2004, *Desulfosporomusa polytropa* gen. nov. sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium from sediments of an oligotrophic lake, *Arch. Microbiol.*, 182, 204–211.

SATPATHY, K.K., 1999, Effects of biofouling on the cooling water quality of a nuclear power plant. *Bull. Electrochem.*, 15, 143–147.

SCHÄFER, H., MUYZER, G., 2001, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology*, In: John Paul (Ed), *Methods in Microbiology*, volume 30, Academic Press, London, pp. 425-468.

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, 2159–2176

SORACCO, R.J., POPE, D.H. EGGERS, J.M., EFFINGER, T.N., 1988, Microbiologically influenced corrosion investigations in electric power generating stations, *Proc. NACE Corrosion 88*, NACE, Houston, TX, Paper 83.

SPRING, S., ROSENZWEIG, R.F., 2006, The genera *Desulfitobacterium* and *Desulfosporosinus*: taxonomy. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, (ed) M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt, 3rd edn, vol. 4, pp. 771–786, New York, Springer.

STACKEBRANDT, E., SPROER, C., RAINEY, F.A., BURGHARDT, J., PAUKER, O., HIPPE, H., 1997, Phylogenetic Analysis of the Genus *Desulfotomaculum*: Evidence for the Misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and Description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb.nov., *Int. J. of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1134-1139.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W., 2002, Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209.

SUTHERLAND, I.W., 1985, Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides, *Annual Review of Microbiology*, 10, 243-270.

SUTHERLAND, I.W., 2001, The biofilm matrix – an immobilised but dynamic microbial environment, *Trends in Microbiology*, 9 (5), 222-227.

TARDY-JACQUENOD, C., CAUMETTE, P., 1996, Characterization of sulfate reducing bacteria isolated from oil field waters, *Canadian Journal of Microbiology*, 42 (3), 259-266.

TATNALL, R.E., 1981, Fundamentals of bacteria induced corrosion. *Materials Performance*, 20, 32-38.

THIERRY, D., SAND, W., 2002, *Microbially Influenced Corrosion*, In: Marcus P., Oudar J. (ed.), *Corrosion Mechanism in Theory and Practice*, 2nd (ed), Marcel Dekker Inc., New York, 0-8247-0666-8, pp.563-605.

TILLER, A.K., BOOTH, G.H., 1968, Anaerobic corrosion of aluminum by sulphate-reducing bacteria, *Corros Sci*, 8, 549–555.

VIDELA, H.A., 1996, *Manual of Biocorrosion*, CRC Press, UK, 0873717260.

VON WOLZOGEN KÜHR, C.A.H., VAN DER VLUGT, L.S., 1934, The graphitization of cast iron as an electrochemical process in anaerobic soils, *Water*, 18, 147-165.

WIDDEL, F., PFENNIG, N., 1984, *Dissimilatory sulfate- and sulfur- reducing bacteria*. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, pp. 663-679, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 0-683-04108-8.

WILLIS, C.L., GIBSON, G.R., HOLT, J., ALLISON, C., 1999, Negative correlation between oral malodour and numbers and activities of sulphate-reducing bacteria in the human mouth, *Archives of Oral Biology*, 44, 665-670.

ZHANG, X.G., 1996, *Corrosion and Electrochemistry of Zinc*, Plenum Press, New York, 0306453347.

ZHANG, X., BISHOP, P.L., KINKLE, B.K., 1999, Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms, *Water Science and Technology*, 39 (7), 211-218.

ZHANG, T., FANG, H.H.P., 2001, Phylogenetic diversity of SRB-rich marine biofilm, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 57, 437–440.

ZHANG, X., BISHOP, P.L., 2003, Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, 50, 63–69.

ZUO, R., WOOD, T.K., 2004, Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria using gramicidin-S-producing biofilms, *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, 747–753.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Gazi Mağusa, Kıbrıs'ta doğdum. İlköğrenimimi Şehit Mustafa Kurtuluş İlkokulu'nda 1995 yılında, ortaöğrenimimi Canbulat Ortaokulu'nda 1998 yılında ve lise öğrenimimi Namık Kemal Lisesi'nde 2001 yılında tamamladım. Aynı yıl Gazi Üniveristesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne kayıt oldum. Lise ve üniversite yıllarında, tiyatro gruplarına üye olarak, 'Rumuz Goncagül', 'Yedi Kocalı Hürmüz', 'Hastalık Hastası' isimli oyunlarda başrol oyuncusu olarak görev aldım. 2005 yılında Lisans öğrenimimi tamamlayarak aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Yüksek Lisans Programı'na kayıt oldum. Yüksek lisans eğitimim süresince 16. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (ECCMID) ve 19. Ulusal Biyoloji Kongresi'ne katıldım. 1 Eylül 2008 ile 4 Haziran 2009 tarihleri arasında Erasmus Öğrenci Değişim Programı kapsamında, Hollanda Delft Teknoloji Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü'nde, Doç. Dr. Gerard Muyzer önderliğinde tezim dahilindeki moleküler analizleri gerçekleştirdim. Bu çalışmanın yanısıra, 'Microbiologically Induced Corrosion of Steel Corrosion Structures in Port Environment' adlı bir Avrupa Birliği projesinde yardımcı araştırmacı olarak çalıştım. 29 Ekim 2008'de Delft Teknoloji Üniversitesi'nde gerçekleştirilen 4. DRC-LST/BSDL Sempozyumu'na ve 9 Nisan 2009'da Radboud Üniversitesi'nde düzenlenen 'Discovery of Impossible Microbes with Global Implications in the Biogeochemical Cycles of Nitrogen and Methane' isimli sempozyuma katıldım.