



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



DOKTORA TEZİ

**UÇAK YAKIT DEPOLARINDA MİKROBİYOLOJİK
KOROZYONDAN SORUMLU BAKTERİ TÜRLERİNİN ve
KOROZİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Simge ARKAN ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Esra SUNGUR**

**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurhan CANSEVER**

Haziran, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 10.06.2024 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi

Prof. Dr. Mehmet Ali Faruk
ÖKSÜZÖMER
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. Miray ONAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33978 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 121Z604 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Arkan-Ozdemir, S., Tüccar, T., Cansever, N. and Ilhan-Sungur, E., 2022, Microbiologically Induced Corrosion of Aluminum Alloy by Manganese Oxidizing Bacterium, European Corrosion Congress-EUROCORR’2022, 28 August-01 September, Berlin, Germany

ÖNSÖZ

Tüm akademik kazanımlarımın baş mimarı olan ve tez çalışmalarım boyunca bana yeni bakış açıları kazandırarak ufkumu genişleten, tezimin tamamlanma sürecinde ise teşvikleri ile bana olan güvenini her zaman hissettiren, değerli fikirleri ve desteği ile yol gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. Esra SUNGUR'a,

Tez çalışmalarım süresince engin tecrübesi ve bilgisi ile bana destek olan Sayın Prof. Dr. Nurhan CANSEVER'e,

Tez çalışmamın çeşitli aşamalarında bilgi ve deneysel tecrübesiyle katkı sağlayan ve ihtiyaç duyduğum anlarda yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Miray ONAN'a,

Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular ile korozyon mekanizmasının yorumlanması sırasında değerli katkıları olan Prof. Dr. Mustafa ÜRGEN'e,

Tez çalışmam için gerekli olan uçak yakıt örneğinin teminini sağlayan Onur Air Taşımacılık A.Ş.'ye ve teknik destekleri için Sayın Cem SOYLU ve Sayın Şükrü CAN'a,

Tez çalışmam için gerekli olan uçak yakıt tankı malzemesi olan alüminyum alaşımının temini konusunda destek sağlayan Kale Havacılık Sanayi A.Ş.'ye ve Sayın Mutluhan ERÖZ'e,

Tez çalışmam için gerekli bazı deneysel hazırlıklarda destek olan ekip arkadaşım Yazgan UĞUR, çeşitli aşamalarda desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Dr. İrem Cemre TÜRÜ, Uzman Biyolog Yasemin ÜNLÜ YOKUŞ ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tüm mücadelelerimde, hayatımın dönüm noktalarında ve sevinçlerimde en büyük destekçim olan canım annem Emine ARKAN, babam ve biricik ağabeyim başta olmak üzere, anlayışlı, düşünceli ve hassas davranışları ile hayattaki şansım olarak gördüğüm kocaman aileme ve, dinleyen, anlayan, sevgi dolu eşim Batur Alp ÖZDEMİR'e, yorulduğumu hissettiğim her anımda benimle oldukları için

en içten dileklerle teşekkür ederim.

En büyük teşekkürü ise hamileliğimde deney yaparken her şeyden habersiz bana eşlik eden ve sonrasındaki tüm süreçlerde beni hiç yormayarak, varlığı ve gülümsemesiyle her anı daha anlamlı hale getiren biricik kızım Dora ÖZDEMİR'e ederim. Dilerim ki, bilimin ve aklın değerini bilen bir birey olarak yetişirsin ve merakının peşinden giderken, bilgiyi kendine ışık seçerek ömrün boyunca apaydınlık bir yolda yürürsün.

Tez çalışması, 121Z604 numaralı 1002 projesi kapsamında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

Haziran 2024

Simge ARKAN ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ.....	xv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xvii
ÖZET	xviii
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. UÇAK YAKIT DEPOLARI VE MİKROORGANİZMALAR	4
2.1.1. Uçak Yakıt Depoları	4
2.2.1.1. Yakıt Deposu Malzemesi Olarak 7175-T7351 Alüminyum Alaşımı.....	5
2.1.2. Uçak Yakıtları ve Jet A-1 Yakıtı	7
2.1.3. Uçak Yakıt Depolarında Bulunan Mikroorganizmalar	8
2.2. BAKTERİYEL TAKSONOMİDE POLİFAZİK YAKLAŞIM.....	10
2.2.1. Genotipik Yöntemler	11
2.2.1.1. DNA Baz Oranları (%mol G+C)	11
2.2.1.2. rRNA Gen Dizilimi.....	11
2.2.1.3. DNA-DNA Hibridizasyonu	12
2.2.1.4. Tüm Genom Analizi	12
2.2.1.5. Ortalama Nükleotid Benzerliği (ANI).....	14
2.2.1.6. Genom-Genom Arası Mesafe Hesaplayıcı.....	14
2.2.2. Fenotipik Yöntemler	15
2.2.2.1 Hücre Duvarı Bileşimi	16
2.2.2.2. Hücresel Yağ Asitleri	16
2.2.2.3. İzoprenoid Kinonlar.....	16
2.2.2.4. Poliaminler	17
2.3. UÇAK YAKIT DEPOLARINDA MİKROORGANİZMA KAYNAKLI PROBLEMLER.....	17
2.3.1. Biyofilm.....	18

2.3.1.1. Biyofilmin Oluşum Aşamaları.....	19
2.3.1.2. Biyofilm Oluşumunun Sonuçları	21
2.3.2. Korozyon	22
2.3.2.1. Abiyotik Koşullarda Elektrokimyasal Korozyon	22
2.3.2.2. Biyotik Korozyon	24
2.4. MİKROBİYOLOJİK OLARAK DESTEKLENEN KOROZYON (MIC).....	24
2.4.1. MIC Mekanizmaları	25
2.4.1.1. Hücre Dışı Elektron Transferi ile MIC (EET-MIC)	25
2.4.1.2. Metabolit-MIC (M-MIC)	27
2.4.1.3. Biyodegradasyon-MIC (BD-MIC)	27
2.4.1.4. Oksijen Varlığındaki Mekanizmalar	27
2.4.2. Uçak Alüminyum Alaşımları İçin Önerilen MIC Mekanizmaları	29
2.4.2.1. Oksijen Konsantrasyon Hücresi	29
2.4.2.2. Organik Asitler	29
2.4.2.3. Enzimatik Aktivite	29
2.4.3. MIC'den Sorumlu Mikrobiyal Gruplar	30
2.4.3.1. Sülfat İndirgeyen Bakteriler (SRB'ler)	30
2.4.3.2. Nitrat İndirgeyen Bakteriler (NRB'ler)	32
2.4.3.3. Demir Okside Eden Bakteriler (IOB'ler).....	32
2.4.3.4. Mangan Okside Eden Bakteriler (MOB'ler)	33
2.4.3.5. Asit ve Ekzopolimer Üreten Bakteriler	33
2.4.3.6. Funguslar.....	34
2.4.3.7. Algler	34
2.5. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLER (MOB'LER) VE MIC İLİŞKİSİ.....	34
2.5.1. Mangan ve Oksidasyonu	34
2.5.2. MOB'lerin İzolasyonu ve Mangan Oksit Varlığının Tespiti.....	36
2.5.3. MOB Korozyon Mekanizması	36
2.6. MIC'İN DEĞERLENDİRİLMESİ	38
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	43
3.1. JET A-1 YAKIT ÖRNEĞİNİN ALINMASI VE BAZI FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ	43
3.1.1. Uçak Yakıt Tanklarından Yakıt Örneğinin Temini.....	43
3.1.2. Jet A-1 Yakıtının Bazı Fizikokimyasal Parametrelerinin Belirlenmesi	43

3.2. JET A-1 YAKIT ÖRNEĞİNDEN AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MANGAN OKSİTLEME YETENEKLERİNİN TESPİTİ	43
3.2.1. Yakıt Örneğinden Aerobik Heterotrofik Bakterilerin (AHB'lerin) İzolasyonu	43
3.2.2. Mangan Okside Eden AHB'lerin Tespiti	44
3.2.2.1. MOB'lere Spesifik Besiyerlerine Ekim	44
3.2.2.2. LBB Testi	44
3.3. EN AKTİF MOB İZOLATININ BELİRLENMESİ	45
3.3.1. Mn Broth ve LBB Besiyerlerinin Hazırlanması	45
3.3.2. MOB İzolatlarının Büyüme Eğrilerinin Eldesi	46
3.3.3. MOB İzolatlarının Mn Oksitleme Aktivitelerinin Tespiti	46
3.4. MOB İZOLATININ POLİFAZİK TAKSONOMİK YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK TANIMLANMASI	47
3.4.1. Klasik Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi	47
3.4.1.1. Hücre ve Koloni Morfolojileri, Spor Oluşturma Özellikleri ve Hareketlilik	47
3.4.1.2. Sıcaklık Toleransının Belirlenmesi	48
3.4.1.3. pH Toleransının Belirlenmesi	48
3.4.1.4. Tuz Toleransının Belirlenmesi	49
3.4.1.5. Biyokimyasal Testler	49
3.4.2. Genotipik Özelliklerinin Belirlenmesi	51
3.4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu	51
3.4.2.2. 16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması	51
3.4.2.3. Dizi Analizi	52
3.4.2.4. Tüm Genom ve Tam 16S Dizilimine Dayalı Genom Özelliklerinin ve Filogeninin Belirlenmesi	53
3.4.3. Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi	53
3.4.3.1. Toplam Hücresel Yağ Asidi Analizi	53
3.4.3.2. Poliamin Analizi	54
3.4.3.3. Kinon Analizi	54
3.4.3.4. Polar Lipid Analizi	54
3.4.3.5. Tüm-Hücre Şekerlerinin ve Diaminopimelik Asit Enantiyomerlerinin Analizleri	54
3.5. MIC ÇALIŞMALARI İÇİN BESİYERİ VE İÇERİĞİNDEKİ MANGAN KONSANTRASYONUN SEÇİMİ	55

3.5.1. Seçilen MOB İzolatının Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Büyüme Eğrilerinin Eldesi	55
3.5.2. Seçilen MOB İzolatının Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Mn Oksitleme Aktivitelerinin Tespiti.....	55
3.6. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 1 G/L.....	55
3.6.1. 7175-T7351 Alüminyum Kuponlar	56
3.6.2. Deney Düzenegi 1'in Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler	58
3.6.2.1. Bakteri Sayısının Tespiti ve Üreme Eğrisinin Belirlenmesi	60
3.6.2.2. EPS Eldesi	60
3.6.2.3. MnO_x Miktarının Tespiti	62
3.6.2.4. Mn^{+2} , Cl^- ve pH Parametrelerinin Tespiti	62
3.6.2.5. Korozyon Hızı Hesabı.....	63
3.6.2.6. Al Analizi	63
3.6.3. Kontrol Düzenegi 1'in Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler	63
3.6.3.1. MnO_x Miktarının Tespiti	64
3.6.3.2. Mn^{+2} , Cl^- ve pH Parametrelerinin Tespiti	64
3.6.3.3. Korozyon Hızı Hesabı.....	64
3.6.3.4. Al Analizi	65
3.7. MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU (MİK) DENEYLERİ	65
3.7.1. Al ile MİK Deneyleri.....	65
3.7.2. Mn ve Al ile MİK Deneyleri	65
3.8. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 0.5 G/L.....	66
3.8.1. Deney Düzenegi 2'nin Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler	67
3.8.1.1. Bakteri Sayısının Tespiti ve Üreme Eğrisinin Belirlenmesi	67
3.8.1.2. EPS Eldesi ve İçeriğindeki Toplam Karbonhidrat Miktarının Tespiti	67
3.8.1.3. MnO_x Miktarının Tespiti	67
3.8.1.4. Mn^{+2} , Cl^- ve pH Parametrelerinin Tespiti	67
3.8.1.5. Korozyon Hızı Hesabı.....	67
3.8.1.6. SEM ve EDS Analizleri	68
3.8.1.7. XPS Analizi	68
3.8.2. Kontrol Düzenegi 2'nin Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler	68
3.8.2.1. MnO_x Miktarının Tespiti	69
3.8.2.2. Mn^{+2} , Cl^- ve pH Parametrelerinin Tespiti	69
3.8.2.3. Korozyon Hızı Hesabı.....	69

3.8.2.4. SEM ve EDS Analizleri	69
3.8.2.5. XPS Analizi	69
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	69
3.10. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER	70
3.10.1. R2A Besiyeri	70
3.10.2. MnA Besiyeri	70
3.10.3. LBB Besiyeri	70
3.10.4. MnOB Besiyeri.....	71
3.10.5. 10N Ayarlı NaOH Çözeltisi	71
4. BULGULAR.....	72
4.1. JET A-1 YAKIT ÖRNEĞİNİN FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELERİ	72
4.2. MANGAN OKSİDE EDEN AHB'LER	72
4.3. EN AKTİF MOB İZOLATI.....	74
4.3.1. MOB İzolatlarının Büyüme Eğrileri.....	74
4.3.2. MOB İzolatlarının Mn Oksitleme Aktiviteleri	78
4.4. SEÇİLEN MOB İZOLATININ TANIMLANMASI	79
4.4.1. Fenotipik Özellikleri.....	79
4.4.2. Genotipik Özellikleri	86
4.4.2.1. Kısmi 16S rRNA Gen Dizileri ile Tanımlama.....	86
4.4.2.2. Bütün 16S rRNA Gen Dizisine ve Tüm Genom Dizilimine Dayalı Filogeni ve Genom Özellikleri	91
4.4.3. Kemotaksonomik Özellikleri.....	94
4.4.3.1. Yağ Asidi Bileşimi.....	94
4.4.3.2. Poliamin İçeriği	94
4.4.3.3. Kinon İçeriği	95
4.4.3.4. Polar Lipid İçeriği	95
4.4.3.5. Tüm-Hücre Şeker ve Diaminopimelik Asit Enantiyomer İçeriği	95
4.5. MIC ÇALIŞMALARI İÇİN UYGUN BESİYERİ VE İÇERİĞİNDEKİ MANGAN KONSANTRASYONU.....	96
4.5.1. JETA1-E2 Suşunun Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Büyüme Eğrileri.....	96
4.5.2. JETA1-E2 Suşunun Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Mn Oksitleme Aktiviteleri	99
4.6. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 1 G/L.....	102

4.6.1. Bakteriyolojik Analiz	102
4.6.2. Biyofilmdeki Toplam Karbonhidrat Miktarı	103
4.6.3. MnO _x Miktarı	103
4.6.4. Mn ⁺² , Cl ⁻ ve pH Parametreleri	104
4.6.5. Korozyon Verileri.....	107
4.6.6. Al Analizi	108
4.7. MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU	109
4.8. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 0.5 G/L.....	110
4.8.1. Bakteriyolojik Analiz	110
4.8.2. Biyofilmdeki Toplam Karbonhidrat Miktarı	112
4.8.3. MnO _x Miktarı	113
4.8.4. Mn ⁺² , Cl ⁻ ve pH Parametreleri	114
4.8.5. Korozyon Verileri.....	117
4.8.6. EDS Analiz Sonuçları.....	121
4.8.7. XPS Analiz Sonuçları.....	124
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	130
KAYNAKLAR.....	146
EKLER	174
ÖZGEÇMİŞ	175

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Tipik bir ticari uçak yakıt deposu düzeni (Langton ve diğ., 2009).....	5
Şekil 2.2: Biyofilm matrisinin şematik gösterimi; Katı bir yüzeye tutunmuş bakteriyel biyofilm modeli (a), EPS matrisinin bileşimi ve ana bileşenlerinin işlevleri (b) (Flemming ve Wingender (2010) ve Pinto ve diğ. (2020) literatürlerinden düzenlenmiştir).	19
Şekil 2.3: Biyofilm oluşum aşamaları; İlk bağlanma ve geri dönüşümlü tutunma (1), geri dönüşümsüz tutunma (2), mikro kolonilerin oluşumu (3), biyofilmin olgunlaşması (4), dağılma (5) (Sauer ve diğ., 2022).	20
Şekil 2.4: Doğrudan ve dolaylı elektron transferi (Li ve diğ., 2018).	26
Şekil 2.5: <i>P.aeruginosa</i> biyofilminin oksijen konsantrasyon hücresi oluşturma mekanizması yoluyla neden olduğu çukurlaşma korozyonunun şematik gösterimi (Jia ve diğ., 2019).	28
Şekil 2.6: Manganın doğadaki oksidasyon hallerinin döngüsü (Tebo ve diğ., 2004).	35
Şekil 2.7: Mn döngüsünün metal yüzeyinde şematik gösterimi (Olesen ve diğ., 2000).	37
Şekil 3.1: LBB testi uygulanan standart KMnO ₄ konsantrasyonlarından hazırlanmış standart eğri ve denklemi.	47
Şekil 3.2: 1 Kb DNA Extension Ladder markırına (Invitrogen) ait jel görüntüsü ve bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA büyüklükleri (ng).	51
Şekil 3.3: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) moleküler markırın jel resmi ve bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA miktarları ve büyüklükleri.	52
Şekil 3.4: 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun görüntüsü; (a) makroskobik, (b) işlem görmemiş, (c) dağlanmış.	57
Şekil 3.5: Deney düzeneği; (a) deney ortamını içeren beher, kupon taşıyıcı ve taşıyıcıya asılmış alüminyum kuponlar. (b) İşletilmesi esnasında üzeri steril alüminyum folyo ile kapatılmış deney düzeneği.	58
Şekil 3.6: Fenol sülfürik asit yöntemi ile standart glukoz konsantrasyonlarından hazırlanmış standart eğri ve denklemi.	62
Şekil 4.1: MOB'lerin LBB (a ve d), MnA (b ve e) ve MnOB (c ve f) besiyerlerindeki üreme görüntüleri.	73
Şekil 4.2: Filtre kağıdı yöntemi ile LBB test sonuçları.	74

Şekil 4.3: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün, Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri (OD ₆₀₀). (a) Mn içermeyen, (b) Mn içeren. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	75
Şekil 4.4: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün Mn içermeyen Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri (ln OD ₆₀₀). (a) 90 günlük tüm deney süresince, (a') deneyin ilk 7 günü. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	76
Şekil 4.5: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün Mn içeren Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri (ln OD ₆₀₀). (a) 90 günlük tüm deney süresince, (a') deneyin ilk 7 günü. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	77
Şekil 4.6: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün, Mn Broth ve LBB besiyerindeki Mn oksitleme aktiviteleri (OD ₆₂₀). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	78
Şekil 4.7: JETA1-E2 suşunun R2A besiyerindeki koloni morfolojisi.	79
Şekil 4.8: JETA1-E2 suşunun mikroskopik özellikleri; Faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (a ve b), SEM görüntüsü (c), Gram boyalı preparatın ışık mikroskobu görüntüsü (d ve e), Spor boyalı preparatın ışık mikroskobu görüntüsü (f).	80
Şekil 4.9: Farklı sıcaklık değerlerinin (4, 20, 30, 37 ve 42°C) JETA1-E2 suşunun büyümesine etkisi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	85
Şekil 4.10: Farklı pH değerlerinin (4, 5, 6, 7, 8 ve 9) JETA1-E2 suşunun büyümesine etkisi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	85
Şekil 4.11: Farklı tuz konsantrasyonlarının (%0, %1, %2, %4, %6, %8, %10 ve %12) JETA1-E2 suşunun büyümesine etkisi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	86
Şekil 4.12: JETA1-E2 suşunun ait gDNA'ların jel görüntüsü (N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, M: Markır).	87
Şekil 4.13: JETA1-E2 suşunun ait PZR ürünlerinin jel görüntüsü (M: Markır, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol).	87
Şekil 4.14: JETA1-E2 suşu ve yakın ilişkili türlerin 16S rRNA gen dizisine dayalı TYGS filogenetik ağacı (Bu grafik ile ilişkili NCBI gen bankası erişim numaraları Tablo 4.5'te verilmiştir).	92
Şekil 4.15: JETA1-E2 suşu ve yakın ilişkili türlerin tüm genom dizisine dayalı TYGS filogenetik ağacı (Bu grafik ile ilişkili NCBI gen bankası erişim numaraları Tablo 4.5'te verilmiştir).	93
Şekil 4.16: JETA1-E2 suşunun polar lipid profili (1, TLC'nin birinci boyutu; 2, TLC'nin ikinci boyutu).	95
Şekil 4.17: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) büyüme eğrileri (OD ₆₀₀); (a) Mn Broth besiyerinde, (b) LBB besiyerinde. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	96

Şekil 4.18: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarına (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) sahip Mn Broth besiyerindeki büyüme eğrileri (ln OD ₆₀₀). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	98
Şekil 4.19: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarına (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) sahip LBB besiyerindeki büyüme eğrileri (ln OD ₆₀₀). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	99
Şekil 4.20: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarına (0.5, 1, 2 ve 3 g/l) sahip besiyerlerinde oluşturduğu MnO _x miktarlarının zamana bağlı değişimi; (a) Mn Broth besiyerinde, (b) LBB besiyerinde. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	100
Şekil 4.21: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğine maruz kalan kuponların yüzeyinde oluşan biyofilmdeki karbonhidrat miktarlarının değişimi.	103
Şekil 4.22: 1 g/l Mn içeren deney ve kontrol düzeneklerindeki MnO _x miktarlarının zamana bağlı değişimi (OD ₆₂₀). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	104
Şekil 4.23: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki Mn ⁺² konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	105
Şekil 4.24: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki pH değerlerinin zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	107
Şekil 4.25: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğinden 80. günde çıkartılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun görüntüleri. (a) tüberkülün makro görüntüsü, (b) tüberkül kaldırılmış kuponun makro görüntüsü, (c) SEM görüntüsü.	111
Şekil 4.26: 0.5 g/l Mn içeren deney düzeneğindeki JETA1-E2 suşunun planktonik ve sesil bakteri sayılarının zamana bağlı değişimi (y eksenindeki değerler logaritmiktir). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	112
Şekil 4.27: 0.5 g/l Mn içeren deney düzeneğine maruz kalan kuponların yüzeyinde oluşan biyofilmdeki toplam karbonhidrat miktarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	113
Şekil 4.28: 0.5 g/l final Mn içeren deney ve kontrol düzeneklerindeki MnO _x miktarlarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	114
Şekil 4.29: 0.5 g/l Mn içeren deney ve kontrol ortamlarındaki Mn ⁺² konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	115
Şekil 4.30: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol ortamlarına ait pH değerlerinin zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.	117

Şekil 4.31: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kaybı verilerinin zamana bağlı değişimi.....	118
Şekil 4.32: .5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların korozyon hızlarının ve korozyon hızı oranlarının zamana bağlı değişimi	119
Şekil 4.33: Deney düzeneğinden 80. günde çıkarılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun SEM görüntüsü; temizlenmemiş kupon yüzeyi (a), tüberkül altındaki oyuk (b ve c).....	120
Şekil 4.34: Deney düzeneğinden (a, b) ve kontrol düzeneğinden (c) 80. günde çıkarılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların temizlenmiş yüzeylerinin SEM görüntüleri.	121
Şekil 4.35: Deney düzeneğindeki 7175-T7351 alüminyum alaşımı kuponlarda 80. günün sonunda oluşan tüberkülün EDS analiz sonuçları (%ağırlık); tüberkülün içi (a), tüberkülün dışı (b).	122
Şekil 4.36: Deney düzeneğindeki 7175-T7351 alüminyum alaşımı kuponlarda 80. günün sonunda oluşan tüberkülün altındaki oyuktan gerçekleştirilen EDS analiz sonuçları (%ağırlık).	123
Şekil 4.37: Kontrol düzeneğinden 80. günde çıkarılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun SEM görüntüleri (a ve b) ve EDS analiz sonuçları (%ağırlık) (c).	124
Şekil 4.38: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğinde 80 gün boyunca bakteri kültürüne maruz bırakılan kupondan yapılan XPS analizlerine ait spektrumlar; a) yüzeyden, b) oyuklanmanın olduğu alandan, c) tüberkülden.	125
Şekil 4.39: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu kontrol düzeneğinde 80 gün boyunca steril Mn Croth besiyerine maruz bırakılan kuponun yüzeyinden yapılan XPS analizlerine ait spektrumlar.	126
Şekil 4.40: JETA1-E2 suşunun süreç üzerindeki etkisi; (a) tutunma ve biyofilm oluşturma, (b ve c) deney kuponu korozyon ürünleri, (d ve e) kontrol kuponu korozyon ürünleri.	127

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Alüminyum alaşımları ve ısıt işlemler uygulamaları.	6
Tablo 2.2: Farklı havacılık yakıtlarından izole edilen bakterilerden, jet A-1 ve jet A yakıtlarında bulunanlar.	9
Tablo 3.1: Polimeraz zincir reaksiyonu programı.	52
Tablo 3.2: 7175-T7351 alüminyum alaşımının kimyasal bileşimi.	56
Tablo 3.3: MİK deneylerinde kullanılan Al ve Mn konsantrasyonları (g/l).	66
Tablo 4.1: Jet A-1 yakıt örneğinin fizikokimyasal parametreleri.	72
Tablo 4.2: JETA1-E2 suşunun fenotipik özellikleri (“+” pozitif, “-” negatif test sonucunu göstermektedir).	81
Tablo 4.3: Kısmi 16S rRNA gen dizisine göre JETA1-E2 suşunun filogenetik olarak ilişkili olduğu bakteri türleri.	88
Tablo 4.4: JETA1-E2 suşunun, kısmi 16S rRNA gen dizilerine göre yakın akraba olduğu <i>Sphingomonas</i> türlerinin tip suşlarından ayırıcı özellikleri.	89
Tablo 4.5: Filogenetik ağaçlardaki suşların NCBI gen bankasındaki erişim numaraları.	91
Tablo 4.6: JETA1-E2 suşuna ait genel genom özellikleri.	94
Tablo 4.7: JETA1-E2 suşunun hücresel yağ asidi bileşimi (%).	94
Tablo 4.8: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğinde bulunan JETA1-E2 suşunun planktonik ve sesil bakteri sayıları.	102
Tablo 4.9: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol ortamlarındaki Cl ⁻ miktarlarının zamana bağlı değişimi.	106
Tablo 4.10: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızı verileri	107
Tablo 4.11: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki deney ortamları ile düzeneklerdeki kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm ve film tabakalarındaki Al konsantrasyonları.	108
Tablo 4.12: Al ve Mn’nın JETA1-E2 suşu üzerindeki antibakteriyel etkisi (%).	109

Tablo 4.13: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol ortamlarındaki Cl ⁻ miktarlarının zamana bağlı değişimi.	116
Tablo 4.14: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların deney süresince ağırlık kayıpları ve korozyon hızı verileri.	118



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
cm^2	: Santimetreka
g	: Gram
l	: Litre
h/cm^2	: Hücre/santimetreka
h/ml	: Hücre/mililitre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat
sn	: Saniye
ppm	: Milyonda bir
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar	Açıklama
EPS	: Hücre dışı polimerik maddeler
MIC	: Mikrobiyolojik olarak desteklenen korozyon
MOB	: Mangan okside eden bakteriler
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
EDS	: Enerji dağılım spektroskopisi
XPS	: X-ışını fotoelektron spektroskopisi
ICP-MS	: İndüktif olarak eşleşmiş plazma- kütle spektrometresi
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu

ÖZET

DOKTORA TEZİ

UÇAK YAKIT DEPOLARINDA MİKROBİYOLOJİK KOROZYONDAN SORUMLU BAKTERİ TÜRLERİNİN VE KOROZİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Simge ARKAN ÖZDEMİR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Esra SUNGUR

II. Danışman: Prof. Dr. Nurhan CANSEVER

Uçak yakıtları, rafineri sürecinde steril olmalarına rağmen, hava ve su yoluyla ya da yakıt sistemleri ile temas sonrasında mikroorganizmalar ile kontamine olabilmektedirler. Yakıttaki mikrobiyal komünitenin baskın üyeleri, askeri ve sivil uçaklarda kullanılan farklı yakıt tiplerinin bileşimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yolcu uçaklarında en sık tercih edilen Jet A-1, uçak yakıt tanklarındaki mikroorganizmalar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılan kerosen tip bir yakıt çeşitidir. Yakıttaki hidrokarbonu aerobik olarak indirgeyebilme ve bir enerji kaynağı olarak kullanabilme yeteneğinde olan bakteriler, su, azot kaynağı ve mineral gibi ihtiyaçlarını da yakıt tanklarının tabanında yoğunlaşarak biriken sudan sağlayarak, yakıtta ve yakıtla temasta bulunan tank yüzeylerinde kontrolsüz olarak çoğalarak biyofilm tabakası oluşturabilmektedir. Bu biyofilm, yakıt tankında mikrobiyolojik olarak indüklenen korozyona (MIC) yol açabilecek mikroorganizmalara habitat sağlayarak, yüksek bakım maliyetlerine ve ciddi güvenlik sorunlarına neden olabilmektedir.

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda, uçak yakıtlarının kontaminasyonundan sorumlu olduğu rapor edilen bazı bakterilerin, farklı çalışmalarda manganı (Mn'yi) okside ederek enerji elde etme yeteneğine sahip oldukları rapor edilmiştir. Bununla birlikte, jet A-1 yakıtından izole edilen bakterilerin Mn oksitleme yeteneklerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Mangan okside eden bakteriler (MOB'ler), çözünebilir Mn iyonlarını (Mn^{+2}) biyotik olarak oksitleyerek metal yüzeyinde katı Mn oksitler (MnO_x 'ler) meydana

getirmektedirler. MnO_x 'ler ile metal yüzey arasında oluşan galvanik çiftin yarattığı elektrokimyasal etkiler metalin korozyonuna neden olmaktadır. MnO_x birikintileri ayrıca, diferansiyel havalandırma hücrelerinin oluşumuna neden olarak, MIC'den sorumlu anaeroplara çoğalmasını da desteklemektedir. Bu nedenle, uçak yakıt tanklarındaki MIC'in azaltılabilmesi/engellenebilmesi açısından, yakıttan izole edilen ve aktif olarak Mn okside etme yeteneğindeki MOB'lerin ve bunların uçak yakıt deposu malzemesi olan alüminyum alaşımına korozyon etkilerinin araştırılması önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında esas olarak, yolcu uçağından alınan jet A-1 tip yakıt örneğinden aktif olarak Mn okside eden bir bakterinin izole edilmesi ve bu bakterinin uçak yakıt tanklarında sıklıkla kullanılan 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine mikrobiyolojik korozyon davranışının araştırılması hedeflenmiştir.

Tez çalışması kapsamında, aktif olarak uçuş gerçekleştiren ve bakım sürecinde olan yolcu uçağından jet A-1 tip yakıt örneği alınmış ve bu örnekten 3 adet MOB izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlardan, MOB'lere spesifik besiyerlerindeki büyümeleri ve Mn oksitleme aktivitelerine göre en aktif olanı seçilmiştir. Seçilen izolatu polifazik taksonomik yaklaşım ile tür düzeyinde tanımlaması yapılmıştır. Klasik taksonomik ve genotipik yöntemlere ek olarak, kemotaksonomik ve ileri genotipik analizler de gerçekleştirilerek, MOB izolatu *Sphingomonadaceae* ailesi içinde yeni bir cins bakteri olduğu tespit edilmiştir. JETA1-E2 olarak kodlanan suşun yeni bir cins ve tür olarak ilanı için validasyon süreci devam etmektedir.

Korozyon deneylerinin öncesinde, farklı Mn konsantrasyonlarında hazırlanan iki farklı besiyerinde JETA1-E2 suşunun en yoğun büyüme ve Mn oksit üretimi gösterdiği besiyeri ve Mn konsantrasyonu araştırılmıştır. 1 g/l final Mn konsantrasyonuna sahip Mn Broth besiyeri JETA1-E2 suşunun büyümesini sınırlandırmayan ve en yüksek Mn oksit üretimini sağlayan besiyeri olarak belirlendiğinden, ilk MIC deneyleri (deney düzeneği 1) bu ortamda, 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponlar ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriyolojik ve gravimetrik analizlerin yanı sıra bazı kimyasal parametrelerin de tespiti ile elde edilen veriler, final Mn konsantrasyonu 1 g/l olan düzenekte alüminyum kuponlar varlığında, JETA1-E2 suşunun çoğalabildiği, Mn oksit üretimi gerçekleştirebildiği ve kuponların korozyonuna yol açabildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, mikrobiyal etkinliğin aynı Mn konsantrasyonundaki kupon içermeyen ortamdakine göre azaldığı belirlenmiştir. Bu durumun alüminyum alaşımlı kuponların korozyonu sonucu deney ortamına katılan Al iyonların, bakteriye inhibitör etki göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülerek, deney düzeneğinde kültür ve biyofilm ile kontrol düzeneğinde besiyeri ve film içeriğindeki Al konsantrasyonları indüktif olarak eşleşmiş plazma- kütle spektrometresi (ICP-MS) analizi ile tespit edilmiştir. Sonuçlardaki Al konsantrasyonları ile ilişkili olarak final konsantrasyonları 0.004 - 4 g/l aralığındaki Al ve final konsantrasyonları 0, 0.5, 1 ve 2 g/l Mn ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) deneyleri gerçekleştirilmiştir. Böylece JETA1-E2 suşunun 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine MIC davranışını araştırmak için 0.5 g/l final Mn konsantrasyonuna sahip Mn Broth besiyerinde MIC deneylerinin (deney düzeneği 2) gerçekleştirilmesinin daha uygun olduğu belirlenmiştir.

0.5 g/l final Mn konsantrasyonu ile JETA1-E2 suşu ve 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponlar varlığında kurulan deney düzeneği 80 gün süresince işletilmiş ve belirli günlerde (6, 13, 25, 40, 60, 75 ve 80. gün) düzenekten çıkarılan kuponlardan bakteriyolojik ve gravimetrik analizler ile MnO_x ve Mn^{+2} tespiti ve kültürden ise bakteriyolojik analiz ve bazı (MnO_x , Mn^{+2} , Cl^- ve pH) fizikokimyasal parametrelerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Son örnekleme gününde sistemden çıkarılan kupondan, biyofilm ve korozyon ürünlerinin tespiti için görüntüleme

(taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılım spektroskopisi (EDS)) ve karakterizasyon (X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS)) analizleri yapılmıştır. Bakteri içermeyen ancak bire bir aynı koşullarda hazırlanan kontrol düzeneği de deney düzeneğine senkronize şekilde işletilmiş ve bu düzenden de aynı analizler gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonucunda JETA1-E2 suşunun 80 gün boyunca aktif olarak çoğaldığı, Mn oksidasyonu yaptığı ve karbonhidrat ürettiği belirlenmiştir. Deney süresince, kültürdeki Mn^{+2} konsantrasyonunun anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir ($p<0.01$). Deney süresince kültürdeki kuponların ağırlık kayıplarının zamanla arttığı saptanmıştır ($p<0.01$) ve deney sonunda JETA1-E2 suşuna maruz kalan 7175-T7351 alüminyum alaşımının kontrol ortamındakinden 2.15 kat daha fazla korozyona uğradığı belirlenmiştir. Deney sonunda gerçekleştirilen makroskobik inceleme ile kupon yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasında kahverengi birikintiler olduğu, yüzeyde tüberkül oluştuğu ve tüberkülün altında oyuk meydana geldiği saptanmıştır. SEM analizleri bakterinin hem kupon yüzeyinde korozyon ürünleri ile birlikte ve dağınık halde hem de tüberkül altındaki oyukta kümeler halinde yoğun bir şekilde bulunduğunu göstermiştir. EDS analizleri oyuk içerisinde yoğun miktarda Cu bulunduğunu göstermiştir. XPS analizleri ise JETA1-E2 suşunun varlığında çeşitli MnO_x 'ler ve alaşımdan çözünen metal iyonları ile oluşan oksitlerin varlığını ortaya koymuştur. MnO_2 , Mn_2O_3 ve Mn_3O_4 bileşikleri sadece bakterili ortamda tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile ilk kez, mangan okside eden bir bakterinin uçak yakıt tank malzemesi olan 7175-T7351 alüminyum alaşımını mikrobiyolojik olarak korozyona uğrattığı rapor edilmiştir. Dahası, mangan okside etme yeteneği tespit edilen bu izolatın *Sphingomonadaceae* ailesi içinde yeni bir cins olduğu polifazik taksonomik yaklaşımla ortaya konmuştur.

Haziran 2024, 199 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mangan okside eden bakteriler (MOB'ler), *Sphingomonadaceae*, Jet A-1 uçak yakıtı, Mikrobiyolojik olarak indüklenen korozyon (MIC), 7175-T7351 alüminyum alaşımı.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF BACTERIAL SPECIES RESPONSIBLE FROM MICROBIOLOGICAL CORROSION IN AIRCRAFT FUEL TANKS AND THEIR CORROSIVE EFFECTS

Simge ARKAN ÖZDEMİR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Esra SUNGUR

Co-Supervisor : Prof. Dr. Nurhan CANSEVER

Aircraft fuels, although sterile during the refining process, can be contaminated with microorganisms through air and water or after contact with fuel systems. The dominant members of the microbial community in fuel vary depending on the composition of the different fuel types used in military and civil aircraft. Jet A-1, most commonly used in passenger aircraft, is a kerosene-type fuel used as a carbon source by microorganisms in aircraft fuel tanks. Bacteria, which are capable of aerobically reducing the hydrocarbon in the fuel and using it as an energy source, can provide their needs such as water, nitrogen source and minerals from the water that condenses and accumulates at the bottom of the fuel tanks and multiply uncontrollably in the fuel and on the tank surfaces in contact with the fuel, forming a biofilm layer. This biofilm provides a habitat for microorganisms that can cause microbiologically induced corrosion (MIC) in the fuel tank, leading to high maintenance costs and serious safety issues.

In research conducted to date, it has been reported that some bacteria reported to be responsible for the contamination of aircraft fuels have the ability to obtain energy by oxidizing manganese (Mn) in different studies. However, there have not been any studies in which the Mn oxidation abilities of bacteria isolated from jet A-1 fuel have been investigated. Manganese oxidizing

bacteria (MOB) form solid Mn oxides on the metal surface by biotically oxidizing soluble Mn ions. The electrochemical effects of the resulting Mn oxides created by the galvanic pair formed between them and the metal surface corrodes the metal to corrosion. Mn oxide deposits also supports the proliferation of anaerobes responsible for MIC by causing the formation of differential aeration cells. Therefore, it is important to investigate MOB isolated from fuel and capable of actively oxidising Mn and their corrosive effects on aluminium alloy, which is the material of aircraft fuel tanks, in order to reduce / prevent MIC in aircraft fuel tanks.

Within the context of the thesis, it was aimed to investigate the microbiological corrosion behaviour of a bacterial isolate, isolated from a jet A-1 type fuel sample taken from a passenger aircraft and capable of actively oxidising Mn, on 7175-T7351 aluminium alloy, which is frequently used in aircraft fuel tanks.

Within the scope of the thesis study, a jet A-1 type fuel sample was taken from a passenger aircraft that was actively flying and under maintenance and 3 MOB isolates were obtained from this sample. Among these isolates, the most active one was selected according to their growth on Mn-specific media and Mn oxidizing activity. The most active isolate was identified to species level by polyphasic taxonomic approach. In addition to classical taxonomic and genotypic methods, chemotaxonomic and advanced genotypic analyses were also performed, and it was determined that the MOB isolate is a new genus of bacteria within the *Sphingomonadaceae* family. The validation process for the declaration of the strain encoded as JETA1-E2 as a new genus and species is ongoing.

Before the corrosion experiments, the medium and the Mn concentration in which the JETA1-E2 strain showed the most intense growth and Mn oxide production were investigated in two different media prepared at different Mn concentrations. Since Mn Broth medium with 1 g/l final Mn concentration was determined as the medium that did not limit the growth of JETA1-E2 strain and provided the highest Mn oxide production, the first MIC experiments (experimental setup 1) were carried out in this medium with 7175-T7351 aluminum alloy coupons. The data obtained by bacteriological and gravimetric analyses as well as the determination of some chemical parameters showed that the JETA1-E2 strain was able to multiply, produce Mn oxide and cause corrosion of the coupons in the presence of aluminium coupons in a setup with a final Mn concentration of 1 g/l. However, it was determined that the microbial activity decreased compared to that in the coupon-free environment of the same Mn concentration. Considering that this may be due to the inhibitory effect of Al ions added to the experimental medium as a result of corrosion of aluminium alloy coupons, Al concentrations in the culture and biofilm in the experimental setup and in the medium and film in the control setup were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analysis. In relation to the Al concentrations in the results, minimum inhibitor concentration (MIC) experiments were performed with Al final concentrations in the range of 0.004 - 4 g/l and final concentrations of 0, 0.5, 1 and 2 g/l Mn. Thus, it was determined that conducting MIC experiments (experimental setup 2) in an Mn Broth medium with a final Mn concentration of 0.5 g/l is more appropriate to investigate the MIC behavior of the JETA1-E2 strain on 7175-T7351 aluminum alloy.

Lab-scale test system with a final Mn concentration of 0.5 g/l was set up in the presence of JETA1-E2 strain and 7175-T7351 aluminium alloy coupons, and was operated for 80 days. Bacteriological and gravimetric analyses as well as determination of MnOx and Mn⁺² were performed from the coupons removed from the test system on certain sampling days (6, 13, 25,

25, 40, 60, 75 and 80 days) and bacteriological analysis and determination of some physicochemical parameters (MnO_x , Mn^{+2} , Cl^- and pH) were performed from the culture. Last sampling day, the coupon removed from test system for detection of biofilm and corrosion products by imaging (scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS)) and characterization (X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)) analyses. The control system, which did not contain bacteria but was prepared under the same conditions, was also operated in a synchronous manner and the same analyses. As a result of the experiments, it was determined that JETA1-E2 strain actively proliferated, oxidized Mn and produced carbohydrates for 80 days. During the experiment, it was found that the Mn^{+2} concentration in the culture decreased significantly ($p < 0.01$). It was determined that the weight loss of the coupons in the culture increased with time during the experiment ($p < 0.01$) and at the end of the experiment, it was determined that the 7175-T7351 aluminium alloy exposed to JETA1-E2 strain corroded 2.15 times more corrosion than in the control environment. With the macroscopic examination performed at the end of the experiment, it was determined that there are brown deposits in the biofilm layer formed on the coupon surface, tubercle is formed on the surface and a cavity is formed under the tubercle. SEM analyses showed that the bacteria were present both on the coupon surface with corrosion products and dispersed, and in the cavity under the tubercle densely and embedded in extracellular polymeric substances (EPS). EDS analyses showed that Mn element was not detected in the cavity, while Cu was detected in large amounts. XPS analyses revealed the presence of various Mn oxides and oxides formed by metal ions dissolved from the alloy in the presence of JETA1-E2 strain.

As a result, with the thesis, it has been reported for the first time that a manganese oxidizing bacterium microbiologically corrodes aluminum alloy 7175-T7351, which is an aircraft fuel tank material. Moreover, the polyphasic taxonomic approach revealed that the manganese oxidizing isolate is a new genus within the *Sphingomonadaceae* family.

June 2024, 199 pages.

Keywords: Manganese oxidizing bacteria (MOB), *Sphingomonadaceae*, Jet A-1 aircraft fuel, Microbiologically induced corrosion (MIC), 7175-T7351 aluminum alloy.

1. GİRİŞ

Uçak yakıtları farklı uygulamalar (ısıtma, karayolu taşımacılığı vb.) için kullanılan yakıtlardan daha yüksek kaliteye sahip özel yakıt türleridir. İlk üretildikleri rafineri sürecinde steril olmalarına rağmen, hava ve su yoluyla ya da yakıt sistemleri ile temas sonrasında, mikroorganizmalar ile kontamine olabilmektedirler (Hemighaus ve diğ., 2006). Jet A-1 yakıtı, yolcu uçaklarında en sık tercih edilen kerosen tip yakıt çeşitlerindendir. Kerosen, uçak yakıt tanklarında, mikroorganizmaların gelişmeleri için ihtiyaç duydukları ana karbon kaynağıdır. Mikroorganizmalar su, nitrojen kaynağı ve mineral besinler gibi diğer ihtiyaçlarını ise yakıt tanklarının tabanında yoğunlaşarak biriken sudan sağlamaktadırlar (Iannuzzi ve Rosales, 2003). Yakıttaki hidrokarbonu aerobik olarak indirgeyebilme ve bir enerji kaynağı olarak kullanabilme yeteneğinde olan bakteriler, uçak iskeletine tutunarak biyofilm tabakası oluşturmakta ve uçak yakıtındaki besinler, kullanarak metabolik ihtiyaçlarını karşılamaktadırlar.

Biyofilm, metaller de dahil olmak üzere farklı malzemelerin yüzeylerine veya birbirlerine tutunan mikrobiyal hücrelerin, kendileri tarafından salgılanan hücre dışı polimerik maddelerden (EPS'den) oluşan bir matris içinde yapılanmış şekilde topluluk halinde yaşamasına olanak tanıyan üç boyutlu bir yapıdır (Donlan ve Costerton, 2002; Flemming ve diğ., 2016; Azeredo ve diğ., 2017). Biyofilm oluşumu, biyofilm/metal arayüzünde değişikliklere ve radikal elektrokimyasal değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler, sırasıyla biyofilm içindeki mikrobiyal metabolik ve solunum faaliyetleri nedeniyle özellikle pH ve çözünmüş oksijen konsantrasyonunu etkiler (Telegdi ve diğ., 2020). Kimyasal ve biyolojik reaksiyonların katalize edilmesi ile birlikte, başta biyolojik bozunma sonucu ilgili ortamın şartlarının değişmesine ve sonrasında da metallerin yüzeyinde “mikrobiyolojik olarak desteklenen korozyon (Microbiologically Influenced Corrosion - MIC)” oluşumuna neden olarak ciddi hasarlara yol açabilmektedirler (Xu ve diğ., 2017). MIC, mikroorganizmaların anodik ve/veya katodik reaksiyonları başlatarak, hızlandırarak ve hatta kolaylaştırarak dahil olduğu elektrokimyasal bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Ford ve Mitchell, 1990; Natarajan, 2013). Mikrobiyal korozyon, küresel ölçekte yılda 30 ile 50 milyar dolarlık toplam korozyon maliyetinin, yaklaşık %20'si olarak tahmin edilen önemli maliyetler yaratan küresel bir endişeyi temsil etmektedir. Bunun 400 milyon doları Almanya ve 100 milyon dolardan fazlası ise İngiltere tarafından beyan edilmektedir (Skovhus ve diğ., 2017; Guo ve diğ., 2018; Fytianos ve diğ., 2020).

Mikrobiyolojik korozyon neredeyse tüm ekosistemlerde meydana gelebilir ve farklı birçok endüstriyel sektördeki ekipman ve altyapıyı etkileyebilmektedir. Gaz ve petrol endüstrisi başta olmak üzere, havacılık yakıt sistemleri, liman tesisleri ve su sistemleri bunların başında gelmektedir (Videla, 2002; Dai ve diğ., 2016; Aktaş ve diğ., 2017; Rhoads ve diğ., 2017).

Uçak yakıtlarını kontamine ederek uçak yakıt depolarında bulunan mikroorganizmalar arasında belirli bakteri ve fungus grupları üzerine yoğunlaşmış olmasına rağmen, mikrobiyal komünitenin baskın üyeleri yakıt bileşimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Christopher ve diğ., 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalar havacılık yakıtı örneklerinde bakteri türlerinin funguslara göre daha baskın olduğunu görülmektedir (Hu ve diğ., 2019; Samuel ve diğ., 2015; Rauch ve diğ., 2006). Bu çeşitliliğin içerisinde mikrobiyolojik korozyondan sorumlu olmaları ile tanınan sülfat indirgeyen bakteriler (suphate reducing bacteria, SRB'ler), demir okside eden bakteriler (iron oxidizing bacteria, IOB'ler), mangan okside eden bakteriler (manganese oxidizing bacteria, MOB'ler), asit üreten bakteriler (acid producing bacteria, APB'ler) bulunmaktadır (Rauch ve diğ., 2006; Lv ve Du, 2018; Vejar ve diğ., 2016; Jia ve diğ., 2018). Bu çalışmalarda uçak yakıtlarının kontaminasyonundan sorumlu olduğu belirtilerek cins ve/veya tür düzeyinde rapor edilen bazı bakterilerin (*Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* vb.), farklı çalışmalarda mangan (Mn) okside ederek enerji elde etme yeteneğine sahip olduğu da rapor edilmiştir (Ridge ve diğ., 2007; Cerrato ve diğ., 2010; Li ve diğ., 2016). Bununla birlikte, jet A-1 yakıtından izole edilen bakterilerin Mn oksitleme yeteneklerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

MOB'ler, yoğun olarak oksik ve anoksik ara yüzeylerde olmak üzere; ferromanganez nodüllerinden denizlere, volkanik taşlardan çöllere kadar geniş bir jeografik alana yayılmakla birlikte boru hatları, depolama tankları ve hidroelektrik santralleri gibi endüstriyel ortamlarda da bulunmaktadırlar (Tebo ve diğ., 2005; Lane, 2005). *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria*'dan oluşan 4 farklı bakteri filumunda yer alarak, filogenetik olarak yaygınlık ve çeşitlilik gösteren bir topluluktur (Tebo ve diğ., 2005; Zhou ve Fu, 2020). Aerobik olarak üreyen, heterotrofik bakterilerdir. Bakterilerin neden Mn okside ettiği konusu üzerine farklı teoriler bulunmaktadır. Bunlardan en yaygını, Mn'nin bakteriler tarafından okside edilerek enerji üretimi için kullanıldığı teorisiidir. Ancak, bunu doğrudan kanıtlayan veriler eksiktir ve konu hala araştırma gerektiren açık bir alan olarak kabul edilmektedir.

Mn oksitleme sistemlerinin mikrobiyal oksidasyon, redoks dengesi ve atık metabolizması gibi bir dizi karmaşık süreci içerdiği bilinmektedir. Ayrıca, enerji üretimi, elektron alımı veya verimi, hücre duvarının korunması gibi fonksiyonlarının yanı sıra korozyon üzerinde etkisi önemlidir. Temel prensipte MOB'lerin, çözünebilir Mn iyonlarını (Mn^{+2}) oksitleyerek metal yüzeyinde katı Mn oksitleri meydana getirdikleri, katı haldeki Mn oksitin de Mn^{+2} 'ye geri indirildiği ve metalde katodik reaksiyon gerçekleştirerek korozyona yol açtığı bilinmektedir (Hakkarainen, 2003). Dahası, Mn oksit birikintilerinin diferansiyel havalandırma hücrelerinin oluşumuna neden olarak, mikrobiyolojik korozyondan sorumlu SRB'lerin ve diğer anaeroplara çoğalmasını teşvik edebileceği de rapor edilmiştir (Wiatr, 2008; Dickinson ve Wiatr, 2013). Bununla birlikte, MOB'lerin farklı metallerde neden olduğu mikrobiyolojik korozyonu rapor eden çalışmalar bulunmasına rağmen (Geiser ve diğ., 2001; Rajasekar ve diğ., 2007; Maruthamuthu ve diğ., 2011), uçak yakıt depo malzemesi olan alüminyum MOB'lerin korozyon etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Literatürde, mevcut tez çalışması ile doğrudan ilişkili olan tek çalışma Vejar ve diğ. (2016)'nin, C130 uçak ana yakıt tankının tahliye vanasından izole ettikleri *Bacillus megaterium*'un, alüminyum alaşımı 7075'e korozyon etkisini araştırdıkları çalışmadır. Ancak, bakterinin Mn okside etme yeteneği veya Mn oksidasyonunun korozyona etkisi ile ilgili herhangi bir bilgi rapor etmedikleri görülmüştür. Tüm bu veriler ışığında, genel olarak mikrobiyolojik korozyon ile ilişkilendirilen MOB'lerin, Mn okside etme özellikleri sebebiyle, uçak yakıt deposu malzemesi olan alüminyum alaşımına nasıl etki ettikleri ile ilgili olarak literatürde bir boşluk olduğu saptanmıştır. Halbuki, uçak endüstrisinde hem güvenlik sorunları hem de ekonomik kayıplar nedeni ile korozyona neden olabilecek bakteri türleri ve bu türlerin metabolik etkileri ile ilgili literatürün zenginleştirilmesi, ilgili sektördeki problemlerin engellenebilmesi veya azaltılabilmesi açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, yolcu uçağından alınan jet A-1 tip yakıt örneğinden izole edilen ve Mn okside etme yeteneği belirlenen JetA1-E 2 suşunun, *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde yer alan yeni bir cins olduğu belirlenmiştir ve uçak yakıt depo malzemesi olarak sıklıkla kullanılan 7175-T7351 alüminyum mikrobiyolojik olarak korozyona uğratıp uğratmadığının incelenmesi hedeflenmiştir. Bakterinin MIC etkisi, mikrobiyolojik, gravimetrik, yüzey görüntüleme ve karakterizasyon analizleri ile değerlendirilmiştir.

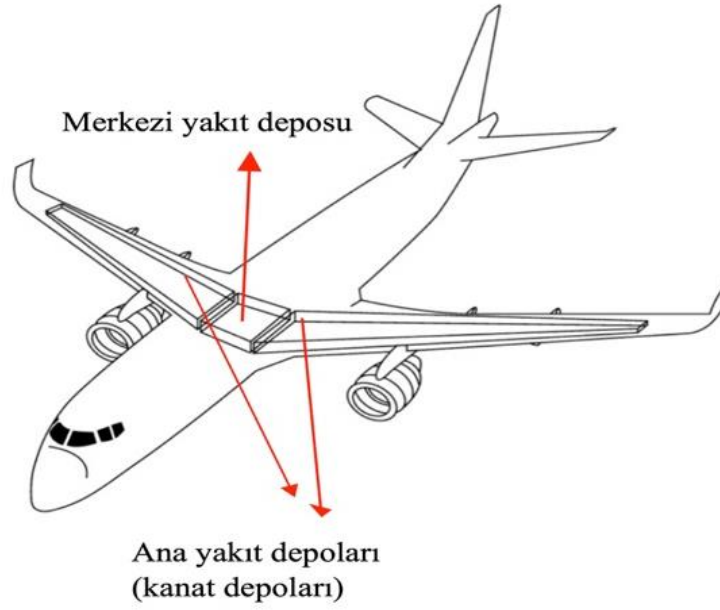
2. GENEL KISIMLAR

2.1. UÇAK YAKIT DEPOLARI VE MİKROORGANİZMALAR

2.1.1. Uçak Yakıt Depoları

Uçaklar, geniş çalışma menzillerinin gerekliliklerini karşılayabilmek adına çok büyük miktarlarda yakıtın depolanabilmesi için uygun şekilde tasarlanmaktadır. Bu özellik, geri dönüş süresinin kritik bir operasyonel faktör olduğu ticari taşımacılık uygulamalarında çok daha önemlidir. Uçağın sistem bütünlüğü içerisinde bulunan sabit yakıt depoları, kanat içlerinde ve uçağın tipine bağlı olarak da gövdeye takılmış olarak bulunan, izole edilmiş, esnek yapılı metallerdir. Şekil 2.1’de ticari bir uçak için tipik bir yakıt deposu düzeni gösterilmektedir. Kanat yapısı, yakıt depolamak için ortak bir konumdur ve birçok ticari taşımada, kanatlar arasındaki alanda ek tanklar bulunmaktadır. Daha uzun menzilli uçaklar ve iş jetleri, kuyruk tanklarına ve/veya ek gövde tanklarına sahip olabilir. Bununla birlikte çoğu durumda gövde öncelikle yolcuların, kargonun, uçuş güvertesinin (kokpit) ve aviyonik ekipmanların bulunduğu yerdir. Uçaklarda yakıtın büyük kısmı (yaklaşık %70) kanatlardaki depolarda bulunmaktadır ve bunun temel sebebi uçuş güvenliğidir. Seyir sırasında yakıtın tüketilmesi ile değişen statik stabilitenin kontrolünü sağlayarak uçağın boylamsal ağırlık merkezini koruyabilmek, aşırı gerilmeyi önlemek ve yakıtla doldurulan kanatların hava akımından korunmayı sağlaması temel sebeplerdir (Langton ve diğ., 2009).

Yakıt sistemleri ile ilgili ele alınması gereken en önemli konulardan biri de uçağın uçuş sırasında maruz kaldığı çevresel koşullardaki (özellikle yerel basınç ve sıcaklık) geniş değişiklikleri yakıt ve yakıt ile ilişkili ekipmanların tolere edebilmesidir. Günümüz yakıtlarının son derece önemli üç özelliği yoğunluk, buhar basıncı ve donma noktasıdır. Yakıtlardaki bu özellikler, uçağın katedebileceği menzili ve irtifa kabiliyetini etkileyebildiği gibi yakıt ile ilişkili ekipmanların zarar görmesine, filtrelerin tıkanmasına ve sonuç olarak motorun kapanmasına bile yol açabilir. Bu nedenledir ki, uçaklarda kullanılan yakıtın tipi son derece önemlidir.



Şekil 2.1: Tipik bir ticari uçak yakıt deposu düzeni (Langton ve diğ., 2009).

2.2.1.1. Yakıt Deposu Malzemesi Olarak 7175-T7351 Alüminyum Alaşımı

Modern teknolojinin gelişmesiyle birlikte, özellikle havacılık ve otomotiv alanlarında, geleneksel malzemelere benzer şekilde mekanik stabiliteyi ve genel yapının korozyon direncini korurken, malzeme ağırlığının minimuma indirecek alternatifler popülerleşmiştir (Dursun ve Soutis, 2014; Prabhu, 2015). Bu bağlamda, yeni geliştirilen uçaklarda titanyum alaşımlarının ve kompozit malzemelerin oranı artmış olsa da, diğer malzemelere kıyasla düşük yoğunluk, iyi korozyon direnci ve işlenebilme özellikleri ile yüksek mukavemetli alüminyum alaşımlarının kullanımı hala büyük bir oranda (%70'in üstünde) yer almaktadır ve bu da onu havacılık alanında vazgeçilmez kılmaktadır (Stayley ve diğ., 1997).

500'den fazla farklı alüminyum alaşımı vardır ve kolaylık olması açısından bunlar “alaşım serisi” adı verilen kategorilere ayrılmıştır. Uluslararası Alaşım Tanımlama Sistemi (International Alloy Designation System, IADS) çoğu ülkede alüminyum alaşımlarını kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırmak için kullanılan bir sınıflandırma şemasıdır (Tablo 2.1) Bu sistem havacılık ve uzay endüstrisi tarafından uçaklarda kullanılan alaşımları sınıflandırmak için kullanılır.

Tablo 2.1: Alüminyum alaşımları ve ısıt işlem uygulamaları.

<u>Alüminyum Alaşımının İdentifikasyonu</u>		<u>Isıl İşlem Uygulamaları</u>	
4 Basamaklı Gösterim Kodu	Ana Alaşım Elementleri	Isıl İşlem Tipi	Uygulama
1xxx	Saf alüminyum ($\geq 99\%$)	T1	Sıcak şekillendirme sonrası soğutma + doğal yaşlandırma
2xxx	Al-Cu	T2	Sıcak şekillendirme sonrası soğutma + soğuk şekillendirme + doğal yaşlandırma
3xxx	Al-Mn	T3	Çözeltiyeye alma + soğuk şekillendirme + doğal yaşlandırma
4xxx	Al-Si	T4	Çözeltiyeye alma + doğal yaşlandırma
5xxx	Al-Mg	T5	Sıcak şekillendirme sonrası soğutma + soğuk şekillendirme + yapay yaşlandırma
6xxx	Al-Mg-Si	T6	Çözeltiyeye alma + yapay yaşlandırma
7xxx	Al-Zn-Mg	T7	Çözeltiyeye alma + aşırı yaşlandırma ile kararlı hale getirme
8xxx	Diğer (Li ve diğ.)	T8	Çözeltiyeye alma + soğuk şekillendirme + yapay yaşlandırma
		T9	Çözeltiyeye alma + yapay yaşlandırma + soğuk şekillendirme
		T10	Sıcak şekillendirme sonrası soğutma + soğuk şekillendirme + yapay yaşlandırma

* Polmear (1996) ve Mouritz (2012) literatürlerinden düzenlenmiştir.

Uçak yapılarında esas olarak kullanılan alüminyum serileri “yüksek mukavemetli Al 2xxx (2024, 2224, 2324, 2424, 2524 vb.) alaşımları ile ultra yüksek mukavemetli Al 7xxx (7075, 7475, 7050, 7150, 7055, 7085, 7175, 7178 vb.) alaşımlarıdır (Koli ve diğ., 2015). Bu alaşımlar, uçak gövdesi, kanatlar, yakıt tankları, yüksek gerilimli yapısal parçalar, uçak bağlantı parçaları, güvenlik parçaları, yük taşıyıcı bileşenler olarak yaygın şekilde kullanılan yapısal malzemelerdir (Warren, 2004; Botilă, 2020).

Alüminyum içerisine ilave edilen %4-8 Zn ve %1-3 Mg kompozisyonu 7xxx serisi alüminyum alaşımlarını işaret etmektedir (Şekil 2.2). 7xxx serisi alüminyum alaşımları diğer alüminyum alaşımları içerisinde en yüksek özgül dayanıma, yüksek özgül sertliğe, yüksek tokluğa,

mükemmel işleme ve kaynak performansına sahip olan malzemelerdir. Zn ve Mg, alüminyum içerisinde yüksek oranda katı eriyebilirliğe sahiptir ve malzemenin ana güçlendirme katkılarıdır. Bu alaşımlara Cu ilavesi ile dayanım değerleri daha da artmaktadır. Ayrıca, Zn ve Mg ile güçlenen alaşımda stres korozyon çatlamasına karşı oluşan yüksek duyarlılık, Cu ve Mn ilavesi ile düşürülebilmektedir. Ayrıca, serinin Cr ilave edilen alaşımlarında gerilim, korozyon, çatlama direncinin büyük ölçüde iyileştirildiği de bilinmektedir. Alaşımda Cr, Mn, Ti, Zr ve Ag kristalleşme davranışını kontrol etmek ve çökeltileri modifiye etmek için kullanılan elementlerdir (Smith, 2001). IADS'ye göre 7175 alüminyum alaşımının bileşimi %5.1-6.1 Zn, %2.1-2.9 Mg, %1.2-2.0 Cu, %0-0.15 Si, %0-0.20 Fe, %0-0.10 Mn, %0.18-0.28 Cr, %0-0.10 Ti elementlerinden oluşmaktadır (Polmear, 1996; Mouritz, 2012).

Isıl işlemler metallerde mikroyapıyı, mekanik özellikleri ve fiziksel özellikleri geliştirmek amacıyla uygulanan ısıtma ve soğutma işlemleri içermektedir (Geçkinli, 2002). Alüminyum alaşımlarının ısıtma işlemi sırasında ortaya çıkan özellik değişimleri çözünme ve belirli alaşım elemanlarının çökmesi ile gerçekleşir. Yaşlanabilir alüminyum alaşımlarından 2xxx, 7xxx ve bu alaşımlara son yıllarda eklenen Al-Li alaşımları özellikle havacılık endüstrisinde kullanıldığından, bu alaşımların ısıtma işlemi teknolojik açıdan önem taşımaktadır. Bu alaşımların kullanımında dayanım, tokluk, yorulma gibi mekanik özelliklerin yanı sıra gerilmeli korozyon direnci gibi özellikler de ön plana çıkmaktadır (Geçkinli, 2002). 7xxx serisi alüminyum alaşımlarında katı erimeye alma işlemini takiben su verme ve yaşlandırma işlemlerinden sonra çökme sonucunda dayanımları artmaktadır (Smith, 2001). 7xxx serisi alüminyum alaşımlarında, yüksek sertlik ve dayanım sağlanması sebebiyle T6 (tek aşamalı yapay yaşlandırma) tipi ısıtma işlemi uygulanmaktadır. T6 ısıtma işlemi sonucunda korozyona karşı duyarlı bir durum ortaya çıktığından, bu tür alaşımların korozyon direncini arttırmak amacıyla T7 (çok adımlı yaşlandırma) tipi ısıtma işlemleri geliştirilmiştir (Kibar, 2010). T73, T74 ve T76 tipleri, %1.25'ten fazla Cu içeren alaşımlara uygulanabilen T7 tipi ısıtma işlem çeşitleridir. T73 tipi, stres korozyon çatlamasına duyarlılığın büyük ölçüde azaltılmasına neden olurken, T76 tipi pul pul dökülme korozyonuna karşı direnci arttırmaktadır (Yoon, 2004). T73 tipi ısıtma işlemde, korozyon direnci artmasına rağmen alaşımların dayanımı %10-15 oranında azalmaktadır (Kibar, 2010).

2.1.2. Uçak Yakıtları ve Jet A-1 Yakıtı

Havacılık yakıtı, farklı uygulamalar (ısıtma, karayolu taşımacılığı vb.) için kullanılan yakıtlardan daha yüksek kaliteye sahip özel bir yakıt türüdür. Petrolün damıtılmasından elde

edilen kerosendir ve binlerce hidrokarbonun bir karışımıdır (Edwards, 2003). Esas olarak uzunlukları 10 karbondan 20 karbona kadar değişen uzun, tek dallı karbon ve hidrojen zincirlerinden veya alkanlardan oluşur (Rauch, 2008). Jet yakıtının ana bileşeni alkanlar olmasına rağmen, tipik olarak az miktarda aromatik hidrokarbonlar, kükürt türleri, nitrojen türleri ve eser metaller de bulunmaktadır (Rauch, 2008). Hidrokarbon zincirinin uzunluğu ve boyutu (moleküler ağırlıklar veya karbon sayıları), ürünün operasyonel gereksinimlerine bağlıdır (Maurice ve diğ., 2001).

Havacılık yakıtları bazen kerosen veya nafta tipi olarak sınıflandırılır. Kerosen tipi yakıtlar arasında Jet A, Jet A-1, JP-5 ve JP-8 bulunur. Kerosen tipi jet yakıtları yaklaşık 8 ila 16 karbon sayısı arasında bir karbon sayısı dağılımına sahiptir (Gaylarde ve diğ., 1999). Nafta tipi jet yakıtları arasında Jet B ve JP-4 yer alır (Hemighaus ve diğ., 2006). Nafta tipi jet yakıtları yaklaşık 5 ila 15 karbon sayısı arasında bir karbon sayısı dağılımına sahiptir (Hemighaus ve diğ., 2006).

Farklı performans ve operasyonel gereklilikleri, maliyetleri veya kullanılabilirlikleri sebebiyle askeri ve sivil havacılık yakıtlarının özellikleri farklılık göstermektedir (Hemighaus ve diğ., 2006). Askeri ve sivil havacılıkta öncelikle beş tür yakıt kullanılmaktadır: Jet A, Jet A-1, JP-5, JP-8 ve JP-8+100. Jet A ve Jet A-1 sırasıyla Amerika Birleşik Devletleri ve deniz aşırı ticari taşıyıcılar tarafından kullanılırken, JP-5, JP-8 ve JP-8+100 askeri havacılıkta kullanılmaktadır. Jet A-1, yolcu uçaklarında en sık tercih edilen kerosen tip yakıt çeşitlerindendir.

Jet A-1 yakıtı, bileşimi üretim sırasında değişen alkanlar, sikloheksanlar, aromatik ve polisiklik bileşikler kapsayan yüzlerce hidrokarbondan oluşan çok bileşenli bir yakıttır (Na'inna ve diğ., 2020). Yoğunluğu 775-840 g/L, erime ve kaynama noktaları sırasıyla -47 °C ve 150 °C - 250 °C olan saman renginde bir sıvıdır. Parlama noktası 38 °C ve kendiliğinden tutuşma sıcaklığı 210 °C'dir.

2.1.3. Uçak Yakıt Depolarında Bulunan Mikroorganizmalar

Uçak yakıtları, ilk üretildikleri rafineri sürecinde steril olmalarına rağmen, hava ve su yoluyla ya da yakıt sistemleri ile temas sonrasında mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedirler (Hemighaus ve diğ., 2006). Uçak yakıtlarındaki mikrobiyal kontaminasyon 1960'lı yılların başından beri rapor edilmekte ve 1980'li yıllardan itibaren de konu ile ilgili araştırmalar yürütülmektedir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda, uçak yakıt kontaminantları olarak

çeşitli bakteri ve fungus grupları üzerine yoğunlaşmış olmasına rağmen, günümüz çalışmaları mikrobiyal komünitenin baskın üyelerinin, yakıt bileşimine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır (Christopher ve diğ., 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalar havacılık yakıtı örneklerinde bakteri türlerinin funguslara göre daha baskın olduğunu göstermektedir (Hu ve diğ., 2019; Samuel ve diğ., 2015; Rauch ve diğ., 2006). Tablo 2.2’de farklı havacılık yakıtlarından (JP-4, Jet A, Jet A-1, JP-8) izole edilen bakterilerin listesi verilmiş, jet A-1 ve jet A yakıtlarında olanlar işaretlenmiştir.

Tablo 2.2: Farklı havacılık yakıtlarından izole edilen bakterilerden, jet A-1 ve jet A yakıtlarında bulunanlar.

Bakteriler	Jet A-1	Jet A	Bakteriler	Jet A-1	Jet A
<i>Acidovorax</i>		+	<i>Herbaspirillum</i>		
<i>Acinetobacter</i>	+	+	<i>Kocuria</i>		
<i>Aerobacter</i>	+	+	<i>Lactococcus</i>		+
<i>Aeromonas</i> sp.	+	+	<i>Leucobacter</i>	+	
<i>Alcaligenes</i>	+	+	<i>Luteococcus</i>		
<i>Aquabacterium</i>		+	<i>Methylobacterium</i>		+
<i>Aquasprillum</i>		+	<i>Microbacterium</i>		+
<i>Arthrobacter</i>	+	+	<i>Micrococcus</i> sp.	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	<i>Moraxella</i>		
<i>Brachybacterium</i>			<i>Mycobacterium</i>		
<i>Bradyrhizobium</i>		+	<i>Padoraia</i>		+
<i>Brevibacterium</i>	+		<i>Pantoea</i>		
<i>Burkholderia</i>		+	<i>Photothabdus</i>		+
<i>Caulobacter</i>		+	<i>Phyllobacterium</i>		+
<i>Chryseobacterium</i>			<i>Propionibacterium</i>		
<i>Clostridium</i>		+	<i>Pseudomonas</i> sp.		
<i>Curtobacterium</i>		+	<i>Rahnella</i>		
<i>Dermacoccus</i>			<i>Ralstonia</i>		
<i>Desulfovibrio</i> sp. (SRB)	+	+	<i>Rhizobium</i>		
<i>Diaphorobacter</i>		+	<i>Rhodococcus</i>		
<i>Dietzia</i> sp.			<i>Roseomonas</i>		
<i>Escherichia</i> sp.		+	<i>Rothia</i>		
<i>Enterobacter</i>	+		<i>Serratia</i>		
<i>Ewingella</i>		+	<i>Sphingomonas</i>		+
<i>Flavobacterium</i>	+	+	<i>Staphylococcus</i> sp.		+
<i>Gordonia</i>			<i>Streptococcus</i>		
<i>Granulicatella</i>		+	<i>Streptomyces</i> sp.		+
<i>Haemophilus</i>		+	<i>Wolinella</i>		+

* Rauch ve diğ. (2006), McComb (2009) ve Hu ve diğ. (2019) literatürlerinden düzenlenmiştir.

Jet A-1, yolcu uçaklarında en sık tercih edilen kerosen tip yakıt çeşitlerindendir. Uçak yakıt tanklarında, mikroorganizmaların gelişmeleri için ihtiyaç duydukları ana karbon kaynağı

kerosendir. Mikroorganizmalar su, azot kaynağı ve mineral gibi diğer ihtiyaçlarını ise yakıt tanklarının tabanında yoğunlaşarak biriken sudan sağlamaktadırlar (Iannuzzi ve Rosales, 2003). Yapılan çalışmalar, jet A-1 tip yakıtlardan çoğunlukla *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Micrococcus*, *Aeromonas* cinslerine ait bakteri türlerinin izole edildiğini göstermektedir (Rauch ve diğ., 2006; Denaro, 2005). Bu bakterilerin büyük çoğunluğu, yakıtta hidrokarbonu aerobik olarak indirgeyebilme ve enerji kaynağı olarak kullanabilme yeteneğindedir.

2.2. BAKTERİYEL TAKSONOMİDE POLİFAZİK YAKLAŞIM

Bakteri taksonomisi, mikrobiyolojinin son derece zahmetli bir alanıdır ve aynı zamanda katı kurallar dizisine dayalı tür tanımlama yönteminde çok dogmatik olduğu düşünülmektedir. rRNA dizisi ve çeşitli moleküler parmak izi tekniklerinin kullanımındaki gelişmeler, bakteriyel taksonomik süreci ilginç bir filogenetik keşif veya macera haline getirmiştir.

Tür, %70 veya daha fazla DNA akrabalığı paylaşan benzer suşlar ve tip suşlardan oluşan bir gruptur ve bakteriyel taksonominin temel birimidir (Wayne ve diğ., 1987). Tip suş, türün isim taşıyıcısıdır ve gelecekteki türler için referans olarak kullanılabilir. Bakteriyel polifazik taksonomide, türlerin tanımlanması için kabul edilen standart kural ve prosedür aşağıdaki gibidir:

1. İki türün genom düzeyinde genetik benzerlik derecesini ölçmek için DNA-DNA hibridizasyonu (DDH) değeri, farklı türler olarak etiketlenmek için %70'ten az olmalıdır (Wayne ve diğ., 1987).
2. İki tür arasında en az %98.7 rRNA gen dizisi benzerliği olmalıdır (Stackebrandt ve Ebers, 2006).
3. Bir izolatu filogenetik sınıflandırma ve veri tabanındaki en yakın komşularından ayırt edebilen birkaç ayırt edici kemotaksonomik ve fenotipik özelliğin ortaya konulması gereklidir.

Yöntemler genel olarak genotipik ve fenotipik yöntemler olarak kategorize edilmektedir.

2.2.1. Genotipik Yöntemler

Genotipik yöntemler, öncelikle DNA ve RNA gibi nükleik asitlerden veya izole edilen organizmanın tam hücre proteininden elde edilen bilgiler sağlar. Bu yöntemlerden bazıları polifazik taksonomi için “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Sık kullanılan genotipik yöntemlerden bazıları aşağıdaki gibidir:

2.2.1.1. DNA Baz Oranları (%mol G+C)

Guanin ve sitozin bazlarının %mol değerinin ölçümü, bakteri sınıflandırmasında temel bir genotipik yöntemdir. %G+C içeriğinin varyasyonu, iyi tanımlanmış bir tür için %3 ve iyi tanımlanmış bir cins için %10’dan fazla olmamalıdır. Bakteri cinsi içinde %24-%76 arasında değişebilir (Fournier ve Raoult, 2009).

2.2.1.2. rRNA Gen Dizilimi

16S rRNA gen dizilimi, bakteriyel ve arkeal izolatlar için hızlı ve doğru bir tanımlama yöntemi olmasına rağmen, birçok cins için yalnızca cins seviyesine kadar tanımlayıcılık sağlamaktadır. 1980’lerde yapılan az sayıda çalışma, genomun korunmuş bölgelerini kullanarak filogenetik karşılaştırma yapmanın, fenotipik özellikler ve diğer bağlantılı özelliklere göre daha kararlı olduğu ortaya konmuştur (Ciccarelli ve diğ., 2006; Staley, 2006; Sayers ve diğ., 2009). Bu nedenle, filogenetik karşılaştırmaları birbirine bağlamak için rRNA kullanımı gündeme gelmiştir (Konstantinidis ve Tiedje, 2007). Üç (5S, 16S ve 23S) rRNA molekülünden, 16S rRNA geni (~1500 bp), mikrobiyal taksonomi alanında etkili olan en yaygın kullanılan filogenetik belirteçtir (Stackebrandt ve Goebel, 1994; Konstantinidis ve Tiedje, 2005, 2007), çünkü diğer ikisi 5S (~120 bp) ve 23S (~3300 bp) sırasıyla çok küçük ve çok büyük boyuttadır.

16S rRNA geni birçok değişken ve korunmuş bölgeden oluşmaktadır. Bu nedenle, taksonomik karşılaştırma için korunmuş değişken ve aşırı değişken bölgeleri kapsayan 16S rRNA geninin tamamı için evrensel primerler tasarlanmıştır. Primer dizileri web erişiminde serbestçe erişilebilir durumdadır (Clarridge, 2004). 16S rRNA gen dizileri Ribozomal Veritabanı Projesi (RDP) II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) ve GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gibi veri tabanlarında mevcuttur. Karşılaştırmalı filogenetik için ilgili türlerin sekansları bu veri tabanlarından alınabilir. BLAST ve CLUSTAL X gibi sekans karşılaştırma yazılımları, çeşitli 16S rRNA gen dizilerinin hizalanması için kullanılır. Bakteri türleri arasındaki akrabalık, PHYLIP ve MEGA7.0 gibi ücretsiz olarak temin edilebilen ağaç oluşturma yazılımları

kullanılarak filogenetik ağaç veya dendrogram oluşturularak incelenebilir. Filogenetik ağaç, tanımlanmak istenen suşun ait olduğu cinsi ve en yakın komşularını veri tabanındaki diğer dizilerle karşılaştırarak doğrular ve ardından daha ileri genotipik, kemotaksonomik ve fenotipik analizler kararlaştırılır. Suşların taksonomik köken modelini gösteren bir filogenetik ağaç oluştururken, ilgilenilen grubun dışında bir taksondan dış grup seçilmelidir (Ciccarelli ve diğ., 2006). Filogenetik ağaç, MEGA yazılımında mevcut olan çeşitli yöntemler kullanılarak oluşturulabilir. Neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) ve maximum likelihood (ML) en yaygın kullanılanlardır. Bunlar, verilen 16S rRNA dizileri kümesi için en iyi açıklamayı bulmayı amaçlamaktadır. En az iki yöntemin kullanılması ve filogenetik ilişkiyi en iyi gösteren ağacın seçilmesi esastır.

2.2.1.3. DNA-DNA Hibridizasyonu

DDH, iki bakteri türünün toplam DNA'ları arasında karşılaştırmalı analize dayanan bir tekniktir. Bu tekniğin arkasındaki prensip, yakın akraba iki organizmanın hibridize DNA'sının termal stabilitesine dayanmaktadır. DNA molekülü denatüre edilebilir, ancak aynı zamanda yeniden birleşme sıcaklığı olarak bilinen sıcaklık düşürülerek doğal konformasyonuna geri getirilebilir. Bu teknikte önemli rol oynayan başlıca parametreler (1) % G+C içeriği, (2) çözeltinin iyonik gücü ve (3) DNA molekülünün erime sıcaklığıdır. Bu üç parametre arasındaki tek değişken parametre DNA molekülünün erime sıcaklığıdır. Heterodubleks molekül arasındaki benzerlik ne kadar fazlaysa, onu ayırmak için gereken sıcaklık da o kadar fazla olur. Hibridizasyon oranı %70'lik eşik değerinden düşükse, iki izolatın iki farklı türe ait olduğu kabul edilir (Wayne ve diğ., 1987). Bu teknikte kullanılan tuz konsantrasyonu ve formamid konsantrasyonu da önemli bir rol oynamaktadır (Johnson, 1991). Şu an itibarıyla, 5000'den fazla bakteri türü bu teknik kullanılarak etkili bir şekilde tanımlanmıştır (Mora, 2006).

2.2.1.4. Tüm Genom Analizi

Yeni bir taksonun tanımlanmasına yönelik mevcut yaklaşımlar genellikle, evrensel olarak bulunan, stabil, korunmuş ve normalde yatay gen transferine maruz kalmayan en etkili moleküler (Woese, 1987) belirteç olan 16S rRNA'nın % dizi benzerliğini belirlemek için genomik DNA'nın izolasyonu ile başlar. 16S rRNA gen dizisi benzerliği BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>) ve Ez-Taxon (www.eztaxon.org/) gibi veri tabanları kullanılarak eşleştirilebilir (Woese ve diğ., 1990; Olsen ve Woese, 1993). İzolatların % dizi benzerlik değeri, filogenetik olarak en yakın komşularıyla

karşılaştırıldığında cins seviyesi için %97 (2006'da %98.5 olarak değiştirilmiştir) (Stackebrandt ve Ebers, 2006) ve tür seviyesi için %95 olarak belirlenmiştir; ancak, 16S rRNA geninin taksonomi için bir belirteç olarak kullanılmasına yönelik çeşitli sınırlamalar mevcuttur (Ludwig, 2010; Janda ve Abbott, 2007). Bunlardan bazıları (1) bazı cinslerde yüksek derecede korunum (Gándara ve diğ., 2001), (2) tek bir genomun birden fazla rRNA operonunda nükleotid varyasyonları (Acinas ve diğ., 2004), (3) bir taksonun edinim üyeleri arasında yatay gen transferi ile 16S rRNA geninin edinilme olasılığı, (4) tür düzeyinde düşük filogenetik yakınlıktır (Fox ve diğ., 1992). İki türün % dizi benzerliği %98.6'dan fazla olduğunda, DDH'nin "altın standart" testi, suşların taksonomik seviyesine atanması için çok değerli, ancak pahalı olması, yoğun emek gerektirmesi, uzmana ihtiyaç duyulması, tüm prokaryotik cinslere uygulanamaması gibi nedenlerden dolayı gelecekteki veri tabanları için göreceli referans olarak kullanılamaz (Tindall ve diğ., 2010). Yeni nesil dizileme teknolojilerinin ortaya çıkması ve gelişmesiyle, taksonomik sürecin değerlendirilmesindeki boşlukların üstesinden gelinebilir. Üstelik korunmuş genler yerine tüm genlerin hizalanmasına dayanan filogenetik ağaçlar daha kesin bilgiler sunmaktadır.

2005 yılı civarında, yeni nesil dizileme teknolojilerinin devreye girmesi ile genom analizi için veri tabanları, algoritmalar ve yazılımlar oluşturulmaya başlandı. Veri tabanlarındaki genom dizileri, araştırmacıların metabolizma ile ilgili genleri bulmalarını ve çıkarmalarını sağlayarak açık ve ücretsiz erişimli bir taksonomi oluşturmada bir yeniliğe neden olmaktadır. Popüler veri tabanlarından bazıları GenBank, EMBO (Avrupa Moleküler Biyoloji Organizasyonu), KEGG Veri Tabanı (Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi), Prokaryotik Genom Veri Tabanları, GEBA (Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea), GOLD (Genome OnLine Database) ve IMG (Integrated Microbial Genome)'dir. Çevrimiçi veri tabanlarına erişim özgürlüğü, genlerin araştırılmasına, PZR primerlerinin tasarlanmasına ve hatta benzer veya diğer filumlardaki genlerin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır.

Tüm genom dizileme, genom bilgilerine açık erişim sağlayarak mikrobiyal fenotiplerin hızlı teşhisi için bir model oluşturmakta ve gelecekte referans ve sınıflandırma için genom temelli yöntemlerin oluşturulmasında etkili olmaktadır (Thompson ve diğ., 2013). Genom dizilimi artık taksonomik karakterizasyon ve çevresel, klinik, veterinerlik ve endüstriyel potansiyele sahip yeni bakteri türlerinin tanımlanması için değerli bir araçtır.

2.2.1.5. Ortalama Nükleotid Benzerliği (ANI)

Genel genom akrabalık indeksi iki genom dizisinin ne kadar benzer olduğunu gösteren ölçümü temsil eder (Chun ve Rainey, 2014) ve bu değerleri hesaplamak için birçok algoritma vardır. Taksonomik çalışmalar için en yaygın kullanılan algoritma ortalama nükleotid benzerliğidir (ANI'dır). Orijinal ANI algoritması ilk olarak Jim Teidje'nin grubu tarafından tanıtılmış ve geliştirilmiştir (Konstantinidis ve Tiedje, 2005; Goris ve diğ., 2007). O zamandan beri, halka açık veri tabanlarında daha fazla genom dizisi biriktikçe, ANI yeni türlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

ANI, deneysel DDH sürecini taklit etmek için en yaygın kullanılan yöntemdir ve bu nedenle DDH'nin dijital versiyonu olarak da adlandırılır (Goris ve diğ., 2007; Konstantinidis ve Tiedje, 2005). ANI değerleri BLASTn ya da MUMMER yazılımı kullanılarak elde edilebilir (Richter ve Rossello-Mora, 2009). İlk olarak, tanımlanmak istenen suşun genom dizisi, 1020 bp uzunluğunda dizilere (fragmanlara) bölünür. İkinci olarak, her bir parça NCBI'nin (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) BLASTn programı (Altschul ve diğ., 1997) kullanılarak suşun tüm genom dizisine karşı aranır. Bu süreçte BLASTn programı, sorgu suşunun parçaları ile söz konusu suşun genomu arasındaki nükleotid özdeşlik değerlerini hesaplar. Ortalama nükleotid özdeşliği, bu nükleotid özdeşliği değerlerinin ortalamasıdır. %70'lik DDH değerlerine karşılık gelen genomlar arasında %95'lik ANI değeri (Goris ve diğ., 2007) tür tanımlaması için kabul edilen bir araçtır.

2.2.1.6. Genom-Genom Arası Mesafe Hesaplayıcı

Neredeyse tüm arke ve bakteri gruplarında, yeni bir türün kendi başına bir tür olarak sınıflandırılıp sınıflandırılmayacağını değerlendirebilmek için %70 DDH benzerliği sınırının aşılmaması gerekmektedir. DDH'nin genom-genom mesafesi (GGD) ile değiştirilmesi ilgi çekicidir çünkü (1) DDH kümülatiftir ve şu anda yalnızca birkaç uzman moleküler laboratuvarında gerçekleştirilmektedir, (2) farklı DDH yöntemleri sonuçlarında farklılık gösterebilir, (3) DNA-DNA hibridizasyonunda hesaplanan benzerlik değeri dışında herhangi bir bilgiye erişim sağlamaz. Bununla birlikte GGDC, G+C içeriğindeki farklılıkları verir ve yeni suşların bilinen tip suşlarla akrabalığına ek olarak genom tabanlı tür ve alt tür tanımlaması için kullanılabilir (Meier-Kolthoff ve diğ., 2014a,b). Ek olarak, genom dizisi bilgileri elbette sonraki karşılaştırmalarda yeniden kullanılabilir ve yalnızca taksonominin ötesinde çeşitli

şekillerde araştırılabilir (Auch ve diğ., 2010) ve ayrıca aşamalı olarak karşılaştırmalı bir veri tabanı oluşturmak için de kullanılabilir.

Genom dizileme alanındaki son teknolojik ilerleme, ıslak laboratuvar DDH'sini dDDH ile değiştirmek için biyoinformatik yöntemlerin kullanılması veya GGD'yi hesaplamak için web tabanlı bir araç kullanarak in silico genom-genom karşılaştırmasıdır (Meier-Kolthoff ve diğ., 2013). Yöntem, eksik genomik dizileme nedeniyle azalmış genomların, tekrarlayan bölgelerin veya eksik fraksiyonların üstesinden gelmek için işlev gören tüm genom mesafelerini girer.

2.2.2. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik testler cins ve familya seviyesine kadar takson, tür ve alt türlerin tanımlanması için kullanılmıştır. Filogenetik bir ağaç üzerinde bir taksonu atamak ve sınıflandırma sisteminde ana bir sınır çizgisi çizmek için kullanılan genotipik yöntemle karşılaştırıldığında, fenotipik yöntem hiyerarşik çizginin derinliğini tanımlayan sınıflandırma sistemi oluşturmak için yararlı bilgiler sağlar (Wayne ve diğ., 1987). Bazen belirli bir bakteri grubundaki fenotipik özelliklerin azlığı, takson tanımı ve ayırımında sorunlara neden olur. Bir bakterinin fenotipik tanımının klasik yaklaşımı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerden oluşmaktadır. Fenotipik özelliklerin birçoğu genetik akrabalık için bir parametre olarak ilgisizlik göstermiştir ancak yine de bir bütün olarak bu teknikler taksonları tanımamızı sağlayan tanımlayıcı bilgiler sağlamaktadır. Bakterilerin morfolojik özellikleri arasında hücresel şekil, endospor, flagella, inklüzyon cisimleri, Gram boyama ve koloni özellikleri yer almaktadır. Benzer şekilde, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler arasında farklı sıcaklıklarda, pH ve tuz konsantrasyonlarında hücresel büyüme veya antimikrobiyal ajanlar, enzimler, metal iyonları gibi çeşitli maddelere yanıt olarak büyüme yer alır (On ve Holmes, 1991, 1992).

Fenotipik yöntemlerin en büyük dezavantajı, aynı organizmanın farklı çevresel koşullarda farklı fenotipik karakterler gösterebileceği gen ifadesi modelidir. Bu nedenle fenotipik sonuçlar, yakın akraba organizma/organizmaların tip suşundan elde edilen benzer veri setiyle karşılaştırılmalıdır (Costas, 1992; Costas ve diğ., 1993). Fenotipik yöntemler, DNA ve RNA bilgilerini içermeyen tüm bu teknikleri kapsar ve bu nedenle kemotaksonomik teknikleri içerir. Kemotaksonomi, bakterileri sınıflandırmak amacıyla hücrenin çeşitli kimyasal bileşenlerinin kodunu çözmek için analitik yöntemlerin uygulanması anlamına gelir

2.2.2.1 Hücre Duvarı Bileşimi

Gram-pozitif bakterilerde hücre duvarı bileşiminin analizi önemliyken, Gram-negatif bakterilerin peptidoglikan tabakası tek tiptir ve bu nedenle çok az bilgi sağlar. Buna karşın Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları, farklı cins veya türe özgü olabilen çeşitli peptidoglikan türlerini barındırır. Analitik prosedür zaman alıcı olsa da, hızlı bir tarama yöntemi önerilmiştir (Schleifer ve Kandler, 1972). Membrana bağlı teikoik asit tüm Gram-pozitif türlerde bulunurken (Archibald ve Baddiley, 1967), hücre duvarına bağlı teikoik asit sadece bazı Gram-pozitif bakteri türlerinde bulunur (Knox ve Wicken, 1973). Teikoik asitler kolayca ekstrakte edilip saflaştırılabilir (Fischer ve diğ., 1983) ve bakteri cinsi hakkında bilgi edinmek için gaz-sıvı kromatografisi ile analiz edilebilir (Fischer ve diğ., 1980; Fischer ve diğ., 1981).

2.2.2.2. Hücresel Yağ Asitleri

Bakteri hücresi çeşitli lipidler içerir. Bunlardan polar lipidler, bakteri membranlarının lipid çift katmanında bulunan ana bileşenlerdir ve halihazırda sınıflandırma ve tanımlama amacıyla sıklıkla çalışılmıştır. Sınırlı sayıda taksonda bulunan sfingofosfolipidler gibi diğer lipid türlerinin bu gruplar içinde değerli olduğu gösterilmiştir (Jones ve Krieg, 1984). Gram-negatif bakterilerin dış membranlarında bulunan lipopolisakkaritler jel elektroforezi ile analiz edilebilir ve daha sonra O-spesifik yan zincirlerdeki varyantlar olarak yorumlanan tipik bir lipopolisakkarit merdiven modeli verebilir (De Weger ve diğ., 1987; Siverio ve diğ., 1993). Lipidlerin ve lipopolisakkaritlerin ana bileşenleri olan yağ asitleri, taksonomik amaçlar için geniş bir şekilde kullanılmaktadır.

Bugüne kadar yağ asitlerinin yaklaşık 300 farklı kimyasal yapısı tanımlanmıştır ve zincir uzunluğu, çift bağ pozisyonu ve süstitüent gruplarındaki eşitsizliğin bakteriyel taksonların karakterizasyonu için çok yararlı bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Suzuki ve diğ., 1993). Genel olarak, toplam hücresel yağ asidi fraksiyonu ekstrakte edilir ve polar lipidler gibi belirli fraksiyonlar analize tabi tutulur (Embley ve Wait, 1994). Hücresel yağ asidi metil ester içeriği, bakterilerin cins seviyesine ilişkin bilgiler sağlayan stabil bir parametredir ve yöntem hızlı ve düşük maliyetli olup yüksek derecede bilgi sağlar.

2.2.2.3. İzoprenoid Kinonlar

İzoprenoid kinonlar, izoprenoid kinon sentezleme yeteneğini kaybetmiş birkaç zorunlu fermentatif bakteri dışında neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunan membrana bağlı bileşenlerdir (Collins ve Jones, 1981). Prokaryotların çoğu sitoplazmalarında elektron

taşınması, oksidatif fosforilasyon, aktif taşıma vb. işlemlerde önemli rol oynayan izoprenoid kinonlar içerir (Collins, 1994; Collins ve Jones, 1981). Bu özellikte ayırt edilen naftokinonlar ve benzokinonlar olmak üzere iki ana yapısal grup vardır.

İlki, bakterilerde daha az yaygın olarak görülen filokinonlar ve menakinonlar olmak üzere iki ana türe ayrılır. Yan zincirlerin büyük değişkenliği (uzunluk, doygunluk ve hidrojenasyon farklılıkları) bakterileri farklı taksonomik seviyelerde karakterize etmek için kullanılabilir (Collins ve Jones, 1981). Çeşitli taksonomik organizma gruplarında bulunan çeşitli izoprenoid kinon grupları vardır ve bu da onları taksonomik çalışma için yararlı bir araç haline getirir.

2.2.2.4. Poliaminler

Poliaminler bakteriyel metabolizma için ana bileşenlerden biri olarak kabul edilir (Tabor ve Tabor, 1985). Evrensel karakterleri ile nicel ve nitel değişkenliklerinin incelenmesi, onları gaz kromatografisi (Yamamoto ve diğ., 1983) veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Carteni-Farina ve diğ., 1985; Scherer ve Kneifel, 1983) ile belirlenebilen uygun bir kemotaksonomik belirteç haline getirmiştir. Çalışılan organizma grubuna bağlı olarak, poliamin örüntüsü, cins düzeyinde ve tür düzeyinde akrabalık çizmek için kullanılmıştır (Busse ve Auling, 1988; Hamana ve Matsuzaki, 1990; Segers ve diğ., 1994; Yang ve diğ., 1993).

2.3. UÇAK YAKIT DEPOLARINDA MİKROORGANİZMA KAYNAKLI PROBLEMLER

Uçak yakıt depolarında çoğalan mikroorganizmalar, metabolik olarak en çok yakıt sistemleri içindeki su-yakıt ara yüzlerinde aktiftir. Alifatik bileşikler seçici olarak tüketen popülasyonlar, yakıt performans özelliklerini olumsuz yönde etkilerler (Passman, 2013). Yakıtın biyodegradasyonundan sorumlu mikroorganizmalar ise asitler, biyosüfaktanlar, solventler ve biyopolimerlerin de dahil olduğu bazı metabolik ürünler üreterek hem yakıtın bozulmasını hızlandırabilir hem de yakıt sisteminin güvenliğine zarar verebilirler (Varjani, 2017).

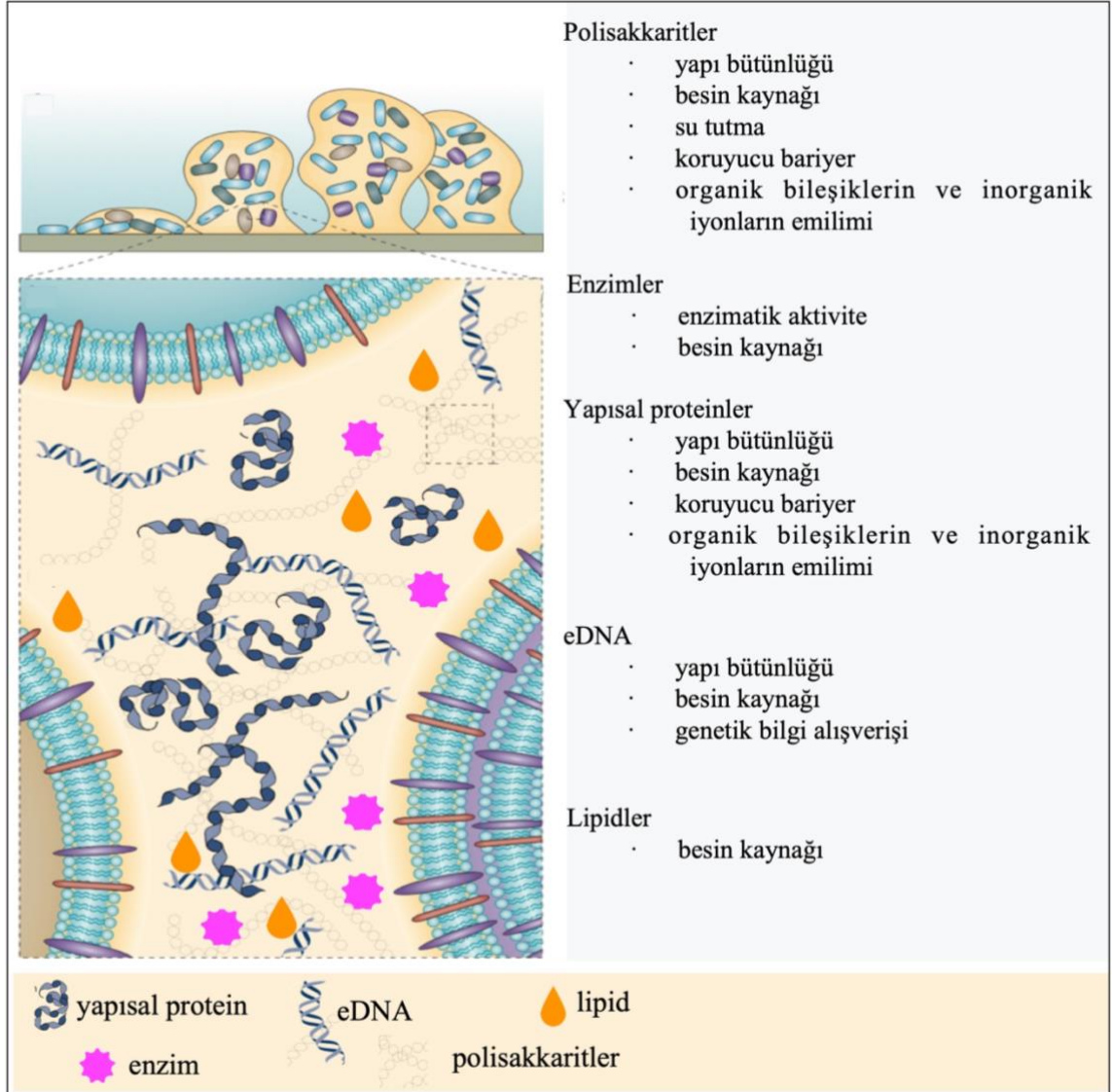
Yakıt içeriğinde çoğalan mikroorganizmalar uçak iskeletine ait yüzeylerde tutunarak biyofilm tabakası oluşturabilmektedirler. Yakıt tanklarında biyofilm oluşumu farklı mikroorganizma gruplarının ortamda bulunması, besin kullanılabilirliği ve ortamın fiziksel parametreleri (oksijen miktarı, sıcaklık, su miktarı vb.) gibi çok sayıda faktörden etkilenmektedir. Uçağın maruz kaldığı iklimsel farklılıklar, uçağın uzun periyotlarda sıcak ve nemli hangarlarda

bekletilmesi ya da depoların temizliği ve yakıt ikmali gibi operasyonel durumlar, yakıt depolarında farklı mikrobiyal çevrelerin, dolayısıyla da farklı yapısal özelliklerde biyofilm tabakalarının oluşmasına neden olabilmektedir (Iannuzzi ve Rosales, 2003). Oluşan biyofilm yakıt filtrelerinin tıkanması, yakıt depo malzemelerinin korozyonu, bakım masraflarının artması ve bu sorunlarla bağlantılı olarak oluşabilecek güvenlik sorunları gibi istenmeyen sonuçlar doğurmaktadır (Rauch ve diğ., 2006).

2.3.1. Biyofilm

Biyofilm, bir terim olarak ilk kez 1978 yılında Costerton tarafından ortaya atılmış (Costerton ve diğ., 1978) ve mikroorganizmaların %99'unun doğal ekosistemlerinde biyofilm yaşam tarzını benimsediği gösterilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Flemming ve diğ., 2016). O zamandan günümüze, bu mikrobiyal yaşam tarzının gizemini çözmek için sayısız bilimsel çalışma yürütülmüş ve literatürde bu yaşam tarzına çok sayıda tanım atfedilmiştir. Çoğu zaman biyofilm, bir arayüze, inert veya biyotik bir yüzeye veya birbirlerine tutunan mikrobiyal hücrelerin, kendileri tarafından salgılanan hücre dışı polimerik maddelerden (EPS'den) oluşan bir matris içinde yapılanmış halde bulunduğu bir mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanmaktadır (Costerton ve diğ., 1994; Donlan 2001). Bu karmaşık matris, biyofilmin olumsuz çevre koşullarına uyum sağlamasına olanak tanır ve farklı stres türlerine (antimikrobiyal ajanlar, kuruluk, besin eksikliği vb.) karşı özel bir direnç kazandırır (Solano ve diğ., 2014; Mazza, 2016).

EPS içeriğinde, esas olarak polisakkaritler ve daha az oranda ise nükleik asitler, proteinler ve lipidler bulunmaktadır (Şekil 2.2). Biyofilmin yapısındaki makromoleküllerin oranları, biyofilmi oluşturan organizmaların çeşitliliğine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca biyofilmin fizyolojik özellikleri, biyofilmin olduğu ortamın doğası ve fiziksel koşulları da makromolekül oranlarını etkilemektedir. Biyofilmin yapısındaki matris, biyofilmin toplam kuru kütlelerinin yaklaşık %90'ını temsil ederken, mikroorganizmalar sadece %10'unu oluşturmaktadır (Flemming ve Wingender, 2010). Doğal ortamda biyofilm tek bir bakteri türünden de oluşabilir, ancak çoğu durumda biyofilm içinde arkeler, protistler, virüsler ve funguslar da dahil olmak üzere birçok tür bir arada bulunur (Fanning ve Mitchell, 2012).



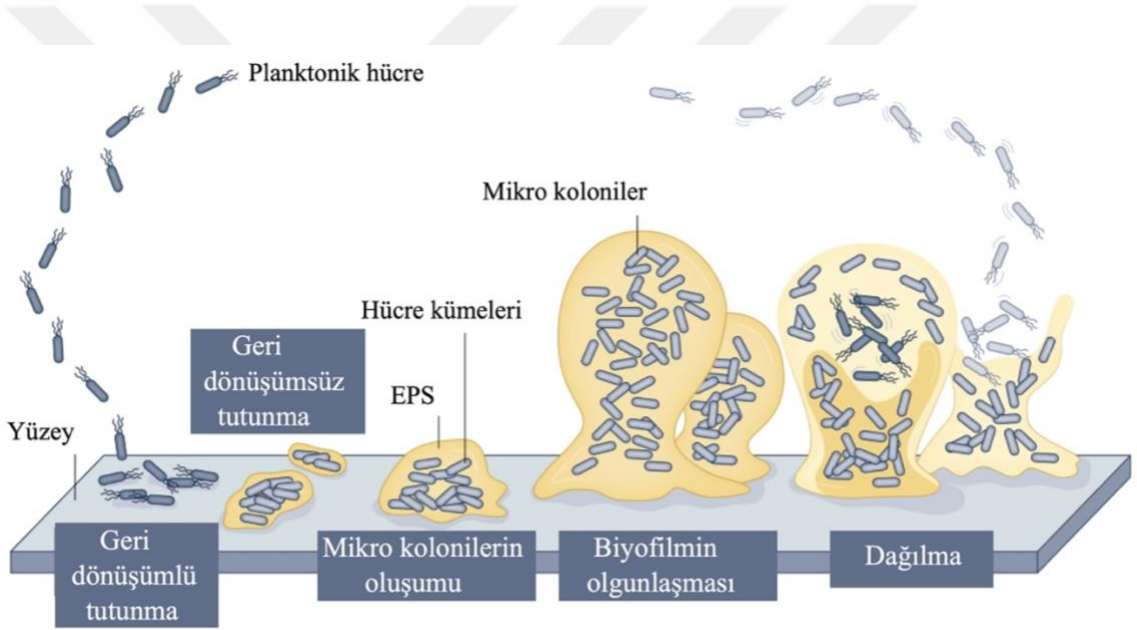
Şekil 2.2: Biyofilm matrisinin şematik gösterimi; Katı bir yüzeye tutunmuş bakteriyel biyofilm modeli (a), EPS matrisinin bileşimi ve ana bileşenlerinin işlevleri (b) (Flemming ve Wingender (2010) ve Pinto ve diğ. (2020) literatürlerinden düzenlenmiştir).

2.3.1.1. Biyofilmin Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu, beş ana aşamada gerçekleşen bir dizi fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreci içeren karmaşık bir olgudur (Şekil 2.3):

1. **Geri dönüşümlü tutunma:** Planktonik bakteriler yüzeye temas etmeden önce, organik makromoleküller ve iyonlar gibi ortam unsurları yüzeye adsorbe olarak yüzeyde heterojen bir film oluştururlar (Rouvre, 2016). Mikroorganizmalar, organik maddelerce zengin

filmin oluşması ile hazır hale gelen yüzeye doğru, çökelme, Brown hareketi, sıvı akımları ve hatta flagella gibi çeşitli hücre yapıları sayesinde hareket ederler (Van Loosdrecht ve diğ., 1995). Yüzeyden onlarca nanometre uzakta bakteriler, pasif partiküller gibi davranırlar ve sonrasında, elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler, Van der Waals kuvveti ve asit-baz etkileşimleri gibi etkiler sayesinde malzeme yüzeyiyle ilk temaslarını gerçekleştirirler (Costerton ve diğ., 1995; Schwarz ve Safran, 2013). Bu ilk aşamadaki tutunma biçimi, yüzeye yeni yaklaşan planktonik mikroorganizmaların daha önce yüzeye tutunmuş mikroorganizmalar ile geçici ilişkiler kurduğu, geri dönüşebilir bir tutunmadır (Katsikogianni ve diğ., 2004). Bu tutunma fiziksel temasın başlangıç aşamasıdır ve zamandan bağımsızdır.



Şekil 2.3: Biyofilm oluşum aşamaları; İlk bağlanma ve geri dönüşümlü tutunma (1), geri dönüşümsüz tutunma (2), mikro kolonilerin oluşumu (3), biyofilmin olgunlaşması (4), dağılma (5) (Sauer ve diğ., 2022).

- 2. Geri dönüşümsüz tutunma:** Bu aşama, belirli bir enerji bariyerinin aşılmasıyla, yüzey ile bakteri arasındaki çekici kuvvetlerin itici kuvvetlerden daha büyük olduğu ve mikrobiyal hücrelerin yapışmasının geri döndürülemez hale geldiği aşamadır. Bu aşamada hücrelerin yüzeye tutunması, zamana bağımlı ve geri döndürülemez moleküler ve hücresel bir yapışmadır (Katsikogianni ve Missirlis, 2004).

3. **Mikro kolonilerin oluşumu:** Yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunan bakteriler, sudaki ve yüzeydeki besinleri kullanarak çoğalır, birikir ve EPS üretirler. Daha sonra materyalin yüzeyinde, biyofilm öncüsü olan mikro koloniler oluştururlar.
4. **Biyofilmin olgunlaşması:** Bu aşamada bakteriler yüzeye ve bütüne yapışan yeni hücrelerle sürekli olarak büyür ve çoğalır. Bu aynı zamanda diğer mikroorganizmaların katılımını ve ardından farklı türler arasında simbiyotik bir ilişkinin gelişmesini sağlamaktadır. Bu simbiyoz, “Quorum Sensing (QS)” adı verilen özel bir iletişim mekanizması sayesinde gerçekleşmektedir (Flemming ve Wingender, 2010). Hücre yoğunluğuna bağlı olarak, QS belirli genlerin ifadesini senkronize etmektedir. Biyofilm oluşturan hücrelerin kendileri tarafından salgılanan ve oto-indüktörler (AI’lar) olarak adlandırılan spesifik moleküler sinyallerin yoğunluğunun ölçümü ile çevrelerindeki mikroorganizmaların yoğunluğunu belirleyebilmekte ve bu verileri popülasyondaki diğer bakterilere ileterek haberleşebilmektedirler. Yani bu mekanizma, bakterilerin topluluk halindeki yaşam tarzını benimsemelerini sağlamaktadır (Luo ve diğ., 2022). Olgunlaşmış biyofilm uzaysal olarak yukarı doğru genişler ve mantar şeklinde üç boyutlu bir yapı ile karakterize edilir (Muhammed ve diğ., 2020). Yapısında hem besinlerin mikroorganizmalara verilmesini hem de atıkların boşaltılmasını kolaylaştıran kanallar bulunmaktadır (Guilhen ve diğ., 2017).
5. **Biyofilmin dağılması:** Biyofilm içindeki çevresel koşullar toksinlerin birikmesi, oksijen ve besin maddelerinin azalması nedeniyle elverişsiz hale geldiğinde, hücre dışı matris bozulmaya başlar ve biyofilm dağılmaya başlayarak hücrelerin serbest kalmasına neden olur. Serbest kalan bakteriler gelişimleri için daha elverişli olduğu diğer yüzeylere göç etmektedirler (Sauer ve diğ., 2022). Bunu sağlayacak hücre yapılarının (flagella gibi) meydana gelebilmesi için ihtiyaç duyulan protein salınımı artmaktadır. Biyofilmlerin dağılması için farklı stratejiler de mevcuttur. Matrisin bileşenlerinin sentezinin durdurulması, biyofilmdeki bakteri üyelerinin enzimatik aktiviteleri ile matrisin bozulması veya hatta matrisin farklı bileşenleri arasındaki kovalent olmayan bağların bozulması bu stratejilerden bazılarıdır (Otto, 2013). Ayrıca, birçok çalışma QS mekanizmasının biyofilmin dağılmasında rol oynayabileceğini de bildirmiştir (Guilhen ve diğ., 2017).

2.3.1.2. Biyofilm Oluşumunun Sonuçları

Mikroorganizmaların her yerde olması ve %99’unun da doğal olarak biyofilm yaşam tarzını benimsemesi, biyofilmlere tüm ekosistemlerde rastlanılmasına neden olmuştur. Bu mikrobiyal

iş birliği, hem sağlık hem de endüstriyel alanlarda ciddi olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Sağlık alanında karşılaşılan en önemli problem, biyofilm oluşturan bakterilerin antibakteriyel maddelere karşı daha dirençli hale gelerek enfeksiyonların ağır bir tabloda seyretmesine ve tedavilerinin güçleşmesine neden olmalarıdır (Gebreyohannes ve diğ., 2019). Diğer yandan, hastane ortamındaki idrar sondaları, kateterler, yapay havalandırma tüpleri, ortopedik protezler gibi farklı alet ve cihazlarda kolonize olma yetenekleri nedeniyle hastane enfeksiyonlarından da sorumludurlar (Donlan, 2001; Sanchez ve diğ., 2013).

Endüstriyel sistemlerde ise biyofilmin varlığı, farklı mikroorganizma çeşitliliği sayesinde kimyasal ve biyolojik reaksiyonların katalize edilmesi ile birlikte, başta ilgili ortamın şartlarını değiştirmesi sebebiyle istenmeyen bir durumdur. Dahası malzemelerin yüzeyinde biyofilm oluşumu, özellikle de mikrobiyal kaynaklı korozyona neden olmaktadır (Xu ve diğ., 2017). Biyofilmler, liman tesisleri (Aktaş ve diğ., 2017), havacılık yakıt sistemleri (Dai ve diğ., 2016), gaz ve petrol endüstrisi (Videla, 2002), su sistemleri (Rhoads ve diğ., 2017), nükleer atık depolama tesisleri (Forte Giacobone ve diğ., 2011) olmak üzere birçok farklı endüstriyel sektördeki ekipman ve altyapıda mikrobiyolojik korozyon hasarına neden olmaktadır.

2.3.2. Korozyon

Korozyon, genellikle metal veya alaşım olan bir malzeme ile çevresi arasında, malzemenin ve özelliklerinin bozulmasına neden olan kimyasal veya elektrokimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanır. Korozyon olayı, abiyotik ve biyotik koşullar altında, kimyasal ve elektrokimyasal olarak gerçekleşebilmektedir (Hamilton, 1985; Revie ve Uhlig, 2008). Kimyasal korozyon, metalin elektrolit etkisi olmayan (yüksek sıcaklıktaki havada oksidasyon, sıvı metallerde çözünme vb.) bir ortam ile reaksiyona girdiği süreçtir. Elektrokimyasal korozyon ise metalin bir elektrolit içinde çözünerek metal katyonları oluşturduğu süreçlerdir ve bu süreçler, elektrik yükünün metal/çevre arayüzü boyunca aktarılmasını ifade eder (Cragnolino, 2020).

2.3.2.1. Abiyotik Koşullarda Elektrokimyasal Korozyon

Korozyon, eş zamanlı olarak meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları yoluyla elektronların transferini içeren elektrokimyasal bir süreçtir. Elektrokimyasal bir korozyon olayının gerçekleşebilmesi için üç temel koşulun bir araya gelmesi gerekmektedir:

1. Anot ve katot bölgeleri (metal) bulunmalıdır.
2. Anot ve katot arasında potansiyel farkı olmalıdır.

3. Anot ve katodu birleştiren elektriksel iletken bir yol (akım yolu) bulunmalıdır. Metallerin temas halinde olduğu ve elektronların iki elektrot arasında akışını sağlayan sulu ortam elektrolittir. Metalin elektrolite maruziyeti korozyon reaksiyonunu başlatmaktadır.

Korozyon sırasında, anodik (elektron veren, yükseltgenme) ve katodik (elektron alan, indirgenme) reaksiyonlar birlikte meydana gelir. Anodik reaksiyonlar sonucunda metal atomlar negatif yüklerini kaybederek pozitif yüklü metal iyonlarına dönüşmektedirler. Anodik reaksiyonlar (Denklem 2.1), elektron üretmekte ve bu elektronlar metal yüzeyinde birikmektedir (Hamilton, 1985).



Anodik reaksiyon sonucu açığa çıkan elektronlar, katodik bir reaksiyonda kullanılır. Korozyonun devam edebilmesi, anotta salınan elektronların, potansiyelin daha negatif olduğu katoda hareket ederek orada tüketilmesine bağlıdır. Elektrolit ortamın pH derecesine ve elektrolit içinde çözülmüş O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak farklı katodik reaksiyonlar meydana gelmektedir (Hamilton, 1985). Bu reaksiyon tiplerinin başlıcaları aşağıda verilmiştir (Denklem 2.2 - 2.6):

1. Nötral ve çözülmüş oksijenin bulunduğu ortamlardaki katodik reaksiyon, su içinde çözülmüş oksijenin elektron alarak hidroksil iyonu haline dönüşmesi şeklinde yürür (Yalçın ve Gürü, 2010).



2. Asitli ve çözülmüş oksijenin bulunduğu ortamlarda, çözülmüş oksijen katodik reaksiyonda yer alır ve su molekülüne indirgenir.



3. Anaerobik bir ortamda, katot öncüsü olarak oksijenin yerini hidrojen iyonları veya su alır (Videla, 1996). Bu durumda, oksijensiz bir ortamda protonlar katodik reaksiyona katılarak önce atomik, sonra moleküler hidrojen oluşturabilirler (Denklem 2.4) (Hamilton, 1985).



4. Metal iyonları katodik reaksiyonda yer alarak metal iyonlarına indirgenebilir.



5. Metal iyonları katodik reaksiyonda yer alarak metal atomlarına indirgenebilir



En yaygın katodik reaksiyonlar, hidrojen ortaya çıkışı ve oksijenin indirgenmesidir. Sulu çözeltiler her zaman H^+ iyonu içerirler. Çözeltinin pH değeri ne kadar düşük olursa, ortamdaki H^+ iyonlarının konsantrasyonu da o kadar yüksek olur ve bunun sonucunda katodik reaksiyon yoluyla hidrojen salınımı kolaylaşır. Anodik ve katodik reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler genellikle reaksiyona girerek korozyon ürünlerini oluştururlar (Iverson, 1987).

2.3.2.2. *Biyotik Korozyon*

Biyotik korozyon, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri varlığında meydana gelen korozyon reaksiyonları ile metalin bozulmasıdır (Hadley, 1948). Elektrokimyasal korozyon, biyotik korozyon için de geçerliliğini korumaktadır, ancak mikroorganizmaların bu olaydaki işlevini değerlendirmek güçtür (Ford ve Mitchell, 1990; De Bruyn, 1992). Temelde korozyonda olayına biyotik katılımın iki temel özelliği bulunmaktadır (Videla, 1996). Bunlar;

1. Metabolik aktiviteleri sebebiyle, metal/çözelti ara yüzünde değişikliğin gerçekleşmesi ile doğrudan etkileri,
2. Kimyasal olarak reaktif ürünleri salgılamaları ile dolaylı etkileridir.

2.4. MİKROBİYOLOJİK OLARAK DESTEKLENEN KOROZYON (MIC)

Biyotik koşullar altında gerçekleşen metal korozyonunda mikroorganizmalar, metal ile elektrolit ara yüzündeki ortamı değiştirerek, anodik ve/veya katodik reaksiyonları başlatabilir veya var olan korozyonun şiddetini arttırabilirler (Ford ve Mitchell, 1990). Bu korozyon tipi “Mikrobiyolojik olarak desteklenen korozyon (Microbiologically Influenced Corrosion - MIC)” olarak tanımlanmaktadır (Kip ve A van Veen, 2015; Natarajan, 2013). MIC kavramı ilk kez, 100 yıldan uzun süre önce Gaines (1910) tarafından öne sürülmüştür. İlerleyen yıllarda farklı endüstriyel sektörlerdeki araştırmacılar ve uygulayıcılar arasındaki farkındalığın artması ile daha iyi bilinen bir kavram haline gelmiştir. Flemming (1996) tarafından yapılan tahminlere göre, korozyonun neden olduğu hasarın neredeyse %20’si MIC kaynaklıdır.

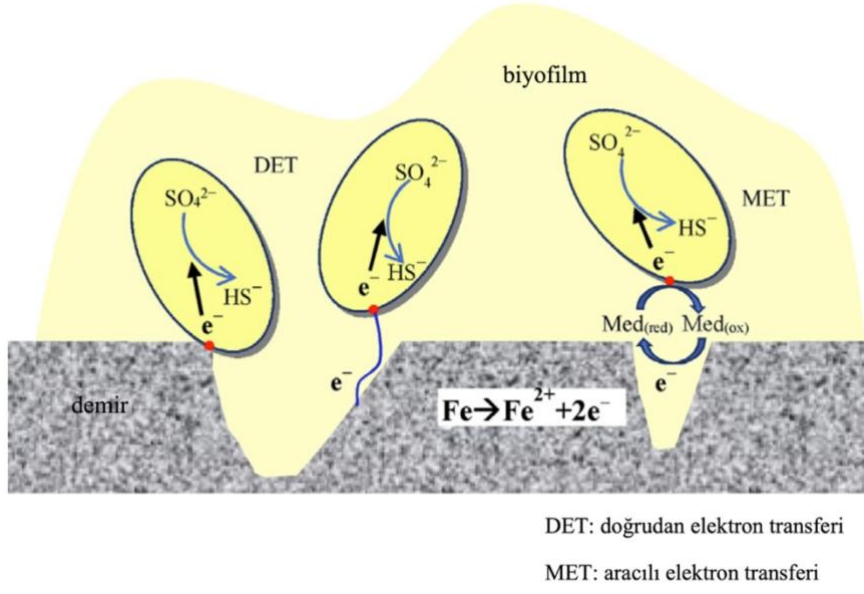
MIC, metalin mikroorganizmaların varlığında elektrolitik bir ortama daldırıldığı elektrokimyasal korozyonun bir özelliğini temsil eder (Féron ve diğ., 2002). Aslında, mikroorganizmalar doğrudan veya metabolizmaları sonucu ortaya çıkan maddeler aracılığıyla etki gösterebilirler. MIC'i başlatmak için mikroorganizmaların varlığına ek olarak, bir karbon kaynağının, elektron vericisinin, elektron alıcısının ve elektrolitin varlığı zorunludur (Javaherdashti, 2017).

2.4.1. MIC Mekanizmaları

MIC, farklı mekanizmalarla hareket eden ve ortamdaki oksijenin varlığı ya da yokluğuna bağlı olarak çeşitli mikroorganizma türlerini içeren karmaşık bir süreçtir. Anaerobik koşullar altında, bu mekanizmalar Gu (2012) tarafından üç tipte kategorize edilmiştir: tip I, tip II ve tip III. Tip I ve II elektrokimyasaldır ve sırasıyla hücre dışı elektron transferi ile MIC (Extracellular Elektron Transfer- MIC, EET-MIC) ve metabolit ile MIC (Metabolite-MIC, M-MIC) olarak adlandırılır. Öte yandan, Tip III elektrokimyasal değildir ve biyodegradasyon ile MIC (Biodegradation-MIC, BD-MIC) olarak bilinir. Öte yandan, aerobik koşullar altında, bilinen mekanizmalar şunlardır:

2.4.1.1. Hücre Dışı Elektron Transferi ile MIC (EET-MIC)

Literatürde biyofilm olgunlaştığında kütle transferini engelleyerek ciddi karbon kaynağı eksikliği durumuna neden olduğu, bunun da hücreleri hayatta kalmaları için gerekli enerjiyi çekmek üzere enerjik bir metale doğru hareket etmeye ittiği belirtilmektedir (Gu ve diğ., 2019; Li ve diğ., 2015). Aslında EET-MIC, elektron donörü olarak elementel demir kullanan ve mikrobiyal solunum için gerekli bir elektron transfer süreci olarak tanımlanabilir. Demir oksidasyonundan kaynaklanan hücre dışı elektronlar, duvar boyunca sülfat nitrat gibi bir elektron alıcısının indirgeneceği sitoplazmaya taşınır. Bu reaksiyon hücre içi enzimlerin müdahalesini gerektirir (Huang ve diğ., 2018; Jia ve diğ., 2017). Elektron transferi, araçlar kullanılarak doğrudan veya dolaylı bir yolla yapılabilir (Unsal ve diğ., 2019) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Doğrudan ve dolaylı elektron transferi (Li ve diğ., 2018).

Doğrudan elektron transferi durumunda, mikroorganizmalar kendilerini doğrudan materyalin yüzeyine bağlayarak, elektronların hücre duvarından geçişini sağlayabilir ve sitokrom c oksidaz gibi spesifik enzimler sayesinde hücre içine, sitokroma nüfuz etmelerini sağlayabilir (Gu ve diğ., 2019). Elektronların doğrudan transferi, bazı bakterilerde iletken pili olan spesifik nano tellerin kullanılmasıyla da sağlanabilir (Logan, 2019). Öte yandan, dolaylı yolda, mikroorganizmalar elektron transferini sağlamak için riboflavin veya flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi aracı moleküller kullanmaktadır (Zhang ve diğ., 2015).

Yakın zamanda, Huang ve diğ. (2018) elektron transfer aracı molekülü fenozin-1-karboksamidi kodlayan phzH geninin MIC sürecini düzenlemede sorumlu olduğunu ilk kez göstermeyi başarmış ve böylece EET-MIC'in *P.aeruginosa* bakterisinde korozyonun “darboğazı” olduğunu kanıtlamıştır. Aynı bağlamda, başka bir çalışma, hücre dışı elektron transfer sürecindeki ara molekülleri kodlayan phzM ve phzS genlerinden yoksun *P.aeruginosa* mutantlarında korozyon oranının %48 oranında azaldığını göstermiştir. Karbon eksikliğinde, *P. aeruginosa*'nın elektron donörü olarak elementel demir kullandığını ve diğer yandan EET-MIC yoluyla daha şiddetli korozyona neden olduğunu rapor etmiştir (Huang ve diğ., 2020).

2.4.1.2. Metabolit-MIC (M-MIC)

M-MIC, mikroorganizmalar tarafından salgılanan metabolitlerin neden olduğu bir mikrobiyal korozyon türüdür. Bu aşındırıcı metabolitler protonlar, organik asitler ve hatta sülfidler olabilir (Li ve diğ., 2018). EET-MIC'in aksine M-MIC, biyokatalizörlerin varlığını gerektirmez. Bu durumun en tipik örneği, asit üreten bakterilerin (acid producing bacteria, APB'lerin) enzimlerin aracılığı olmadan doğrudan metalin dış yüzeyine saldıran protonlar ile korozyona sebep olmalarıdır (Li ve diğ., 2018). Ayrıca, anaerobik solunum da M-MIC'e yol açabilecek diğer bir potansiyel metabolizma olarak kabul edilmektedir. Örneğin, sülfat indirgeyen bakteriler (SRB) anaerobik solunum sürecinde sülfid üreterek bakırın korozyonuna yol açmaktadırlar (Jia ve diğ., 2019; Dou ve diğ., 2020). Bakterilerin yanı sıra funguslar da bu tür M-MIC'e neden olabilirler. Nitekim Dai ve diğ. (2016), *Aspergillus niger* tarafından oluşturulan biyofilmlerin organik asitlerin salgılanması yoluyla M-MIC'i indüklediğini bildirmiştir.

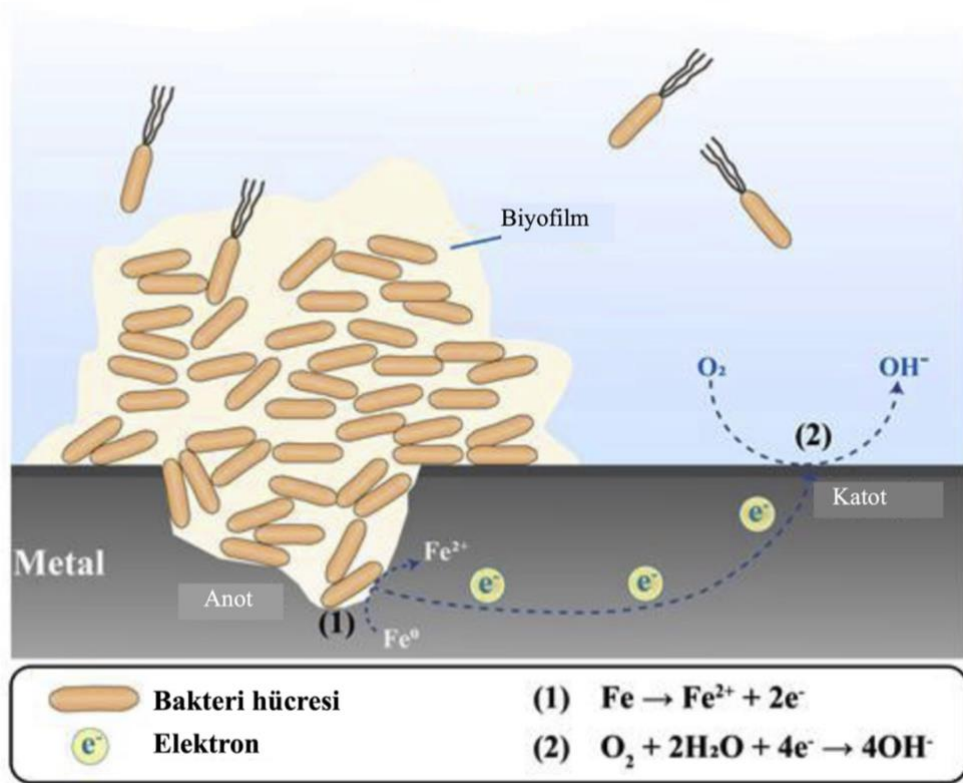
2.4.1.3. Biyodegradasyon-MIC (BD-MIC)

BD-MIC, plastikleştiriciler ve polimerler gibi organik maddelere saldıran mikroorganizmalardan kaynaklanır (Jia ve diğ., 2018). BD-MIC mekanizması, mikroorganizmaların besin olarak kullanılacak küçük organik molekülleri üretmek için salgıladıkları enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu mekanizma hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalarda benimsenmiştir. Mikrobiyal korozyon alanındaki araştırmacıların çoğu metalik malzemelere odaklanmaktadır, bu nedenle BD-MIC ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır (Jia ve diğ., 2019).

2.4.1.4. Oksijen Varlığındaki Mekanizmalar

Aerobik koşullardaki mikrobiyal korozyon sürecinde, oksijen çoğunlukla son elektron alıcısı rolündedir. Üstelik, oksijen varlığındaki mikrobiyal korozyon, metal oksitleyici bakteriler ve özellikle de demir okside eden bakteriler (iron oxidizing bacteria, IOB'ler) ve mangan okside eden bakteriler (manganese oxidizing bacteria, MOB'ler) gibi farklı mekanizmaları benimseyen çeşitli mikroorganizma türlerini içerir. Bu bakteriler, enerji üretimi için son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanarak sırasıyla, demir iyonlarının ferrik iyonlara ve Mn(II)'nin Mn(IV)'e oksidasyonunu katalize ederler (Wang ve diğ., 2014; Linhardt ve diğ., 2010).

Doğada çoğu zaman, biyofilm içerisinde farklı bakteri türleri bir arada bulunmaktadır. Biyofilmdeki IOB'lerin yanı sıra MOB'lerin de oksijeni tüketmesiyle, biyofilmin altında özellikle de SRB'nin gelişebileceği oksijensiz veya düşük oksijen konsantrasyonlu bölgeler oluşmaktadır (Jia ve diğ., 2019). Sonuç olarak, bu bölgeler lokal korozyona yol açan bir anot gibi davranır. Öte yandan, oksijen içeriğinin daha yüksek olduğu ve mikrobiyal popülasyonun daha az yoğun olduğu veya hiç bulunmadığı bölgeler katot gibi davranmaktadır (Şekil 2.5). Bunun sonucunda iki bölge arasında son elektron alıcısı olarak oksijen ile bir elektron akışı oluşur (Skohvus ve diğ., 2017). Bu mekanizma “oksijen konsantrasyon hücresi” olarak adlandırılır. Literatürde bu mekanizmanın, başta *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere bazı bakterilerde metallerin ve alaşımların korozyon hızının artmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Abdolahi ve diğ., 2015).



Şekil 2.5: *P.aeruginosa* biyofilminin oksijen konsantrasyon hücresi oluşturma mekanizması yoluyla neden olduğu çukurlaşma korozyonunun şematik gösterimi (Jia ve diğ., 2019).

2.4.2. Uçak Alüminyum Alaşımları İçin Önerilen MIC Mekanizmaları

Uçak alüminyum alaşımlarının mikrobiyal korozyon sürecini açıklamak için farklı mekanizmalar önerilmiştir: (1) oksijen konsantrasyon hücresi, (2) organik asitler ve (3) hücre dışı enzim aktivitesi (Nelson ve diğ., 2017).

2.4.2.1. Oksijen Konsantrasyon Hücresi

Bölüm 2.4.1.4'te de anlatılan “oksidasyon konsantrasyon hücresi” (Şekil 2.5) mikrobiyal yüzey filmini ve kolonizasyonu destekleyerek, mikroorganizmaları koruma ve besleme işlevini farklı endüstriyel uygulamalarda sağlamaktadır. Uçaklardaki yakıt tanklarında aerobik funguslar çoğalır ve oksijen konsantrasyon hücreleri oluşturarak, anaerobik SRB'lerin bulunmasına olanak sağlar (Miller ve diğ., 1964; Iverson ve diğ., 1967). Tekdüze olmayan bakteri kolonizasyonu, diferansiyel havalandırma hücresinin oluşmasıyla birlikte yerel anot ve katot bölgelerine neden olur. Aerobik ortamda, solunum yapan kolonilerin altındaki alanlar anodik reaksiyona (metal çözünmesi) dönüşürken, çevredeki alanlar katodik (oksijen indirgeme reaksiyonu) hale gelir (Wagner ve Little, 1993).

2.4.2.2. Organik Asitler

Alüminyum alaşımlarının mikrobiyal korozyonuyla ilgili bir diğer mekanizma ise mikrobiyal metabolizma sonucu organik asitlerin üretilmesidir. Çoğu heterotrofik bakteri, organik substratların fermantasyonu sırasında organik asitler salgılar. Asitlerin türü ve miktarı mikroorganizmaların türüne ve mevcut substrat moleküllerine bağlıdır. Asidik metabolitlerin etkisi, biyofilm/metal arayüzünde tutulduklarında yoğunlaşır Organik asitler korozyonun meydana gelme eğiliminde bir değişikliğe neden olabilir.

2.4.2.3. Enzimatik Aktivite

Enzimatik aktivitenin önemi, korozyon ürünlerinin oluşumu ile kanıtlanmıştır ve alüminyum alaşımlarının mikrobiyal korozyonunu açıklamadaki en önemli süreçlerden biri olarak kabul edilmiştir. Hedrick ve diğ. (1969) mikroorganizma büyümesinde magnezyum iyonlarının önemi göz önüne alındığında, alüminyum alaşımlarındaki farklı magnezyum içeriklerinin saldırı derecesini karşılaştırarak belirli metalik atomların dönüşümünün veya çözünmesinin hücre dışı enzimin varlığına bağlanabileceğini bulmuşlardır. Çalışma, enzimatik aktivitenin önemini ortaya koymak adına özellikle önemlidir. Başka bir örnek olarak katalaz mekanizması da verilebilir. Bakteriler reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini ve olumsuz etkilerini

önlemek için spesifik mekanizmalar geliştirmiştir. Katalazın, oksidatif strese karşı bakteriyel hücre tepkisinin ayrılmaz bir bileşenidir ve süperoksit dismutaz ve alkil hidroperoksidazlarla birlikte, su ve oksijene ayrışmasını katalize ederek hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin birikimini sınırladığı düşünülmektedir (Lai ve Bergel, 2000). Yüzey oksitlerinin bileşimine bağlı olarak peroksitin elektro-indirgenmesi engellenebilir.

2.4.3. MIC'den Sorumlu Mikrobiyal Gruplar

Çeşitli mikrobiyal gruplar, farklı mekanizmalar kullanarak mikrobiyal korozyona dahil olmaktadır. Bakteriler, MIC ile ilgili en yaygın çalışılan mikrobiyal gruptur. Bunların arasında, sülfat indirgeyen bakteriler (suphate reducing bacteria, SRB'ler), nitrat indirgeyen bakteriler (nitrate reducing bacteria, NRB'ler), IOB'ler ve MOB'ler ile asit ve ekzopolimer üreten bakteriler bulunmaktadır (Lv ve Du, 2018; Jia ve diğ., 2018). Bununla birlikte, çalışmalar fungusların yanı sıra alglerin de metabolik faaliyetleri yoluyla mikrobiyal korozyonu başlatabileceğini veya hızlandırabileceğini bildirmiştir (Little ve Lee, 2007; Liu ve diğ., 2018a; Dong ve diğ., 2020).

2.4.3.1. Sülfat İndirgeyen Bakteriler (SRB'ler)

SRB'lerin çoğu zorunlu anaerobik bakteriler kategorisinde sınıflandırılmakta ve bazıları da fakültatif anaerobik olabilen ve bu nedenle de büyümeleri ve metabolik aktiviteleri için oksijen varlığına ihtiyaç duymayan bakterilerdir ve son elektron alıcısı olarak sülfatı kullanırlar (Javaherdashti, 2017). Aslında, SRB'ler organik bir bileşiğin oksidasyonu yoluyla sülfatın sülfüre indirgenmesi için elektron üretirler. SRB biyofilmi, organik karbon kaynağında bir eksiklik durumunda, sesil SRB'lerin organik karbonu bir elektron vericisi olarak elemental demir ile değiştirme yetenekleri sayesinde daha aşındırıcı hale gelmektedir (Xu ve diğ., 2014). SRB'lerin metabolik aktivitesi korozyona neden olabilmektedir. SRB'lerin MIC mekanizması, 1934 yılında ilk defa, Von Wolzogen Kühr ve Van der Vlugt tarafından önerilen “katodik depolarizasyon teorisi” ile açıklanmıştır (Von Wolzogen Kühr ve Van Der Vlugt, 1934). Bu mekanizma, katodik reaksiyondan kaynaklanan hidrojeni tüketen ve katalizör rolü oynayan hidrojenaz enziminin etkisine dayanan bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (Barton ve Hamilton, 2007). Sonraki yıllarda geniş çapta tartışılarak sorgulanmış ve yerini oksitlenmiş sülfür bileşiklerinin indirgenmesinden kaynaklanan oldukça toksik hidrojen sülfür (H_2S) üretiminin yanı sıra, demir sülfür (FeS) çökmesinden oluşan alternatif süreçler almıştır (Javaherdashti, 2011). SRB biyofilminin varlığında metal korozyonu sırasında gerçekleşen

elektrokimyasal reaksiyonlar, sülfatın bir elektron alıcısı olarak kullanılmasıyla katotta biriken atomik hidrojenin tüketilmesi ve sülfüre indirgenmesinden oluşur. Ayrıca, SRB'lerin metabolik aktivitesinden kaynaklanan sülfid üretimi ve anodik çözünmeden kaynaklanan demir iyonları, aşağıdaki reaksiyonlara göre FeS ve Fe(OH)₂ korozif çökeltilerinin oluşumuna yol açar. Bu süreçler temelde aşağıdaki reaksiyonlar ile açıklanabilir (Denklem 2.7 - 2.13):

Sulu ortama yerleştirilen demirdeki başlangıç reaksiyonları (Denklem 2.7-2.9):



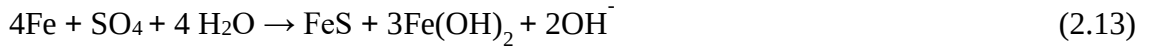
Bakteriyel etkileşim (Denklem 2.10):



Korozyon ürünleri (Denklem 2.11 ve 2.12):



Toplam reaksiyon (Denklem 2.13):



SRB'ler, özellikle gaz ve petrol endüstrisinde, mikrobiyal korozyona en çok karışan mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir (San ve diğ., 2012; Li ve diğ., 2018). Ayrıca, çeşitli çalışmalar SRB'lerin çok çeşitli çelikler ve alüminyum alaşımları da dahil olmak üzere çeşitli alaşımlar üzerindeki korozif etkisini rapor etmiştir (Guan ve diğ., 2017; Liu ve Cheng, 2020; Wasim ve Djukic, 2020; Xi ve diğ., 2020). SRB'ler çok sayıda cins içermesine rağmen, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacterium*, *Desulfovibrio* ve *Desulfopila* cinsleri korozyon fenomenine en çok dahil olan cinslerdir (Li ve diğ., 2018; Liu ve diğ., 2018a).

2.4.3.2. Nitrat İndirgeyen Bakteriler (NRB'ler)

NRB'ler fakültatif anaerobik olabilen birkaç istisna dışında çoğunlukla zorunlu anaerobik bakterilerdir. Bu tür bakteriler nitratı nitrit veya amonyuma indirgeme yeteneğine sahiptir (Yu ve diğ., 2020). Çoğu zaman toprak, büyük miktarda nitrit ve NRB'leri içerir ve bu, doğal nitrojen döngüsünden, nitrojen gübrelerinin varlığından ve ayrıca biyolojik nitrojen fiksasyonundan kaynaklanır (Roco ve diğ., 2016; Chu ve diğ., 2017). Petrol endüstrisinde, SRB'lerin neden olduğu korozyon ile mücadele edebilmek için en çok kullanılan yöntemlerden biri, tanklara nitrat enjeksiyonu sayesinde SRB'ler ile rekabet etme yetenekleriyle bilinen NRB'lerin büyümesinin teşvik edilmesidir. Bununla birlikte, mikroorganizmalar tarafından katalize edilen nitratın indirgenmesiyle birlikte, demirin oksidasyonunun termodinamik olarak daha elverişli hale geldiği ve dolayısıyla NRB'leri daha korozif hale getirdiği ortaya çıkmıştır (Xu ve diğ., 2013). SRB'lerin aksine, NRB'lerin neden olduğu korozyon üzerine çok az çalışma yapılmıştır ve bunların çoğu anaerobik koşullar altında gerçekleştirilmiştir (Gieg ve diğ., 2011; Halim ve diğ., 2011). Bu çalışmalardan birinde Yuk ve diğ. (2020), petrol sahalarından izole ettikleri bir NRB olan *Marinobacter* YB03'ün karbon çeliğindeki şiddetli çukurcuk (pitting) korozyonundan sorumlu olduğunu rapor ederken, Pu ve diğ. (2020) ise tipik bir NRB olarak kabul edilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın, deniz suyu ile hazırlanmış ve oksijeni uzaklaştırılmış LB-NO₃ besiyerine maruz bırakılan bakırın çukurcuk (pitting) ve düzgün (üniform) korozyonundan sorumlu olduğunu ve bunun NRB'lerin EET-MIC mekanizmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

2.4.3.3. Demir Okside Eden Bakteriler (IOB'ler)

IOB'ler veya diğer bir deyişle ferrobakteriler, büyümeleri için gerekli enerjiyi elde etmek amacıyla, demir içeren ortamlardaki demir iyonlarının (Fe⁺²) ferrik iyonlara (Fe⁺³) oksidasyonunu katalize eden aerobik bir bakteri grubudur (Denklem 2.14, 2.15). Bu işlem, son elektron alıcısı olarak oksijen kullanılarak gerçekleştirilir (Emerson ve Moyer, 1997):



Bu şekilde oluşan demir hidroksit az çok jelatinimsi bir yapıya sahiptir, metal yüzeyinde çökeler ve korozyon potansiyelini arttırarak lokal çukurcuk (pitting) korozyonuna neden olur. Nitekim Yue ve diğ. (2019), *Pseudomonas* sp.'nin korozif davranışını ve mekanizmasını araştırdıkları

çalışmalarında, deniz suyuna daldırılmış ve ferro-oksidatif suşa maruz bırakılan X65 karbon çeliğinde korozyonunun hızlanarak yüzeyde oyuk oluşumu neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Ek olarak literatürde, doğal biyofilmlerde IOB ve SRB'lerin bir arada bulunarak sinerjik ilişki içinde oldukları rapor edilmiştir. Lv ve diğ. (2019) tarafından, IOB ve SRB'lerin varlığında deniz suyuna maruz bırakılan X65 karbon çeliğinin korozyon davranışını incelendiğinde, IOB'ler tarafından tüketilen oksijenin, anaerobik SRB'lerin büyümesini hızlandırdığı ve ortamda bulunan iki bakteri grubunun, metalin korozyon şiddetini arttırdığı belirlenmiştir.

2.4.3.4. Mangan Okside Eden Bakteriler (MOB'ler)

Mn(II)'nin Mn(IV)'e oksidasyonunu katalize etme ve mangan dioksit (MnO_2) biriktirme yetenekleri ile karakterize edilen aerobik bir bakteri grubudur (Linhardt, 2010). Mikrobiyal korozyonda rol oynadığı bilinmektedir. Bu tez çalışması ile ulaşılması planlanan temel hedef arasında, MOB'lerin mikrobiyal korozyonda aldığı rolün araştırılması bulunduğu için MOB'ler Bölüm 2.5'te daha detaylı bir şekilde ele alınacaktır.

2.4.3.5. Asit ve Ekzopolimer Üreten Bakteriler

Mikroorganizmalar tarafından metallerin yüzeyinde ekzopolimerlerin ve organik asitlerin üretilmesi, biyofilm/metal ara yüzeyindeki elektrokimyasal koşulların değiştirilmesine yol açan anodik ve/veya katodik reaksiyonları etkileyebilir. Biyofilm, içeriğindeki EPS ile çeliklerin lokal korozyonunda rol oynamaktadır. Biyomolekül düzeyinde büyük çeşitlilikleri sayesinde EPS'lerin, katyonları metal yüzeyine sabitlemelerine izin veren bir elektronegatifliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Flemming, 2011; Ma ve diğ., 2020). Bu nedenle EPS, biyofilm ve metal arasında bir elektron taşıyıcısı olarak hareket edebilir. Böylece, redoks reaksiyonu katodun depolarizasyonuna yol açarak, elektron alıcılarının varlığında korozyonu hızlandırır (Beech ve Sunner, 2004). Ayrıca APB'lerin, biyofilm altındaki pH'ı düşüren organik asitlerin üretimi nedeniyle mikrobiyal korozyona dahil oldukları uzun zamandır bilinmektedir (Xu ve diğ., 2016). Nitekim Dong ve diğ. (2018) tarafından, *Acidithiobacillus caldus* SM-1 bakterisinin, biyofilm altında agresif asitlerin üretilmesi sonucu metal yüzeyindeki pasif filmin çözülmesi nedeniyle yüksek korozyon direnci ile bilinen süper östenitik S32654 paslanmaz çeliğin yüzeyinde şiddetli koroziyon çukurluklarına neden olduğu bildirilmiştir.

2.4.3.6. *Funguslar*

Funguslar, özellikle sıcak ve nemli ortamlarda olmak üzere doğada her yerde bulunan ökaryotik mikroorganizmalardır. Fungusların mikrobiyal korozyona katılımını bildiren çalışmaların sayısı az olmakla birlikte (Jia ve diğ., 2019); bakır, karbon çeliği, paslanmaz çelik ve alüminyum gibi çeşitli metal türlerinin ve alaşımlarının korozyonunda rol oynamaktadırlar (Cojocar ve diğ., 2016; Lugaskus ve diğ., 2016). Nitekim Qu ve diğ. (2015), *Aspergillus niger*'in yapay deniz suyu çözeltisindeki magnezyum alaşımı AZ31B'nin korozyon davranışı üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında, *A. niger*'in metabolik aktivitesine bağlı olarak ortamın pH'ında güçlü bir düşüşe sebep oldukları ve alaşımların yüzeyinde çukurların oluşmasıyla korozyon hızını arttırdıklarını bildirmişlerdir. İlerleyen yıllarda yapılan başka bir çalışmada Qu ve diğ. (2017) ise *Trichoderma harzianum*'un belirli organik asitlerin üretimi nedeniyle aynı alaşımların korozyon sürecini hızlandırdığını göstermişlerdir. Ek olarak, doğal ortamlarda mantarların biyofilmdeki oksijeni tüketerek, SRB gibi anaerobik mikroorganizmaların büyümesine yardımcı olduğu ve korozyonu dolaylı olarak hızlandırdığı da bildirilmiştir (Usher ve diğ., 2014).

2.4.3.7. *Algler*

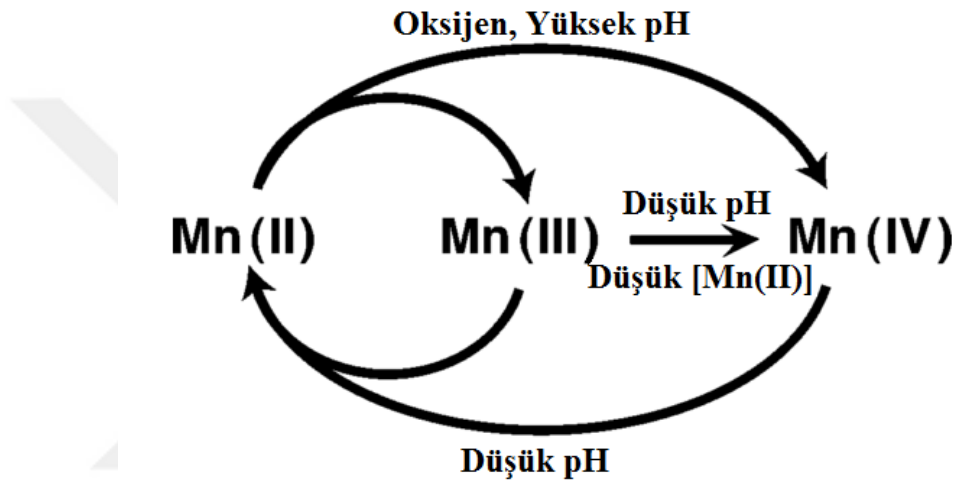
Algler, büyümeleri için oksijen ve ışığa ihtiyaç duyan fotosentetik mikroorganizmalardır. Alglerin fotosentetik süreci, oksijen üretimi ve pH değişimi yoluyla mikrobiyal korozyonda rol oynamaktadır (Javaherdashti ve diğ., 2009). Liu ve diğ. (2018b), *Chlorella vulgaris*'in 316L paslanmaz çelik üzerindeki etkisini incelemiş ve *C. vulgaris* hücrelerinin EPS'leri aracılığıyla birbirine ve paslanmaz çeliğin yüzeyine yapıştıklarını ve böylece 20 µm derinliğe ulaşan lokalize çukurcuk (pitting) korozyonuna neden olduklarını bildirmiştir. Dahası, gün boyunca *C. vulgaris*'in fotosentez yoluyla daha aktif olmaları ve oksijen üretmeleri sayesinde, biyofilm ve elektrolitteki çözünmüş oksijen konsantrasyonunda artışa yol açarak, katodik reaksiyonun hızlanmasına ve sonuç olarak da korozyon artışına neden oldukları rapor edilmiştir.

2.5. MANGAN OKSİDE EDEN BAKTERİLER (MOB'LER) VE MIC İLİŞKİSİ

2.5.1. Mangan ve Oksidasyonu

Mangan (Mn); yirminci element, beşinci metal ve yer kabuğunda oksidoredüktif aktiviteye sahip en bol bulunan geçiş metallerinden biri olarak kabul edilir. Mn, 0 ile +7 arasında değişen yedi farklı oksidasyon durumunda bulunur ve bunlar arasında Mn(II), Mn(III) ve Mn(IV) doğal

ortamlarda baskın olan Mn türleridir (Brouwers ve diğ., 2000). Bu üç değerlik arasındaki Mn döngüleri, biyotik veya abiyotik süreçlerdeki oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarını içerir (Elzinga, 2011). Kimyasal Mn(II) oksidasyonu termodinamik olarak mümkün olmasına rağmen pH değeri 8'in altında olduğunda reaksiyon hızı çok yavaştır (Hansel ve Learman, 2016). Bununla birlikte, nötr ortamlarda birçok mikroorganizma, Mn(II) oksidasyonunu kimyasal süreçten 4-5 kat daha hızlı gerçekleştirebilir. Bu nedenle doğal mangan oksitler öncelikle biyojeniktir (BioMnO_x).



Şekil 2.6: Manganın doğadaki oksidasyon hallerinin döngüsü (Tebo ve diğ., 2004).

Mn(II) oksidasyon mekanizması açısından bakıldığında, hem biyotik (enzimatik güdümlü) hem de abiyotiklerin (pH, radikaller ve alkalın metabolitler gibi kimyasal güdümlü) farklı mikroorganizmalar tarafından Mn(II) oksidasyonunu kolaylaştırdığı doğrulanmıştır. Bununla birlikte, mikrobiyal Mn(II) oksidasyonunun spesifik olarak fizyolojik rolü hala belirsizliğini korumaktadır. Mangan okside eden mikroorganizmalar (MOM'ler) arasında aside dirençli ve anaerobik olanların tanımlanması, fizyolojik gereklilik açısından mikrobiyal Mn(II) oksidasyonu ile ilgili olasılıkları arttırmaktadır. MOM'ler, bakteriler, funguslar ve algler de dahil olmak üzere filogenetik olarak çeşitlidir, ancak arkeler bu özellikleri açısından hiç rapor edilmemişlerdir. MOM'ler arasında en baskın grup bakterilerdir (Zhou ve Fu, 2020).

MOB'ler, yoğun olarak oksik ve anoksik ara yüzeylerde olmak üzere; ferromanganez nodüllerinden denizlere, volkanik taşlardan çöllere kadar geniş bir jeografik alana yayılmakla birlikte boru hatları, depolama tankları ve hidroelektrik santralleri gibi endüstriyel ortamlarda

da bulunmaktadırlar (Tebo ve diğ., 2005; Lane, 2005). *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria*'dan oluşan 4 farklı bakteri filumunda yer alarak, filogenetik olarak yaygınlık ve çeşitlilik gösteren bir topluluktur ve tipik suşları Tablo 2.3'te verilmiştir (Tebo ve diğ., 2005; Zhou ve Fu, 2020). Aerobik olarak üreyen bu bakterilerin tamamı heterotrofiktir. Bakterilerin neden Mn okside ettiği günümüzde hala aydınlatılamamış olup, konu üzerine farklı teorilerde bulunmaktadır (Tebo ve diğ., 2005). Bunlardan en yaygını, Mn'nin bakteriler tarafından okside edilerek enerji üretimi için kullanıldığı teorisidir. Ancak, bunu doğrudan kanıtlayan veriler eksiktir ve konu hala araştırma gerektiren açık bir alan olarak kabul edilmektedir.

Bakterilerin Mn oksitleme sistemleri, birçok açıdan çeşitlilik göstermekte ve mikrobiyal oksidasyon, redoks dengesi ve atık metabolizması gibi bir dizi karmaşık süreci içermektedir. Bakteriler, Mn oksidasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak gerçekleştirmektedirler. Doğrudan Mn oksidasyonu, bakteri türüne özgü olarak üretilen ptein ve polisakkarit gibi makromoleküller ile oksidasyonun katalizlenmesi yoluyla gerçekleştirilir (Ghiorse ve Hirsch, 1979; Beveridge, 1989; Okazaki ve diğ., 1997; Larsen ve diğ., 1999; Francis ve Tebo, 2001). Dolaylı Mn'nin oksidasyonunda ise bakteri, bulunduğu sulu ortamın koşullarını (pH değerleri, redoks dengesi vb.) değiştirerek ya da Mn'nin kimyasal oksidasyonuna neden olan metabolik ürünleri ortama salarak Mn oksidasyonuna yol açar (Richardson ve diğ., 1988; Hullo ve diğ., 2001). Mekanizmalar farklılık göstermekle birlikte, model mikroorganizma olarak kullanılan çoğu MOB türünde ortak olarak, Multicopper oxidase (MCO) ve MopA enzimlerinin oksidasyon sürecine katıldığı rapor edilmiştir.

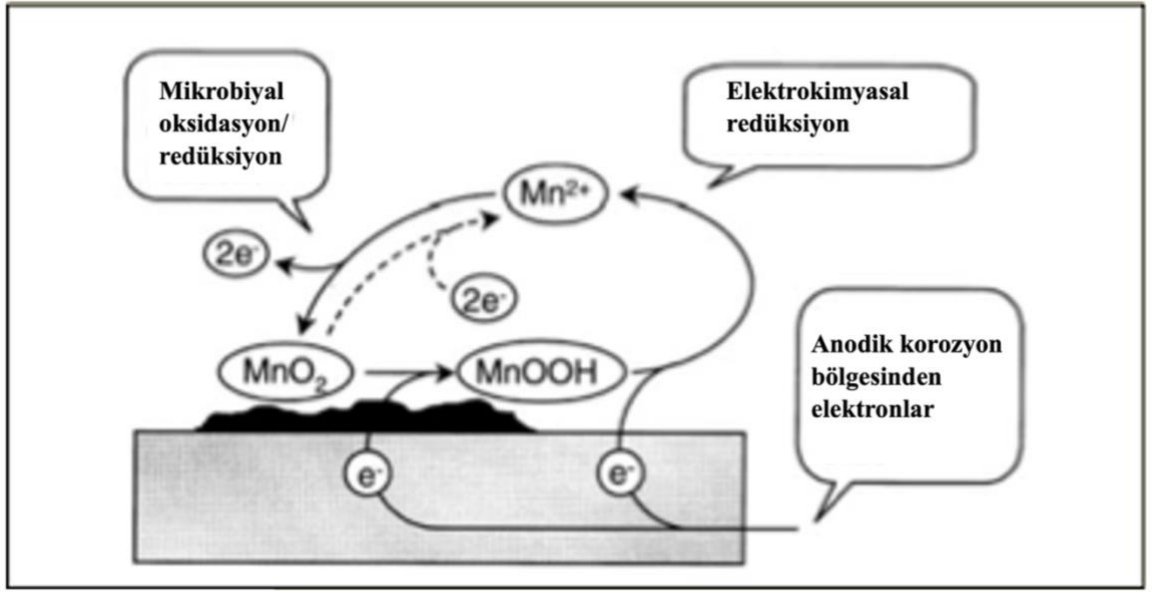
2.5.2. MOB'lerin İzolasyonu ve Mangan Oksit Varlığının Tespiti

2.5.3. MOB Korozyon Mekanizması

MOB'lerin korozyf etkisi öncelikle aerobik sulu ortamda metal yüzeyine tutunmalarına ve ardından çözünmüş Mn(II) iyonlarının varlığına bağlıdır (Linhardt, 2010). Bunların varlığında MOB'ler, Mn^{+2} iyonlarının oksidasyonunu katalize ederek, metal yüzeyinde tortular oluşturan MnOOH ve MnO₂ üretirler (Denklem 2.16, 2.17) (Lewandowski ve Beyenal, 2009; Little ve Lee, 2007).



Mn(IV) oksitler, metalin yüzeyi ile temas ettiğinde, Mn^{+2} iyonlarının yenilenmesine yol açan katodik bir reaksiyonu indükleyebilen ve sonuç olarak metal/biyofilm/elektrolit arayüzünde bir Mn döngüsü oluşturulan güçlü oksidanlardır (Şekil 2.7) (Linhardt, 2010).



Şekil 2.7: Mn döngüsünün metal yüzeyinde şematik gösterimi (Olesen ve diğ., 2000).

MOB'lerin metal malzemelerdeki korozyonun mekanizması iki aşama ile karakterize edilmektedir: biyotik ve abiyotik. Biyotik süreçte MOB'ler, ortamdaki serbest Mn^{+2} iyonlarını oksijenin varlığında, MnO_2 ve ilgili bileşiklere oksitler. Metal yüzeyinde biriken bileşikler metalin elektrokimyasal özelliklerini değiştirirler. Abiyotik süreçte ise metal yüzeyinde biriken katı Mn oksitler tekrar Mn^{+2} iyonlarına geri indirgenir. Böylece metaldeki katodik reaksiyonlar artar ve metalde korozyon meydana gelir (Şekil 2.7). Mn oksitler ayrıca, metalin anodik potansiyelini değiştirerek çukurcuk (pitting) korozyonuna neden olabilir (Hakkarainen, 2003; Linhardt, 2004). Ayrıca Mn oksit birikintilerinin diferansiyel havalandırma hücrelerinin oluşumuna neden olarak, mikrobiyolojik korozyondan sorumlu SRB'lerin ve diğer anaeroplara çoğalmasını teşvik edebileceği rapor edilmiştir (Dickinson ve Lewandowski, 1996; Dickinson ve Wiatr, 2013). Dahası, MOB'lerin farklı metallerdeki MIC'i literatürde uzun yıllardır

bildirilmektedir (Linhardt, 1994; Dickinson ve diğ., 1997; Maruthamuthu ve diğ., 2008; Olesen ve diğ., 2000; Lewandowski ve diğ., 2002; Ashassi-Sorkhabi ve diğ., 2012).

2.6. MIC'İN DEĞERLENDİRİLMESİ

MIC mekanizmaları, etken mikroorganizmaların çeşitliliği (1), duyarlı materyaller (2) ve yaşamı destekleyen ortamlar (3) gibi 3 temel bileşenin etkileşimlerine dayandığından (Little ve diğ., 2020), MIC'i anlamak için kimya, mikrobiyoloji, metalurji, fizik, elektrokimya ve genetik gibi birden fazla disiplinin iş birliğine ihtiyaç duyulmaktadır (Knisz ve diğ., 2023). Mikrobiyolojik açıdan vurgulamak gerekirse, biyofilmlerdeki çeşitli mikroorganizmalar arasında meydana gelebilecek etkileşimlerin karmaşıklığı ve bu mikroorganizmaların metabolik yetenekleri ile anodik ve katodik reaksiyonlara etkililerinin ortaya konulması MIC'in doğru değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu bağlamda mikrobiyolojik karakterizasyon yöntemlerinin/teknolojilerinin güçlü yönlerinin ve sınırlamalarının anlaşılması da elzemdir. MIC'de mikrobiyolojik etki sıklıkla mikrobiyal çeşitlilik, mikroorganizma sayısı ve mikrobiyal aktivite ile tanımlanmaktadır. Puentes-Cala ve diğ. (2022) son 12 yılda yayınlanan MIC literatürünü gözden geçirmiş ve araştırmaların yaklaşık dörtte üçünde, saha örneklerinde mikrobiyal toplulukları karakterize etmek için moleküler mikrobiyolojik yaklaşımların kullanıldığını bildirmiştir. Nitekim yıllar geçtikçe, MIC'i moleküler seviyeye kadar araştırmak için çeşitli teknikler geliştirilmiş ve bunların yerini yavaş yavaş daha ileri teknolojiler almıştır (Little ve diğ., 2006, Beale ve diğ., 2016, Trif ve diğ., 2018, Kotu ve diğ., 2019). Tablo 2.3'te mikrobiyolojik verileri elde etmek için kullanılabilecek geleneksel ve daha gelişmiş yöntemlerden bazılarını özetlenmiş, MIC araştırmaları sırasında karar vermeye yardımcı olmak için bunların avantajlarını ve dezavantajlarını vurgulanmıştır. Bu tekniklerin hepsi eğer layığıyla kullanılırsa hem arazi hem de laboratuvar çalışmalarında kullanılmaya uygundur (Eckert ve diğ., 2022).

Tablo 2.3: MIC çalışmaları için mikrobiyolojik veri elde etmede kullanılan bazı yöntemler (Knisz ve diğ., 2023).

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar	Referanslar
Mikrobiyoloji (kültür temelli teknikler)			
Plak sayımı	- Düşük maliyetlidir. - Seçici ortam kullanılarak mikroorganizma türleri sayılabilir ve izole edilebilir.	- Mikroorganizmaların %1'den azı kültüre edilebilir. - Sonuç almak günler alır. - Sonuçları doğrulamak için moleküler yaklaşımlar gereklidir.	Health Canada, 2013
En Muhtemel Sayı (MPN)	- Düşük maliyetlidir. - Kullanımı kolaydır.	- Aktiviteyi tanımda başarısız olur. - MIC ile ilgili birçok mikroorganizma kültüre edilemez.	Jensen ve diğ., 2013; Skovhus ve diğ., 2017
MIC ilişkili mikroorganizmaları saymak için test kitleri	- Kullanımı kolaydır. - Eğitimli personele ihtiyaç yoktur.	- Düşük özgüllük. - Sonuç almak günler alır. - Yanlış sonuçlar ortaya çıkar. - Koşulların kullanımı dikkatle belirlenmelidir.	Phan ve diğ., 2022
Mikroskopi			
Işık Mikroskobu	- Düşük maliyetlidir. - Kullanımı kolaydır.	Mikroorganizmaların yalnızca tespiti MIC için tanısal değildir.	Dang ve diğ., 2022
Epifloresan Mikroskobu	Biyosit etkinliğini test etmek veya korozyon bölgesinde mikroorganizma varlığını göstermek için kullanışlıdır.	- Numunenin fikse edilmesi ve boyanması gerekiyor. - Hücreleri arka plan materyalinden ayırt etmek genellikle zordur.	Dang ve diğ., 2022
Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM)	Spesifik boyama kullanılarak yüzdeki biyofilm görselleştirilebilir.	Eğitimli personel gereklidir.	Arun ve diğ., 2020
2D ve 3D Optik Koherens Tomografi (OCT)	- Boyama gerekmez. - Biyofilmlerin yapısal özelliklerini değerlendirmek için spesifik görüntüleme tekniklerine dayanır.	Eğitimli personel gereklidir.	Lima ve diğ., 2022; Romeu ve diğ., 2022
Elektron Mikroskobu (EM)	- Korozyon bölgesinde mikroorganizmaları/biyofilmi görselleştirilebilir. - Mikroorganizmanın metalle doğrudan teması gösterilir. - EDS ile korozyon ürünlerinin elementel bileşimi saptanabilir	- Eğitimli personel gereklidir. - SEM analizi sırasında biyofilmin yapısı bozulur.	Ray ve diğ., 1997
Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	SEM'den daha yüksek çözünürlüklüdür.	- Küçük tarama alanları vardır. - Eğitimli personele ihtiyaç vardır.	Xu ve diğ., 2002
DNA/RNA/ protein temelli teknikler			
Hibridizasyon yöntemleri (FISH, DNA mikrodizileri vb.)	- Niceldir. - Seçilen genler görselleştirilebilir.	- Tespit edilecek mikroorganizmalar hakkında önceden bilgi sahibi olunmalıdır. - Eğitimli personel gereklidir.	Kotu ve diğ., 2019; Skovhus ve diğ., 2009
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)/ Kantitatif PCR (qPCR)	Ucuz ve hızlı bir alternatiftir. Birkaç saat içinde sonuç verebilir.	- Amplifikasyon için genlerin seçilmesi gerekir; bilinmeyen türler tanımlanamamaktadır. - Eğitimli personel gereklidir.	Lahme ve diğ., 2021; Parow ve diğ., 2022
Amplikon dizileme	- Bakteri ve mantarlara özeldir. - Shot-gun metagenomiklerinden daha az maliyetlidir.	- Az taksonomik çözünürlüğü vardır. - İşlevsel profil oluşturmak imkansız.	Sharma ve diğ., 2022

Tablo 2.3 (devam): MIC çalışmaları için mikrobiyolojik veri elde etmede kullanılan bazı yöntemler.

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar	Referanslar
DNA/RNA/ protein temelli teknikler (devam)			
Shot-gun metagenomikleri	- Yüksek özgüllük sağlar. - Yüksek sınıflandırma çözünürlüğü sağlar. - Fonksiyonel profil oluşturma mümkündür. - Tür veya suş seviyesinde virüsleri, bakterileri, arkeleri ve ökaryotları kapsar.	- Aktif ve pasif hücreler arasında ayırım yapamaz. - Daha ucuza gelse de pahalı olabilir. - Numuneler analiz için özel laboratuvarlara gönderilmelidir.	Bonifay ve diğ., 2017; Gösi ve diğ., 2022
Metatranskriptomikler	Gen aktivitesi hakkında önemli bilgiler sağlar.	- Analizleri için daha büyük numune boyutları gereklidir. - Numuneler bozulmaya karşı daha duyarlıdır. - Pahalı olabilir ve özel bir laboratuvara ihtiyaç vardır. - Verileri yorumlama için eğitimli personele ihtiyaç vardır.	Krohn ve diğ., 2021
Metaproteomikler	Mikrobiyal türler veya topluluklar tarafından üretilen proteinlerin tanımlanmasına olanak tanır.	- İyi açıklanmış protein veri tabanlarının eksikliği. - Eğitimli personel ve pahalı ekipman gerektirir. - Analiz için büyük hücre sayısına ihtiyaç vardır.	Dupree ve diğ., 2020
Metabolomik	MIC ile ilgili metabolitlerin tanımlanmasına ve ölçülmesine izin verir.	- Pahalı olabilir ve uzmanlaşmış laboratuvara ihtiyaç vardır. - Mevcut tüm metabolitlerin tanımlanması için birden fazla analitik yöntemle ihtiyaç duyulabilir. - MIC'e özgü metabolitler henüz açıkça tanımlanmamıştır.	Bonifay ve diğ., 2017; Mand ve diğ., 2016
Enzimatik Yöntemler			
ATP Tahlil Yöntemi	- Kullanılması kolaydır. - Mikrobiyal inhibisyonun, mikroorganizmanın metabolik durumunun ve toplam biyokütlenin tahminini sağlayan hızlı ölçüm.	Biyokütlenin bileşimi hakkında bilgi sağlamaz.	Dockens ve diğ., 2017

MIC'in tanısı için korozyonla ilişkilendirilen mikroorganizmaların tespiti tek başına yeterli değildir (Little ve diğ., 2006). Her mikrobiyolojik yöntemin sınırlamaları vardır ve bu sınırlamalar her zaman dikkate alınmalıdır. Yöntemlerin seçimi ayrıca, etkilenen varlık, yanıtlanması gereken ana sorular, numune almayı gerçekleştirecek eğitimli personelin mevcudiyeti ve/veya ilgili laboratuvarlara erişim ışığında dikkatle değerlendirilmelidir. Tablo 2.3'te sunulan yöntemler, mikroorganizmaların korozyona katılımını değerlendirmek için mümkün olan en iyi veriyi sağlamak amacıyla çeşitli kombinasyonlarda kullanılabilir.

Mikrobiyologların, belirli bir malzemenin korozyonunda mikroorganizmaların rolünü incelerken, MIC'den ayrı veya MIC ile birlikte olarak mevcut korozyona katkıda bulunan abiyotik etkenleri anlamaları önemlidir. Böylece, mikrobiyolojik metabolizmanın, korozyonun gerçekleşmesi için gereken anodik ve katodik korozyon reaksiyonlarının kinetiğini nasıl

kolaylaştırdığına veya geliştirdiğine dair bir anlayış geliştirebilirler. MIC potansiyeli kimyasal, mikrobiyolojik ve fiziksel çevreye ek olarak bu parametrelerden etkilenen malzemenin bileşimine ve metalurjik özelliklerine bağlıdır. Endüstriyel uygulamalarda kullanılan metallerin çoğu, (elementlerin birleşimi) bileşimlerindeki küçük değişikliklerin önemli performans farklılıkları yaratabildiği alaşımlardır. Belirli bir metal türü için MIC olasılığını ve kapsamını etkileyebilecek çok sayıda faktör vardır. Bunların başında yüzey kaplaması, metalin spesifik kimyasal bileşimi, metal üretiminde kullanılan işlemler (örneğin sıcaklıklar, mekanik işlemler) ve mikro yapıya etkisi gelmektedir. Araştırmacılar bu faktörlerin bilincinde olarak, karşılaştırılabilir ve tekrarlanabilir uygun teknikleri seçmelidirler. MIC çalışmalarıyla ilgili metalurjik açıdan önemli özellikler hakkında bilgi sağlamak için kullanılabilecek teknikler Tablo 2.4'te özetlenmiştir:

Tablo 2.4: Metal yüzeylerin ve korozyon yan ürünlerinin incelenmesi için analitik teknik örnekleri (Knisz ve diğ., 2023).

Analiz Teknikleri	Tanım	Avantajları	Dezavantajları	Referanslar
Ağırlık Kaybı	Bir test kuponunun ağırlık değişiminin ölçülmesi ile korozyon oranına ilişkin bir gösterge sağlar.	Nispeten basittir.	Genel / homojen dağılımlı korozyon olduğunu varsayar. Lokalize korozyon genellikle MIC için daha önemlidir.	ASTM G1-03 2017
Yüzey Profilleme	Lokal korozyon oranları ve morfoloji hakkında bilgi sağlar. Örnek: AFM, 2D ve 3D tarayıcılar, manuel çukur göstergesi vb.	MIC için yaygın olan lokal korozyon saldırısı için uygundur. Manuel çukur ölçerler nispeten basit ve ucuzdur; çukurlar nispeten derinse iyidir.	Bu tekniklerden bazıları zaman alıcı olabilir ve/veya pahalı ekipman gereklidir. Manuel çukur göstergesi bazı durumlarda gerekli çözünürlüğe sahip olmayabilir.	ASTM G46 - 94 2018
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Lokalize korozyon morfolojisi hakkında bilgi sağlar.	Hızlı, yaygın olarak bulunur, numunenin vakumla uyumlu olmasını gerektirebilir.	Morfoloji mutlaka MIC saldırısıyla doğrudan ilişkili olamaz.	Dang ve diğ., 2022
Enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDS)	Genellikle SEM ile birleştirilir. Korozyon ürünlerinin belirlenmesinde yararlı olan uzamsal olarak çözülmüş temel analiz sağlar.	Hızlı, yaygın olarak kullanılabilir.	Yarı kantitatif, çok sayıda element zirvesi örtüşür, diğer yüzey analiz yöntemlerine göre daha az bilgi verir.	Ray, 2010
X-ışını kırınım spektroskopisi (XRD)	Korozyon ürünlerini belirlemek için yararlı olan kristal malzemeleri karakterize etme tekniği.	Minimal numune hazırlama. Önemli MIC yan ürünlerini tanımlayabilir.	Amorf materyalleri tanımlayamaz.	Little ve diğ., 2015
X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS)	Fotoelektrik etkiye dayanarak, elementleri tanımlar. Bir numunenin yüzeyinde bulunan, korozyon ürünlerini belirlemek için yararlıdır.	Detaylı kimyasal durum bilgisi, kantitatif analiz sağlar.	Yaygın olarak bulunmaz, numune ultra yüksek vakum uyumlu olmalıdır.	Kearns ve diğ., 1992
mikro-Raman spektroskopisi (Raman mikroskopisi)	Bir optik mikroskopla (örneğin konfokal Raman mikroskobu –CRM) eşleştirilmesi, korozyon ürünlerinin bileşimini ve yapısal organizasyonunu karakterize etmeyi sağlar.	Tahribatsız, hızlı satın alma süresi.	Sıfır değerlikli metali tespit edemez, sadece oksitlenmiş veya indirgenmiş metal türlerini tespit edebilir.	Colomban 2011; Lanneluc ve diğ., 2015; Refait ve diğ., 2020; Trif ve diğ., 2018

Tablo 2.4 (devam): Metal yüzeylerin ve korozyon yan ürünlerinin incelenmesi için analitik teknik örnekleri (Knisz ve diğ., 2023).

Analiz Teknikleri	Tanım	Avantajları	Dezavantajları	Referanslar
FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi) spektroskopisi / ATR (Zayıflatılmış toplam yansıma)-FTIR	Kimyasal fonksiyonel grupların tanımlanmasını sağlar, organik ve/veya inorganik maddeleri ayırt edebilme ve bir numunenin yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar, bu nedenle korozyon ürünlerini tanımlamak veya mikroorganizma-yüzey etkileşimlerini izlemek için yararlıdır.	Kimyasal kompleks bilgileri elde etmek için hızlı, tahribatsız, yaygın olarak kullanılabilir, minimum numune hazırlığı.	Sadece laboratuvar ortamında kullanılabilir ve elde edilen spektrumları maskeleyebilen ve bozabilen suya duyarlıdır. Canlı ve ölü hücreler arasında bir ayrım yoktur.	Basera ve diğ., 2019; Bremer ve Geesey 1991; Romero ve diğ., 2007; Welikala ve ark. 2022

3. MALZEME VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında, öncelikle yolcu uçağından alınan jet A-1 tip yakıt örneğinden MOB izolasyonu gerçekleştirilmiş ve sonrasında, MOB izolatları arasında en aktif olduğu belirlenen bakteri izolatı polifazik taksonomik analizler ile tanımlanmıştır. Daha sonra tanımlanan MOB suşunun, uçak yakıt tankı malzemesi olarak sıklıkla kullanılan 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine mikrobiyolojik korozyon davranışı incelenmiştir.

3.1. JET A-1 YAKIT ÖRNEĞİNİN ALINMASI VE BAZI FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ

3.1.1. Uçak Yakıt Tanklarından Yakıt Örneğinin Temini

Aktif olarak uçuş gerçekleştiren ve C bakımı olarak adlandırılan 1 aylık bakım sürecindeki yolcu uçağının merkez ve kanat depolarından toplam 4 l jet A-1 tip yakıt örneği alınmıştır. Örnek alımını takip eden 2 sa içerisinde yakıt örnekleri laboratuvara ulaştırılmış ve hemen analizlere başlanmıştır. Aynı zamanda uçak yakıtının bazı fizikokimyasal parametreleri de incelenmiştir.

3.1.2. Jet A-1 Yakıtının Bazı Fizikokimyasal Parametrelerinin Belirlenmesi

Jet A-1 yakıt örneğinin bazı fizikokimyasal parametreleri (çözülmüş oksijen, mangan, klorür, fosfat, hidrojen sülfür, çözülmüş demir, hidrokarbonlar, iletkenlik, tuzluluk) hizmet alımı kapsamında, TÜBİTAK Marmara Araştırma Enstitüsü ve AEM Çevre Laboratuvar Analiz Tic. A.Ş. tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2. JET A-1 YAKIT ÖRNEĞİNDEN AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MANGAN OKSİTLEME YETENEKLERİNİN TESPİTİ

3.2.1. Yakıt Örneğinden Aerobik Heterotrofik Bakterilerin (AHB'lerin) İzolasyonu

Yakıt örneği 0.2 µm por çaplı steril naylon membran filtrelerden (Sartolon, Sartorius AG, Goettingen, Germany) geçirilmiş ve sonrasında filtreler içerisinde 20 ml %0.85 NaCl içeriğine sahip fizyolojik tuzlu su (FTS) bulunan steril poşetlere konulmuştur. Daha sonra bu poşetler, 2 dk stomacher cihazında (IUL Instruments) tutularak bakterilerin filtre kağıdından FTS'ye

geçmesi sağlanmıştır (Ilhan-Sungur, 2007). Elde edilen bakteri süspansiyonlarından, 10^{-1} ile 10^{-6} 'ya kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır. Her bir sulandırmadan 3 tekrarlı olarak R2A besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petri kutuları 30°C 'lik etüvde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, petride oluşan farklı morfolojideki kolonilerden saf kültürler elde edilmiştir.

3.2.2. Manganez Okside Eden AHB'lerin Tespiti

3.2.2.1. MOB'lere Spesifik Besiyerlerine Ekim

Elde edilen AHB izolatları arasından MOB'lerin tespiti için MOB'lere spesifik olan 3 farklı besiyerine (LBB, Mn Agar ve MnOB) ekim yapılmıştır (Cerrato ve diğ., 2010; Rajasekar ve diğ., 2010; Zakharova ve Prfenova, 2007). Ekimler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Petri kutuları 30°C 'lik etüvde 3 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda, LBB ve Mn Agar besiyerlerinde üreyen MOB şüpheli bakterilere Leucoberbelin Blue (LBB) testi uygulanarak Mn oksit üretenler tespit edilmiştir (Krumbein ve Altmann, 1973). MnOB besiyeri, içeriğindeki yüksek Mn konsantrasyonu sebebiyle inkübasyon süresinin başlarında kendiliğinden okside olarak yalancı pozitiflik verdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle daha sonraki deneylerde kullanılmamıştır.

3.2.2.2. LBB Testi

LBB testi hem besiyerinde hem de filtre kağıdı üzerinde uygulanarak iki farklı şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar birlikte değerlendirilmiştir. Besiyerinde LBB testi uygulanırken, inkübasyon süresi sonunda MOB spesifik besiyerlerinde üreyen MOB şüpheli koloni üzerine 1 damla %0.04'lük LBB solüsyonu damlatılmıştır.

Filtre kağıdı yöntemi ile uygulanan LBB testinde ise inkübasyon süresi sonunda MOB spesifik besiyerlerinde üreyen tüm MOB şüpheli bakterilerden platin öze ile alınarak filtre kağıdına sürülmüş, üzerine 1 damla %0.04'lük LBB solüsyonu damlatılmıştır. LBB solüsyonu damlatıldıktan sonra her iki yöntemde de 1 dk'lık bekleme süresi sonunda, mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Saf MOB izolatları %50'lik steril gliserol çözeltisi içerisinde -86°C 'de saklanmıştır.

3.3. EN AKTİF MOB İZOLATININ BELİRLENMESİ

LBB testi sonucunda güçlü Mn okside etme yeteneğine sahip olduğu tespit edilen, morfolojik olarak farklı 3 adet MOB izolatu elde edilmiştir. Devam eden deneylerde kullanılmak üzere, bu izolatlar içerisinde aktif olarak en iyi büyüyen ve en fazla MnO_x üreten izolatın seçimi gerçekleştirilmiştir. MOB izolatlarının, MOB spesifik besiyerleri içerisinde Mn Agar ve LBB besiyerlerinde daha iyi büyüme gösterdiği tespit edildiğinden dolayı aktivasyon deneyleri, bu iki besiyerinin sıvı kültürleri ile gerçekleştirilmiştir. Aktivasyon deneylerinde MOB izolatlarının, Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme fazları ve Mn oksitleme aktiviteleri 3 ay süresince takip edilmiştir. Her iki besiyeri de, besiyerlerinin standart içerikleri baz alınarak, aynı final Mn konsantrasyonu (2 g/l) ile hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak her iki besiyerinin de Mn içermeyen formları kullanılmıştır.

3.3.1. Mn Broth ve LBB Besiyerlerinin Hazırlanması

Aktivasyon deneyleri için Mn Agar ve LBB besiyerlerinin sıvı halleri hazırlanmıştır. Bununla birlikte, Mn Agar besiyerinin sıvı formunun (Mn Broth) hazırlığı sırasında, besiyeri içerisindeki Mn'nin presipite olarak dibe çökmesi, besiyerinin optimizasyonu ile ilgili çalışmaların yürütülmesine neden olmuştur. Optimizasyon çalışmaları sonucunda ise Mn broth içerisine tampon olarak HEPES konulmasına karar verilmiştir. Mn Broth hazırlığı için 1 g et özütü, 0.075 g maya özütü, 0.5 g amonyum demir (II) sülfat ve 0.15 g sodyum sitrat 900 ml distile su içerisinde çözünmüştür. Aynı bir beherde ise, 2.38 g (10 mM) HEPES 100 ml distile su içerisinde, çözünmüş ve pH değeri 7.4 ± 0.2 olarak ayarlanmıştır (%10 m/V NaOH ile). Daha sonra 100 ml HEPES çözeltisi, 900 ml'lik besiyeri içeriğine eklenmiş ve sonrasında besiyeri, otoklavda 121°C 'de (1 atm basınçta) 15 dk steril edilmiştir. Besiyeri oda sıcaklığına geldiğinde, final Mn konsantrasyonunda 2 g/l olacak şekilde, filtre yöntemi ile steril edilmiş $MnSO_4$ solüsyonundan damla damla ve besiyeri sürekli karıştırılarak eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri, kullanım anına kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Besiyeri içeriğinde herhangi bir çökelti oluşumu gözlenmemiştir.

Sıvı LBB besiyeri hazırlığı için; maya özütü (0.5 g), pepton (2 g) ve demir (II) sülfat (0.001 g), 900 ml distile su içerisinde çözünmüştür. HEPES (2.38 g), 100 ml distile su içerisinde çözünmüş ve pH değeri 7.4 ± 0.2 olarak ayarlanmıştır (%10 m/V NaOH ile). Daha sonra 100 ml HEPES çözeltisi, 900 ml'lik besiyeri içeriğine eklenmiştir. Besiyeri, otoklavda yardımıyla 121°C 'de (1

atm basınçta) 15 dk steril edilmiştir (Cerrato ve diğ., 2010). Besiyeri oda sıcaklığına geldiğinde, final Mn konsantrasyonu 2 g/l olacak şekilde, filtre yöntemi ile steril edilmiş $MnSO_4$ solüsyonundan damla damla ve besiyeri sürekli karıştırılarak eklenmiştir.

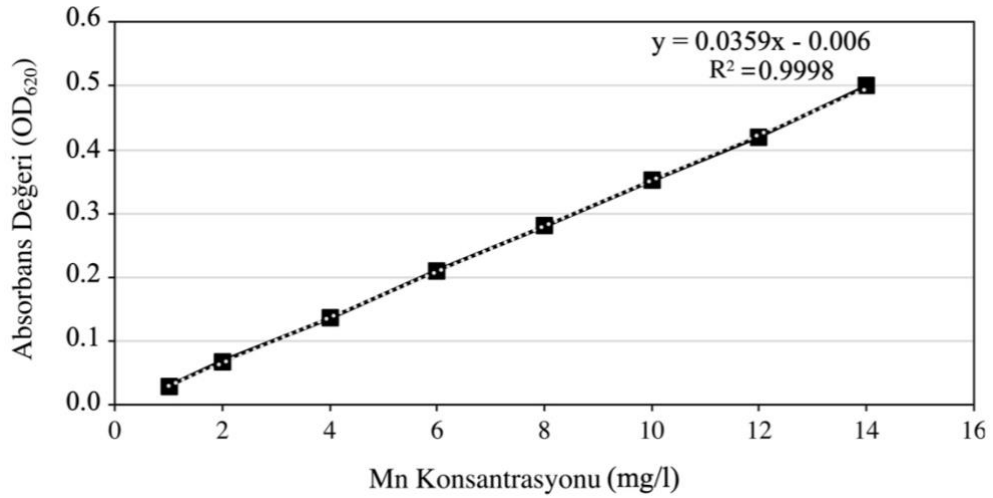
3.3.2. MOB İzolatlarının Büyüme Eğrilerinin Eldesi

MOB izolatlarının her birinin Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak, bu besiyerlerine $MnSO_4$ solüsyonu eklenmeden hazırlanan besiyerleri (Mn içermeyen) kullanılmıştır. Bu doğrultuda, her bir bakteri izolatı için Mn'lı Mn broth (1), Mn'sız Mn Broth (2), Mn'lı LBB (3) ve Mn'sız LBB (4) olmak üzere 4 farklı ortamda çalışılmıştır. İlk olarak bakteri izolatlarının 18-24 sa'lık taze katı kültüründen 15 ml hacmindeki bu 4 farklı sıvı besiyerine ekim yapılmış ve kültürlerin bulanıklığı McFarland 1 standardına göre ayarlanarak, hücre sayısı yaklaşık 3×10^8 h/ml olan bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Daha sonra hazırlanan bu bakteri süspansiyonları 165 ml hacmindeki sıvı besiyerine eklenmiş ve 3 ay süresince 30°C'de 110 rpm hızda inkübasyona bırakılmıştır. Ekimin gerçekleştirildiği an deneyin 0. sa'sı olarak kabul edilmiş ve inkübasyonun belirli günlerinde (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 27, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90. gün) kültürden örnek alınarak spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer, Lambda 35) 600 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Referans olarak steril besiyeri kullanılmıştır (Divekar, 2010). Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.3.3. MOB İzolatlarının Mn Oksitleme Aktivitelerinin Tespiti

İzolatların Mn oksitleme aktivitelerinin ölçümü, büyüme eğrisi deneyleri ile eş zamanlı gerçekleştirilmiş ve örnekler aynı bakteri kültüründen alınmıştır. Her örnekleme gününde kültürden 0.1 ml örnek alınmıştır. Örneğe %0.04'lük LBB solüsyonundan 0.5 ml eklendikten sonra karışım, 10 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda MnO_x 'ler ile LBB solüsyonunun reaksiyonu sonucu oluşan mavi rengin yoğunluğu spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer, Lambda 35) 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Fakat bakteri bulanıklığının spektrofotometrik ölçümü etkilememesi amacıyla, ölçümden önce karışım 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve bakterilerin çökmesi sağlanmıştır. Referans olarak steril besiyeri kullanılmış ve örnek ile aynı şekilde LBB solüsyonu ile muamele edilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri standart grafikten elde edilen eğri denkleminde yerine konarak bakterinin ürettiği MnO_x miktarı tespit edilmiştir (Wright ve diğ., 2016).

Standart potasyum permanganat (KMnO_4) eğrisi, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l, 12 mg/l ve 14 mg/l konsantrasyonlarındaki standart KMnO_4 çözeltileri kullanılarak elde edilmiştir. Standart KMnO_4 çözeltileri %0.04'lük LBB solüsyonu ile muamele edilmiş ve oluşan mavi rengin yoğunluğu spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer, Lambda 35) 620 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Marbaniang, 2012). Referans olarak distile su kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri çizilmiş ve eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: LBB testi uygulanan standart KMnO_4 konsantrasyonlarından hazırlanmış standart eğri ve denklemi.

Deneyler sonucunda, izolatların üreme fazları ve yoğunlukları ile birlikte ürettikleri MnO_x miktarları değerlendirilerek, en aktif olan MOB izolatı belirlenmiştir.

3.4. MOB İZOLATININ POLİFAZİK TAKSONOMİK YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK TANIMLANMASI

3.4.1. Klasik Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.1.1. Hücre ve Koloni Morfolojileri, Spor Oluşturma Özellikleri ve Hareketlilik

Seçilen MOB izolatının koloni morfolojisi ve karakteristiği Reasoner's 2A (R2A) katı besiyerinde belirlenmiştir. İzolatın 18-24 sa'lık kültürlerinden hazırlanan preparatlara Gram boyama uygulanmış ve ışık mikroskopunda (Olympus CX21) immersiyon objektifinde (x100) incelenerek Gram özelliği ve morfolojisi belirlenmiştir. İzolata ait hücrelerin morfolojisi ve büyüklüğü ayrıca, SEM (FEI, Versa 3D) analizi ile de belirlenmiştir. İzolatın 18 sa'lık sıvı

kültüründen hazırlanan preparatlar, faz kontrast mikroskopunda (Nikon 80i) incelenerek hareket yeteneği araştırılmıştır. Ayrıca, izolatın spor oluşturma özelliği, 3 günlük kültürlerinden, endospor boyama yöntemi ile araştırılmıştır (Çotuk ve Anđ-Küçüker, 1995). Hücre büyümesi, R2A besiyerinin yanı sıra, triptik soya agar (TSA; Merck), nutrient agar (NA; Merck) ve Luria-Bertani agar (LB; Merck) besiyerlerinde de incelenmiştir.

3.4.1.2. Sıcaklık Toleransının Belirlenmesi

İzolatın büyüme sıcaklık toleransının belirlenmesi için, bakterinin sıvı R2A besiyerlerinden hazırlanan kültürleri farklı (4, 20, 30, 37 ve 42°C) sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve her bir kültürdeki bakteri büyümesi 3 gün boyunca takip edilmiştir.

Deneylerde sıvı R2A besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan sıvı R2A besiyeri cam şişelere 90 ml hacminde paylaştırıldıktan sonra, otoklavda 121°C’de (1 atm basınç) 15 dk steril edilmiştir. Daha sonra bakteri izolatının 18-24 saatlik katı kültüründen, steril sıvı R2A besiyerine ekim yapılmış ve süspansiyon bulanıklığı McFarland 1 standardına (3×10^8 h/ml) göre ayarlanmış ve her bir kültür 3 gün süresince farklı (4, 20, 30, 37 ve 42°C) sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. Sıcaklık parametresi hariç, tüm inkübasyon koşulları standart tutulmuş ve kültürlerin her biri 110 rpm hızda karıştırılmıştır. Ekimin gerçekleştirildiği an deneyin 0. sa’sı olarak kabul edilmiş ve inkübasyonun 4, 24, 48 ve 72. sa’larında kültürlerden, büyüme eğrisi için 1’er ml örnek alınmıştır. Örnek alımı çift tekrarlı olarak yapılmıştır. Her örnekleme zamanında örneklerin bulanıklığı, spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer, Lambda 35) 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Referans olarak steril R2A besiyeri kullanılmıştır. Tüm ölçümler çift tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.4.1.3. pH Toleransının Belirlenmesi

İzolatın büyüme için pH toleransının belirlenmesi amacıyla, pH değerleri 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 olan sıvı R2A besiyerlerinden hazırlanan kültürler, bakterinin optimum büyüme sıcaklığında bekletilmiş ve her bir kültürdeki bakteri büyümesi 3 gün boyunca takip edilmiştir.

Hazırlanan sıvı R2A besiyeri, 90 ml hacminde cam şişelere paylaştırıldıktan sonra pH değerleri (4, 5, 6, 7, 8 ve 9) NaOH ve HCl tampon çözeltileri ile ayarlanmış ve akabinde otoklavda 121°C’de (1 atm basınçta) 15 dk steril edilmiştir. Daha sonra, Bölüm 3.4.1.2’de anlatıldığı şekilde farklı pH değerlerindeki steril R2A besiyerlerine, süspansiyon bulanıklığı McFarland 1 standardına göre ayarlanmış bakteri kültüründen 10 ml alınarak ekim yapılmış ve her bir kültür

3 gün bakterinin optimum üreme sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Tüm inkübasyon koşulları standart tutulmuş ve kültürlerin her biri 110 rpm hızda karıştırılmıştır. Ekimin yapıldığı an deneyin 0. sa'sı olarak kabul edilmiştir. Büyüme eğrisi için inkübasyonun 4, 24, 48 ve 72. sa'larında kültürlerden 1 ml örnek alınmış ve bakteri yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Referans olarak steril R2A besiyeri kullanılmıştır. Tüm ölçümler çift tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.4.1.4. Tuz Toleransının Belirlenmesi

İzolatin tuzla karşı toleransının belirlenebilmesi için %0, %1, %2, %4, %6, %8, %10 ve %12 NaCl (w/v) içeren optimum pH değerindeki sıvı R2A besiyerlerinde hazırlanan kültürler, bakterinin optimum büyüme sıcaklığında inkübe edilmiş ve her bir kültürdeki bakteri yoğunluğu 4 gün boyunca takip edilmiştir.

Hazırlanan sıvı R2A besiyerinden cam şişelere 90 ml hacminde paylaştırıldıktan sonra, besiyerinin tuz içeriği farklı (%0, %1, %2, %4, %6, %8, %10 ve %12 (w/v)) NaCl konsantrasyonlarına göre ayarlanmıştır. Besiyerlerinin pH değerleri bakterinin optimum pH değerine ayarlandıktan sonra, otoklavda 121°C'de (1 atm basınçta) 15 dk steril edilmiştir. Daha sonra Bölüm 3.4.1.2'de anlatıldığı şekilde, farklı NaCl içeriğine sahip steril R2A besiyerlerine, süspansiyon bulanıklığı McFarland 1 standardına göre ayarlanmış bakteri kültüründen 10 ml ekim yapılmış ve kültür şişereli 4 gün optimum büyüme sıcaklığında bekletilmiştir. Tüm inkübasyon koşulları standart tutulmuş ve kültürlerin her biri 110 rpm hızda karıştırılmıştır. İnkübasyonun gerçekleştirildiği an deneyin 0. sa'sı olarak kabul edilmiş ve inkübasyonun 4, 24, 48, 72 ve 96. sa'larında kültürlerden büyüme eğrisi için 1 ml örnek alınarak, bakteri yoğunlukları Bölüm 3.4.1.2'de anlatıldığı şekilde spektrofotometre cihazında ölçülmüştür.

3.4.1.5. Biyokimyasal Testler

İzolatin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri, API (Analitik Profil İndeksi) 50CH, API 20NE, API 20E ve API ZYM olmak üzere 4 farklı API test kiti (bioMérieux) kullanılarak belirlenmiştir. Ek olarak izolatin oksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri de tespit edilmiştir.

İzolatin karbohidrat fermentasyon testleri API 50CH kiti (bioMérieux) kullanılarak saptanmıştır. Kit kapsamında uygulanan testlerde yer alan substratlar; gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, D-riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, D-adonitol, metil-βD-ksilopiranozid, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, L-sorboz, L-ramnoz, dulcitol, inositol, D-mannitol,

D-sorbitol, metil- α D-mannopiranozid, metil- α D-glukopiranozid, N-asetilglukozamin, amigdalin, arbutin, eskülin (ferrik sitrat), salisin, D-sellobioz, D-maltoz, D-laktoz, D-melibioz, D-sukroz, D-trehaloz, inulin, D-melezitoz, D-rafinoz, amidon (nişasta), glikojen, ksilitol, gentibioz, D-turanoz, D-likoz, D- tagatoz, D-fukoz, L-fukoz, D-arabitol, L-arabitol, potasyum glukonat, potasyum 2- ketoglukonat ve potasyum 5-ketoglukonat'tır.

API 20NE kiti (bioMérieux) ile nitratın, nitrite (NO_2) ve azot (N_2) gazına indirgenmesi, L-triptofan ile indol üretimi, D-glukoz fermentasyonu, arjinin dihidrolaz reaksiyonu, üre kullanımı, eskülin hidrolizi, jelatin hidrolizi ile birlikte, glukoz, arabinoz, mannoz, manitol, N-asetil-glukozamin, maltoz, potasyum glukonat, kaprik asit, malat, trisodyum sitrat ve fenilasetik asit aimilasyon testleri yapılmıştır.

API 20E kiti (bioMérieux) ile β -galaktosidaz (ONPG) testleri, arjinin dihidrolaz, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz reaksiyonları, sitrat kullanımı, hidrojen sülfür (H_2S) üretimi, triptofan deaminaz reaksiyonu, üre kullanımı, jelatin hidrolizi, indol üretimi, asetoin üretimi (Voges Proskauer testi) gibi çeşitli biyokimyasal testler gerçekleştirilmiştir.

API ZYM kiti (bioMérieux) ile alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin, α -kimotripsin, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, β -glukuronidaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz, N-asetil- β -glukozaminidaz, α -mannosidaz, α - fukosidaz enzim aktivite testleri yapılmıştır. Elde edilen fenotipik test sonuçlarına göre izolatların fenotipik özellikleri ortaya konmuştur.

Oksidaz Testi:

İzolatın R2A'daki 18-24 sa'lık kültütünden, platin öze ile alınan bakteri kolonisi filtre kağıdına sürüldükten sonra üzerine tetrametil p-fenilendiamin-dihidroklorid ayracı damlatılmış ve 30 s beklenilmiştir. Süre sonunda mavi renk oluşumu gözlenmesi pozitif test sonucu olarak değerlendirilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

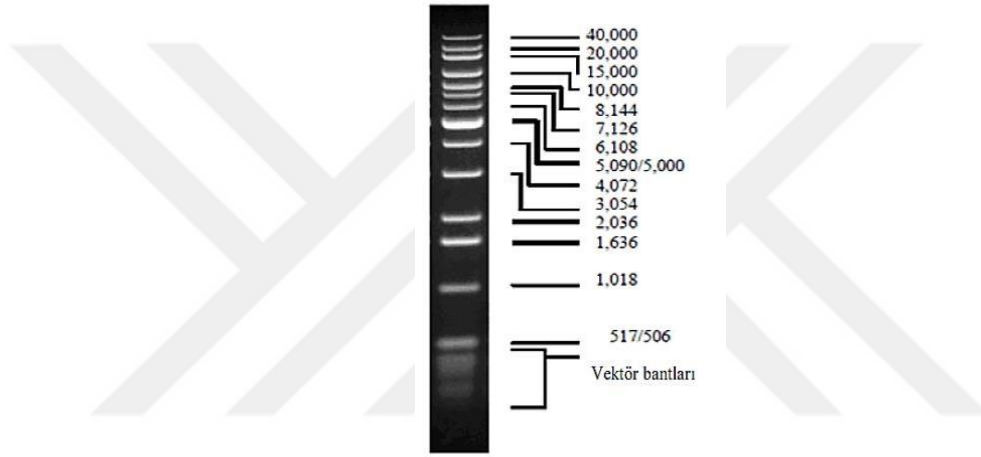
Katalaz Testi:

İzolatın R2A'daki 18-24 sa'lık kültütünden platin öze ile alınan bakteri kolonisi üzerine %3'lük H_2O_2 çözeltisinden ilave edilmiş ve oksijen kabarcıklarının çıkması pozitif test sonucu olarak kaydedilmiştir (Çotuk ve İlhan-Sungur, 2014).

3.4.2. Genotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Saf olarak elde edilen MOB izolatına ait genomik DNA (gDNA) izolasyonu, ticari olarak satılan “PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.)” ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gDNA ve markır (1 kb DNA Extension Ladder, Invitrogen) 1.5 µl GelRed (Biotium) içeren %0.8’lik agaroz jele yüklenmiş ve 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu içerisinde 90V, 400mA’de 32 dk elektroforez işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.2). Elde edilen gDNA’nın agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü fotoğraflanmış ve -20°C’de saklanmıştır.



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

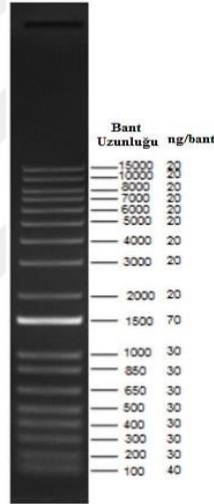
3.4.2.2. 16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

MOB izolatına ait gDNA örneğinin 16S rRNA’yı kodlayan gen bölgeleri universal bakteri primeri olan 27F (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) ve 1492R (5’-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3’) kullanılarak geleneksel PZR yöntemi (BioRad, T100 Thermocycler) ile çoğaltılmıştır (Lane, 1991; Heuer ve diğ., 1997). PZR için 25 µl reaksiyon hacmi ile Tablo 3.1’de verilen protokol uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* suşu (ATCC 8739) ve negatif kontrol olarak da DNA içermeyen örnek kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Polimeraz zincir reaksiyonu programı.

Aşama	Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk	1
2	Denatürasyon	95	1 dk	33
	Primer bağlanması	57	1 dk	
	Zincir uzaması	72	40 s	
3	Son uzama	72	30 dk	1

Elde edilen PZR ürününün kalitesi, GelRed (Biotium) nükleik asit boyasının eklendiği %1.5'luk agaroz jelde incelenmiştir. Jelin görüntüsü dijital olarak kaydedilmiştir (Pavic ve diğ., 2015). Moleküler markır olarak 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) moleküler markırın jel resmi ve bant kalınlıklarına karşılık gelen DNA miktarları ve büyüklükleri.

3.4.2.3. Dizi Analizi

PZR ürününün, saflaştırılması ve dizi analizi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (Eurofins, Almanya). Dizi kromatogramlarının güvenilirliği, Clustal X programı ile manuel olarak kontrol edilmiştir. Elde edilen 16S rDNA gen dizileri öncelikle “Gene Doc” programı ile analiz edildikten sonra (Nicholas ve diğ., 1997), Clustal X programıyla hizalanmıştır (Thompson ve diğ., 1997). Daha sonra BLAST algoritması kullanılarak NCBI “National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankasında saklanan dizilerle karşılaştırılmıştır. Gen bankasında bulunan diziler arasından filogenetik olarak en yakın türler belirlenmiştir (McGinnis ve Madden, 2004; Ludwig ve diğ., 2004; Benson ve diğ., 2005).

3.4.2.4. Tüm Genom ve Tam 16S Dizilimine Dayalı Genom Özelliklerinin ve Filogeninin Belirlenmesi

İzolatan tüm genom dizilemesi, Illumina NovaSeq platformu (2x150 baz çifti (bç) döngü) kullanılarak hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (Eurofins, Almanya). BBtools v.38.94 (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) aracılığıyla kırılmış ve SPAdes v.3.15.4 (Bankevich ve diğ., 2012) algoritması kullanılarak birleştirilmiştir. Taslak genom dizisi için NCBI'yeden aksesyon numarası alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Genom anotasyonu DFAST “DDBJ Fast Annotation and Submission Tool” (<https://dfast.nig.ac.jp/>) sunucusunda gerçekleştirilmiştir.

Tüm genom bazlı taksonomik analiz, TYGS “Type (Strain) Genome Server” biyoinformatik platformu (<https://tygs.dsmz.de>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatan genom boyutu, G+C içeriği (%mol) ve protein sayısı da TYGS internet sunucusu kullanılarak elde edilmiştir (Meier-Kolthoff ve Goker, 2019). Dijital DNA-DNA hibridizasyonu (dDDH) değerleri, GGDC 4.0 “Genome-to-Genome Distance Calculator” kullanılarak belirlenmiştir (Meier-Kolthoff ve diğ., 2013 ve 2022). İzolatan yakın ilişkili olduğu diğer suşlar ile arasındaki ortalama nükleotid benzerliği (ANI) değerleri, ANI hesaplayıcısı sunucusu (<http://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) kullanılarak saptanmıştır (Yoon ve diğ., 2017). 16S rDNA gen dizisinin tamamı, RNAmmer internet sunucusu kullanılarak tüm genomdan elde edilmiştir (Lagesen ve Hallin, 2007) ve her dizi daha sonra, TYGS veritabanında mevcut olan her bir tip suşun 16S rDNA gen dizisi ile BLAST algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır (Camacho ve diğ., 2009). Genomlar arası mesafeler, FastME 2.1.6.1 sunucusu aracılığıyla dengeli bir minimum evrim ağacını ortaya çıkarmak için kullanılmıştır (Lefort ve diğ., 2015). Filogenetik ağaçlar, veri setlerinin 1000 kez tekrar edildiği bootstrap analizi ile oluşturulmuş (Farris, 1972) ve PhyD3 programı ile görselleştirilmiştir (Kreft ve diğ., 2017).

3.4.3. Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.3.1. Toplam Hücresel Yağ Asidi Analizi

İzolatan hücresel yağ asidi bileşimi, MIDI Mikrobiyal Tanımlama Sistemi için tarif edilen standart protokollere göre belirlenmiştir (Sasser, 1990). Hücresel yağ asidi içeriği, TSBA6 yöntemi kullanılarak izole edilmiştir (MIDI, 2008). Daha sonra, yağ asidi metil esterleri karışımı Agilent 6850 gaz kromatografisi sistemi içeren Sherlock Microbial Identification Sistemi (MIS, MIDI Inc, Newark, USA) kullanılarak ayrılmıştır. Pikler otomatik olarak bütünleştirilmiş ve

hücre bileşenindeki yağ asitleri belirlenmiştir. Yüzdeleri ise MIS standart yazılımı (MIDI Inc Sherlock MIS software) ile hesaplanmıştır.

3.4.3.2. Poliamin Analizi

İzolatan poliamin içeriği, Zech ve diğ. (2009) tarafından rapor edilen metabolit ekstraksiyonu protokolüne göre ıslak biyokütleden ekstrakte edilmiştir. Poliaminler türevlendirilmiş ve hedeflenebilecek poliamin türleri ve öncülleri (agmatin, kadaverin, homospermidin, norspermidin, 1,2- ve 1,3-diaminopropan, putresin, N-asetil-putresin, 2-hidroksiputresin, spermidin ve spermin) Will ve diğ. (2019) tarafından bildirilen protokole göre gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilmiştir.

3.4.3.3. Kinon Analizi

İzolatan solunum kinonları taze hücre materyalinden ekstrakte edilmiş ve silika bazlı katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan numuneler, absorbsiyon spektrumlarını kaydeden bir ters faz kolonu kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiştir (Vieira ve diğ., 2021). Ölçümlerde ubikinonlar için 270 nm ve menakinonlar için 326 nm dalga boyu kullanılmıştır.

3.4.3.4. Polar Lipid Analizi

İzolatan polar lipidleri dondurularak kurutulmuş hücre materyalinden kloroform:metanol:%0.3 sulu NaCl karışımı kullanılarak ekstrakte edilmiştir (Bligh ve Dyer, 1959). Polar lipidler iki boyutlu silika jel ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrılmıştır. İlk yön kloroform:metanol:su ve ikinci yön kloroform:metanol:asetik asit:su içinde geliştirilmiştir. Toplam lipid materyali molibdatofosforik asit ve tanımlanmış fonksiyonel gruplara özgü sprey reaktifler kullanılarak tespit edilen spesifik fonksiyonel gruplar kullanılarak tespit edilmiştir (Tindall ve diğ., 2007).

3.4.3.5. Tüm-Hücre Şekerlerinin ve Diaminopimelik Asit Enantiyomerlerinin Analizleri

İzolatan tüm hücre şekerleri ve diaminopimelik asit enantiyomerleri Schumann'ın 1 ve 3 numaralı protokolleri izlenerek analiz edilmiştir (Schumann, 2011). Tanısal hücre şekerleri için 1N H₂SO₄, 100°C, 2 sa ve diaminopimelik asit enantiyomerleri için 4N HCl, 100°C, 16 sa koşullarında elde edilen tüm hücre hidrolizatları selüloz plakalar üzerinde TLC ile analiz edilmişlerdir.

3.5. MIC ÇALIŞMALARI İÇİN BESİYERİ VE İÇERİĞİNDEKİ MANGAN KONSANTRASYONUN SEÇİMİ

Bu aşamada yapılan deneyler ile korozyon deneylerinde deney ortamı olarak kullanılacak besiyeri ve içeriğinde olması gereken Mn konsantrasyonunun belirlenmesi için ön çalışmalar yapılmıştır.

3.5.1. Seçilen MOB İzolatının Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Büyüme Eğrilerinin Eldesi

İzolatın farklı besiyerleri ve farklı Mn konsantrasyonlarındaki büyüme eğrilerinin belirlenmesi amacıyla, Mn Broth ve LBB besiyerleri farklı (0, 0.5, 1, 2, 3 g/l) Mn konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Büyüme eğrileri, Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan ve 3 ay süresince inkübe edilen bakteri kültürlerinin hücre yoğunluğu belirli örneklem günlerinde (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 27, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90. gün) 600 nm dalga boyunda spektrometre cihazında (Perkin Elmer, Lambda 35) ölçülerek tespit edilmiştir. Kör olarak, aynı Mn konsantrasyonundaki steril besiyeri kullanılmıştır. Ölçümler çift tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Seçilen MOB İzolatının Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Mn Oksitleme Aktivitelerinin Tespiti

İzolatın Mn oksitleme aktivitesinin ölçümü, Bölüm 3.5.1’deki Mn içeren 8 farklı bakteri kültürünün (0.5, 1, 2 ve 3 g/l Mn içeren Mn Broth ve LBB’den), 3 aylık inkübasyon süresi boyunca büyüme eğrisi ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir Mn’lı kültürden, 3. günden itibaren her ölçüm saatinde, 0.1 ml örnek alınmıştır. Alınan örnekten Bölüm 3.2.3’te anlatıldığı şekilde bakterinin Mn oksitleme aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir.

3.6. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 1 G/L

Seçilen ve tanımlanan MOB izolatının, uçak yakıt deposu yapımında sıklıkla tercih edilen 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine mikrobiyolojik korozyon davranışını araştırmak için 2’si deney ve 2’si kontrol olmak üzere 4 adet laboratuvar ölçekli düzenek kurulmuş ve işletilmiştir.

1 g/l Final Mn Konsantrasyonlu Deney Düzenegi (Deney Düzenegi 1): Bu düzenegin isletimiyle, seçilen ve tanımlanan MOB izolatının, 1 g/l final Mn konsantrasyondaki ortamda, 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine MIC davranışı araştırılmıştır. MOB izolatının, 1 g/l final Mn konsantrasyonuna sahip Mn Broth besiyerinde hazırlanan kültürü, deney ortamı olarak kullanılmış ve 7175-T7351 alüminyum alaşımları 160 gün boyunca bu ortama maruz bırakılmıştır. Düzenekten belirli günlerde (4, 25, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160. gün) çıkarılan kuponlardan bakteriyolojik ve gravimetrik analizler ile MnO_x tespiti ve kültürden ise bakteriyolojik analiz ve bazı (MnO_x , Mn^{+2} , Cl^- ve pH) fizikokimyasal parametrelerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda, kültürden ve kültüre maruz kalan kupon yüzeyindeki biyofilm tabakasından Al iyon konsantrasyonları tespit edilmiştir.

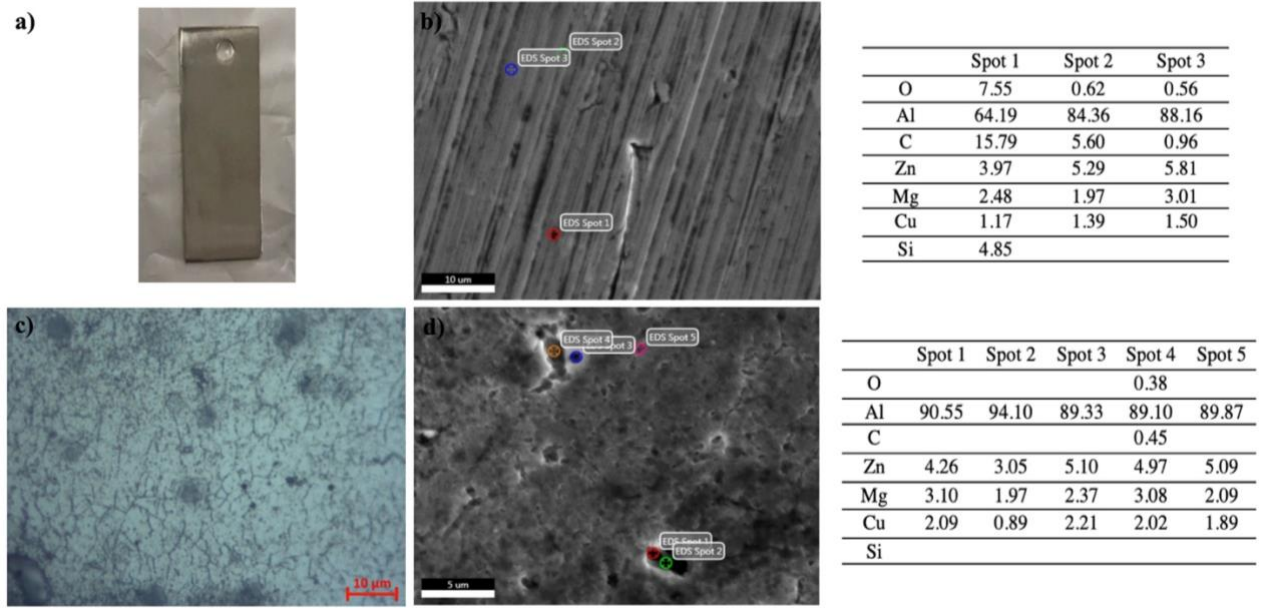
1 g/l Final Mn Konsantrasyonlu Kontrol Düzenegi (Kontrol Düzenegi 1): Bu düzenegin isletimiyle, 1 g/l final Mn konsantrasyondaki steril ortamın, 7175-T7351 alüminyum alaşımları üzerine korozif etkisinin olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir Kontrol düzenegi, 1 g/l final Mn konsantrasyonuna sahip steril Mn Broth besiyerine maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımları varlığında 160 gün boyunca işletilmiştir. Düzenekten belirli günlerde (4, 25, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160. gün) çıkarılan kuponlardan gravimetrik analizler ile MnO_x tespiti ve Mn Broth besiyerinden bazı (MnO_x , Mn^{+2} , Cl^- ve pH) fizikokimyasal parametrelerin analizi gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda, Mn Broth besiyerinden ve besiyerine maruz kalan kupon yüzeyindeki film tabakasından Al iyon konsantrasyonları tespit edilmiştir.

3.6.1. 7175-T7351 Alüminyum Kuponlar

Deney numunesi olarak, uçak yakıt depolarında sıklıkla kullanılan bir malzeme olan 7175-T7351 alüminyum alaşımı kullanılmıştır. Malzeme, Kale Havacılık Sanayi A.Ş. tarafından sağlanmıştır. 7175-T7351 alüminyum alaşımının kimyasal bileşimi Tablo 3.2’de verilmiştir. Alüminyum malzemedan, 25 mm x 10 mm x 1.5 mm boyutlarında kuponlar kestirilmiş ve laboratuvar ölçekli düzeneklere asabilmek için kuponların kısa kenarını ortalayacak şekilde 2.5 mm çapında bir delik açtırılmıştır (Şekil 3.4a).

Tablo 3.2: 7175-T7351 alüminyum alaşımının kimyasal bileşimi.

%Al	%Zn	%Mg	%Cu	%Cr	%Fe	%Si	%Mn
90.04	5.60	2.50	1.50	0.18	0.11	0.07	0.00



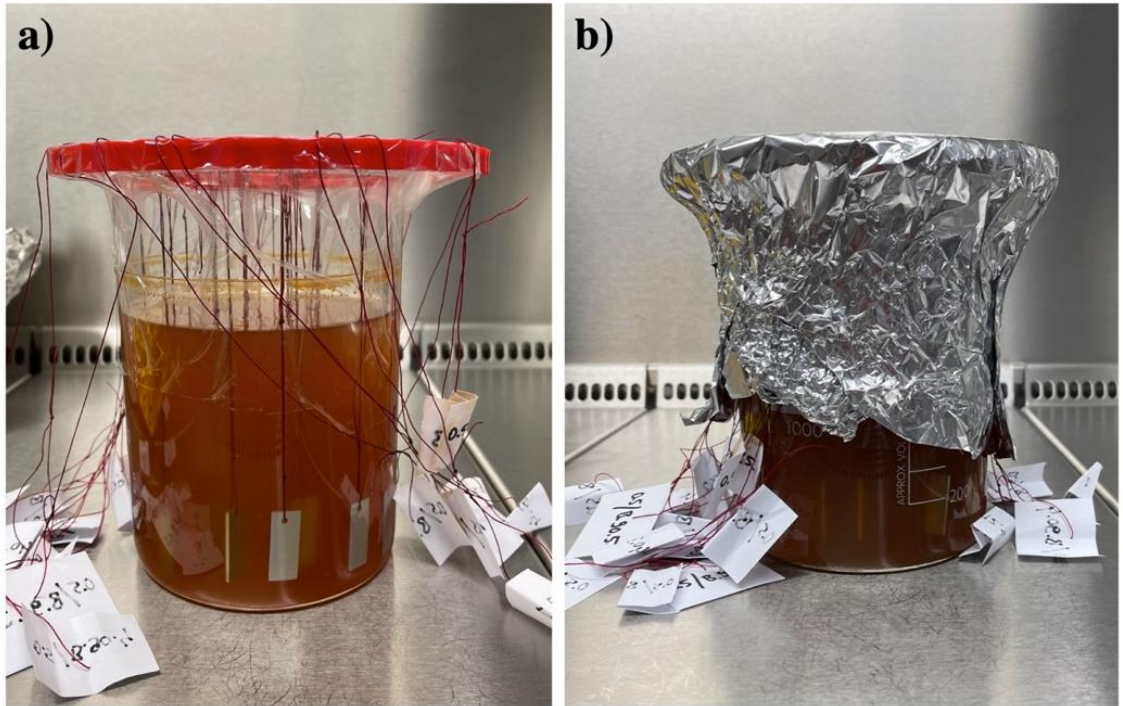
Şekil 3.4: 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun görüntüsü; (a) makroskobik, (b) işlem görmemiş, (c) dağlanmış.

Deney kuponları hazırlanırken, malzemenin gerçek yapısını ortaya çıkarmak ve standardizasyonunu sağlamak için öncelikle kuponların her iki yüzeyi de metalografik numune hazırlığına göre, zımparalanmış ve parlatılmıştır (Vander Voort ve diğ., 2004). Zımparalama işlemi, döner disk sisteminde (Metkon, Gripo) 180, 240, 320, 400, 600 ve 800, 1000 numaralı zımparalar kullanılarak yapılmıştır. Zımparalama aşamasından sonra kuponlar yıkanmış ve 70°C'deki Pasteur fırınında kurutulmuştur. Sonrasında parlatma işlemi, üzerine 5/3 μm elmas süspansiyon (SDP Impex) dökülen keçe ile döner disk sisteminde gerçekleştirilmiştir. Parlatma işleminden sonra kuponlar, distile su ile yıkanıp kurutulmuştur. Daha sonra kuponların boyutları ölçülerek, toplam yüzey alanları hesaplanmıştır. Sonrasında aseton ile temizlenen kuponlar, Pasteur fırınında tekrar kurutulmuş ve ardından ağırlıkları ölçülmüştür. Hazırlıkları tamamlanan kuponlar, korozyon deneylerine kadar havaya maruz kalmayacak şekilde desikatör içerisinde saklanmıştır.

Mikro yapı karakterizasyonu amacıyla, kuponlardan biri zımparalama ve parlatma işlemi sonrası hiçbir işlem yapılmadan SEM analizi ile incelenirken (Şekil 3.4b), diğer numune Keller solüsyonu (2 ml HF, 3 ml HCl, 20 ml HNO₃, 175 ml H₂O ile hazırlanan dağlayıcıyla 1–2 dk) ile dağlanarak ışık mikroskonunda incelenmiştir (Şekil 3.4c).

3.6.2. Deney Düzeneği 1'in Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler

Laboratuvar ölçekli deney düzeneği 1'de, Bölüm 3.3'te tanımlanan MOB izolatının 1 g/l final Mn konsantrasyonundaki Mn Broth ile hazırlanan kültürüne maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımının mikrobiyolojik korozyon davranışı incelenmiştir. Deney düzeneği 1, cam beher (1 l hacimli), kupon taşıyıcı aparat, alüminyum kuponlar ve deney ortamı (bakteri kültürü) ile hazırlanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Deney düzeneği; (a) deney ortamını içeren beher, kupon taşıyıcı ve taşıyıcıya asılmış alüminyum kuponlar. (b) İşletilmesi esnasında üzeri steril alüminyum folyo ile kapatılmış deney düzeneği.

Beher; deneyin yapıldığı 1 l hacimli cam malzemedir. Deney öncesinde 170°C'deki Pasteur fırınında 1 sa bekletip steril edilerek, deney için hazırlanmıştır.

Kupon taşıyıcı; alüminyum kuponların deney ortamında birbirine temas etmeden asılı kalmasını sağlayan delikli plastik malzemedir. Kuponlar, kenarlarından açılan deliklerden geçirilen ipler ile kupon taşıyıcıya asılmaya uygun hale getirilmiştir. Kuponların her iki tarafı 15 dk süresince 260 nm dalga boyundaki UV ışınına maruz bırakılarak steril edilmiştir. Steril kuponlar, aseptik koşullar altında, birbirlerine değmeyecek şekilde kupon taşıyıcıya asılmıştır.

Kuponlar; deney numunesi olarak, 7175-T7351 alüminyum alaşımından Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kuponlar kullanılmıştır (Şekil 3.4).

Deney ortamı; deneylerin yürütüldüğü ortamdır. Deney ortamı olarak, Bölüm 3.3’te tanımlanan MOB izolatının 1 g/l final Mn konsantrasyonundaki Mn Broth ile hazırlanan kültürü kullanılmıştır.

1 g/l final Mn konsantrasyonu ile Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan Mn Broth besiyerinden 720 ml, aseptik koşullar altında, 1 l hacimli steril cam behere aktarılmıştır. Besiyerine %10 oranını sağlayacak şekilde bulanıklığı McFarland 1 standart değerine göre ayarlanmış 24 sa’lık saf bakteri kültüründen 80 ml eklenmiş ve 25×10^6 h/ml başlangıç konsantrasyonuna sahip bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Saf bakteri kültürü içeren deney ortamına, 7175-T7351 alüminyum kuponların daldırılması ile deney düzeneği kurulmuş ve bu an 0. sa olarak kaydedilmiştir. Daha sonra deney düzeneği, 160 gün süresince sıcaklığı 30°C olan bir çalkalamalı inkübatörün içerisinde tutulmuş ve deney ortamı 110 rpm hızla karıştırılmıştır. Deney düzeneğinden belirli örnekleme zamanlarında (4, 25, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160. gün) analizler gerçekleştirilmiştir

Bakteriyolojik ve korozyon analizleri için belirlenen örnekleme saatlerinde deney düzeneğinden 4 adet kupon çıkartılmış ve eş zamanlı olarak da 30 ml bakteri kültürü alınmıştır. Biyofilm tabakasındaki bakteri sayısının saptanması, MnO_x miktarının tespiti ve EPS’nin eldesi için birer adet kupon kullanılmıştır. Aynı zamanda bu üç kupon, gravimetrik yöntem ile ağırlık kaybının ve korozyon hızının tespitinde kullanılmıştır. Diğer 1 kupon fikse edilmek için, 1 sa boyunca, +4°C’deki %2.5 glutaraldehit çözeltisinde bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda kuponlar, önce steril bidistile su ile hafifçe yıkanmış, sonra etanol serisi (%30, %50, %80 ve %95) içerisinde 10’ar dk bekletilerek suyu uzaklaştırılmıştır. İşlem sonunda kuponlar havada kurumaya bırakılmıştır (Campanac ve diğ., 2002). Fiksasyon işlemi tamamlanan kuponlar desikatörde saklanmıştır.

Örnekleme günlerinde alınan kültür örneklerinden planktonik bakterilerin sayısı belirlenmiş, MnO_x ve Mn^{+2} miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca kültürün Cl⁻ ve pH değerleri de saptanmıştır. Ayrıca, son örnekleme gününde, deney düzeneğindeki deney ortamından ve bu ortama maruz kalan kupon yüzeyindeki biyofilm tabakasından alınan örneklerdeki Al iyon konsantrasyonları, indüktif olarak eşleşmiş plazma- kütle spektrometresi (ICP- MS) analizi ile ölçülmüştür.

Laboratuvar ölçekli deney düzeneğinden gerçekleştirilen analizler aşağıdaki gibidir:

3.6.2.1. Bakteri Sayısının Tespiti ve Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

Planktonik bakterilerin sayımı için örnekleme günlerinde alınan kültür örneklerinden, 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar sulandırım serileri hazırlanmıştır. Sulandırım serilerinden R2A besiyerine ekim yapılmıştır. Ekimler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve petri kutuları 30°C 'de 7 gün inkübe edilmiştir (Reasoner ve Geldrich, 1985). İnkübasyon süresi sonunda koloniler sayılarak, ml başına düşen koloni sayısı belirlenmiş ve koloni oluşturan birim (CFU -Colony Forming Unit) olarak kaydedilmiştir.

Sesil bakterilerin sayımı için örnekleme günlerinde deney düzeneğinden 1 adet kupon çıkartılmıştır. Kuponlar 2-3 defa dikkatli bir şekilde steril distile suya daldırılarak yüzeye gevşek tutunmuş bakteriler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra steril eküvyon ile kupon yüzeyindeki biyofilm tabakası toplanmış ve içerisinde 10 ml steril Mn Broth bulunan steril naylon poşetlere konulmuştur. Naylon poşetler 2 dk stomacher cihazında tutularak bakterilerin besiyerine geçmesi sağlanmıştır (Power ve diğ., 2001). Daha sonra eküvyonla birlikte bakteri süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılmış ve en 2 dk vorteksenerek bakterilerin besiyerine transfer işlemi tamamlanmıştır (Gagnon ve Slawson, 1999). Elde edilen biyofilm süspansiyonundan, 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar sulandırım serileri hazırlanmış ve bu serilerden R2A besiyerine ekim yapılmıştır. Ekimler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve petri kutuları 30°C 'de 7 gün inkübe edilmiştir. Sonrasında koloniler sayılarak, CFU/cm² olarak kaydedilmiştir.

3.6.2.2. EPS Eldesi

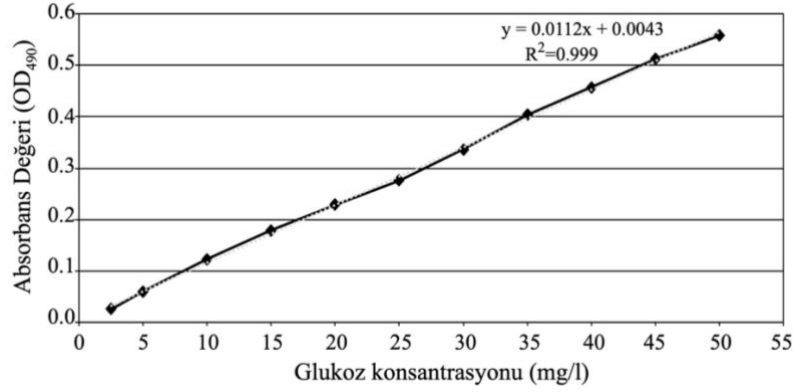
EPS eldesi için her örnekleme saatinde deney düzeneğinden 1 adet kupon çıkartılmıştır. Kupon yüzeyine gevşek tutunmuş bakteriler uzaklaştırıldıktan sonra EPS elde edilmiştir. EPS eldesi yıkama, ayırma, ekstraksiyon ve filtrasyon olmak üzere dört aşamada gerçekleştirilmiştir (Zhang ve diğ., 1999).

1. Yıkama işlemi aşamasında, steril eküvyon ile kuponun yüzeyindeki biyofilm tabakası toplanmış ve içerisinde 10 ml steril bidistile su bulunan santrifüj tüpünde süspanse edilmiştir. Biyofilm süspansiyonu 6000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant başka bir steril santrifüj tüpüne aktararak saklanmıştır.

2. Ayırma aşamasında, ilk aşamadan geriye kalan biyofilm peletine 10 ml %8.5 NaCl ve %0.22 formaldehit çözeltisinden eklendikten sonra, en yüksek devirde 1 dk vortekslenmiştir. Her iki aşamada elde edilen solüsyonlar steril bir santrifüj tüpünde birleştirilmiştir (toplam hacim 20 ml).
3. Ekstraksiyon aşamasında, toplam hacmi 20 ml olan birleştirilmiş örnek kombinasyonu 11227 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir.
4. Filtrasyon işleminin yapıldığı son aşamada ise, süpernatant 0.22 µm por çaplı steril membran filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmektedir. Sonrasında bu örnek toplam karbonhidrat miktarı tayini için kullanılmaktadır.

Biyofilmden elde edilen EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarının tayini, fenol sülfürik asit yöntemine göre yapılmıştır (Dubois ve diğ., 1956). Fenol sülfürik asit yönteminde, geniş çaplı (18x20 mm) deney tüplerine aktarılan 1 ml EPS solüsyonu üzerine, polisakkaritleri dimerlerine ayırmak için 1 ml %5'lik fenol çözeltisi eklenmiş ve hemen ardından 5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilerek 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonucu yükselen sıcaklığın düşürülmesi ve oluşan reaksiyonun durdurulması amacıyla tüpler, 25-30°C'lik su banyosunda 10-20 dk soğumaya bırakılmıştır. Gerçekleşen reaksiyon sonucunda, sarı-turuncu renk oluşumu gözlemlenmiş ve rengin koyuluğu spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer, Lambda 35) 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Toplam karbonhidrat miktarı, spektrofotometredeki ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerinin, standart eğriye ait denklemde yerine koyulması ile hesaplanmıştır. Ölçümler 4 tekrarlı yapılmıştır.

Standart eğriyi oluşturmak için 2.5 mg/l, 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, 50 mg/l konsantrasyonlarda standart glukoz çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilere fenol sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Kör referans olarak distile su kullanılmıştır. Her bir konsantrasyona ait absorbans değerleri ile standart grafik çizilmiş ve eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.6). Kontrol amacıyla 2.5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l ve 50 mg/l konsantrasyonlardaki standart glukoz çözeltileri deneylerle eş zamanlı olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.6: Fenol sülfürik asit yöntemi ile standart glukoz konsantrasyonlarından hazırlanmış standart eğri ve denklemi.

3.6.2.3. *MnO_x Miktarının Tespiti*

Deney süresince belirtilen örnekleme günlerinde, kültürde ve kültüre maruz bırakılan kuponların yüzeyinde biriken MnO_x miktarları tespit edilmiştir. Kültürdeki MnO_x miktarının tespiti Bölüm 3.3.3'te anlatılan şekilde LBB testine tabi tutulmuş ve oluşan mavi rengin yoğunluğu spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Referans olarak LBB testinin uygulandığı steril Mn Broth besiyeri kullanılmıştır. Referans olarak kullanılan besiyeri, besiyerinin abiyotik oksidasyonunun gerçekleşme ihtimaline karşı, deney ortamı ile aynı koşullarda bekletilmiştir. Tüm spektrofotometrik ölçümler 2 tekrarlı yapılmıştır.

Kupon yüzeyinde biriken MnO_x miktarının tayininde ise deney düzeneğinden çıkartılan 1 adet kupon kullanılmıştır. Steril eküvyon ile kuponun yüzeylerindeki biyofilm tabakası toplanmış ve içerisinde distile su bulunan santrifüj tüpüne alındıktan sonra, 60 sn vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra karışımdan alınan örnek LBB testine tabi tutulmuş ve oluşan mavi rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek MnO_x miktarı tespit edilmiştir. Kör referans olarak steril Mn Broth kullanılmıştır.

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

Deney düzeneğindeki bakteri kültürünün Mn⁺² ve Cl⁻ içeriği ile birlikte pH değerindeki değişimler, her örnekleme saatinde kültürden yapılan ölçümler ile tespit edilmiştir. Bakteri kültüründe bulunan Mn⁺² ve Cl⁻ miktarları, fotometre cihazı (Lovibond, MD600) ile ölçülmüştür. Kültürün pH değeri ise pH metre cihazı (Denver Instrument, Meridian MR-10) ile belirlenmiştir.

3.6.2.5. Korozyon Hızı Hesabı

7175-T7351 alüminyum kuponların korozyon hızı, deneyden önce ve sonra ölçülen ağırlık farkından hesaplanmıştır. Deney sırasında düzenekten çıkarılarak, bakteri sayımı, EPS eldesi ve MnO_x miktarının tespiti amacı ile kullanılan 3 adet kupon daha sonra, gravimetrik olarak korozyon hızının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Belirtilen analizleri tamamlanan kuponlar, yüzeyden korozyon ürünlerini uzaklaştırmak için konsantre HNO_3 çözeltisi içeren beher içerisine konularak ultrasonik su banyosunda (Alex) 220 V'de 2-5 dk bekletilmiş, distile su ile yıkanmış, %96'lık etanolde 1 dk boyunca tekrar ultrasonik su banyosunda bekletilmiş ve Pasteur fırınında 70°C'de kurutulmuştur (Wang ve diğ., 2021). Deney öncesi ve sonrası elde edilen ağırlık değerleri arasındaki fark, ağırlık kaybı olarak not edilmiş ve korozyon hızı hesaplanmıştır (ASTM G1-03, 2017).

3.6.2.6. Al Analizi

Bakteri kültürü içeriğindeki Al iyonlarının tespiti için deneyin son örnekleme günü deney ortamından, 20 ml örnek alınmış ve bu örnek 0.5 ml %65'lik nitrik asit ile asitlendirildikten sonra 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius) geçirilmiştir (Percival ve diğ., 1998).

Düzenekteki kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasındaki Al konsantrasyonunun tespiti için deneyin son örnekleme gününde, düzenekten 1 adet kupon çıkartılmıştır. Steril eküvyon ile kuponun her iki yüzeyinde de oluşan biyofilm tabakası toplanmış ve içerisinde 20 ml steril bidistile su bulunan steril naylon poşetlere konulmuştur. Naylon poşetler 2 dk stomacher cihazında tutularak bakterilerin besiyerine geçmesi sağlanmıştır (Power ve diğ., 2001). Daha sonra eküvyonla birlikte bakteri süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılmış ve en 2 dk vorteksenerek bakterilerin suya transfer işlemi tamamlanmıştır (Gagnon ve Slawson, 1999). Biyofilm homojenatları 0.5 ml %65'lik nitrik asit ile asitlendirildikten sonra 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius) geçirilmiştir (Percival ve diğ., 1998).

Bakteri kültürü ve biyofilmden elde edilen örneklerin içeriğindeki Al konsantrasyonu ICP-MS cihazı (Thermo, XSeries2) ile ölçülmüştür.

3.6.3. Kontrol Düzeneği 1'in Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler

Kontrol düzeneği 1 ile 1 g/l final Mn konsantrasyonundaki Mn Broth besiyerinin, 7175-T7351 alüminyumun kimyasal korozyonuna etkisi incelenmiştir. Kontrol düzeneği, Bölüm 3.6.2'de anlatıldığı gibi deney düzeneği 1'e benzer şekilde steril cam beher (1 l hacimli), kupon taşıyıcı

aparar ve alüminyum kuponlar ile birlikte deney ortamından oluşmaktadır. Deney düzeneği 1'den tek farkı, deney ortamı olarak steril Mn Broth besiyerinin kullanılmış olmasıdır.

Kuponların Mn Broth ile temas ettiği an, 0. sa olarak kaydedilmiştir. Sonrasında kontrol düzeneği 160 gün süresince sıcaklığı 30°C olan bir çalkalamalı inkübatörün içerisinde tutulmuş ve deney ortamı 110 rpm hızla karıştırılmıştır. Düzeneğin sterilitesini kontrol etmek amacı ile deney süresince her hafta R2A besiyerine ekim yapılmıştır. Korozyon analizleri için belirlenen örnekleme günlerinde (4, 25, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160. gün) kontrol düzeneğinden 4 adet kupon çıkartılmıştır. Kontrol düzeneğinden çıkartılan 3 adet kuponun ağırlık kayıpları belirlenmiş ve kuponların korozyon hızları hesaplanmıştır. Bu üç kupondan biri, aynı zamanda MnO_x miktarının belirlenmesi için de kullanılmıştır. Diğer kupon fiksasyon işlemine tabi tutulmuş (Campanac ve diğ., 2002) ve sonrasında desikatörde saklanmıştır.

Aynı örnekleme günlerinde, kontrol düzeneğinden alınan deney ortamının Mn^{+2} ve Cl^- içeriği ile birlikte pH değeri tespit edilmiştir. Ayrıca steril Mn Broth besiyerindeki MnO_x miktarı da ölçülmüştür. Ek olarak, son örnekleme gününde, kontrol düzeneğindeki besiyeri ortamı ve bu ortama maruz kalan kupon yüzeyindeki film tabakasından alınan örneklerdeki Al iyon konsantrasyonları da ICP- MS analizi ile belirlenmiştir.

Laboratuvar ölçekli kontrol düzeneğinden gerçekleştirilen analizler aşağıdaki gibidir:

3.6.3.1. MnO_x Miktarının Tespiti

Deney ortamı olan steril Mn Broth besiyerindeki MnO_x miktarı, Bölüm 3.6.2.3'te anlatılan prosedüre göre tespit edilmiştir.

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

İlgili parametreler, Bölüm 3.6.2.4'te anlatılan şekilde ölçülmüştür.

3.6.3.3. Korozyon Hızı Hesabı

Örnekleme saatlerinde, kontrol düzeneğinden çıkartılan 3 adet kuponun temizliği ve korozyon hızı hesabı Bölüm 3.6.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6.3.4. Al Analizi

Steril Mn Broth içeriğindeki ve besiyerine maruz bırakılan kupon yüzeyinde oluşan film tabakasındaki Al konsantrasyonu Bölüm 3.6.2.6’da belirtildiği şekilde analiz için hazırlanmış ve ölçümler ICP-MS cihazında (Thermo, XSeries2) gerçekleştirilmiştir.

3.7. MINİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU (MİK) DENEYLERİ

3.7.1. Al ile MİK Deneyleri

Deney düzeneği 1 ve kontrol düzeneği 1’den gerçekleştirilen ICP-MS analiz sonuçları ile belirlenen Al konsantrasyonları doğrultusunda, final konsantrasyonları 0.004 - 4 g/l aralığında MİK deneyleri gerçekleştirilmiştir. Böylece Al elementinin, seçilen MOB izolatının üremesi üzerine etkisi incelenmiştir.

MİK deneyleri mikrobrot seyretime tekniği ile gerçekleştirilmiştir (NCCLS, 2000). Al’nin etkisi, alüminyum potasyum sülfat $[KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$ kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler mikropalakalarda, 4 - 0.004 g/l final konsantrasyonları arasında 2 kat seri seyreltmeler ile hazırlanan Al konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler 2 tekrarlı, ölçümler ise 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen absorbans verileri ile antibakteriyel etkinlik değerleri hesaplanmıştır (Bono ve diğ., 2019).

3.7.2. Mn ve Al ile MİK Deneyleri

Korozyon deneylerinin yürütüleceği laboratuvar ölçekli düzeneklerdeki deney ortamı içeriğinde Mn bulunacağından, Mn’nin Al ile birlikte, seçilen MOB izolatı üzerine sinerjistik etki göstermesi ihtimali söz konusu olabilir. Bu görüşü araştırmak üzere, sadece Al ile yapılan MİK deneylerine ek olarak, Mn’nin farklı final konsantrasyonları (0, 0.5, 1 ve 2 g/l) kullanılarak da Al ile MİK deneyleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). MİK deneyleri mikrobrot seyretime tekniği ile Bölüm 3.7.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3: MİK deneylerinde kullanılan Al ve Mn konsantrasyonları (g/l).

Mikro-plakalar	Elementler (g/l)	Kuyucuklar										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Al	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	0.015	0.007	0.003
	Mn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Al	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	0.015	0.007	0.003
	Mn	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
3	Al	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	0.015	0.007	0.003
	Mn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	Al	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	0.015	0.007	0.003
	Mn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

3.8. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 0.5 G/L

0.5 g/l Final Mn Konsantrasyonlu Deney Düzeneği (Deney Düzeneği 2): Bu düzeneğin işletimiyle, seçilen ve tanımlanan MOB izolatının, 0.5 g/l final Mn konsantrasyondaki ortamda, 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine MIC davranışı araştırılmıştır. MOB izolatının 0.5 g/l final Mn konsantrasyonuna sahip Mn Broth besiyerinde hazırlanan kültürü deney ortamı olarak kullanılmış ve 7175-T7351 alüminyum alaşımları 80 gün boyunca bu ortama maruz bırakılmıştır. Düzenekten belirli günlerde (6, 13, 25, 40, 60, 75 ve 80. gün) çıkarılan kuponlardan bakteriyolojik ve gravimetrik analizler ile MnO_x tespiti ve kültürden ise bakteriyolojik analiz ve bazı (MnO_x , Mn^{+2} , Cl^- ve pH) fizikokimyasal parametrelerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Son örnekleme gününde sistemden çıkarılan kupondan, biyofilm ve korozyon ürünlerinin tespiti için görüntüleme (SEM ve EDS) ve karakterizasyon (XPS) analizleri yapılmıştır.

0.5 g/l Final Mn Konsantrasyonlu Kontrol Düzeneği (Kontrol Düzeneği 2): Bu düzeneğin işletimiyle, 0.5 g/l final Mn konsantrasyondaki steril ortamın, 7175-T7351 alüminyum alaşımları üzerine korozyon etkisinin olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Kontrol düzeneği, 0.5 g/l final Mn konsantrasyonuna sahip steril Mn Broth besiyerine maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımları varlığında 80 gün boyunca işletilmiştir. Düzenekten belirli günlerde (6, 13, 25, 40, 60, 75 ve 80. gün) çıkarılan kuponlardan gravimetrik analizler ile MnO_x tespiti ve Mn Broth besiyerinden bazı (MnO_x , Mn^{+2} , Cl^- ve pH) fizikokimyasal parametrelerin analizi gerçekleştirilmiştir. Son örnekleme gününde sistemden çıkarılan kupondan, film ve

korozyon ürünlerinin tespiti için görüntüleme (SEM ve EDS) ve karakterizasyon (XPS) analizleri yapılmıştır.

3.8.1. Deney Düzeneği 2'nin Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler

Laboratuvar ölçekli deney düzeneği 2'de, Bölüm 3.3'te tanımlanan MOB izolatının varlığında 7175-T7351 alüminyum alaşımının mikrobiyolojik korozyon davranışı, 0.5 g/l final Mn konsantrasyonundaki Mn Broth ile hazırlanan bakteri kültüründe incelenmiştir. Laboratuvar ölçekli deney düzeneği, steril cam beher (1 l hacimli), kupon taşıyıcı aparat, alüminyum kuponlar ve deney ortamından oluşmaktadır. Deney düzeneği 2, Bölüm 3.6.2'de anlatılan şekilde kurulmuştur. Deney düzeneği 1'den farklı olarak, deney ortamında 0.5 g/l final Mn konsantrasyonundaki Mn Broth ile hazırlanan bakteri kültürü kullanılmış ve düzenek 80 gün boyunca işletilmiştir. Örnekleme günlerinde (6, 13, 25, 40, 60, 75 ve 80. gün) deney düzeneğinden çıkarılan kuponlardan ve bakteri kültüründen Bölüm 3.6.2'de anlatılan analizler gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar ölçekli deney düzeneğinden gerçekleştirilen analizler aşağıdaki gibidir:

3.8.1.1. Bakteri Sayısının Tespiti ve Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

Kültürdeki planktonik ve sesil bakteri sayısı, Bölüm 3.6.2.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.8.1.2. EPS Eldesi ve İçeriğindeki Toplam Karbonhidrat Miktarının Tespiti

Biyofilmden EPS'nin eldesi ve içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarının tespit edilmesi, Bölüm 3.6.2.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.8.1.3. MnO_x Miktarının Tespiti

Kültürde bulunan ve bu kültüre maruz bırakılan kuponların yüzeyinde biriken MnO_x miktarının tespiti, Bölüm 3.6.2.3'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

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

Deney düzeneğindeki bakteri kültürünün Mn^{+2} ve Cl^- içeriği ile birlikte pH değerindeki değişimler, Bölüm 3.6.2.4'te anlatıldığı şekilde ölçülmüştür.

3.8.1.5. Korozyon Hızı Hesabı

Örnekleme saatlerinde, deney düzeneğinden çıkartılan 3 adet kuponun temizliği ve korozyon hızı hesabı, Bölüm 3.6.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8.1.6. SEM ve EDS Analizleri

Deney kuponlarının yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakası ve korozyon ürünleri SEM ve EDS analizi ile belirlenmiştir. Görüntüleme analizlerinin yapılabilmesi amacıyla deney süresince her örnekleme saatinde, deney düzeneğinden bir adet kupon çıkartılmıştır.

Analizler öncesi kuponlar +4°C'de %2.5 glutaraldehit çözeltisinde 1 saat bekletilerek fikse edilmiştir. Bekleme süresi sonunda kuponlar, önce steril bidistile su ile hafifçe yıkanmış, sonra etanol serisi (%30, %50, %80 ve %95) içerisinde 10'ar dk bekletilerek suyu uzaklaştırılmıştır. İşlem sonunda havada kurumaya bırakılmıştır (Campanac vd., 2002). Fiksasyon işlemi tamamlanan kuponlar desikatörde saklanmıştır. Deneyin son örnekleme gününe ait fikse edilmiş kuponlardan seçilerek, SEM ve EDS analizleri öncesinde kuponların yüzeyi 15 nm kalınlıkta altın ile kaplanmış ve SEM cihazında (FEI, Versa 3D) incelenmiştir.

3.8.1.7. XPS Analizi

Deney kuponlarının yüzeylerinde oluşan korozyon ürünlerinin karakterizasyonu, hassas bir yüzey analiz tekniği olan XPS analizi ile gerçekleştirilmiştir. XPS analizinin yapılabilmesi amacıyla son örnekleme saatinde, deney düzeneğinden bir adet kupon çıkartılmıştır. Bölüm 3.8.1.6'da anlatılan şekilde fikse edilerek hazırlanan kuponların analizi, Boğaziçi Üniversitesi İleri Teknolojiler Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde, XPS cihazı (Thermo Scientific K-Alpha X-ray Fotoelektron Spektrometresi) ile hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. Kontrol Düzeneği 2'nin Kurulumu, İşletimi ve Yapılan Analizler

0.5 g/l final Mn konsantrasyonundaki Mn Broth besiyerinin, 7175-T7351 alüminyumun kimyasal korozyonuna etkisi, steril kontrol düzeneği 2 ile incelenmiştir. Kontrol düzeneği, Bölüm 3.6.5'te anlatıldığı gibi deney düzeneği 2'ye benzer şekilde steril cam beher (1 l hacimli), kupon taşıyıcı aparat ve alüminyum kuponlar ile birlikte deney ortamından oluşmaktadır. Deney düzeneği 2'den tek farkı, deney ortamı olarak steril Mn Broth besiyerinin kullanılmış olmasıdır. Düzenek 80 gün boyunca işletilmiştir ve örnekleme günlerinde (6, 13, 25, 40, 60, 75 ve 80. gün) kontrol düzeneğinden çıkarılan kuponlardan ve steril Mn borth besiyerinden Bölüm 3.6.3'te anlatılan analizler gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar ölçekli kontrol düzeneğinden gerçekleştirilen analizler aşağıdaki gibidir:

3.8.2.1. MnO_x Miktarının Tespiti

Deney ortamı olan steril Mn Broth besiyerindeki MnO_x miktarı, Bölüm 3.6.2.3'te anlatılan prosedüre uygun olarak tespit edilmiştir.

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

İlgili parametreler, Bölüm 3.6.2.4'te anlatıldığı şekilde ölçülmüştür.

3.8.2.3. Korozyon Hızı Hesabı

Örnekleme saatlerinde, kontrol düzeneğinden çıkartılan 3 adet kuponun temizliği ve korozyon hızı hesabı, Bölüm 3.6.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8.2.4. SEM ve EDS Analizleri

Kontrol kuponlarının yüzeylerinde oluşan film tabakası ve korozyon ürünleri SEM ve EDS analizi ile belirlenmiştir. Analizler Bölüm 3.8.1.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8.2.5. XPS Analizi

Kontrol kuponlarının yüzeylerinde oluşan korozyon ürünlerinin karakterizasyonu XPS analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz, Bölüm 3.8.1.7'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen istatistiksel analizlerde SPSS 24.0 programı kullanılmıştır. Bakteri sayıları, EPS'deki toplam karbonhidrat miktarları, alüminyum alaşımlı kuponların ağırlık kaybı ve korozyon hızı değerleri, deney ortamlarının fizikokimyasal parametreleri arasındaki ilişki Pearson ve Spearman korelasyon katsayıları testleri ile gösterilmiştir. Deney ve kontrol düzenekleri arasındaki değerlerin ortalamalar açısından farkının değerlendirilmesi t-testi ve Mann Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir.

3.10. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.10.1. R2A Besiyeri

Maya özütü	0.5 g
Pepton	0.5 g
Kazein hidrolizatı	0.5 g
Glukoz ($C_6H_{12}O_6$)	0.5 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	0.3 g
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.05 g
Nişasta	0.5 g
Pirüvik asit ($C_3H_3O_3Na$)	0.3 g
Agar	12 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanmıştır.

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

3.10.2. MnA Besiyeri

Maya özütü	0.075 g
Et ekstraktı	1 g
Amonyum demir (II) sülfat ($Fe (NH_4)_2(SO_4)$)	0.15 g
$MnCO_3$	2 g
Sodyum sitrat	0.15 g
Agar	20 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanmıştır.

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

3.10.3. LBB Besiyeri

Maya özütü	0.5 g
Pepton	2 g
Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.001 g
Manganez sülfat ($Mn SO_4 \cdot H_2O$)	0.15 g
0.1 M Hepes	100 mL

Agar	15 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanmıştır.

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

3.10.4. MnOB Besiyeri

Amonum sülfat ((NH ₄)SO ₄)	0.5 g
Manganez sülfat (MnSO ₄ .H ₂ O)	3 g
Sodyum nitrat (NaNO ₃)	0.5 g
Dipotasyum fosfat (K ₂ HPO ₄)	0.5 g
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.5 g
Tripton	1 g
Sükroz	2 g
Sitrik asit	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanmıştır.

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

3.10.5. 10N Ayarlı NaOH Çözeltisi

NaOH	40 g
Distile su	250 mL'ye tamamlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. JET A-1 YAKIT ÖRNEĞİNİN FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELERİ

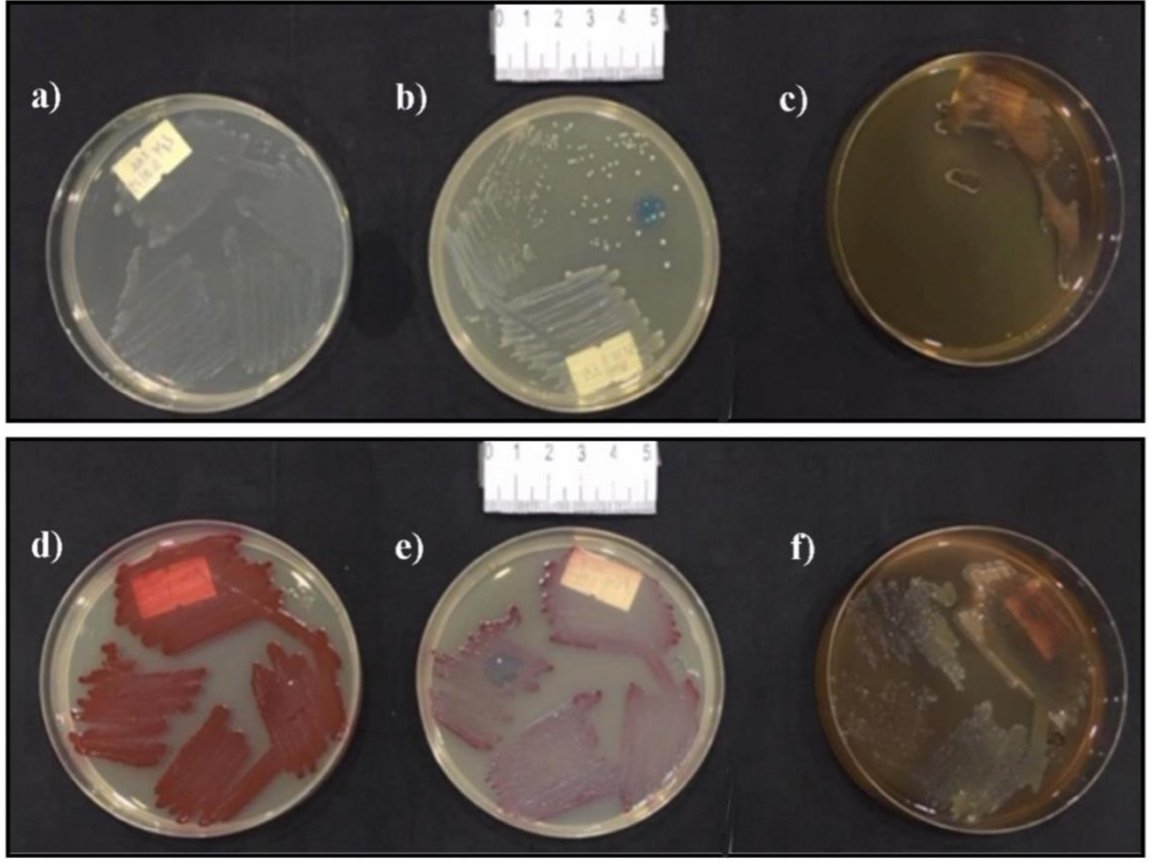
Aktif olarak uçuş gerçekleştiren ve C bakımı olarak adlandırılan 1 aylık bakım sürecindeki yolcu uçağının merkez ve kanat depolarından alınan Jet A-1 yakıt örneğinin fizikokimyasal parametreleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Yakıt örneği pH değerinin 6.58 olduğu, 8.10 mg/l çözülmüş oksijen içerdiği ve 0.2 mg/l’den daha düşük miktarda Mn içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Litresinde 0.34 mg hidrokarbon içerdiği ve bunların hacimce (%v/v) %82.9’ünü doymuş hidrokarbonların, geri kalan doymamış hidrokarbonların ise %16.3’ünü aromatiklerin, %0.8’ini ise olefinlerin oluşturduğu saptanmıştır.

Tablo 4.1: Jet A-1 yakıt örneğinin fizikokimyasal parametreleri.

Parametre	Değer	Birim
Sıcaklık	23.2	°C
pH	6.58	pH
Çözülmüş oksijen	8.10	mg/l
Demir (Fe)	<0.2	mg/l
Mangan (Mn)	<0.2	mg/l
Fosfat fosforu (PO_4^{-3})	0.124	mg/l
Klorür (Cl^-)	97	mg/l
Hidrojen sülfür (H_2S)	<0.1	mg/l
Hidrokarbonlar	0.34	mg/l
İletkenlik	809	$\mu\text{S}/\text{cm}$

4.2. MANGAN OKSİDE EDEN AHB’LER

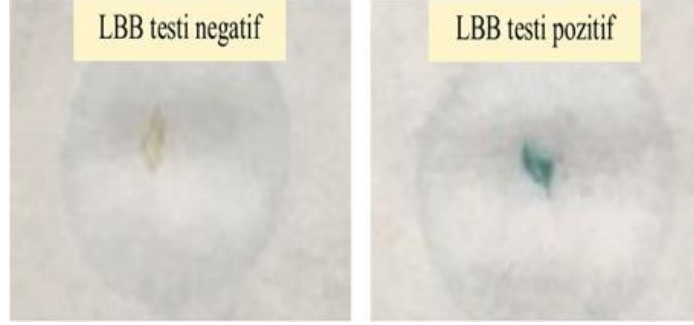
AHB izolatlarından MOB olanların tespiti için MOB’lere spesifik LBB, Mn Agar ve MnOB besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bu üç farklı besiyerinde üreyen bakterilerin oluşturduğu kolonilerin farklı özellikler gösterdiği tespit edildiğinden, bu besiyerlerinde üreyen tüm AHB’ler MOB şüpheli olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: MOB'lerin LBB (a ve d), MnA (b ve e) ve MnOB (c ve f) besiyerlerindeki üreme görüntüleri.

MOB şüpheli bakterilerin Mn okside edebilme yeteneğinde olup olmadığının doğrulanması amacıyla besiyerlerindeki kolonilere LBB testi uygulanmış, fakat aynı bakteri için farklı besiyerlerinde farklı sonuçlar alınmıştır. Besiyerindeki LBB test sonuçları, Mn Agar ve MnOB besiyerlerinde tüm izolatlar için pozitif iken, LBB besiyerinde az sayıdaki izolat hariç hepsi için negatif olarak tespit edilmiştir. Yüksek Mn konsantrasyonuna sahip Mn Agar (2 g/l) ve MnOB (3 g/l) besiyerlerindeki tüm sonuçların pozitif olması, besiyerlerinin kimyasal oksidasyonu sebebiyle yalancı pozitifliğin meydana gelmiş olabileceğini düşündürmüştür. Bu sebeple Mn Agar ve MnOB besiyerlerinin steril koşullarda kimyasal olarak okside olup olmadığı araştırılmıştır. MnOB besiyerinin kendiliğinden okside olarak yalancı pozitiflik verdiği belirlendiğinden, ileri ki deneylerde kullanılmamıştır. Ayrıca besiyerinde uygulanan LBB testinin de, besiyeri içeriğindeki Mn sebebiyle hatalı sonuç verebildiği fark edildiğinden tüm izolatlar için, filtre kağıdı üzerinde uygulanan LBB testi sonucunun dikkate alınması gerektiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.2). Filtre kağıdı yöntemi ile uygulanan LBB test

sonuçlarında, daha önce besiyerinde gerçekleştirilen LBB testinde pozitif sonuç veren izolatlardan sadece üç tanesinin (izolat 1, izolat 2, izolat 3) Mn'ı okside ettiği belirlenmiştir. Bu izolatlar MOB izolatı olarak adlandırılmıştır.



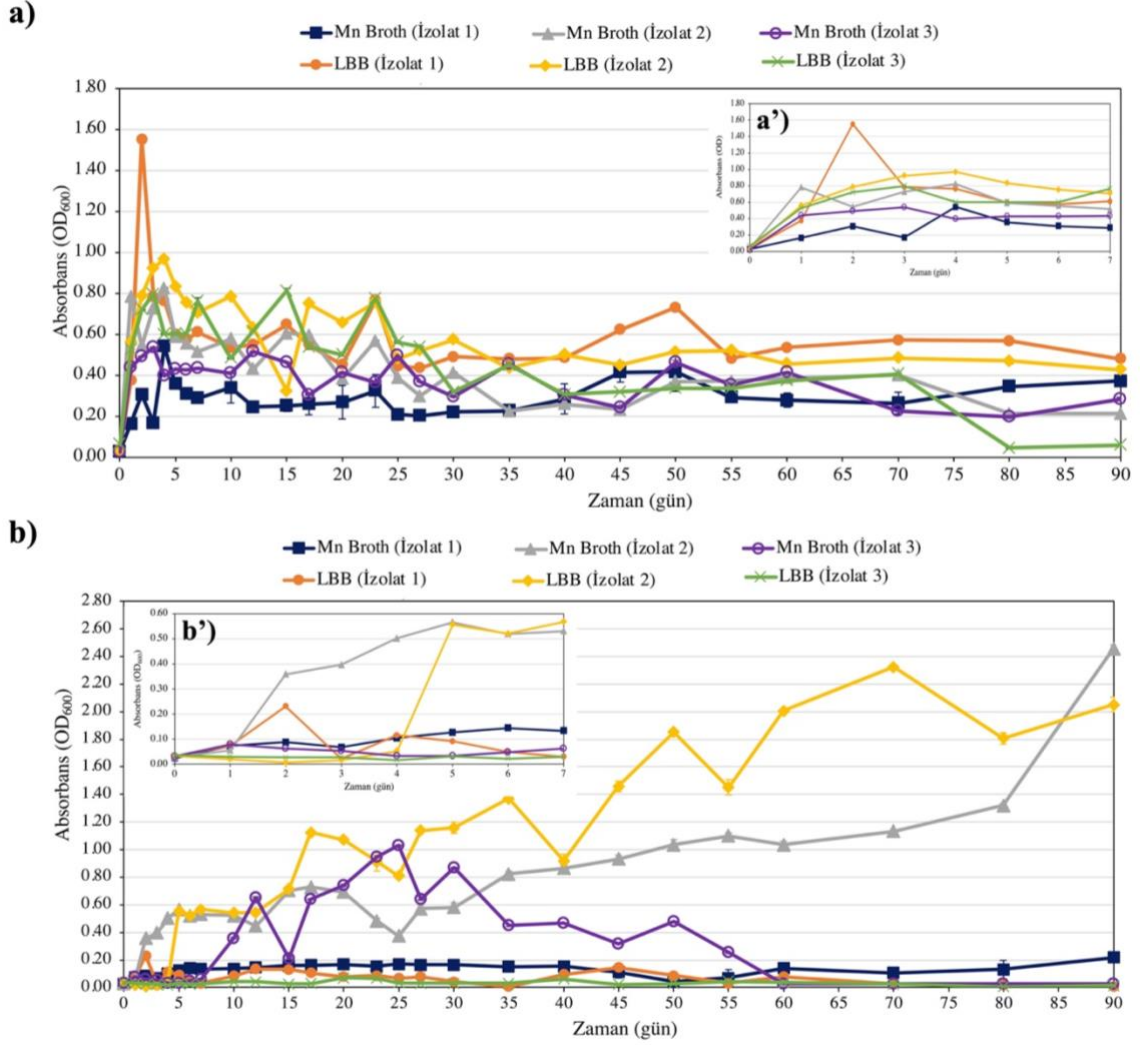
Şekil 4.2: Filtre kağıdı yöntemi ile LBB test sonuçları.

4.3. EN AKTİF MOB İZOLATI

Jet A-1 yakıt örneğinden, izolat 1, izolat 2, izolat 3 olmak üzere üç farklı MOB izolatı elde edilmiştir. Bu üç izolatın Mn Broth ve sıvı LBB besiyerlerindeki gelişim durumları (bakteri yoğunlukları ve üreme fazları) ve Mn oksitleme aktiviteleri belirlenerek, metabolik olarak en aktif olan izolat tespit edilmiştir.

4.3.1. MOB İzolatlarının Büyüme Eğrileri

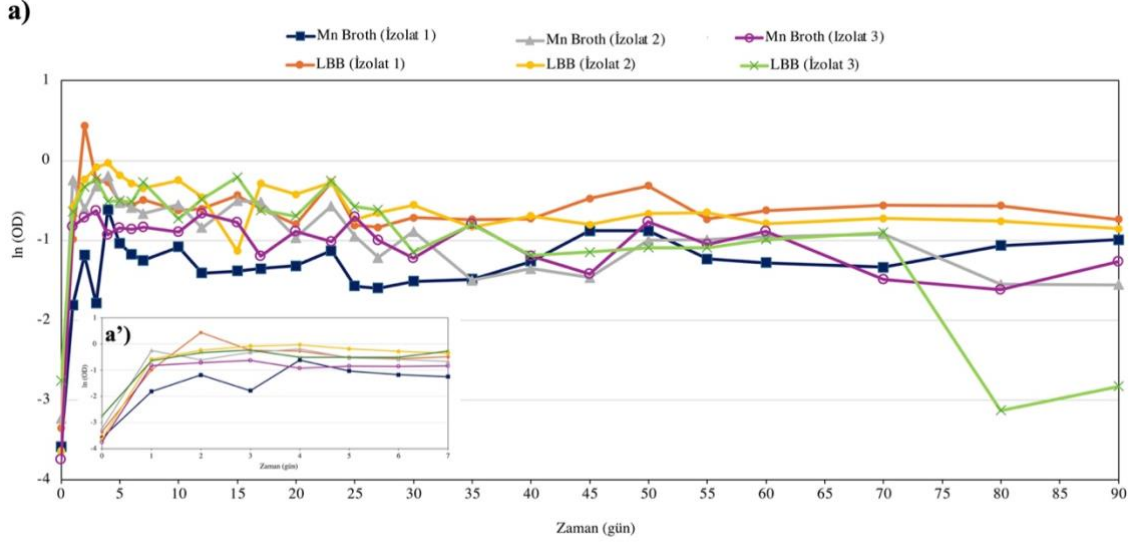
Bakteri izolatlarının Mn içeren ve içermeyen Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Mn varlığında ve yokluğunda, bakterilerin büyüme eğrilerinde belirgin bir farklılık olduğu gözlemlenmiş olup, her iki besiyerinde de Mn varlığının izolat 2'nin büyümesini teşvik ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.3: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün, Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri (OD₆₀₀). (a) Mn içermeyen, (b) Mn içeren. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

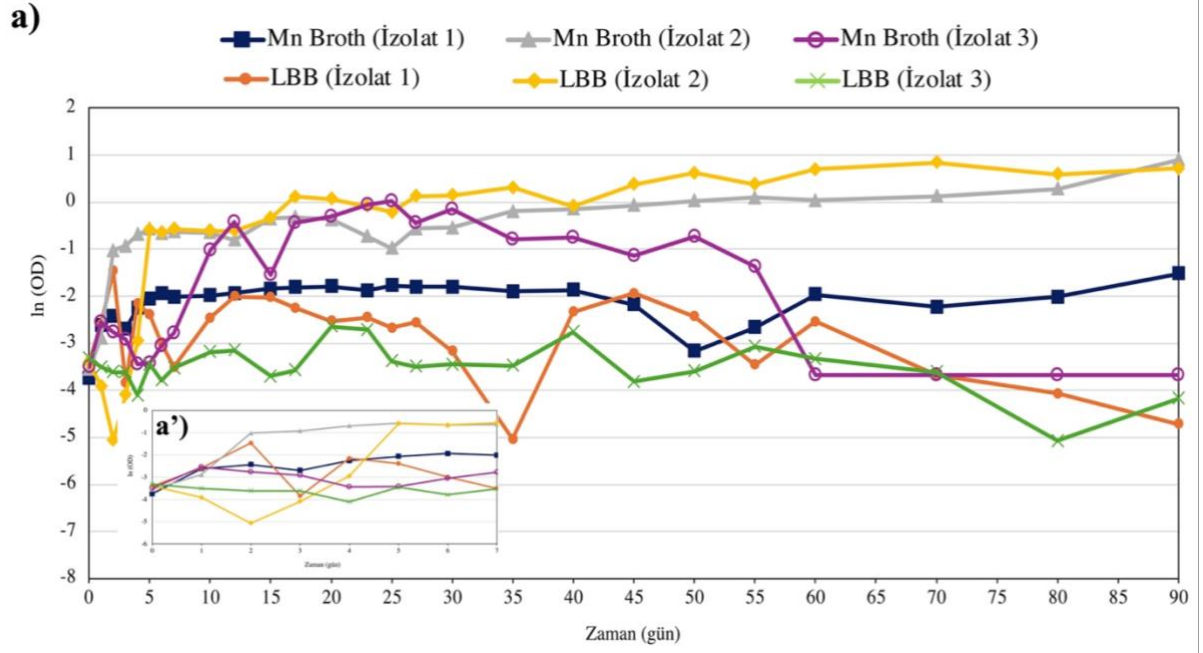
Mn içermeyen Mn Broth ve LBB besiyerlerinde üç bakteri izolatu da çoğalmış ve yoğunluklarının da deney süresince genel olarak birbirine yakın seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4.3a ve Şekil 4.4a). Ancak bakteri izolatların büyüme fazlarının bakteri türüne ve besiyerine göre değiştiği belirlenmiştir. İzolat 1'in her iki besiyerinde de 2. günde duraklama fazına girdiği (Şekil 4.4a) ve deney sonuna kadar duraklama fazında kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.4b). İzolat 2'nin, Mn Broth ve LBB besiyerinde 1. günde duraklama fazına girdiği (Şekil 4.4b) ve LBB besiyerinde deney sonuna kadar duraklama fazında kaldığı gözlenirken, Mn broth besiyerinde 70. günde ölüm fazına girdiği saptanmıştır (Şekil 4.4a). İzolat 3'ün ise her iki besiyerinde de 1. günde duraklama fazına girdiği (Şekil 4.4b) ancak, Mn Broth besiyerinde deney sonuna kadar

duraklama fazında kalmasına rağmen, LBB besiyerinde 70. günde ölüm fazına girdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4a).



Şekil 4.4: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün Mn içermeyen Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri ($\ln OD_{600}$). (a) 90 günlük tüm deney süresince, (a') deneyin ilk 7 günü. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Bakterilerin, Mn içeren besiyerlerindeki büyüme eğrileri karşılaştırıldığında, izolat 2'nin hem Mn Broth hem de LBB besiyerinde izolat 1 ve izolat 3'e göre daha yoğun ürediği saptanmıştır (Şekil 4.5). İzolat 1, deney süresince her iki besiyerinde de zayıf bir üreme göstermiş, belirgin olarak büyüme fazları gözlenmemiştir (Şekil 4.3b, Şekil 4.5a). İzolat 2, Mn Broth besiyerinde 2. gün durgun faza girmekle birlikte (Şekil 4.5a'), deney sonuna büyümenin artış eğiliminde olduğu ve deney sonunda da en yoğun büyümeyi (2.46 OD) gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3b, Şekil 4.5a) LBB besiyerinde ise 4. güne kadar lag fazında kaldıktan sonra logaritmik faza (Şekil 4.3b, Şekil 4.5a), 5. günden sonra da duraklama fazına girdiği ancak deney sonuna kadar büyümenin artış eğiliminde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5a). İzolat 3'ün ise Mn Broth besiyerinde 7. güne kadar lag fazında kaldıktan sonra logaritmik faza girdiği, 12. günden sonra durağan faza geçtiği ve 50. günden itibaren de ölüm fazına girdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3b, Şekil 4.5a). LBB besiyerinde ise İzolat 3'ün Mn'nin toksik etkisini aşmakta zorlandığı tespit edilmiş olup, deney süresince büyüme fazları gözlenmemiştir (Şekil 4.3b, Şekil 4.5a).



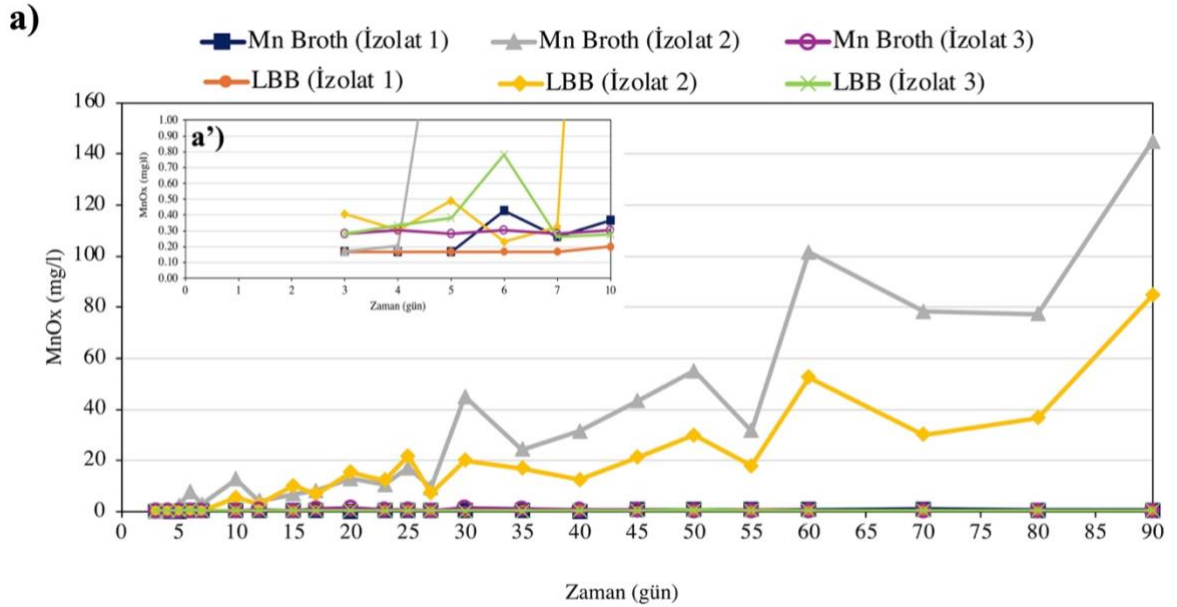
Şekil 4.5: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün Mn içeren Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri (ln OD₆₀₀). (a) 90 günlük tüm deney süresince, (a') deneyin ilk 7 günü. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Her bir izolatın Mn içeren ve içermeyen aynı besiyerinde farklı büyüme davranışı sergilediği ve Mn varlığında izolatların duraklama fazına daha geç girdiği tespit edilmiştir. İzolat 1'in Mn varlığında büyüme gösteremediği belirlenmiştir. İzolat 2'nin ise Mn varlığında her iki besiyerinde de Mn içermeyen besiyerlerindeki göre daha iyi üreme gösterdiği ve duraklama fazına daha geç girdiği, hatta deney sonuna kadar da büyümenin devam ettiği saptanmıştır. İzolat 3'ün ise Mn varlığında Mn Broth besiyerinde Mn'siz besiyerine göre daha iyi bir büyüme gösterdiği tespit edilirken, LBB'de ise tam tersine büyümesinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Mn'nin varlığı, izolat 1'in büyümesini baskılarken, izolat 2'ninkini her iki besiyerinde de teşvik etmiştir. Bununla birlikte, izolat 3'ün büyümesini Mn Broth besiyerinde teşvik ederken, LBB besiyerinde baskılamıştır. Bu bulgular, her bir izolatın Mn içeren farklı besiyerlerinde farklı büyüme davranışı sergilediğini göstermektedir. Mn varlığının izolat 2'nin büyümesini teşvik ettiği ve ayrıca her iki besiyerinde de en yoğun büyümeyi izolat 2'nin gösterdiği tespit edilmiştir.

4.3.2. MOB İzolatlarının Mn Oksitleme Aktiviteleri

Bakteri izolatlarının, Mn oksitleme yetenekleri hem Mn Broth hem de LBB besiyerinde spektrofotometrik olarak LBB solüsyonu kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Tüm izolatlar için her iki besiyerinde de ilk MnO_x üretimi 3. günde tespit edilmiştir. Deney süresince, izolat 1 ve izolat 3'ün her iki besiyerinde de düşük miktarlarda (sırasıyla, 0.16-0.42 mg/l ve 0.28-0.78 mg/l) MnO_x üretebildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, izolat 2'nin deney süresince her iki besiyerinde de, diğer izolatlara göre daha yüksek miktarlarda MnO_x üretebildiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: İzolat 1, izolat 2 ve izolat 3'ün, Mn Broth ve LBB besiyerindeki Mn oksitleme aktiviteleri (OD_{620}). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

İzolat 2'nin deney süresince Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki Mn'yi oksitleme aktivitesinin farklılık gösterdiği saptanmıştır. İzolat 2'nin Mn oksitleme aktivitesi, Mn Broth besiyerinde 4. günden sonra, LBB besiyerinde ise 7. günden sonra ivme kazanmıştır. Mn Broth besiyerinde 27. günden itibaren deney sonuna kadar LBB'ye göre daha fazla miktarda MnO_x üretmiştir. Ayrıca 40. günden sonra Mn oksitleme aktivitesinin her iki besiyerinde de benzer şekilde seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4.6).

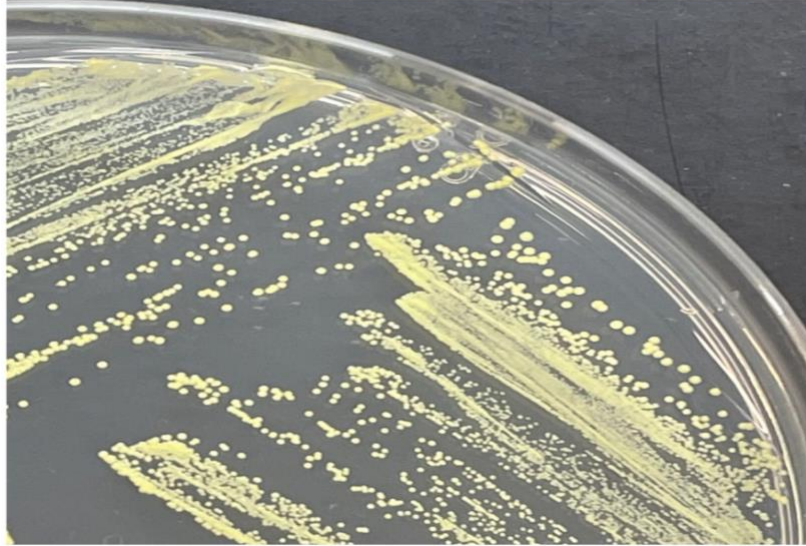
Bakterilerin Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki büyüme eğrileri ile birlikte bu besiyerlerindeki Mn oksitleme aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda, en aktif MOB izolatının izolat 2

olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, korozyon deneylerinde izolat 2'nin kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla birlikte, bu bakterinin LBB besiyerinde daha iyi ürediği belirlenirken, Mn Broth besiyerinde daha fazla Mn oksitleme aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle deney ortamı olarak hangi besiyerinin kullanılacağı ve bu besiyerinin Mn konsantrasyon içeriği ileri analizlerle belirlenmiştir.

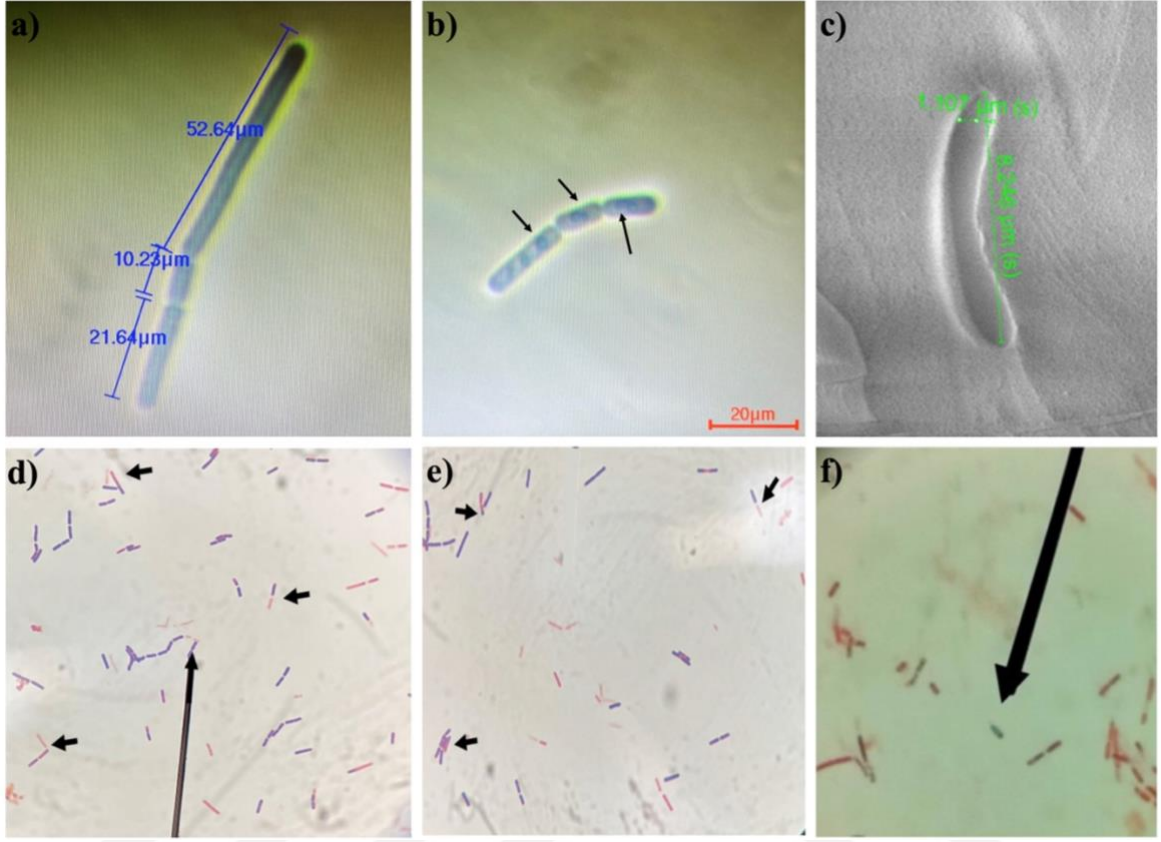
4.4. SEÇİLEN MOB İZOLATININ TANIMLANMASI

4.4.1. Fenotipik Özellikleri

İzolat 2'ye JETA1-E2 kodu verilmiştir. JETA1-E2 suşunun R2A, TSA ve LB besiyerlerinde iyi, NA besiyerinde ise zayıf ürediği saptanmış ve tüm besiyerlerinde sarı renkte koloniler oluşturduğu gözlenmiştir. JETA1-E2 suşu, R2A besiyerinde 1 mm çapında, yuvarlak, sarı, düz kenarlı koloniler oluşturmaktadır (Şekil 4.7). Mikroskopik incelemeler, hücrelerin farklı uzunluklarda, düzgün çomak şeklinde (Şekil 4.8a - Şekil 4.8c) ve hareketli olduğunu ortaya koymuştur. Suşa ait hücrelerin ayrıca, “Gram-belirsiz (Gram-indeterminate)” (Şekil 4.8d ve Şekil 4.8e) olduğu ve 3 günlük inkübasyondan sonra spor oluşturduğu da saptanmıştır (Şekil 4.8f) (Tablo 4.2).



Şekil 4.7: JETA1-E2 suşunun R2A besiyerindeki koloni morfolojisi



Şekil 4.8: JETA1-E2 suşunun mikroskopik özellikleri; Faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (a ve b), SEM görüntüsü (c), Gram boyalı preparatın ışık mikroskobu görüntüsü (d ve e), Spor boyalı preparatın ışık mikroskobu görüntüsü (f).

JETA1-E2 suşunun fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini ortaya koyan API 20NE, API 20E, API ZYM ve API 50CH test kitlerine ait sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir. JETA1-E2 suşunun L-arabinoz, D-ksiloz, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, N-asetilglukozamin, amigdalın, eskülin hidrolizi, jelatin hidrolizi, salisin (zayıf pozitif), D-sellobiyoz, D-maltoz, D-laktoz (sığır kaynaklı), D-sakaroz (sükroz), D-trehaloz, gentiobiyo, para-nitrofenil-β-D-galaktopiranosidaz, Voges-Proskauer, alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), lösin arilamidaz, valin arilamidaz, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, β-glucosidase, N-asetil-β-glukozaminidaz, üreaz enzim testlerinin yanı sıra glukoz, arabinoz, mannoz ve N-asetilglukozamin asimilasyonları ile nitratın nitrite indirgenmesi ve sitratın yalnızca karbon kaynağı olarak kullanımı testlerinin de pozitif olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak bakterinin, oksidaz testi zayıf pozitif ve katalaz testi pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: JETA1-E2 suşunun fenotipik özellikleri (“+” pozitif, “-” negatif test sonucunu göstermektedir).

Özellikler / Testler	Test Sonucu
Hücre Morfolojisi	
Gram Özelliği	Belirsiz
Hücre Şekli	Çomak
Koloni Morfolojisi	
Tüm Koloni	Yuvarlak
Kenar Yapısı	Düz
Dikey Görünüm	Kabarık
Yüzey	Düz
Mukoidlik	-
Koloni Rengi	Sarı
Transparan/Opak	Opak
Hücre boyutu (µm)	Belirsiz
Spor Özelliği	+
Hareket Yeteneği	+
Katalaz	+
Oksidaz	Zayıf ⁺
Büyüme sıcaklık aralığı (°C) (optimum değer)	20-42 (30)
Büyüme pH aralığı (optimum değer)	6-9 (7)
Büyüme NaCl aralığı (% w/V) (optimum değer)	0-12 (2-4)
Oksijen toleransı	Zorunlu aerobik
API 20 NE	
NO ₃ Nitratların nitritlere indirgenmesi	+
TRP L-triptofan ile indol üretimi	-
GLU D-glikozun (heksoz şekeri) fermentasyonu	-
ADH L-arjinin amino asidinin arjinin dihidrolaz ile dekarboksilasyonu	-
URE Üreaz enzimi testi	-
ESC Hidroliz (β-glukosidaz) (eskülin)	+
GEL Hidroliz (proteaz) (jelatin)	+
PNG β-Galaktosidaz (para-nitrofenil-βD-galaktopiranosidaz)	+
GLU Glikoz asimilasyonu	+
ARA Arabinoz asimilasyonu	+
MNE Mannoz asimilasyonu	+
MAN Mannitol asimilasyonu	-
NAG N-asetil-glukozamin asimilasyonu	+
MAL Maltoz asimilasyonu	+
GNT Potasyum glukonat asimilasyonu	-

Tablo 4.2 (devam): JETA1-E2 suşunun fenotipik özellikleri (“+” pozitif, “-” negatif test sonucunu göstermektedir).

Özellikler / Testler		Test Sonucu
CAP	Kaprik asit asimilasyonu	-
ADI	Adipik asit asimilasyonu	-
MLT	Malat asimilasyonu	-
CIT	Trisodyum sitrat asimilasyonu	-
PAC	Fenilasetik asit asimilasyonu	-
API 20 E		
ONPG	o-nitrofenil-b-D-galaktopiranosid substratının hidrolizi ile β -galaktosidaz enzimi testi	+
ADH	L-arjinin amino asidinin arjinin dihidrolaz ile dekarboksilasyonu	-
LDC	Lizin amino asidinin lizin dekarboksilaz ile dekarboksilasyonu	-
ODC	Ornitin amino asidinin ornitin dekarboksilaz ile dekarboksilasyonu	-
CIT	Sitratın yalnızca karbon kaynağı olarak kullanılması	+
H ₂ S	Hidrojen sülfür üretimi	-
URE	Üreaz enzimi testi	-
TDA	Triptofan deaminaz enziminin tespiti	-
IND	İndol testi- triptofanaz enzimi ile triptofandan indol üretimi	-
VP	Voges-Proskauer testi	+
GEL	Jelatini sıvılaştıran jelatinaz enziminin üretimi için test	-
GLU	D-glikozun (heksoz şekeri) fermantasyonu	-
API ZYM		
	Alkalın fosfataz	+
	Esteraz (C4)	+
	Esteraz Lipaz (C8)	+
	Lipaz (C 14)	-
	Lösin arilamidaz	+
	Valin arilamidaz	+
	Sistin arilamidaz	-
	Tripsin	-
	α -kimotripsin	-
	Asit fosfataz	+
	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	+
	α -galaktosidaz	-
	β - galaktosidaz	-
	β -glukuronidaz	-
	α -glukosidaz	-
	β - glukosidaz	+

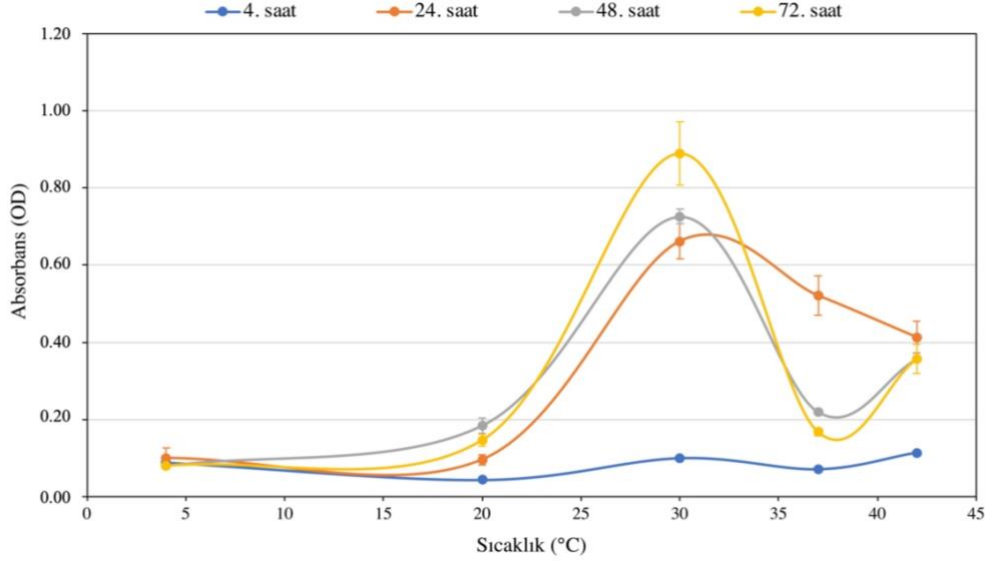
Tablo 4.2 (devam): JETA1-E2 suşunun fenotipik özellikleri (“+” pozitif, “-” negatif test sonucunu göstermektedir).

Özellikler / Testler		Test Sonucu
N-asetil-β-glukozaminidaz		+
α-mannosidaz		-
α-fukosidaz		-
API 50 CH		
GLY	Gliserol	-
ERY	Eritrol	-
DARA	D-arabinoz	-
LARA	L- arabinoz	+
RIB	D-riboz	-
DXYL	D-ksiloz	+
LXYL	L- ksiloz	-
ADO	Adonitol	-
MDX	Metil-beta-D- ksilopiranosid	-
GAL	D-galaktoz	+
GLU	D-glukoz	+
FRU	D-fruktoz	+
MNE	D-mannoz	+
SBE	L-sorboz	-
RHA	L-ramnoz	-
DUL	Dulcitol	-
INO	Inositol	-
MAN	D-mannitol	-
SOR	D-sorbitol	-
MDM	Metil-alfa-D-mannopiranosid	-
MDG	Metil-alfa-D-glukopiranosit	-
NAG	N-asetilglukozamin	+
AMY	Amigdalın	+
ARB	Arbutin	-
ESC	Eskülin ferrik sitrat	+
SAL	Salisin	Zayıf ⁺
CEL	D-sellobiyoz	+
MAL	D-maltoz	+
LAC	D-laktoz (sığır kökenli)	+
MEL	D-melibiyoz	-
SAC	D-sakaroz (sükroz)	+
TRE	D-trehaloz	+

Tablo 4.2 (devam): JETA1-E2 suşunun fenotipik özellikleri (“+” pozitif, “-” negatif test sonucunu göstermektedir).

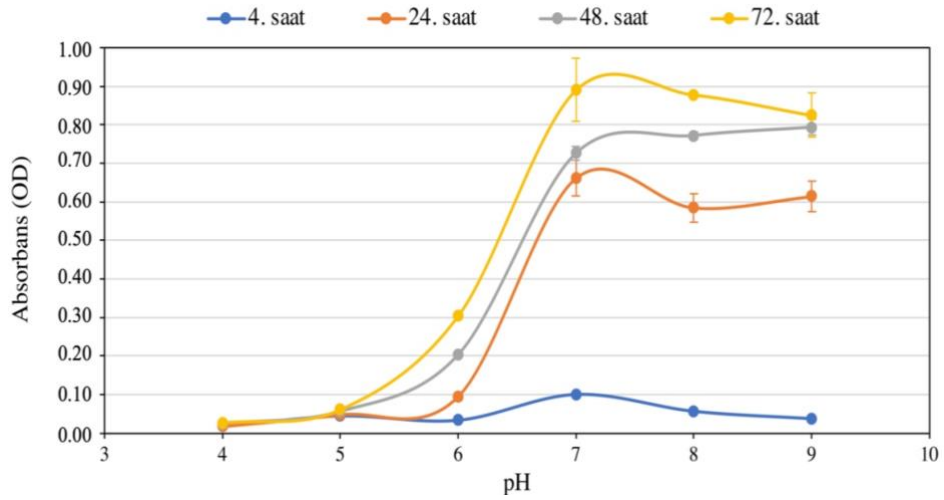
Özellikler / Testler		Test Sonucu
INU	Inülin	-
MLZ	D-melezitoz	-
RAF	D-rafinoz	-
AMD	Amidon (nişasta)	-
GLYG	Glikojen	-
XLT	Ksilitol	-
GEN	Gentiobiyoz	+
TUR	D-turanoz	-
LYX	D-liksoz	-
TAG	D-tagatoz	-
DFUC	D-fukoz	-
LFUC	L- fukoz	-
DARL	D-arabitol	-
LARL	L-arabitol	-
GNT	Potasyum glukonat	-
2KG	Potasyum 2-ketoglukonat	-
5KG	Potasyum 5-ketoglukonat	-

JETA1-E2 suşunun farklı sıcaklıklardaki (4, 20, 30, 37 ve 42°C) büyüme toleransı incelendiğinde, bakterinin 20-42°C sıcaklık aralığında büyüebildiği ve optimum üremeyi 30°C’de gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Bakteri en zayıf büyümeyi 20°C’de göstermiş olup, optimum değerden sonra, sıcaklık arttıkça absorbans değerlerinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.9).



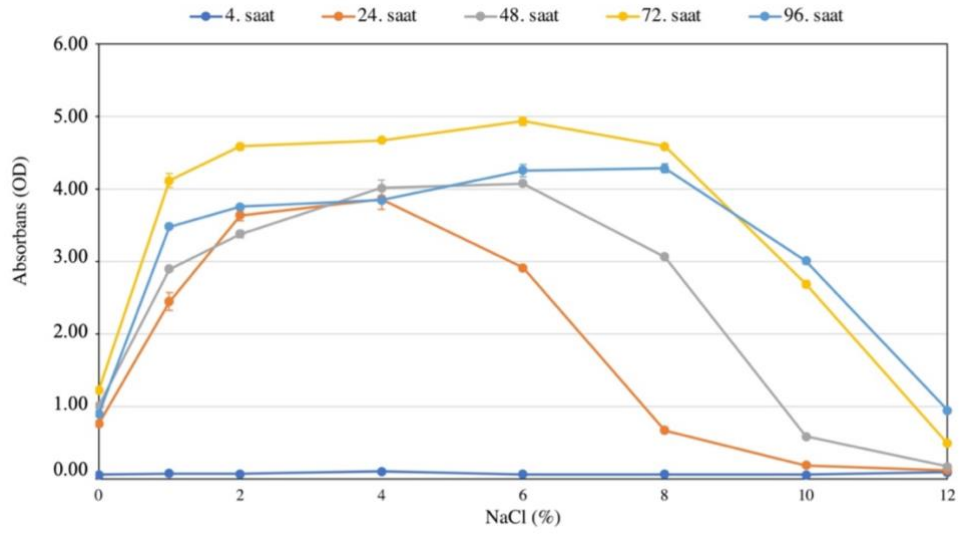
Şekil 4.9: Farklı sıcaklık değerlerinin (4, 20, 30, 37 ve 42°C) JETA1-E2 suşunun büyümesine etkisi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

JETA1-E2 suşunun farklı pH değerlerindeki (4, 5, 6, 7, 8 ve 9) büyüme toleransı araştırılmış ve bakterinin, 6-9 aralığındaki pH değerlerinde üreyebildiği ve optimum büyümeyi de pH 7'de gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Bununla birlikte pH 8 ve pH 9'da ölçülen absorbans değerlerinin, genellikle daha düşük olmakla birlikte pH 7'de ölçülenlere çok yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Farklı pH değerlerinin (4, 5, 6, 7, 8 ve 9) JETA1-E2 suşunun büyümesine etkisi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

JETA1-E2 suşunun farklı tuz konsantrasyonlarındaki (%0, %1, %2, %4, %6, %8, %10 ve %12 NaCl (w/v)) büyüme toleransı incelenmiş ve tuz varlığının bakterinin büyümesini motive ettiği tespit edilmiştir. Bakterinin optimum olarak %2 ve %4 NaCl konsantrasyonlarında büyüdüğü saptanmıştır. Bakterinin %4'ün üzerindeki NaCl konsantrasyonlarına karşı tolerans gösterdiği tespit edilmiştir. Bu toleransın artan tuz konsantrasyonlarına karşı ilk 24 sa'da düşük olduğu görülmekle birlikte, zamanla özellikle de 72 sa'lık inkübasyon süresi sonunda, arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

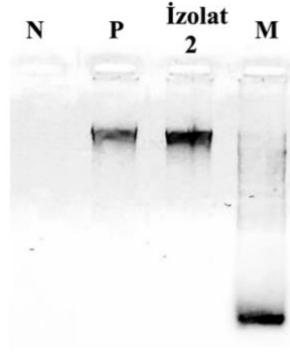


Şekil 4.11: Farklı tuz konsantrasyonlarının (%0, %1, %2, %4, %6, %8, %10 ve %12) JETA1-E2 suşunun büyümesine etkisi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

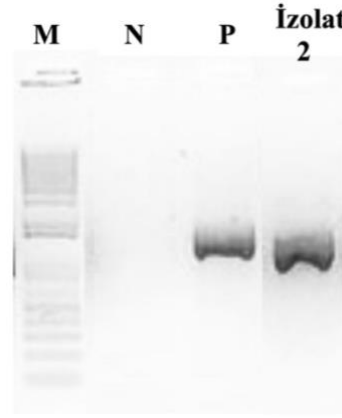
4.4.2. Genotipik Özellikleri

4.4.2.1. Kısmi 16S rRNA Gen Dizileri ile Tanımlama

JETA1-E2 suşundan gDNA ve sonrasında PZR ürünlerinin eldesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.12: JETA1-E2 suşunun ait gDNA'ların jel görüntüsü (N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, M: Markır).



Şekil 4.13: JETA1-E2 suşunun ait PZR ürünlerinin jel görüntüsü (M: Markır, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol).

Çift yönlü DNA dizi analizi sonucunda elde edilen 16S rDNA gen dizilerinden 1377 baz uzunluğunda konsensus dizi elde edilmiştir. Bu dizi, BLAST algoritma kullanılarak NCBI “National Center for Biotechnology Information”, (www.ncbi.nlm.nih.gov) Gen Bankasında saklanan diziler ile karşılaştırılmıştır. JETA1-E2 suşunun filogenetik olarak seçilen en yakın türleri Tablo 4.3’te ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Suşun kısmi 16S rRNA gen dizileri, *Sphingomonas paucimobilis* (MT367853) (%99.42), *Sphingomonas sanguinis* (MF319771) (%99.34) ve *Sphingomonas pseudosanguinis* (HE716953) (%99.27) ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Tespit edilen benzerlik değerleri, prokaryotik organizmalarda tür düzeyinde tanımlama için kabul edilen eşik değerinin (%98.5) üzerinde olduğundan, JETA1-E2 suşu tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Bununla birlikte, benzerlik değerleri cins düzeyinde

tanımlama için kabul edilen eşik değerinin (%94.5) üzerinde olduğundan bu durum, JETA1-E2 suşunun *Sphingomonas* cinsine ait bir bakteri türü olduğuna işaret etmektedir.

Tablo 4.3: Kısmi 16S rRNA gen dizisine göre JETA1-E2 suşunun filogenetik olarak ilişkili olduğu bakteri türleri.

NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Mikroorganizma	Erişim Numarası	Query Cover (%)	E Değeri	Benzerlik (%) (Eşleşen Baz Sayısı)
<i>Sphingomonas</i> sp. Sph5	KP866797.1	98	0.0	99.71
<i>Sphingomonas</i> sp. 2363	JX174240.1	99	0.0	99.35
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	MT367853.1	99	0.0	99.42
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	MT367836.1	99	0.0	99.42
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	MF319771.1	99	0.0	99.34
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	JQ660132.1	99	0.0	99.27
<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>	HE716953.1	99	0.0	99.27
<i>Sphingomonas</i> sp. SG73	LC618681.1	99	0.0	99.27
<i>Sphingomonas</i> sp. Sph2	KP866794.1	99	0.0	99.34

JETA1-E2 suşunun, benzerlik gösterdiği *Sphingomonas* türleri içerisinde hangisine ait olduğunun tespit edilebilmesi için API test sonuçları, kısmi 16S rRNA gen dizilerine göre filogenetik olarak yakından ilişkili olduğu bakterilerin tip türlerine (*Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098^T, *Sphingomonas sanguinis* DSM 13885^T ve *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512^T) ait literatürde yer alan API test sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Yabuuchi ve diğ., 1990; Takeuchi ve diğ., 1993; Kämpfer ve diğ., 2007; Xue ve diğ., 2018). JETA1-E2 suşu ile bu suşun genotipik açıdan yüksek oranda benzerlik gösterdiği *Sphingomonas* tip türlerinin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

JETA1-E2 suşu da dâhil olmak üzere, karşılaştırılan tüm suşların katalaz, L-arabinoz, D-ksiloz, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, N-asetilglukozamin, amigdalin, eskülin hidrolizi, D-sellobiyoz, D-maltoz, D-laktoz (sığır kaynaklı), D-sakaroz (sükroz), D-trehaloz, gentiobiyoz, para-nitrofenil-β-D-galaktopiranosidaz, alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), lösin arilamidaz, valin arilamidaz, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, β-glucosidase, N-asetil-β-glukozaminidaz testlerinin ve glukoz, arabinoz, mannoz ve maltoz asimilasyonunun pozitif olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, tüm suşların, eritritol, D-riboz, D-ksiloz, L-sorboz, dulsitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, inülin, glikojen, ksilitol, D-likoz, D-tagatoz, D-arabitol, L-arabitol, potasyum glukonat, potasyum 2-ketoglukonat, potasyum 5-ketoglukonat,

indol üretimi, glukoz fermantasyonu, arjinin dihidrolaz, üreaz, lipaz (C 14), α -mannosidaz testleri ve mannitol, potasyum glukonat, kaprik asit, adipik asit ve fenilasetik asit asimilasyonu açısından negatif olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.4: JETA1-E2 suşunun, kısmi 16S rRNA gen dizilerine göre yakın akraba olduğu *Sphingomonas* türlerinin tip suşlarından ayırıcı özellikleri.

Özellik	1	2	3	4
İzolasyon kaynağı	Jet A-1 yakıt	Hastane solunum cihazı	Kan	Hava nemlendirici yüzeyi
Koloni rengi	Sarı	Sarı	Koyu sarı	Sarı
Gram-boyama	Belirsiz	-	-	-
Hücre büyüklüğü (μm)	Belirsiz	0.7x1.4 (ortalama)	NF	0.8-1.5x0.4-0.6
Spor	+	-	-	-
Hareketlilik	+	+	+	-
Oksidaz	z^+	-	+	+
Büyüme sıcaklık aralığı ($^{\circ}\text{C}$) (optimum)	20-42 (30)	4-40 (25-37)	20-41 (30)	20-41 (28-37)
Büyüme pH aralığı (optimum)	6-9 (7)	5-8 (7)	4.5-10 (7)	4.5-10 (7)
Büyüme NaCl aralığı (% w/V) (optimum)	0-12 (2-4)	0-4 (1-2)	0-7 (0-2)	0-7 (0-2)
API 20 NE				
Nitratların nitritlere indirgenmesi	+	-	-	-
Hidroliz (proteaz) (jelatin)	+	-	+	-
Malat asimilasyonu	-	+	+	+
Trisodyum sitrat asimilasyonu	-	-	-	+
API ZYM (enzymatic activity)				
Sistin arilamidaz	-	-	+	-
Tripsin	-	-	z^+	-
α -kimotripsin	-	+	+	+
α -galaktosidaz	-	-	+	-

Tablo 4.4 (devam): JETA1-E2 suşunun, kısmi 16S rRNA gen dizilerine göre yakın akraba olduğu *Sphingomonas* türlerinin tip suşlarından ayıracı özellikleri.

Özellik	1	2	3	4
β- galaktosidaz	-	+	+	+
β-glukuronidaz	-	-	+	-
β- glukosidaz	-	+	+	+
α-fukosidaz	-	-	z ⁺	-
API 50 CH (asit üretimi)				
Gliserol	-	-	+	+/-
D-arabinoz	-	+	z ⁺	-
L- ksiloz	-	-	+	-
Metil-beta-D- ksilopiranosid	-	+	+	-
Metil-alfa-D-mannopiranosid	-	-	+	-
Metil-alfa-D-glukopiranosit	-	+	+	-
Amidon (nişasta)	-	+	+	+
Salisin	z ⁺	+	+	-
D-melibiyoz	-	+	+	-
D- melezitoz	-	+	+	-
D- rafinoz	-	+	+	-
Amidon (nişasta)	-	+	-	-
D- turanoz	-	+	+	+/-
D- fukoz	-	-	+	+
L- fukoz	-	+	+	-

Suşlar: 1, JETA1-E2; 2, *S. paucimobilis* DSM 1098^T; 3, *S. sanguinis* DSM 13885^T; 4, *S. pseudosanguinis* DSM 19512^T. *Sphingomonas* tip suşlarına ait veriler Yabuuchi ve diğ., 1990; Takeuchi ve diğ., 1993; Kämpfer ve diğ., 2007; Xue ve diğ., 2018 makalelerinden alınmıştır. +, pozitif; -, negatif; z⁺, zayıf pozitif; NF, bulunamadı.

API testlerinde, JETA1-E2 suşunun, *Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098^T, *Sphingomonas sanguinis* DSM 13885^T ve *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512^T tip suşlarından farklı olarak nitrat indirgemesi testinde pozitif sonuç verdiği, malat asimilasyonu ve arbutinden asit üretimi için ise negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Enzimatik aktivite açısından değerlendirildiğinde, suşlar arasından sadece JETA1-E2 suşunun α-kimotripsin, β-galaktosidaz ve α-glukosidaz enzim aktivitesi açısından negatif olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, oksidaz testi

negatif olan *Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098^T'nin aksine, JETA1-E2 suşunun oksidaz testi zayıf pozitif olarak belirlenmiştir. JETA1-E2 suşunun genotipik açıdan yüksek oranda benzerlik gösterdiği *Sphingomonas* tip türleri ile fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından farklılık gösterdiği, dolayısıyla da bu bakteri türlerinden birine ait olmadığı tespit edilmiştir. JETA1-E2 suşunun tür düzeyinde tanımlanabilmesi için ileri moleküler ve kemotaksonomik analizler yapılmıştır.

4.4.2.2. Bütün 16S rRNA Gen Dizisine ve Tüm Genom Dizilimine Dayalı Filogeni ve Genom Özellikleri

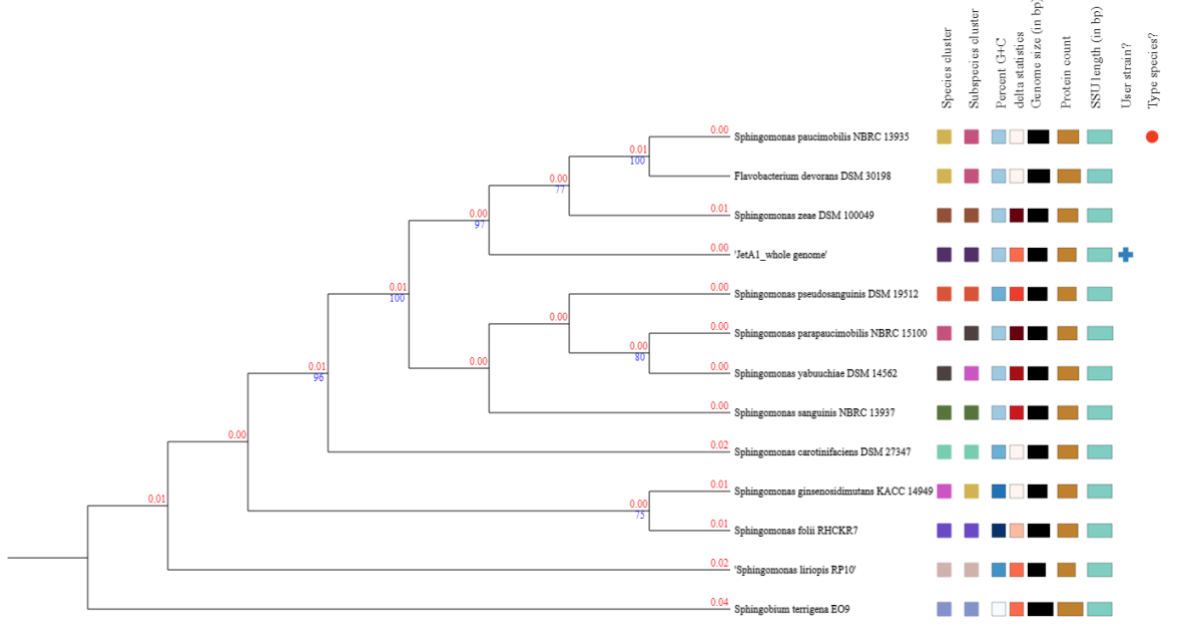
JETA1-E2 suşunun *Sphingomonadaceae* ailesi içerisindeki filogenetik yerleşimini doğru bir şekilde belirleyebilmek için bütün 16S rRNA gen dizisine (Şekil 4.12) ve tüm genom dizilimine (Şekil 4.13) ait filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçlarda yer alan bakteri türleri ve NCBI gen bankasındaki erişim numaraları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: Filogenetik ağaçlardaki suşların NCBI gen bankasındaki erişim numaraları.

Suş	Erişim numarası
<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> DSM 19512	GCA_014196255
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> NBRC 15100	GCA_000787715
<i>Flavobacterium devorans</i> DSM 30198	GCF_016028435
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> NBRC 13935	GCA_000739895
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> DSM 14562	GCA_014199595
<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937	GCA_001591005
<i>Sphingomonas zeae</i> DSM 100049	GCA_014197135
<i>Sphingobium terrigena</i> EO9	GCA_003591655
<i>Sphingomonas carotinifaciens</i> DSM 27347	GCA_014197095
<i>Sphingomonas ginsenosidimutans</i> KACC 14949	GCA_002374835
<i>Sphingomonas folii</i> RHCKR7	GCA_019429525
<i>Sphingomonas liriopis</i> RP10	GCA_024211255
<i>Candidatus Sphingomonas excrementigallinarum</i> 1562	GCA_019112965

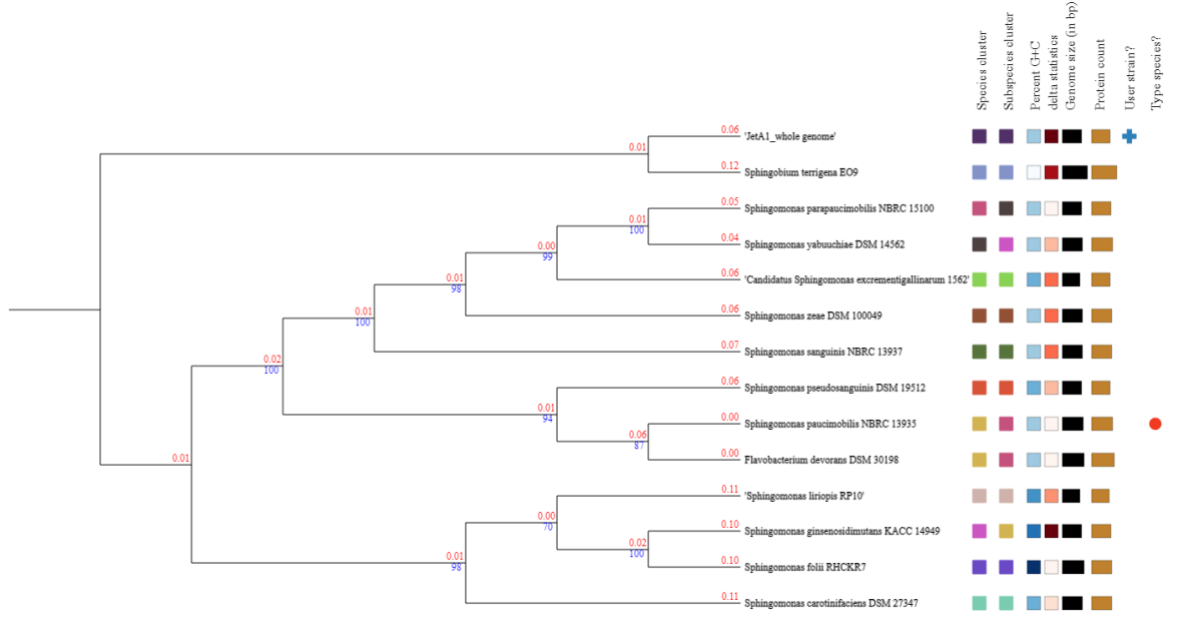
16S rRNA gen dizisinin tamamına göre çizilen filogenetik ağaca göre, suşun en yakın olduğu türlerin *Sphingomonas paucimobilis* NBRC 13935 (DSM 1098^T) (%99.10), *Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100 (%98.52), *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512^T (%98.92), *Sphingomonas sanguinis* NBRC 13937 (DSM 13885^T) (%99.29) ve *Sphingomonas*

zeae DSM 100049 (%97.86) olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte JETA1-E2 suşunun *Sphingomonas* cinsi içinde ayrı bir dal oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: JETA1-E2 suşu ve yakın ilişkili türlerin 16S rRNA gen dizisine dayalı TYGS filogenetik ağacı (Bu grafik ile ilişkili NCBI gen bankası erişim numaraları Tablo 4.5'te verilmiştir).

JETA1-E2 suşunun tüm genom dizilimine göre çizilen filogenetik ağaç ise, suşun *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde *Sphingomonas* ve *Sphingobium* cinsleri ile uzak bir şekilde kümelenerek farklı bir monofiletik grup oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 4.15). JETA1-E2 suşunun tüm genomu göre çizilen filogenetik ağaçtaki ayırt edici dallanma modeli, bu suşun *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde yer alan yeni bir cins olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.15: JETA1-E2 suşu ve yakın ilişkili türlerin tüm genom dizisine dayalı TYGS filogenetik ağacı (Bu grafikte ilişkili NCBI gen bankası erişim numaraları Tablo 4.5'te verilmiştir).

JETA1-E2 suşunun genel olarak genom özellikleri Tablo 4.6'da gösterilmiş olup, genom büyüklüğü 3,872,561 bp ve DNA G+C içeriği 66.3 %mol'dur. JETA1-E2 suşunun, filogenetik olarak yakın ilişki olduğu, *Sphingobium terrigena* EO9, *Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100, *Sphingomonas zeae* DSM 100049, *Sphingomonas sanguinis* NBRC 13937, *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512 ve *Sphingomonas paucimobilis* NBRC 13935 ile arasındaki dDDH değerleri sırasıyla %24.40, 28.30, 27.20, 27.50, 28.60 ve 28.00 iken, OrthoANI değerleri sırasıyla %74.48, 84.43, 83.69, 84.25, 84.66 ve 84.34 olarak belirlenmiştir. Elde edilen dDDH ve OrthoANI değerleri, prokaryotik tür ayrımı için sırasıyla, %70 ve %95-96 olan eşik değerlerden oldukça düşüktür (Goris ve diğ., 2007; Lee ve diğ., 2016). Bu bulgular, JETA1-E2 suşunun *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde yer alan ve yeni bir cinsi temsil ettiğini ortaya koyan tüm genomu dayalı filogenetik ağaç bulgusunu desteklemektedir. Bu suşa ait genom dizisi NCBI Gen Bankası'nda JAVSCQ000000000 erişim numarası altında saklanmıştır.

Tablo 4.6: JETA1-E2 suşuna ait genel genom özellikleri.

Özellik	Değer
Tüm genom büyüklüğü (bç)	3,872,561
G+C içeriği	%66.3
Kodlama oranı	%89.7
Kodlayıcı genler (CDS'ler)	3581
Ortalama protein uzunluğu	323.3
rRNA sayısı	3
tRNA sayısı	57
CRISPR sayısı	1

4.4.3. Kemotaksonomik Özellikleri

4.4.3.1. Yağ Asidi Bileşimi

JETA1-E2 suşunun hücresel yağ asidi bileşimi Tablo 4.7’de gösterilmiştir. JETA1-E2 suşunun, başlıca yağ asitleri (%10’dan fazla) C_{16:0} (%19.3) ve *Sphingomonadaceae* ailesi üyelerinde karakteristik baskın yağ asidi olan C_{18:1ω7c} (%62.9) olarak belirlenmiştir. Suşun tek hidroksillenmiş yağ asidinin, *Sphingomonadaceae* ailesi üyelerinde yaygın bulunan 2-hidroksimiristik asit (C_{14:0} 2-OH) olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.7: JETA1-E2 suşunun hücresel yağ asidi bileşimi (%).

Yağ asidi tipi	Miktarı (%)
C _{16:0}	19.3
C _{19:0}	2.6
C _{14:0} 2-OH	7.6
C _{16:1ω7c}	2.0*
C _{17:1ω6c}	3.1
C _{18:1ω7c}	62.9‡

*Summed feature 3: C_{16:1ω7c} and/or C_{16:1ω6c}

‡Summed feature 8: C_{18:1ω7c} and/or C_{18:1ω6c}

4.4.3.2. Poliamin İçeriği

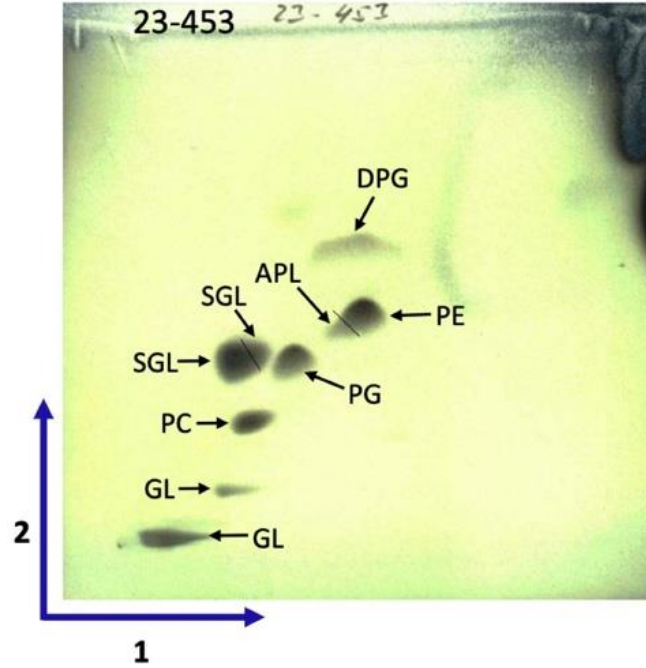
JETA1-E2 suşunun sadece az miktarda putresin içerdiği, bununla birlikte *Sphingomonadaceae* ailesi için karakteristik majör poliaminlerden olan homospermidin ve/veya spermidin içermediği tespit edilmiştir.

4.4.3.3. Kinon İçeriği

JETA1-E2 suşunun %92.3 oranında, *Sphingomonadaceae* ailesine ait bakterilerde en sık tanımlanan solunum izoprenoid kinonu olan, ubikinon-10 (Q-10) içerdiği tespit edilmiştir. JETA1-E2 suşunda ayrıca, az miktarda Q-8 (%0.5), Q-9 (%3.9) ve Q-11 (%3.3) bulunmaktadır.

4.4.3.4. Polar Lipid İçeriği

JETA1-E2 suşunun difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilkolin (PC), aminofosfolipid (APL), tanımlanamayan glikolipid (GL) ve tanımlanamayan iki sfingoglikolipid (SGL) içerdiği tespit edilmiştir. Sfingoglikolipid varlığı *Sphingomonadaceae* ailesine ait bakteriler için karakteristiktir. Suşun polar lipid profiline ait TLC görüntüsü Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16: JETA1-E2 suşunun polar lipid profili (1, TLC'nin birinci boyutu; 2, TLC'nin ikinci boyutu).

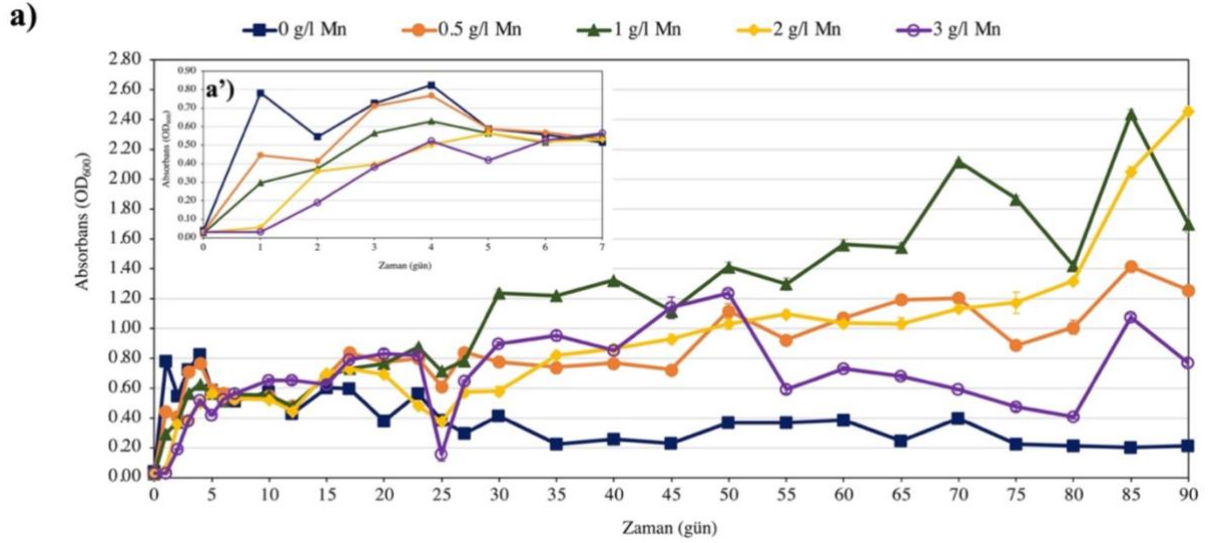
4.4.3.5. Tüm-Hücre Şeker ve Diaminopimelik Asit Enantiyomer İçeriği

JETA1-E2 suşunun tam hücre hidrolizatının ramnoz, riboz, fukoz, mannoz ve az miktarda glukoz ve galaktoz içerdiği tespit edilmiştir. Hücre duvarında herhangi bir diaminopimelik asit enantiyomeri içermediği belirlenmiştir.

4.5. MIC ÇALIŞMALARI İÇİN UYGUN BESİYERİ VE İÇERİĞİNDEKİ MANGAN KONSANTRASYONU

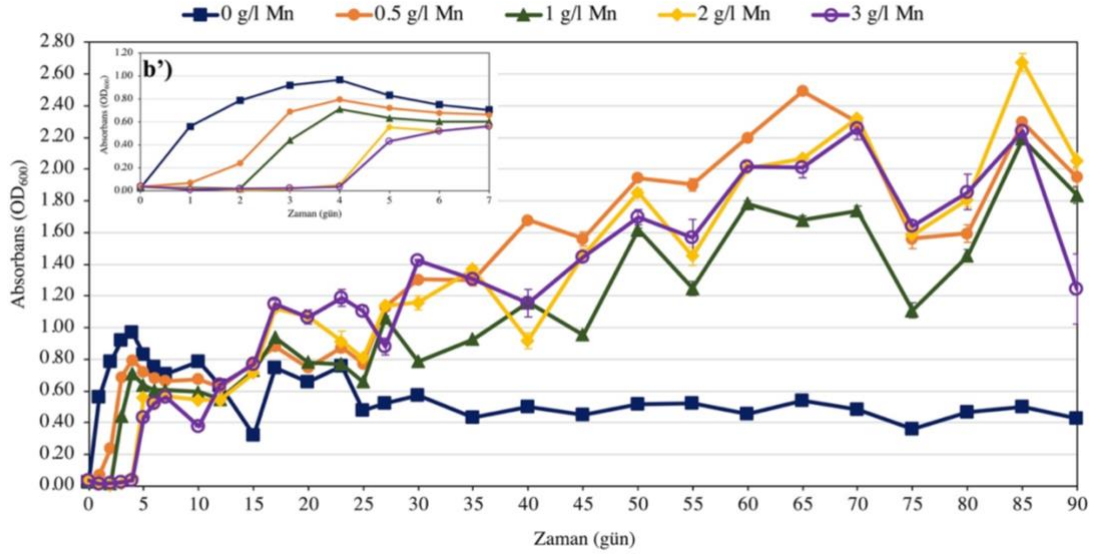
4.5.1. JETA1-E2 Suşunun Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Büyüme Eğrileri

JETA1-E2 suşunun, Mn Broth ve LBB besiyerlerinin farklı Mn konsantrasyonlarında (0, 0.5, 1, 2, 3 g/l) hazırlanmış 10 farklı ortamda 3 aylık inkübasyonu süresince elde edilen büyüme eğrileri Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, mangan okside eden JETA1-E2 suşunun her iki besiyerinin de farklı Mn konsantrasyonlarında çoğaldığı tespit edilmiş olup, her iki besiyerinde de Mn varlığının uzun inkübasyon süresi boyunca bakterinin büyümesini teşvik ettiği ve bakterinin deney süresince birden fazla logaritmik faz geçirdiği saptanmıştır.



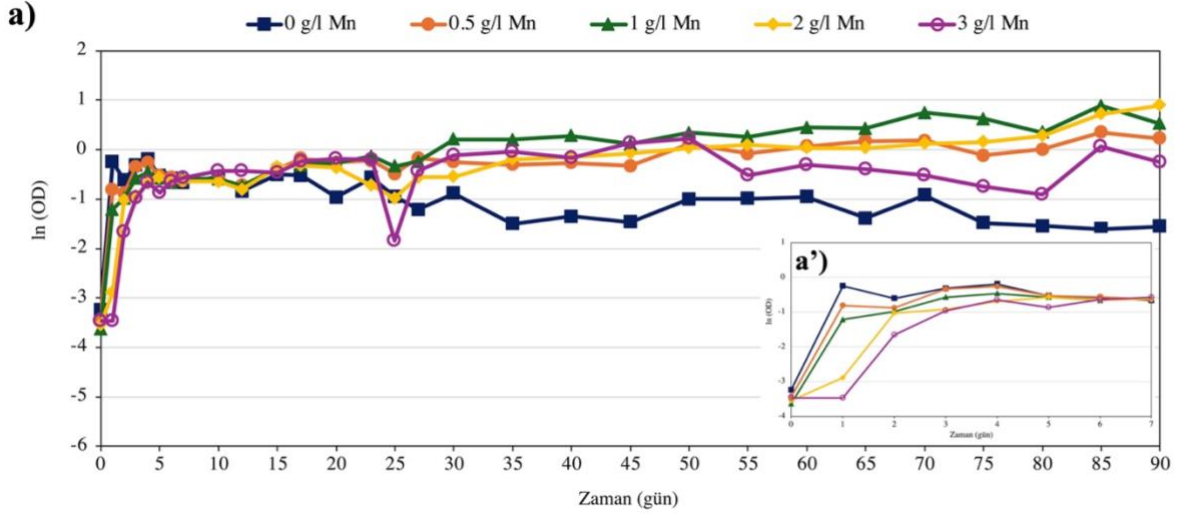
Şekil 4.17: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) büyüme eğrileri (OD₆₀₀); (a) Mn Broth besiyerinde, (b) LBB besiyerinde. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

b)



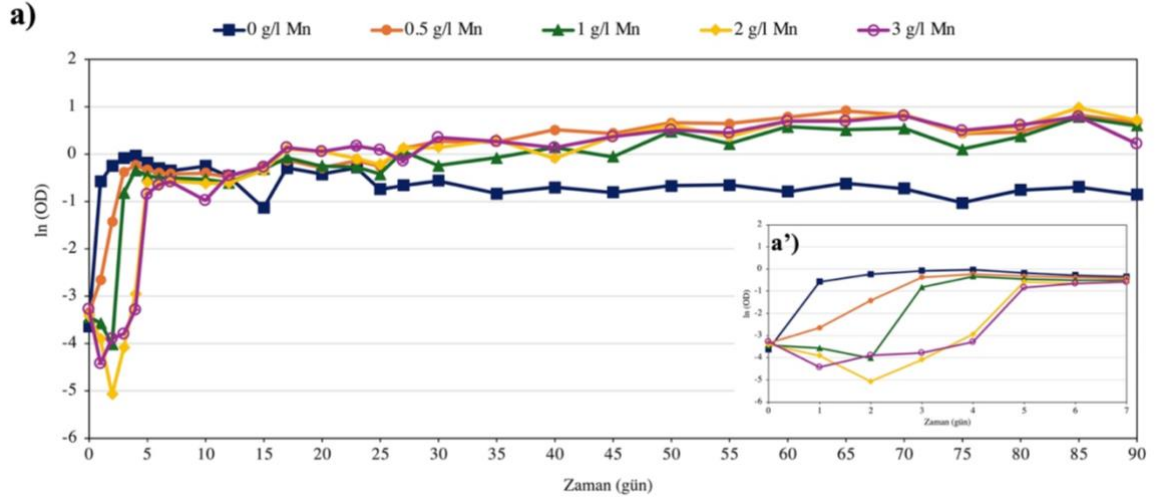
Şekil 4.17 (devam): JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) büyüme eğrileri (OD_{600}); (a) Mn Broth besiyerinde, (b) LBB besiyerinde. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Mn Broth besiyerinde, bakterinin 3 g/l Mn konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarında deneyin 85. gününe kadar büyüme eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.17a ve Şekil 4.18a). 2 g/l'nin altındaki konsantrasyonlarda Mn'siz besiyerindeki gibi bakterinin büyümeye hemen başladığı tespit edilmekle birlikte, 2 ve 3 g/l Mn konsantrasyonunda bakterinin lag fazının 1 gün sürdüğü görülmüştür (Şekil 4.18a'). Daha sonra özellikle 27. güne kadar tüm Mn konsantrasyonlarında bakteri yoğunluğunun birbirine çok yakın değerlerde olduğu ve bakterinin benzer büyüme eğilimi gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.17a). Sonrasında ise bakterinin deneyin 85. gününe kadar 1 g/l Mn varlığında diğer konsantrasyonlara göre daha fazla büyüme eğilimi sergilediği ve daha yoğun ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.17a).



Şekil 4.18: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarına (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) sahip Mn Broth besiyerindeki büyüme eğrileri ($\ln OD_{600}$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

LBB besiyerinde, bakterinin tüm Mn konsantrasyonlarında Mn Broth besiyerindeki gibi deneyin 85. gününe kadar büyüme eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.17b ve Şekil 4.19a). Bakteri Mn'siz ortamda büyümeye hemen başlarken, Mn konsantrasyonuna bağlı olarak lag fazı süresinin arttığı belirlenmiştir. 2 ve 3 g/l Mn konsantrasyonlarında bakterinin lag fazı 4 gün sürmüştür. Bununla birlikte inkübasyonun 5. gününden itibaren bu Mn konsantrasyonlarındaki bakterinin büyüme eğiliminin diğer konsantrasyonlardakiler ile benzerlik gösterdiği ve yoğunluğunun da 1 g/l Mn konsantrasyonundakinden fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.19: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarına (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) sahip LBB besiyerindeki büyüme eğrileri ($\ln OD_{600}$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

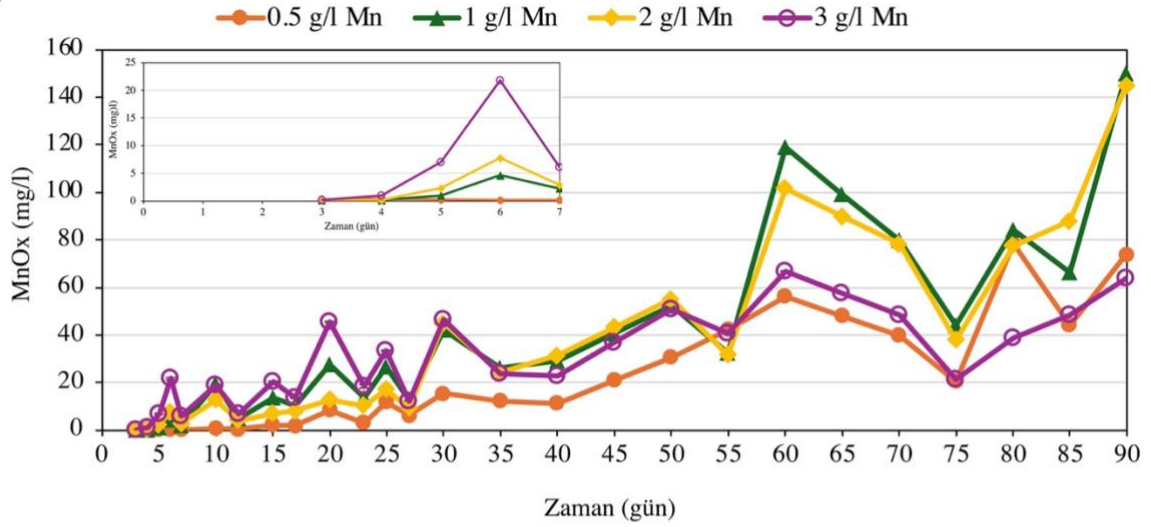
Elde edilen veriler, bakterinin LBB besiyerinin genel olarak tüm Mn konsantrasyonlarında Mn Broth besiyerine göre daha yoğun ürediğini göstermekle birlikte, özellikle de 0.5 ve 3 g/l Mn konsantrasyonları için bu yoğunluğun istatistiksel olarak anlamlı olduğu da tespit edilmiştir (sırasıyla, $p < 0.05$ ve $p \leq 0.01$) (Şekil 4.15). Ayrıca, Mn konsantrasyonlarının bakterinin büyümesi ve büyüme fazları üzerine etkisinin besiyerine göre değiştiği tespit edilmiştir. Bakteri Mn Broth besiyerinde en iyi üremeyi 1g/l Mn konsantrasyonunda gösterirken (Şekil 4.17a), LBB besiyerinde aynı konsantrasyonda en düşük üremeyi (Şekil 4.17b) göstermiştir. Yüksek Mn varlığında, bakterinin LBB besiyerindeki lag fazı süresi Mn Broth besiyerine göre belirgin bir şekilde artmıştır.

4.5.2. JETA1-E2 Suşunun Farklı Besiyerleri ve Farklı Mn Konsantrasyonlarındaki Mn Oksitleme Aktiviteleri

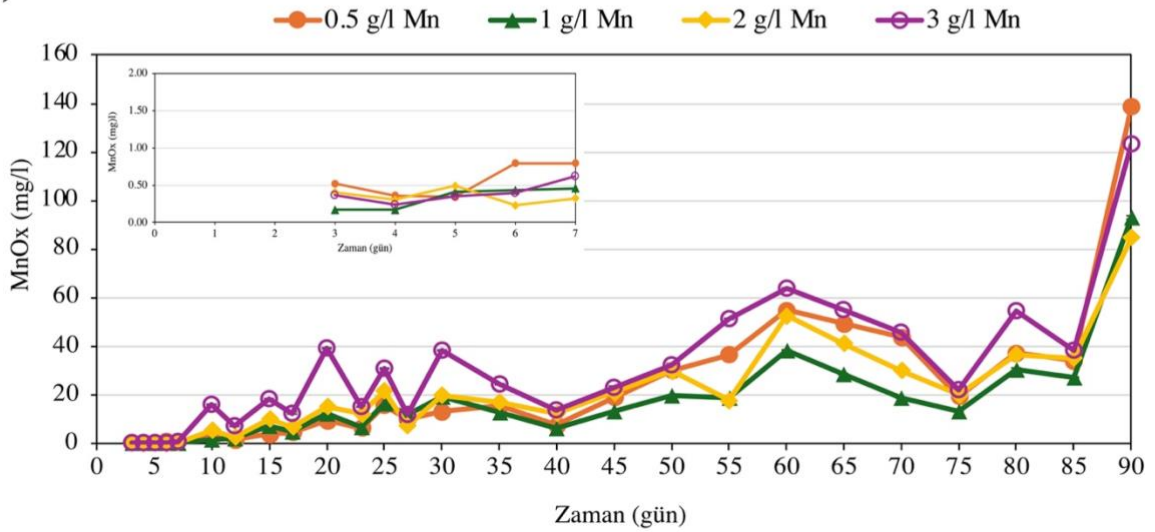
JETA1-E2 suşunun, farklı Mn konsantrasyonlarına (0, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l final) sahip Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki Mn oksitleme aktivitesinin ve üretilen MnO_x miktarının 3 ay süresince değişimi Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Her iki besiyerinde de ilk MnO_x üretimi 3. günde tespit edilmiş olup, deney süresince de bakterinin MnO_x üretmeye devam ettiği ve, miktarında da artış ve azalışlar gözlenmekle birlikte genel olarak artış eğiliminde olduğu görülmüştür (r değerleri

farklılık göstermekle birlikte, her iki besiyeri ve içeriğindeki Mn konsantrasyonu için korelasyon değeri ortaktır ve $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir).

a)



b)



Şekil 4.20: JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarına (0.5, 1, 2 ve 3 g/l) sahip besiyerlerinde oluşturduğu MnOx miktarlarının zamana bağlı değişimi; (a) Mn Broth besiyerinde, (b) LBB besiyerinde. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

JETA1-E2 suşunun, Mn Broth besiyerindeki kültüründe 3. günden itibaren tüm konsantrasyonlarda düşük miktarlarda (0.17 mg/l- 0.52 mg/l) MnO_x üretildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.20a'). İnkübasyonun 27. gününe kadar tüm Mn konsantrasyonlarındaki MnO_x

miktarlarında artış gözlenmekle birlikte, en fazla MnO_x miktarının 3 g/l Mn varlığında olduğu görülmüştür (Şekil 4.20a). Daha sonra 55. güne kadar, 1, 2 ve 3 g/l Mn konsantrasyonlu bakteri kültürlerindeki MnO_x miktarları benzer şekilde seyretmiştir. Sonrasında ise 1 ve 2 g/l Mn konsantrasyonlu kültürlerde deney sonuna kadar belirgin şekilde daha yüksek miktarda MnO_x üretimi gerçekleşmiştir. Deney sonunda bu konsantrasyonlar için en yüksek MnO_x miktarları sırasıyla 93.30 mg/l ve 84.81 mg/l olarak tespit edilmiştir. Deney süresince en düşük MnO_x üretimi 0.5 g/l Mn varlığında gerçekleşmiştir. Deney süresince kültürdeki Mn konsantrasyonu ile MnO_x miktarı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

LBB besiyerinde de Mn Broth besiyerine benzer şekilde, 3. günden itibaren tüm konsantrasyonlarda düşük miktarlarda MnO_x üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.20b'). Deney süresince tüm Mn konsantrasyonlarındaki MnO_x miktarlarında artış eğilimi gözlenmekle birlikte, 85. güne kadar en fazla MnO_x oluşumu 3 g/l Mn varlığında gerçekleşmiştir (Şekil 4.20b). Deneyin son günü (90. gün) ise en yüksek MnO_x miktarı 0.5 g/l Mn varlığında 138.87 mg/l olarak tespit edilmiştir. Deney süresince en düşük MnO_x üretiminin 1 g/l Mn varlığında gerçekleştiği görülmüştür. Deney süresince kültürdeki Mn konsantrasyonu ile MnO_x miktarı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

JETA1-E2 suşunun, 0.5 g/l ve 3 g/l Mn içeren Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki kültürlerinde oluşan MnO_x miktarlarının deney süresince genel olarak benzer değerlerde olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, 1 g/l ve 2 g/l Mn konsantrasyonlarındaki MnO_x miktarlarında ise belirgin bir farklılık olduğu ve bu konsantrasyonlardaki Mn Broth besiyerindeki kültürde, LBB besiyerindeki kültüre göre, daha yoğun miktarda MnO_x oluştuğu belirlenmiştir (sırasıyla, $p<0.01$ ve $p<0.01$) (Şekil 4.20).

JETA1-E2 suşunun mangan oksidasyon aktivitesi sonucu MnO_x çökeltilerinin oluşumu ve miktarı, 7175-T7351 alüminyum kuponlarının korozyon mekanizmasının incelenmesi açısından önemli bir parametredir. Bu nedenle korozyon çalışmalarında, yoğun miktarda MnO_x oluşumunun tespit edildiği Mn Broth besiyerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, Mn konsantrasyonu olarak da bakterinin hem MnO_x oluşumunu hem de büyümesini en fazla teşvik ettiği 1 g/l değeri seçilmiştir.

4.6. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 1 G/L

4.6.1. Bakteriyolojik Analiz

Deney süresince, 7175-T7351 alüminyum alaşımı kuponların yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakasından ve deney ortamı olan JETA1-E2 suşuna ait kültürden bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. sa'da kültürde $1.25 \times 10^7 \pm 3.91 \times 10^6$ h/ml olarak tespit edilen JETA1-E2 sayısı, 4. günde $5.66 \times 10^2 \pm 4.04 \times 10^1$ h/ml olarak belirlenmiş ve 25. günde bakteri üreme tespit edilmemiştir. Daha sonra 40. günde $5.50 \times 10^3 \pm 6.36 \times 10^2$ h/ml olarak belirlenen bakteri sayısının, 60. günde $2.01 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^1$ h/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Biyofilmdeki bakteri sayısının ise 4. günde $2.89 \times 10^3 \pm 3.13 \times 10^2$ h/ml ve 25. günde $1.30 \times 10^2 \pm 0.30 \times 10^1$ h/ml olduğu, 40. günde belirgin bir değişikliğin gözlenmeyerek, 60. günde $8.41 \times 10^2 \pm 1.67 \times 10^1$ h/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Daha sonraki örnekleme zamanlarında, petride hiç büyüme gözlenmemiştir. Tespit edilebilen bakteri sayılarına ait veriler Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğinde bulunan JETA1-E2 suşunun planktonik ve sesil bakteri sayıları.

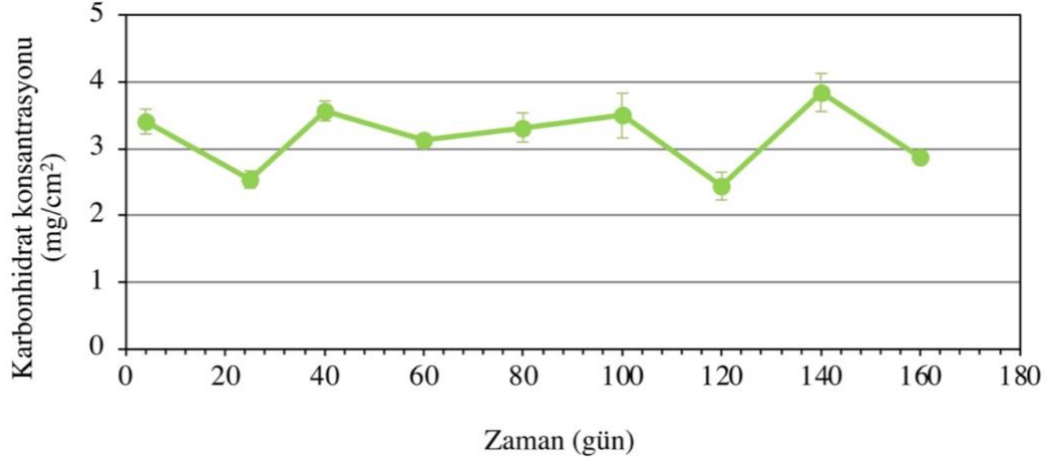
Zaman (gün)	Kültür (h/ml)	Biyofilm (h/cm ²)
0	$1.25 \times 10^7 \pm 3.91 \times 10^6$	-
4	$5.66 \times 10^2 \pm 4.04 \times 10^1$	$2.89 \times 10^3 \pm 3.13 \times 10^2$
12	*	*
25	**	$1.30 \times 10^2 \pm 0.30 \times 10^1$
40	$5.66 \times 10^2 \pm 4.04 \times 10^1$	$1.10 \times 10^2 \pm 0.10 \times 10^1$
60	$2.01 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^1$	$8.41 \times 10^2 \pm 1.67 \times 10^1$
80	**	**
100	**	**

* Örnekleme yapılamamıştır.

** Ölçüm alındığı halde üreme tespit edilememiştir.

4.6.2. Biyofilmdeki Toplam Karbonhidrat Miktarı

Deney düzeneğinden çıkartılan kuponların yüzeyindeki biyofilm tabakalarından elde edilen EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarları Şekil 4.21’de gösterilmiştir. EPS’deki toplam karbonhidrat miktarlarının zaman içerisinde değişkenlik gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.21: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğine maruz kalan kuponların yüzeyinde oluşan biyofilmdeki karbonhidrat miktarlarının değişimi.

Deneyin ilk ölçüm saati olan 4. günde EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarı 3.41 ± 0.19 mg/cm² olarak tespit edilmiş ve deney sonunda (160. günde) 3.57 ± 0.15 mg/cm² olarak ölçülmüştür. Deney süresince toplam karbonhidrat miktarının en yüksek değere 140. günde (3.84 ± 0.28 mg/cm²) ve en düşük değere ise 120. günde (2.45 ± 0.21 mg/cm²) ulaştığı saptanmıştır.

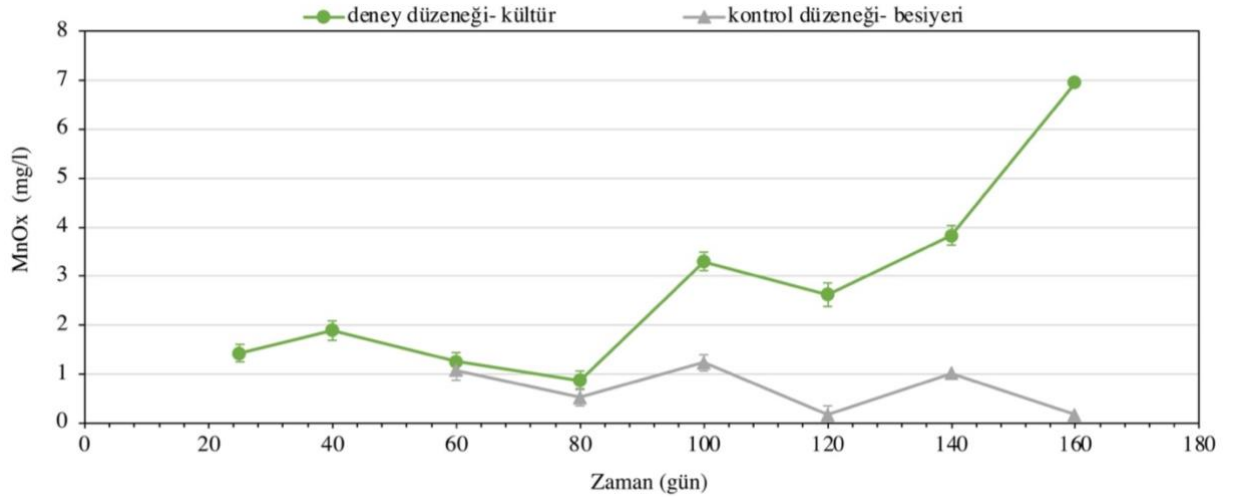
4.6.3. MnO_x Miktarı

Örnekleme günlerinde, deney ortamı olan bakteri kültüründen ve kontrol düzeneğindeki steril Mn broth besiyerinden yapılan MnO_x ölçümlerine ait sonuçlar Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Bununla birlikte, deney düzeneğindeki kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasından da örnekleme yapıldığı halde, MnO_x ölçümü gerçekleştirilememiştir.

Kültürden elde edilen veriler ile JETA1-E2 suşunun 25. günden itibaren Mn oksitlemeye başladığı ve MnO_x miktarının 1.43 ± 0.18 mg/l olduğu belirlenmiştir. Daha sonra MnO_x

miktarının 40. günde 1.89 ± 0.20 mg/l değerine ulaştıktan sonra, 80. güne kadar azaldığı tespit edilmiştir. Sonrasında ise MnO_x miktarının deney sonuna kadar artış trendinde olduğu saptanmış olup ($r= 0.816$, $p \leq 0.01$), en yüksek MnO_x miktarı da deney sonunda 6.96 ± 0.22 mg/l olarak tespit edilmiştir.

Deney düzeneği ile aynı koşullarda bekletilen steril besiyerinde ise ilk MnO_x 60. günde 1.07 ± 0.18 mg/l olarak tespit edilmiş ve deney sonuna kadar miktarında artış ve azalış gözlenmiştir. En yüksek MnO_x miktarı 100. günde 1.23 ± 0.18 mg/l olarak tespit edilirken, en düşük değer deney sonunda gözlenmiş ve 0.17 ± 0.01 mg/l olarak tespit edilmiştir. Bakterinin bulunmadığı kontrol düzeneğindeki MnO_x miktarının deney süresince deney düzeneğindeki bakterili ortama göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.22).

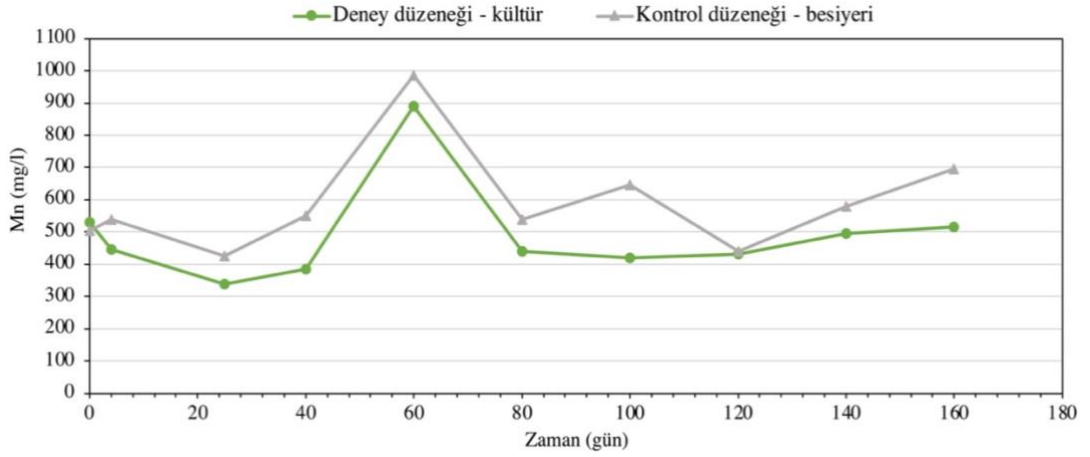


Şekil 4.22: 1 g/l Mn içeren deney ve kontrol düzeneklerindeki MnO_x miktarlarının zamana bağlı değişimi (OD_{620}). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

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

Deney düzeneğindeki bakteri kültürünün ve kontrol düzeneğindeki steril Mn Broth besiyerinin Mn^{+2} değerlerindeki deney süresince gerçekleşen değişimi Şekil 4.23'te verilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0.sa'da bakteri kültüründeki Mn^{+2} konsantrasyonu 530 ± 0.01 mg/l olarak tespit edilmiştir. Daha sonra deney süresince azalıp artarak değişiklik gösterdiği ve deney sonunda 515 ± 0.01 mg/l olduğu belirlenmiştir. Kontrol düzeneğinde, 0.sa'da 505 ± 0.01 mg/l olan Mn^{+2}

konsantrasyonunun, deney düzeneğindeki benzer şekilde, deney süresince azalıp artarak değişiklik gösterdiği ve deney sonunda 695 ± 0.01 mg/l olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler, deney süresince deney düzeneğindeki Mn^{+2} konsantrasyonuna ait değerlerin kontrol düzeneğinden anlamlı olarak düşük olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki Mn^{+2} konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

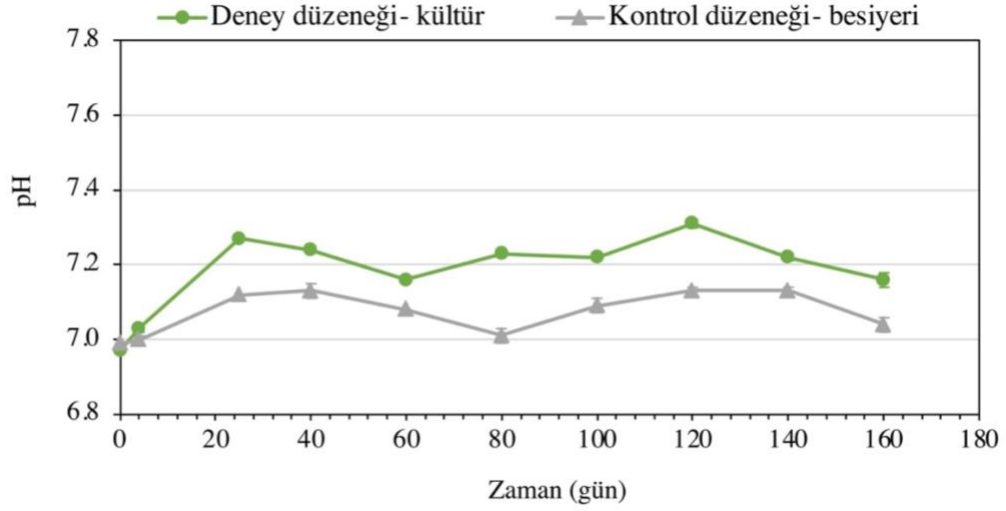
Deney düzeneğindeki bakteri kültürünün ve kontrol düzeneğindeki steril Mn Broth besiyerinin Cl^- miktarları deney süresince ölçülmüş ve değerler Tablo 4.9'da gösterilmiştir. Deneyin başladığı 0. sa'da bakteri kültüründeki serbest Cl^- miktarı 0.01 ± 0.00 mg/l iken, 4. günde 0.11 ± 0.01 mg/l'ye artmış ve bu artış 80. güne kadar sürekli olarak devam ederek 1.21 ± 0.01 mg/l'ye ulaşmıştır. Daha sonra Cl^- miktarının değişkenlik gösterdiği ve deney sonunda 0.83 ± 0.01 mg/l olduğu belirlenmiştir. Kontrol düzeneğindeki steril besiyerinde ise 0. saatte 0.03 ± 0.00 mg/l ve 4. günde 0.02 ± 0.01 mg/l olarak belirlenmiştir. Daha sonra Cl^- miktarının 80. güne kadar arttığı (0.71 ± 0.01 mg/l), sonrasında azalıp arttığı ve deney sonunda ise 1.33 ± 0.01 mg/l olduğu belirlenmiştir. En yüksek serbest Cl^- miktarı 120. günde ve 1.74 ± 0.01 mg/l olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.9: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol ortamlarındaki Cl⁻ miktarlarının zamana bağlı değişimi.

Örnekleme günü	Deney düzeneği			Kontrol düzeneği		
	serbest Cl ⁻	bağlı Cl ⁻	total Cl ⁻	serbest Cl ⁻	bağlı Cl ⁻	total Cl ⁻
0	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00
4	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.34 ± 0.02
25	0.20 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.06 ± 0.00	*	0.03 ± 0.01
40	0.25 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.28 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.00
60	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.40 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.92 ± 0.00
80	1.21 ± 0.01	0.24 ± 0.02	1.45 ± 0.10	0.71 ± 0.01	0.55 ± 0.01	1.27 ± 0.01
100	0.58 ± 0.10	0.24 ± 0.00	0.82 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.37 ± 0.00
120	0.93 ± 0.00	0.16 ± 0.02	1.09 ± 0.08	1.74 ± 0.20	0.27 ± 0.00	2.01 ± 0.09
140	0.32 ± 0.08	0.22 ± 0.00	0.54 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.35 ± 0.00	0.54 ± 0.00
160	0.83 ± 0.01	1.10 ± 0.10	1.93 ± 0.01	1.33 ± 0.01	0.01 ± 0.00	1.34 ± 0.00

* Ölçüm alınmadı.

Deney ve kontrol düzeneklerinden elde edilen pH değerlerinin değişim grafiği Şekil 4.24'te verilmiştir. Deneyin başlatıldığı 0. saatte bakteri kültürünün 6.97 ± 0.00 olarak ölçülen pH değeri, deney süresince değişiklik göstermiş ve 120. günde en yüksek değerine (pH: 7.31 ± 0.01) ulaşmıştır. Daha sonra deney sonuna kadar azalarak 160. günde 7.16 ± 0.02 olarak tespit edilmiştir. Kontrol düzeneğindeki steril besiyerinin pH değeri ise 0. saatte 6.99 ± 0.00 olarak ölçülmüş olup, 40. güne kadar artış göstermiştir. Daha sonra pH değeri 80. güne kadar azalmış ve akabinde 120. güne kadar kademeli artmıştır. Son örnekleme gününde ise düşmüş ve 7.04 ± 0.02 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.24). Maksimum pH değeri 40, 120 ve 140. günlerde 7.13 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, deney ortamındaki pH değerlerinin kontrol ortamındaki değerlerden daha yüksek olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$).



Şekil 4.24: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki pH değerlerinin zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir

4.6.5. Korozyon Verileri

Deney ve kontrol düzeneklerindeki, deney ortamlarına (sırasıyla, bakteri kültürü ve steril Mn Brtoh) maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların, deney süresince tespit edilen ağırlık kayıpları ve korozyon hızları Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kayıpları ve korozyon hızı verileri

Örnekleme zamanı (gün)	Ağırlık kaybı, deney (mg/cm ²)	Ağırlık kaybı, kontrol (mg/cm ²)	Korozyon hızı, deney (µm/y)	Korozyon hızı, kontrol (µm/y)	Oran (deney/kontrol)
4	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	5.58 ± 0.01	5.53 ± 0.23	1.01
25	0.09 ± 0.04	0.02 ± 0.00	4.93 ± 1.79	0.89 ± 0.63	5.57
40	0.11 ± 0.04	0.02 ± 0.01	3.62 ± 1.21	0.56 ± 0.55	6.49
60	0.41 ± 0.18	0.11 ± 0.01	9.27 ± 3.46	2.56 ± 0.12	3.62
100	0.45 ± 0.11	0.16 ± 0.01	6.13 ± 1.26	2.10 ± 0.15	2.92
120	0.36 ± 0.14	0.11 ± 0.01	4.01 ± 1.22	1.28 ± 0.01	3.14
140	0.35 ± 0.18	0.13 ± 0.03	3.38 ± 1.01	1.26 ± 0.10	2.67
160	0.70 ± 0.13	0.31 ± 0.01	5.93 ± 2.82	2.62 ± 0.12	2.27

Deney düzeneğindeki alüminyum kuponların ağırlık kayıplarının deney süresince genel olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Deneyin ilk örnekleme günü olan 4. günde $0.02 \pm 0.00 \text{ mg/cm}^2$ ile en düşük ve deneyin son günü olan 160. günde ise $0.70 \pm 0.13 \text{ mg/cm}^2$ ile en yüksek ağırlık kaybı değeri tespit edilmiştir. Kuponların korozyon hızlarının ise en düşük (140. gün) ve en yüksek (60. gün) değerleri sırasıyla, $3.38 \pm 1.01 \text{ } \mu\text{m/y}$ ve $9.27 \pm 3.46 \text{ } \mu\text{m/y}$ olarak tespit edilmiştir.

Kontrol düzeneğindeki alüminyum kuponların ağırlık kayıplarının, ilk örnekleme günü olan 4. günde $0.02 \pm 0.01 \text{ mg/cm}^2$ olduğu, sonrasında belirgin bir değişiklik gözlenmediği, daha sonra 60. günde arttığı ve yine 160. güne kadar anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Kuponlardaki en yüksek ağırlık kaybı değeri, 160. günde $0.31 \pm 0.01 \text{ mg/cm}^2$ olarak belirlenmiştir. Kuponların korozyon hızlarının ise en düşük (40. gün) ve en yüksek (4. gün) değerleri sırasıyla, $0.56 \pm 0.55 \text{ } \mu\text{m/y}$ ve $5.53 \pm 0.23 \text{ } \mu\text{m/y}$ olarak tespit edilmiştir. Deney düzeneğindeki kuponların ağırlık kaybı değerlerinin kontrol düzeneğindeki kilerden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca deney düzeneğindeki korozyon hızının kontrol düzeneğinde tespit edilenden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$).

4.6.6. Al Analizi

Deney sonunda laboratuvar ölçekli deney ve kontrol düzenekleri ile bu düzeneklerdeki ortamlara maruz bırakılan kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm ve film tabakalarındaki Al miktarları Tablo 4.10'da verilmiştir. Bakteri kültüründeki ($68.52 \text{ } \mu\text{g/ml}$) Al konsantrasyonunun, steril besiyerindekinden ($10.14 \text{ } \mu\text{g/ml}$) 6 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm örneklerindeki Al konsantrasyonunun ($274.27 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$) da filmdekinden $248.53 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ daha yüksek değerde olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.11: 1 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki deney ortamları ile düzeneklerdeki kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm ve film tabakalarındaki Al konsantrasyonları.

Örnek	Al konsantrasyonu
Deney düzeneği ortamı (JETA1-E2 suşunun kültürü)	$68.52 \text{ } \mu\text{g/ml}$
Kontrol düzeneği ortamı (steril besiyeri)	$10.14 \text{ } \mu\text{g/ml}$
Deney düzeneğinde oluşan biyofilm	$274.27 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$
Kontrol düzeneğinde oluşan film	$248.53 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$

4.7. MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU

Al ve Al+Mn'nin JETA1-E2 suşu üzerine antibakteriyel etkisi (%) Tablo 4.12'de gösterilmiştir. Mn'nin tek başına antibakteriyel etkisi ise JETA1-E2 suşunun farklı Mn konsantrasyonlarındaki büyüme eğrileri (Bölüm 4.5.1) ve Mn oksitleme aktivitelerinin (Bölüm 4.5.2) araştırıldığı deneylerle ortaya konulmuştur. Deneylerden elde edilen sonuçlarda 1 g/l final Mn konsantrasyonunun JETA1-E2 suşu üzerine bir toksik etkisi bulunmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, model laboratuvar ölçekli düzeneklerdeki üreme yoğunluğunun kuponsuz ortamdakine göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kupon malzemesi olan Al'nin MOB suşu üzerine toksik etkisinin olabileceğine işaret etmiştir.

Tablo 4.12: Al ve Mn'nin JETA1-E2 suşu üzerindeki antibakteriyel etkisi (%).

Konsantrasyon	0 g/l Mn	0.5 g/l Mn	1 g/l Mn	2 g/l Mn
4 g/l Al	%29	%37	%56	%54
2 g/l Al	%25	%34	%52	%50
1 g/l Al	%1	%6	%9	%12

Sadece Al varlığında gerçekleştirilen deneylerde, 4 g/l ve 2 g/l final Al konsantrasyonlarına sahip ortamların JETA1-E2 suşu üzerine sırasıyla %29 ve %25 antibakteriyel etki gösterdiği, 1 g/l final Al konsantrasyonunda ise bu etkinin %1 olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.12). Bu durum, 1 g/l final Al konsantrasyonunun üstündeki değerlerde Al'nin JETA1-E2 suşu üzerine toksik etkisinin belirgin bir şekilde arttığını ve bu etkinin Al konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte ICP-MS analizinden elde edilen sonuçlarda, kültür ve biyofilmdeki Al konsantrasyonlarının 1 g/l'nin ortalama 10 kat altında bir değerde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, kuponlardan çözünen Al'nin JETA1-E2 suşu üzerine toksik bir etkisi olmadığını ortaya koymaktadır.

Al elementinin de bakteri üzerine tek başına toksik etki göstermemesi, bu iki elementin bakterinin büyümesi üzerine sinerjistik toksik etki gösterme ihtimalini gündeme getirmiştir. Nitekim, değişen final konsantrasyonlardaki (0.5, 1 ve 2 g/l) Mn'nin de eklendiği MİK deneylerinden elde edilen sonuçlar, Al ve Mn'nin bir arada olması ile belirgin bir antibakteriyel etkinin oluştuğunu ortaya koymuştur. Al varlığında ortama Mn eklendiğinde, antibakteriyel

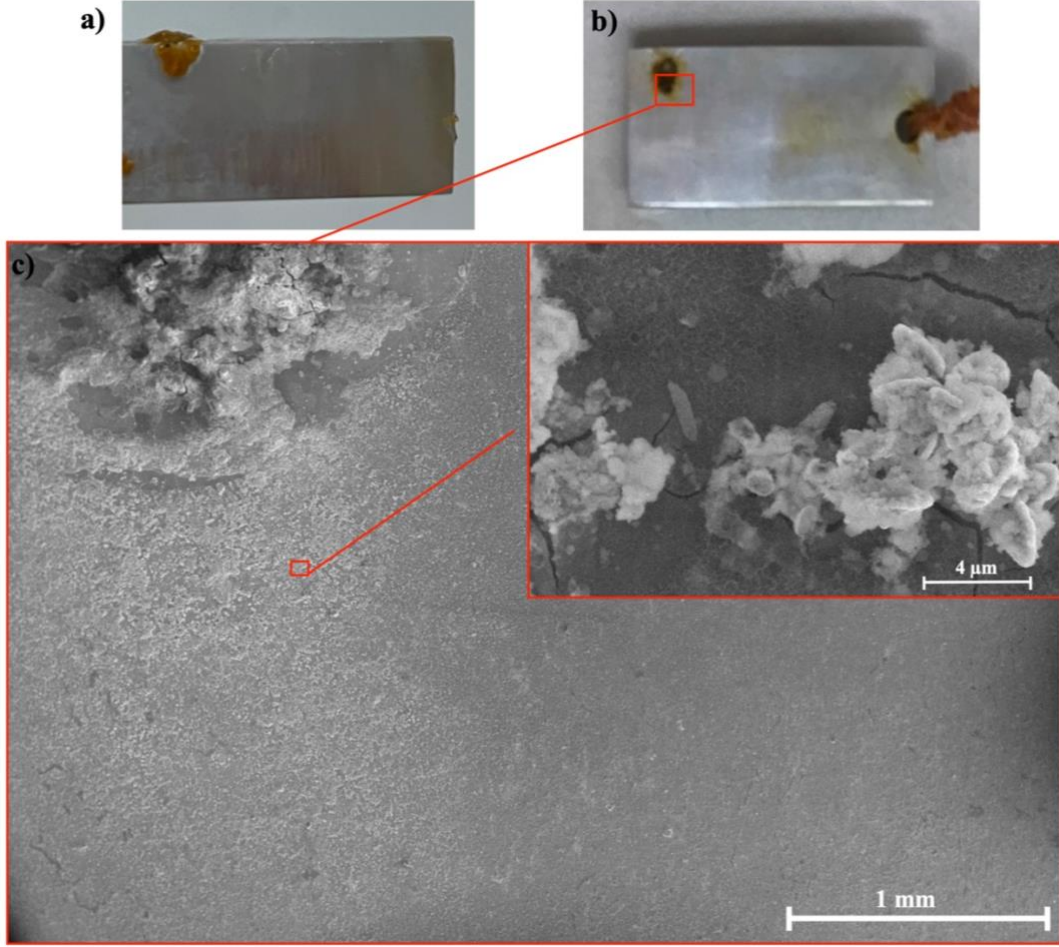
etkinin arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.12). 0.5 g/l Mn ile 4 g/l ve 2 g/l final Al varlığında sırasıyla, %37 ve %34 antibakteriyel etki belirlenirken, 1 g/l ve 2 g/l Mn varlığında bu değerlerin %50'nin üzerine çıktığı tespit edilmiştir. Bu durum, Al varlığında Mn konsantrasyonu arttıkça, antibakteriyel etkinin de arttığının bir göstergesidir. Ayrıca 1 g/l final Mn konsantrasyonu içeren laboratuvar ölçekli deney düzeneğindeki (deney düzeneği 1) düşük bakteri yoğunluğunu (Bölüm 4.6.1) da açıklamaktadır.

Elde edilen bulgular, 1 g/l ve 2 g/l Mn konsantrasyonlarının tercih edileceği düzeneklerde, kuponlardan çözünecek Al'nin de etkisi ile JETA1-E2 suşunun mikrobiyolojik korozyon etkisinin araştırılmasının mümkün olamayacağını açıkça ortaya koymuştur. Bu doğrultuda, mangan okside eden JETA1-E2 suşunun 7175-T7351 alüminyumdaki korozyon etkisinin araştırılabilmesi amacıyla gerçekleştirilecek korozyon deneylerinde, deney ortamı olarak final Mn konsantrasyonu 0.5 g/l olan Mn broth besiyerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.8. LABORATUVAR ÖLÇEKLİ DÜZENEKLERDE MIC DENEYLERİ: FİNAL MN KONSANTRASYONU 0.5 G/L

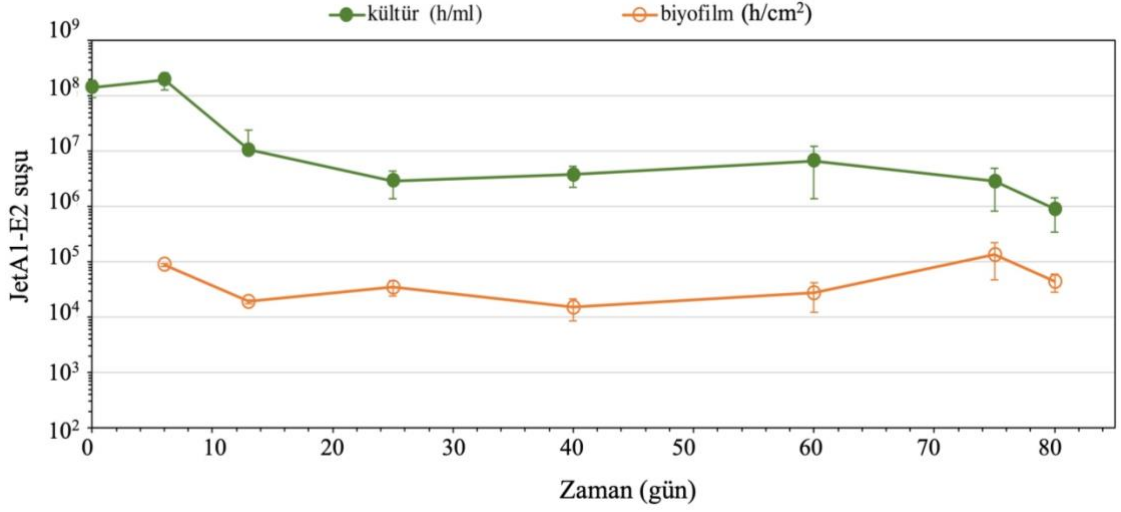
4.8.1. Bakteriyolojik Analiz

Mangan okside eden JETA1-E2 suşuna maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların yüzeyinde, deneyin ilk örnekleme gününden itibaren (6. gün) gözle görülebilen, ince ve yüzeyden kolayca alınabilen bir biyofilm tabakası oluştuğu, deneyin ilerleyen sürecinde ise kuponların yüzeyinde kahverengi birikintiler ve tüberkül oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.25a). SEM incelemesinde, birikintilerin altında kaldıkları için bakterilerin gözlenmesinde zorluk yaşanmıştır. Bununla birlikte, tüberkülün altında bakterilerin kümeler halinde yoğun olarak bulundukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.25c).



Şekil 4.25: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğinden 80. günde çıkartılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun görüntüleri. (a) tüberkülün makro görüntüsü, (b) tüberkül kaldırılmış kuponun makro görüntüsü, (c) SEM görüntüsü.

Deney süresince örnekleme zamanlarında (6, 13, 25, 40, 60, 75 ve 80. günlerde) hem 7175-T7351 alüminyum kuponların yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakasından (sesil) hem de eş zamanlı olarak deney ortamı olan JETA1-E2 suşunun kültüründen (planktonik) bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Sesil ve planktonik bakterilere ait büyüme eğrileri Şekil 4.26'da verilmiştir. Biyofilmdeki bakteri sayısı 6. günde $8.78 \times 10^4 \pm 4.74 \times 10^3$ h/cm² olarak tespit edilmiş olup, deney süresince sesil bakteri sayısında belirgin olmayan artış ve azalışlar tespit edilmiştir. En düşük ve en yüksek sesil bakteri sayıları sırasıyla $1.51 \times 10^4 \pm 6.37 \times 10^3$ h/cm² ve $1.34 \times 10^5 \pm 8.70 \times 10^4$ h/cm² olarak 40. ve 75. örnekleme günlerinde tespit edilmiştir.

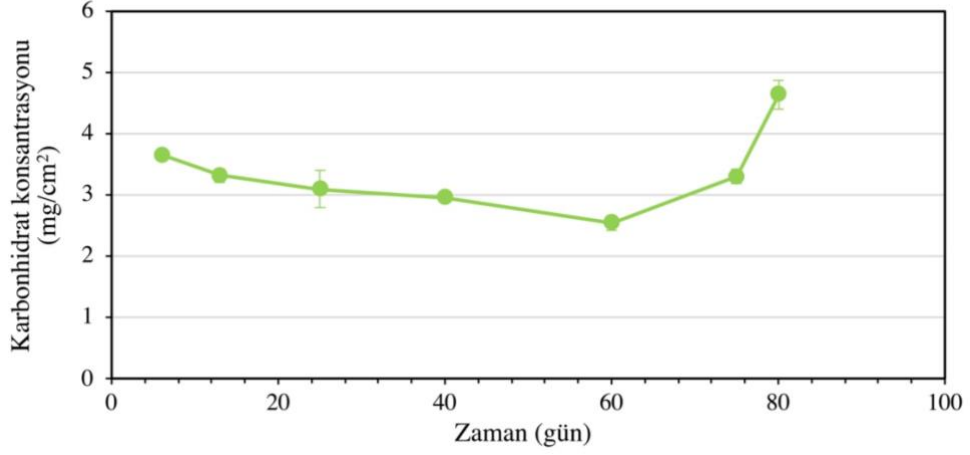


Şekil 4.26: 0.5 g/l Mn içeren deney düzeneğindeki JETA1-E2 suşunun planktonik ve sesil bakteri sayılarının zamana bağlı değişimi (y eksenindeki değerler logaritmiktir). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Deneyin başlatıldığı 0. günde kültürde $1.44 \times 10^8 \pm 5.10 \times 10^7$ h/ml olarak tespit edilen planktonik bakteri sayısında 6. güne kadar anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Fakat sonrasında bakteri sayısında azalma gözlenmiş ve 25. günde $2.90 \times 10^6 \pm 1.53 \times 10^6$ h/ml olarak saptanmıştır. Daha sonra ise planktonik bakteri sayısında 60. güne kadar belirgin bir farklılık gözlenmemiş olup, sonrasında ise bakterinin ölüm fazına girdiği belirlenmiştir (Şekil 4.26). Deney süresince JETA1-E2 suşuna ait planktonik bakteri sayısının, her örnekleme gününde, sesil bakteri sayısından yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$) (Şekil 4.26).

4.8.2. Biyofilmdeki Toplam Karbonhidrat Miktarı

Deney düzeneğinden çıkartılan kuponların yüzeyindeki biyofilm tabakalarından elde edilen EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.27’de gösterilmiştir. Deneyin ilk ölçüm saati olan 6. günde EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarı 3.65 ± 0.08 mg/cm² olarak tespit edilmiştir. Sonrasında toplam karbonhidrat miktarı 60. güne kadar kademeli olarak azalmış ve deney süresince en düşük değeri 2.54 ± 0.11 mg/cm² olarak saptanmıştır. Akabinde, toplam karbonhidrat miktarının deney sonuna kadar belirgin bir artış göstermiş ve en yüksek olduğu değere (4.63 ± 0.22 mg/cm²) 80. günde ulaşmıştır.

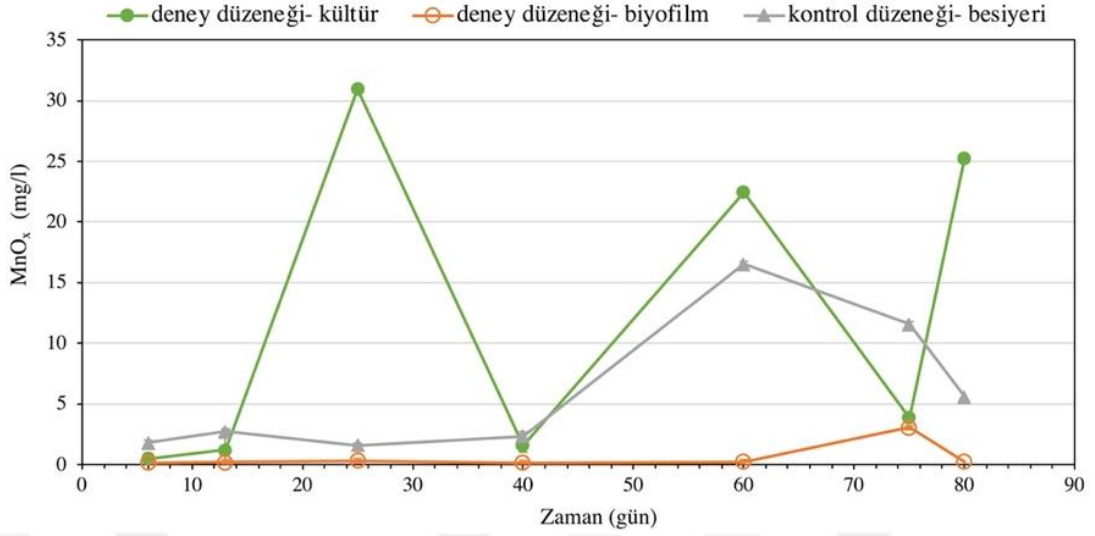


Şekil 4.27: 0.5 g/l Mn içeren deney düzeneğine maruz kalan kuponların yüzeyinde oluşan biyofilmdeki toplam karbonhidrat miktarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

4.8.3. MnO_x Miktarı

Örnekleme günlerinde, deney ortamı olan bakteri kültürü ile bu kültüre maruz kalan kuponların yüzeylerindeki biyofilm tabakasından ve kontrol düzeneğindeki steril Mn broth besiyerinden yapılan MnO_x ölçümlerine ait sonuçlar Şekil 4.28’de gösterilmiştir.

Bakteri kültüründen elde edilen veriler, JETA1-E2 suşunun 6. günden (0.50 ± 0.17 mg/l) itibaren Mn oksitlemeye başladığını ve MnO_x miktarının 25. güne kadar artarak, deney süresince tespit edilen en yüksek değere (30.96 ± 1.66 mg/l) ulaştığını göstermektedir. Daha sonraki örnekleme gününde (40. gün) ise MnO_x miktarında (1.57 ± 0.24 mg/l) belirgin bir azalma gözlenmiş, ve sonrasında deney süresince artış ve azalmaların olduğu görülmüştür. Kültüre maruz kalan kuponların yüzeylerindeki biyofilm tabakasındaki MnO_x miktarı ise deneyin 6. gününde 0.18 ± 0.04 mg/l olarak tespit edilmiş olup, 60. güne kadar miktarında anlamlı bir değişim görülmemiştir. Sonrasında ise MnO_x miktarında bir artış olmuş ve deney süresince en yüksek değer 75. günde 3.05 ± 0.19 mg/l olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: 0.5 g/l final Mn içeren deney ve kontrol düzeneklerindeki MnO_x miktarlarının zamana göre değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

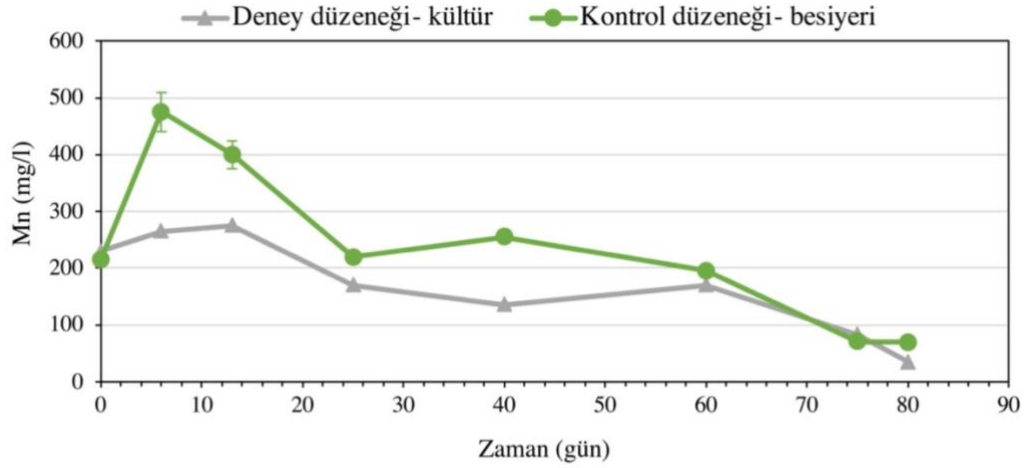
Deney düzeneği ile aynı koşullarda bekletilen steril Mn Broth besiyerinde ise 6. günde 0.81 ± 0.17 mg/l olan MnO_x miktarında 40. güne kadar belirgin bir fark gözlenmezken, 60. günde 16.54 ± 0.32 mg/l olarak ölçülmüştür. Daha sonra MnO_x miktarı deney sonuna kadar azalmış, 80. günde 5.58 ± 0.20 mg/l olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.28).

Bakteri kültüründeki MnO_x miktarının steril Mn Broth besiyerinde tespit edilenden daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca bakteri varlığında yüksek miktarda MnO_x üretiminin (13. günden itibaren) steril ortama göre (60. günden itibaren) daha erken bir zamanda başladığı tespit edilmiştir. Bu durum, bakterinin MnO_x üretim sürecini hızlandırdığının bir göstergesidir.

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

Hem deney düzeneğindeki bakteri kültüründeki hem de kontrol düzeneğindeki steril Mn Broth besiyeri içeriğindeki Mn^{+2} değerlerinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.29'da verilmiştir. Deneyin başladığı ilk günde (0. gün) deney düzeneğindeki bakteri kültüründeki Mn^{+2} miktarı 230 ± 0 mg/l olarak ölçülmüş, daha sonra 13. güne kadar artmış ve 275 ± 25 mg/l ile en yüksek değerine ulaşmıştır. Sonrasında ise bakteri kültüründeki Mn^{+2} miktarının deney süresince genel olarak azalma eğiliminde olduğu gözlenmiş ve deney sonunda 35 ± 2 mg/l olarak ölçülmüştür (Şekil 4.29). Steril Mn Broth besiyerindeki Mn^{+2} miktarı ise, deneyin ilk gününde (0. gün) 215

± 5 mg/l olarak ölçülmüş olup, 6. günde artış göstererek 475 ± 3 mg/l ile en yüksek değerine ulaşmıştır. Daha sonra, deney süresince genel bir azalma eğiliminde olduğu görülmüş ve deney sonunda (80. gün) steril Mn broth besiyerindeki Mn^{+2} miktarı 70 ± 0 mg/l olarak ölçülmüştür (Şekil 4.29). Deney süresince genel olarak, steril Mn Broth besiyerindeki Mn^{+2} miktarının bakteri kültüründekinden yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.29: 0.5 g/l Mn içeren deney ve kontrol ortamlarındaki Mn^{+2} konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

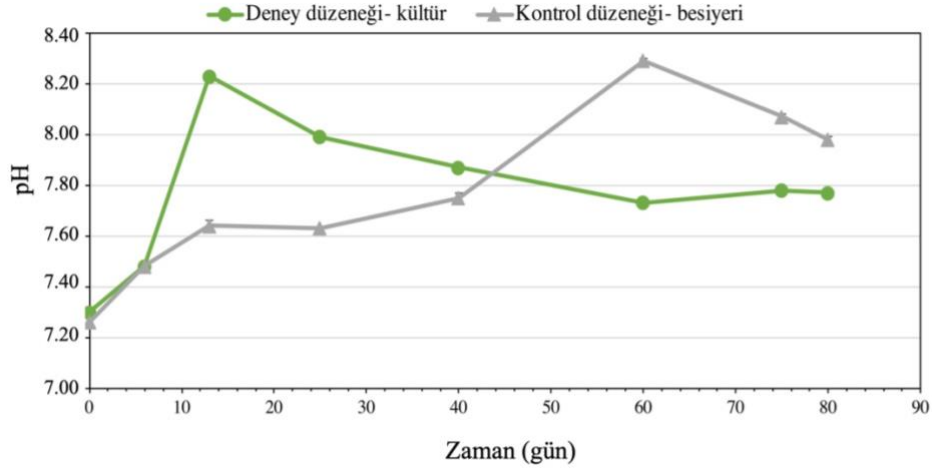
Deney süresince, deney düzeneğindeki bakteri kültürü ile kontrol düzeneğindeki steril Mn Broth besiyeri içeriğindeki Cl^- miktarlarındaki değişimler Tablo 4.13'te verilmiştir. Deneyin başladığı ilk günde (0. gün) bakteri kültüründeki serbest Cl^- miktarı 0.13 ± 0.00 mg/l olarak ölçülmüştür. Serbest Cl^- miktarının 60. güne kadar sürekli artarak 45 ± 2.15 mg/l ile en yüksek değerine ulaşmıştır. Daha sonra, deney sonuna kadar sürekli azalmış ve 80. günde 2.6 ± 0.01 mg/l olarak ölçülmüştür. Steril Mn Broth besiyerindeki Cl^- miktarı ise, deneyin ilk gününde (0. gün) 0.11 ± 0.01 mg/l olarak ölçülmüş olup, deney süresince zamana bağlı olarak artmıştır ($p \leq 0.01$). En yüksek Cl^- miktarı deneyin son örnekleme gününde 1.84 ± 0.01 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol ortamlarındaki Cl^- miktarlarının zamana bağlı değişimi.

Örnekleme günü	Bakteri kültürü			Steril Mn Broth Besiyeri		
	serbest Cl^-	bağlı Cl^-	total Cl^-	serbest Cl^-	bağlı Cl^-	total Cl^-
0	0.13 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.11 ± 0.01	*	0.08 ± 0.00
6	0.68 ± 0.01	0.35 ± 0.01	1.03 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.2 ± 0.01	0.32 ± 0.01
13	3.79 ± 0.20	0.48 ± 0.02	4.27 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.27 ± 0.01
25	5.28 ± 0.15	*	*	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.16 ± 0.00
40	*	*	5.67 ± 0.10	0.23 ± 0.05	0 ± 0.00	0.23 ± 0.01
60	45.00 ± 2.15	*	*	0.81 ± 0.02	0.32 ± 0.01	1.13 ± 0.01
75	31.60 ± 1.20	30.80 ± 2.20	62.4 ± 2.10	0.72 ± 0.01	0.41 ± 0.00	1.13 ± 0.01
80	2.60 ± 0.01	21.80 ± 1.05	24.6 ± 1.34	1.84 ± 0.01	1.55 ± 0.01	3.38 ± 0.15

* Ölçüm alınamadı.

Deney ve kontrol düzeneklerindeki deney ortamlarına (bakteri kültürü ve steril Mn broth besiyeri) ait pH değerlerinin deneyin ilk 6 günü birbirine yakın değerlerde olduğu tespit edilmekle birlikte, sonrasında farklı eğilim gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.30). Deneyin başlatıldığı 0. sa'da bakteri kültürünün ölçülen pH değeri (7.30 ± 0.01), 13. güne kadar artış göstermiş ve deney süresince en yüksek değerine (8.23 ± 0.00) ulaşmıştır. Daha sonra deney sonuna kadar pH değerinin azaldığı ve deney sonunda 7.77 ± 0.01 olduğu tespit edilmiştir. Kontrol düzeneğindeki steril Mn Broth besiyerinin deneyin başlatıldığı 0. sa'daki pH değeri (7.26 ± 0.01) ise 60. güne kadar artış göstererek, deney süresince en yüksek değerine (8.29 ± 0.01) ulaşmıştır. Daha sonra deney sonuna kadar azalmış ve 7.98 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.30: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol ortamlarına ait pH değerlerinin zamana bağlı değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

4.8.5. Korozyon Verileri

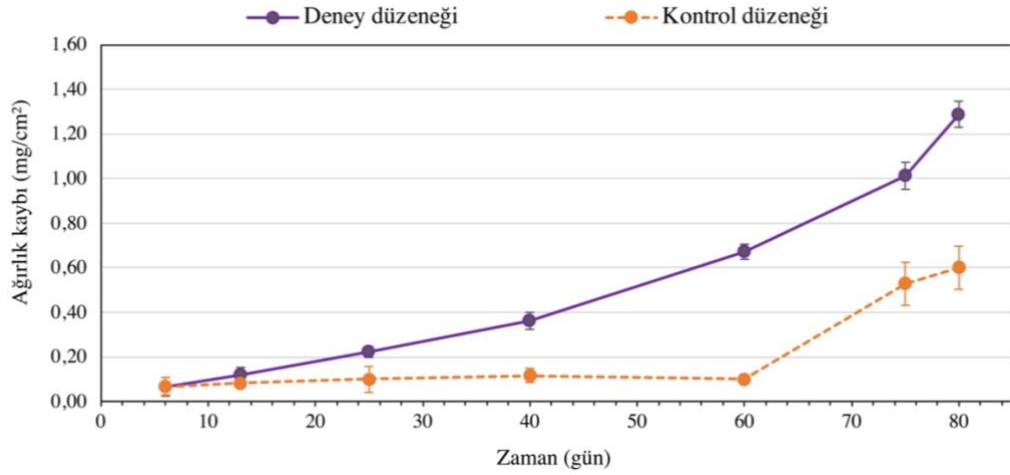
Deney düzeneğindeki JETA1-E2 suşunun kültürüne ve kontrol düzeneğindeki steril Mn Broth besiyerine maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kaybı ve korozyon hızı verileri Tablo 4.14'te verilmiştir. Deney süresince, JETA1-E2 suşunun kültürüne maruz kalan 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kaybı değerlerinin zamanla arttığı ($r = 0.970$, $p < 0.01$) ve ilk ölçüm gününde (6. gün) 0.07 ± 0.04 mg/cm² olarak belirlenen değer, deney sonunda (80. gün) 1.29 ± 0.04 mg/cm² ile en yüksek değerine ulaştığı belirlenmiştir (Tablo 4.14, Şekil 4.31). Kuponların korozyon hızı ise ilk ölçüm gününde 14.88 ± 0.97 µm/y olarak saptanmıştır. Daha sonra korozyon hızının 25. güne kadar azaldığı, sonrasında ise deney sonuna kadar artarak 80. günde 21.78 ± 2.02 µm/y değerine ulaştığı tespit edilmiştir (Tablo 4.14, Şekil 4.32). Kuponların ağırlık kaybı ile korozyon hızı verileri arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki bulunduğu tespit edilmiştir ($r = 0.883$, $p < 0.01$).

Kontrol düzeneğindeki steril Mn Broth besiyerine maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kaybı değerlerinde 60. güne kadar anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. İlk ölçüm gününde (6. gün), deney düzeneğindeki gibi 0.07 ± 0.04 mg/cm² olarak belirlenen ağırlık kaybı değerinin, 60. günde 0.10 ± 0.02 mg/cm² değerinde olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra ağırlık kaybı değerlerinde artış olmuş ve deney sonunda (80. gün) 0.60 ± 0.10 mg/cm² ile en yüksek değerine ulaşmıştır (Tablo 4.14). Kuponların korozyon hızı ise en yüksek ilk ölçüm gününde 14.83 ± 0.11 µm/y olarak tespit edilmiştir. Daha sonra korozyon hızında düşüş olmuş

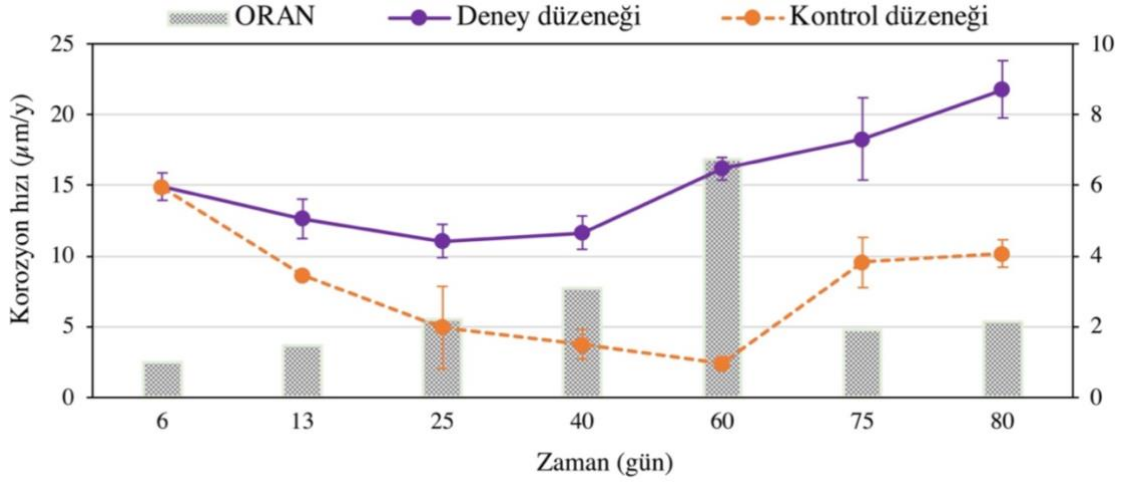
ve 60. günde $2.40 \pm 0.46 \mu\text{m/y}$ olarak tespit edilmiştir. Sonrasında ise korozyon hızı deney sonuna kadar tekrar artmış ve 80. günde $10.15 \pm 0.98 \mu\text{m/y}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.14, Şekil 4.32).

Tablo 4.14: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların deney süresince ağırlık kayıpları ve korozyon hızı verileri.

Örnekleme zamanı (gün)	Ağırlık kaybı, deney (mg/cm^2)	Ağırlık kaybı, kontrol (mg/cm^2)	Korozyon hızı, deney ($\mu\text{m}/\text{y}$)	Korozyon hızı, kontrol ($\mu\text{m}/\text{y}$)	Oran (deney/kontrol)
6	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.04	14.88 ± 0.97	14.83 ± 0.11	1.00
13	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.00	12.63 ± 1.40	8.64 ± 0.11	1.46
25	0.22 ± 0.02	0.10 ± 0.06	11.06 ± 1.22	4.97 ± 2.92	2.23
40	0.36 ± 0.04	0.12 ± 0.03	11.64 ± 1.19	3.75 ± 1.06	3.10
60	0.67 ± 0.03	0.10 ± 0.02	16.19 ± 0.81	2.40 ± 0.46	6.75
75	1.01 ± 0.06	0.53 ± 0.10	18.28 ± 2.91	9.55 ± 1.75	1.91
80	1.29 ± 0.06	0.60 ± 0.10	21.78 ± 2.02	10.15 ± 0.98	2.15



Şekil 4.31: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kaybı verilerinin zamana bağlı değişimi.

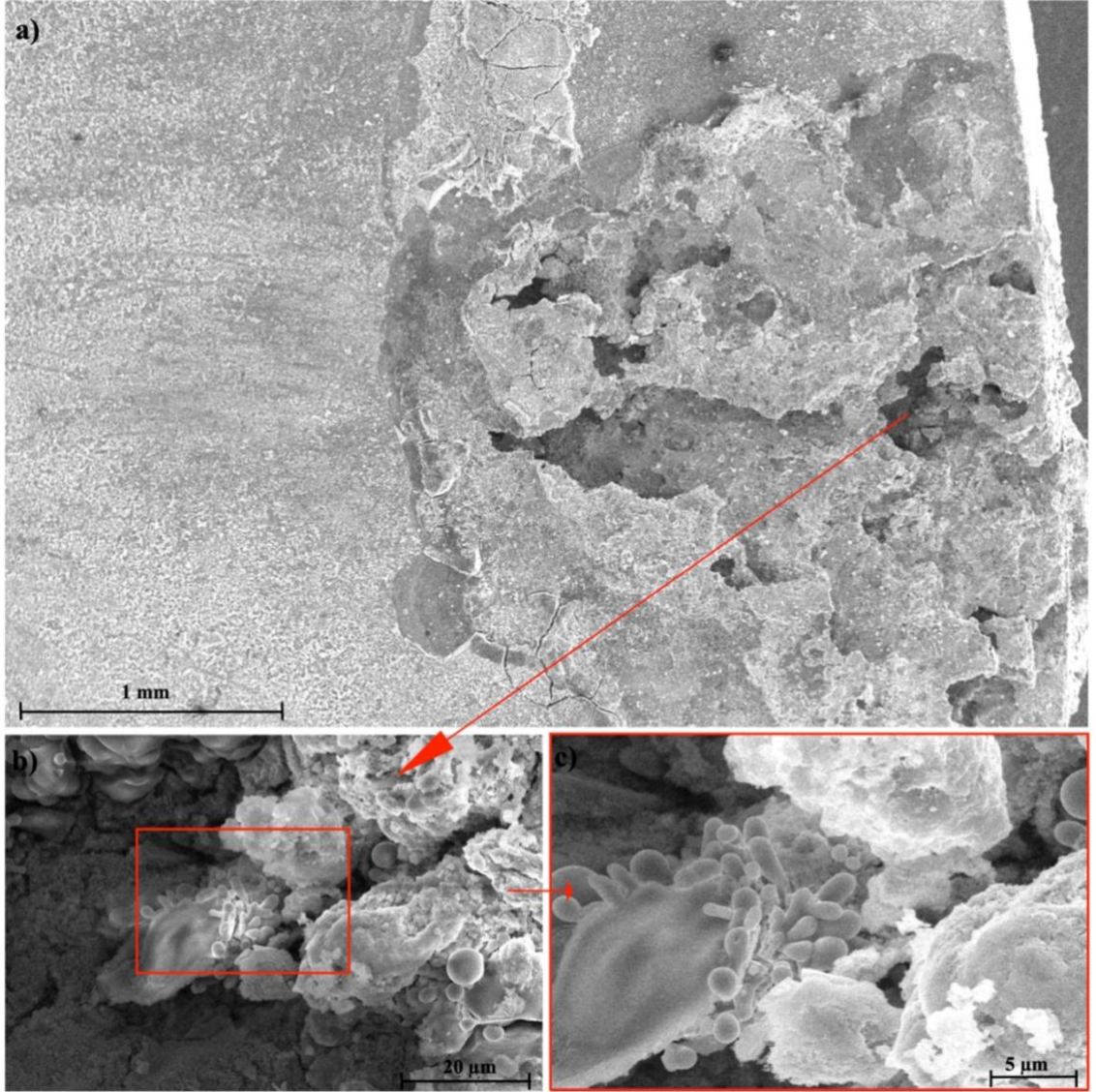


Şekil 4.32: .5 g/l Mn konsantrasyonlu deney ve kontrol düzeneklerindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların korozyon hızlarının ve korozyon hızı oranlarının zamana bağlı değişimi

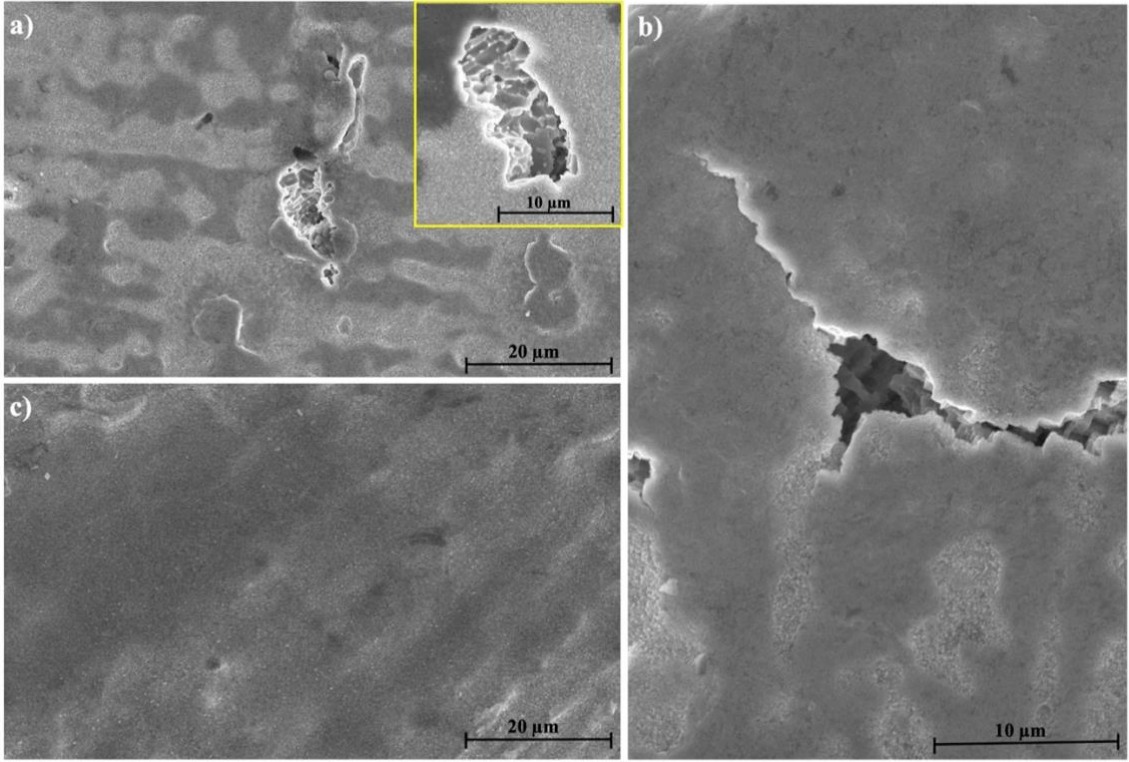
Deney düzenneğindeki kuponların ağırlık kayıplarının ve korozyon hızlarının deney süresince kontrol düzenneğindeki korozyon hızlarından daha yüksek olduğu ve korozyon hızı verileri açısından bu farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Ayrıca, 60. günde deney düzenneğindeki kuponların korozyon hızının kontrol düzenneğindeki korozyon hızından 6.75 kat fazla olduğu saptanmıştır. Bu değer, deney süresince elde edilen en yüksek korozyon hızı oranıdır. Deneyin son günü olan 80. günde ise deney düzenneğindeki kuponların korozyon hızının kontrol düzenneğindeki korozyon hızından 2.15 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Gravimetrik analiz çalışmaları sonucunda, JETA1-E2 suşunun 7175-T7351 alüminyum alaşımını korozyona uğrattığı tespit edilmiştir. Ayrıca, deneyin ilk 6 günlük sürecinde ağırlık kaybının, deney ve kontrol düzeneklerindeki kuponlarda aynı miktarda gerçekleştiği tespit edilirken, bakteri kültürünün 6. günde MnO_x üretim aktivitesinin başlaması ile birlikte ağırlık kaybının da kontrole göre artması ve deney süresince de daha yüksek değerlerde olması, 7175-T7351 alüminyum alaşımının mikrobiyolojik korozyonunda JETA1-E2 suşunun Mn oksidasyon aktivitesinin ve bu aktivite sonucunda üretilen MnO_x 'lerin rolü olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.28 ve Şekil 4.34).

Deneyin son örnekleme gününde deney düzenneğinden çıkarılan kuponlardan temizlenmemiş (Şekil 4.33) yüzeyden çekilen SEM görüntülerinde, bakterilerin kümeler halinde ve korozyon ürünleri ile bir arada özellikle tüberkül altındaki oyukta yoğun bir şekilde bulunduğu (Şekil 4.33b ve Şekil 4.33c) gözlemlenmiştir. Kuponların temizlenmiş (Şekil 4.34) yüzeylerindeki farklı alanlardan çekilen SEM görüntüleri, bakteri kültürüne maruz kalan kuponlarda yüzey

boyunca korozyona bağılı oyukların meydana geldiğini göstermiştir (Şekil 4.34a). Dahası oyukların olduğu yerlerde, sınır boyunca devam eden çatlaklar da gözlenmiştir (Şekil 4.34b). Kontrol düzeneğinde steril Mn Broth besiyerine maruz bırakılan kuponların yüzeyinde ise bu tarz oyukların ve çatlakların bulunmadığı saptanmıştır (Şekil 4.34c).



Şekil 4.33: Deney düzeneğinden 80. günde çıkarılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun SEM görüntüsü; temizlenmemiş kupon yüzeyi (a), tüberkül altındaki oyuk (b ve c).



Şekil 4.34: Deney düzeneğinden (a, b) ve kontrol düzeneğinden (c) 80. günde çıkarılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların temizlenmiş yüzeylerinin SEM görüntüleri.

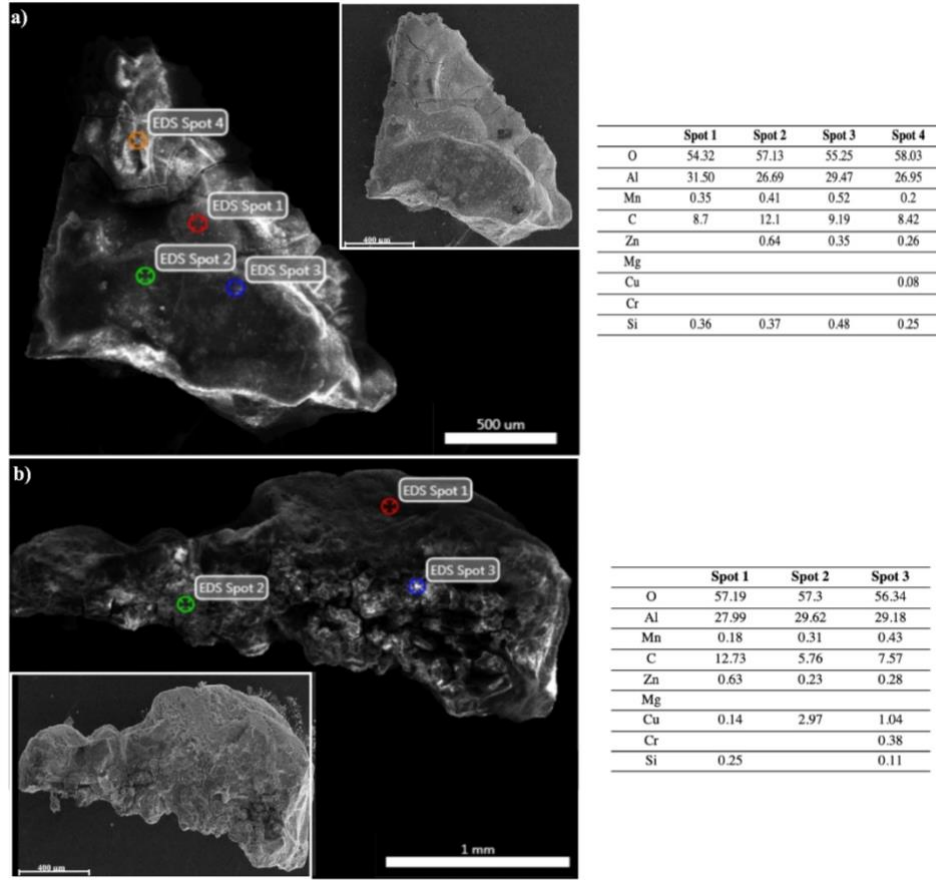
4.8.6. EDS Analiz Sonuçları

Deneyin son örnekleme gününde sistemden çıkartılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kupon yüzeyindeki biyofilmin yapısı ve oluşan korozyon ürünleri SEM ve EDS analizleri ile incelenmiştir. Mangan okside eden JETA1-E2 suşuna maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların makroskobik incelemesi sonucunda, kupon yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasında kahverengi birikintiler olduğu, yüzeyde kahverengi bir tüberkülün olduğu ve tüberkülün altında oyuk meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.25).

Temizlenmiş kuponlarda gözlemlenen oyuklar, JETA1-E2 suşunun 7175-T7351 alüminyum alaşımını mikrobiyolojik olarak korozyona uğrattığını göstermekle birlikte, bakterinin korozyon sürecindeki rolünü net bir şekilde ortaya koyabilmek amacıyla hem tüberkülün altında oluşan oyuktaki korozyon ürünlerinden hem de tüberkülün içinden ve dışından EDS analizleri yapılmıştır. Tüm EDS analizi sonuçları, kuponların yüzeylerinde oluşan korozyon ürünlerinin yüksek miktarda O ve Al içerdiğini göstermektedir. O ve Al elementlerine ek olarak genellikle Zn, Mg, Cu, Mn ve Si elementleri saptansa da, bu elementlerin çözünen miktarlarının

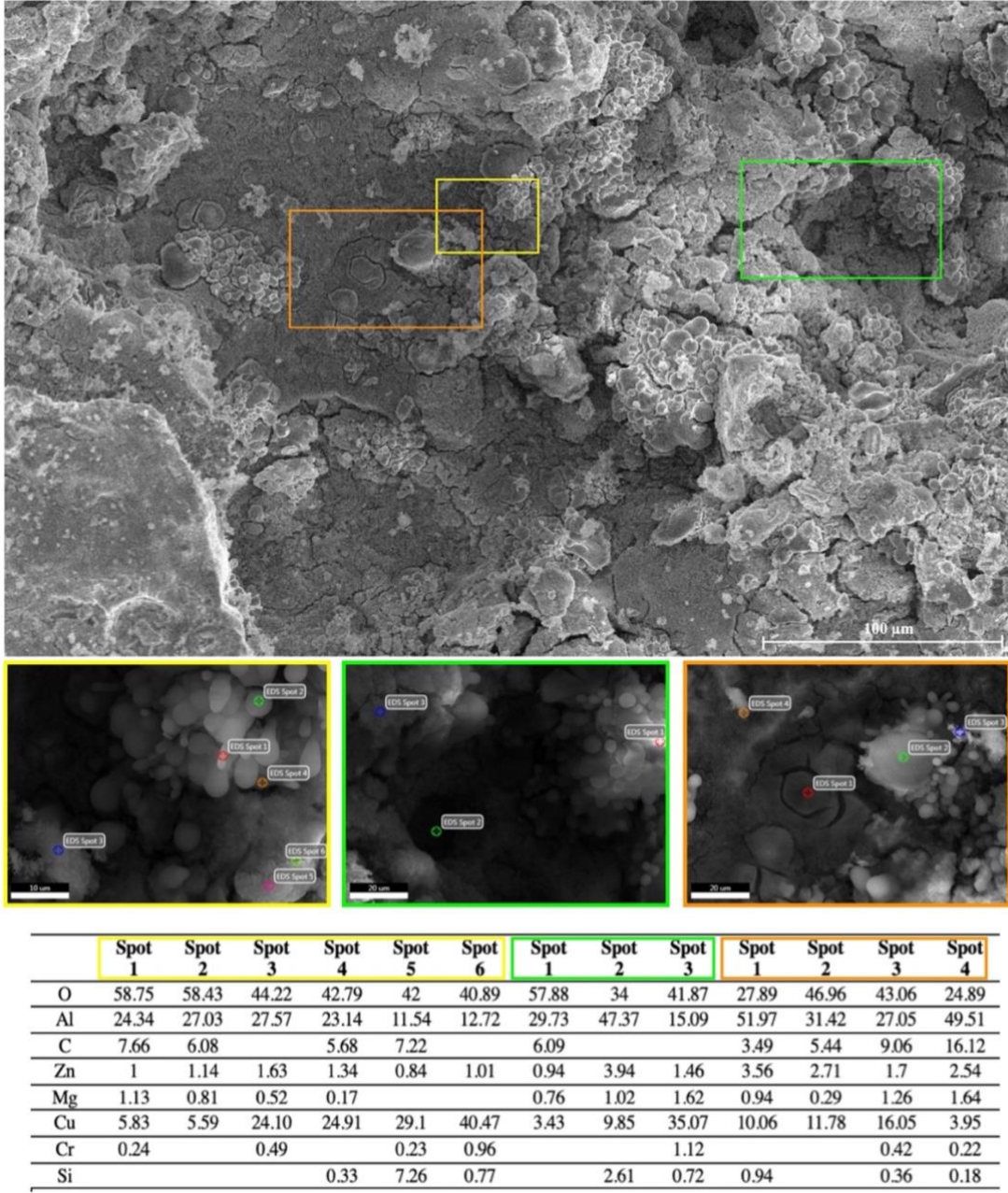
(%ağırlık), bulundukları alana spesifik olarak farklı yoğunluklarda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.35 ve Şekil 4.36).

Tüberkülden yapılan EDS analizleri ile tüberkülün hem iç hem de dış kısımlarında yüksek miktarlarda O, Al ve C, düşük miktarlarda ise Zn, Mn ve Si elementleri tespit edilmiştir (Şekil 4.35). Ayrıca SEM analizlerinde, tüberkülün hiçbir noktasında bakteriye rastlanılmamıştır. Bu durum tüberkülün içeriden büyüdüğüne işaret etmektedir.



Şekil 4.35: Deney düzeneğindeki 7175-T7351 alüminyum alaşımı kuponlarda 80. günün sonunda oluşan tüberkülün EDS analiz sonuçları (%ağırlık); tüberkülün içi (a), tüberkülün dışı (b).

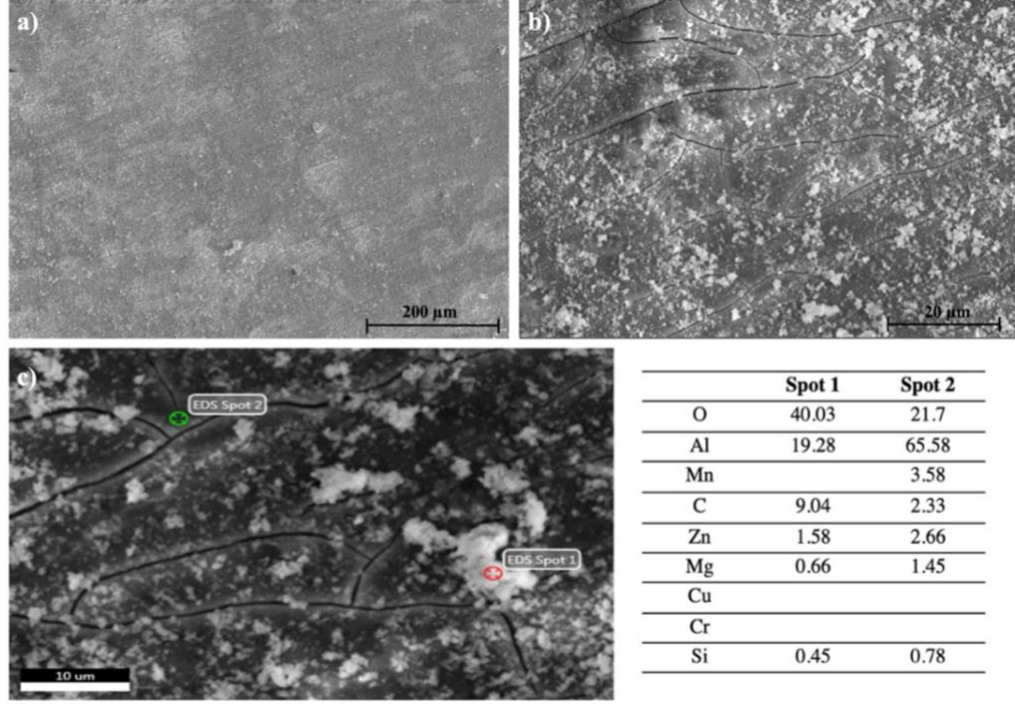
Tüberkülün altında oluşan oyuğun ise çok sayıda katman içerdiği, korozyon ürünleri ve yoğun miktardaki bakterilerin her katmanda iç içe olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.35). Oyuğun farklı katmanlarından yapılan EDS analizleri ise, korozyon ürünlerinin yüksek miktarlarda sırasıyla O, Al ve Cu, daha düşük miktarlarda ise Zn ve Mg elementlerini içerdiğini göstermektedir (Şekil 4.35).



Şekil 4.36: Deney düzeneğindeki 7175-T7351 alüminyum alaşımı kuponlarda 80. günün sonunda oluşan tüberkülün altındaki oyuktan gerçekleştirilen EDS analiz sonuçları (%ağırlık).

Kontrol düzeneğinde steril Mn Broh besiyerine maruz bırakılan kuponlardan 80. günde yapılan SEM analizinde, kupon yüzeyinde düzgün tek tabakalı, heterojen ve bozulmamış bir film tabakası olduğu gözlemlenmiştir. Film tabakasında yoğun şekilde kümeler halinde korozyon ürünleri görülmüştür. Bu oluşumların EDS analizinde en yüksek O, daha sonra da yüksek miktarda Al ve C elementleri, az miktarda ise Zn, Mg ve Si elementleri içerdiği saptanmıştır. Bu korozyon ürünleri dışındaki yüzeyi tamamen kaplayan film tabakasından yapılan EDS

analizinde ise en yüksek Al, daha sonra da yüksek miktarda O elementleri, az miktarda ise Mn, C, Zn, Mg ve Si elementleri saptanmıştır (Şekil 4.37). Kontrol kuponlarında oluşan korozyon ürünlerinde deney kuponlarından farklı olarak Cu elementi tespit edilmemiştir.



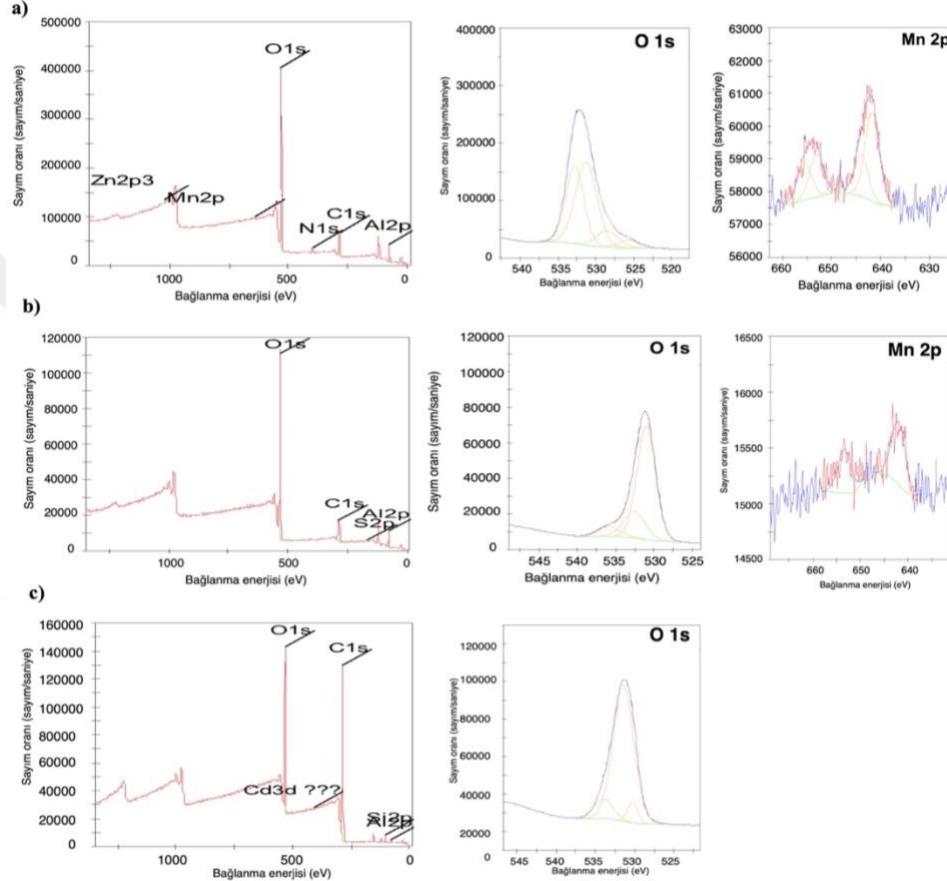
Şekil 4.37: Kontrol düzeneğinden 80. günde çıkarılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponun SEM görüntüleri (a ve b) ve EDS analiz sonuçları (%ağırlık) (c).

4.8.7. XPS Analiz Sonuçları

Son örnekleme gününde deney ve kontrol düzeneklerinden çıkarılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların yüzeylerindeki biyofilm ve film tabakalarının korozyon ürünlerinin karakterizasyonu için yapılan XPS analizlerine ait spektrumlar Şekil 4.38 ve Şekil 4.39’da gösterilmiştir.

Deney düzeneğinde JETA1-E2 suşuna maruz bırakılan kuponun yüzeyindeki kahverengi birikintilerin gözlendiği genel biyofilm yapısındaki analiz sonucunda (Şekil 4.38a), çeşitli Mn oksitler ve alaşımdan çözünen metal iyonları ile oluşan oksitlerin varlığı saptanmıştır. O 1s piklerinin enerjileri 525.64 eV (data bulunamamıştır), 528.50 eV (Mn_2O_3), 531.30 eV (Al_2OSiO_4), 532.80 eV (SiO_2); Mn 2p piklerinin bağlanma enerjileri 641.69 eV (Mn_2O_3), 643.95 eV (MnO_2), 653.07 eV (MnO_3) ve 655.53 eV (Mn^{+3} oksidasyon hali) olarak belirlenmiştir. Aynı kuponda oyuklanmanın olduğu alandan yapılan analizde (Şekil 4.38b) ise

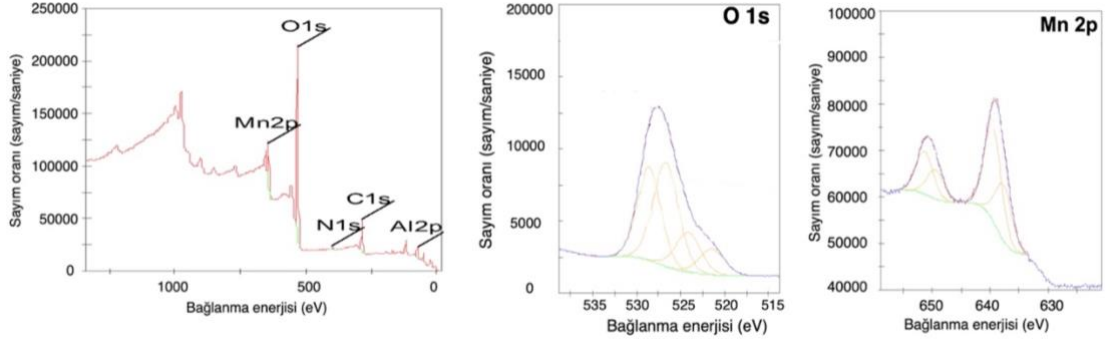
O 1s piklerinin bağlanma enerjileri 530.99 eV, 535.90 eV ve 532.56 eV olarak tespit edilmiş ve sırasıyla, MgO, SiO ve AlO bileşiklerine karşılık geldiği saptanırken; Mn 2p piklerinin bağlanma enerjilerinin ise 642.00 eV ve 653.36 eV olarak bulunduğu ve bunların da sırasıyla Mn_2O_3 ve Mn_3O_4 bileşiklerine karşılık geldiği belirlenmiştir (<https://srdata.nist.gov/xps/SpectralIdentifier>).



Şekil 4.38: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu deney düzeneğinde 80 gün boyunca bakteri kültürüne maruz bırakılan kupondan yapılan XPS analizlerine ait spektrumlar; a) yüzeyden, b) oyuklanmanın olduğu alandan, c) tüberkülden.

Deney kuponunun yüzeyinde oluşan tüberküde (Şekil 4.38c) O 1s piklerinin bağlanma enerjileri 530.20 eV, 531.40 eV ve 533.88 eV olarak bulunmuştur. 530.20 eV piki korozyon ürünlerinden ZnO ve Cu_2O 'dan birine ve 531.40 eV piki ise $ZnAl_2O_4$, $Al_2O_3 \cdot 3H_2O$ veya Al_2FeO bileşiklerinden birine atfedilebilmektedir (<https://srdata.nist.gov/xps/SpectralIdentifier>). 533.88 eV pikinin ise karşılığı olan bir data bulunamamıştır. Tüberkülün (Şekil 4.38c) Mn 2p spektrumunda hiç pik çıkmadığı için dekonvolüsyon analizi yapılamamıştır.

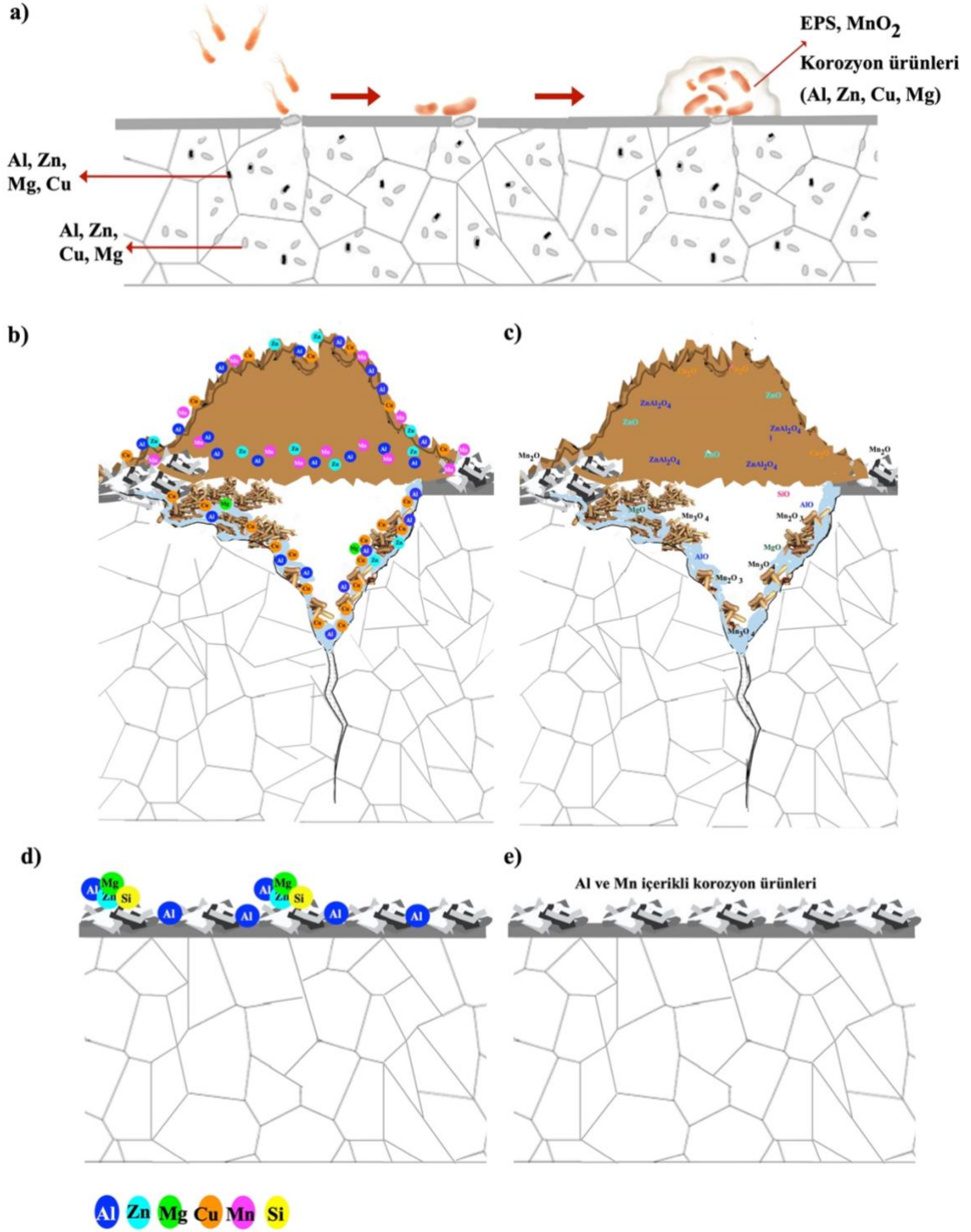
Kontrol düzeneğinde steril Mn Broth besiyerine maruz bırakılan kuponun yüzeyinden yapılan XPS analizi sonucunda, Mn 2p piklerinin bağlanma enerjileri 651.25 eV (Mn), 649.42 eV ($\text{Al}_{78.9}\text{Mn}_{3.8}\text{Pd}_{17.3}\text{O}_x$), 639.49 eV (MnP) ve 637.66 eV ($\text{Al}_{56}\text{Mn}_8\text{Pd}_{36}$) olarak bulunmuştur (Şekil 4.39).



Şekil 4.39: 0.5 g/l Mn konsantrasyonlu kontrol düzeneğinde 80 gün boyunca steril Mn Croth besiyerine maruz bırakılan kuponun yüzeyinden yapılan XPS analizlerine ait spektrumlar.

XPS analiz sonuçları, bakterili ve steril ortamlara maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların yüzeylerindeki korozyon ürünlerinin farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. MnO_2 , Mn_2O_3 ve Mn_3O_4 bileşikleri sadece bakterili ortamda tespit edilmiştir.

Mangan okside eden JETA1-E2 suşunun 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponlar üzerine mikrobiyolojik korozif etkisinin değerlendirildiği bu tez çalışmasında, bakterinin alüminyum alaşımı ile ilk etkileştiği andan, deney sonuna kadar geçen süreç Şekil 4.40'ta şematize edilerek özetlenmiştir.



Şekil 4.40: JETA1-E2 suşunun süreç üzerindeki etkisi; (a) tutunma ve biyofilm oluşturma, (b ve c) deney kuponu korozyon ürünleri, (d ve e) kontrol kuponu korozyon ürünleri.

JETA1-E2 suşuna ait bakteriler, kendi kültürlerine maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların yüzeyi ile etkileştikleri andan itibaren, yüzeyde kolonize olarak daha avantajlı bir yaşam formu olan biyofilm oluşturma eğilimindedirler. Bu hedefle bakterinin genellikle alüminyum alaşımın yüzeyine tutunurken daha ince bir oksit tabakanın bulunduğu çökelti noktalarını tercih ettiği düşünülmektedir. Farklı görüntülere sahip çökeltilerden yapılan EDS analizleri, bu çökeltilerin yoğunlukla Al, Zn, Mg ve Cu elementlerinden oluştuğunu ortaya koymuştur (Şekil 3.4 ve Şekil 4.40a).

Bakteriler yüzeyde geri dönüşümsüz tutunmayı gerçekleştirdikten sonra çoğalmaya ve EPS üretmeye başlamıştır. Böylece alaşımın yüzeyinde bir biyofilm tabakası oluşmuş ve zamanla kuponun tüm yüzeyini kaplamıştır. Biyofilm oluşum ve olgunlaşma süreci devam ederken, bir yandan da bakteri aracılı MnO_x üretimi gerçekleşmiştir. Deneyin 6. gününden itibaren MnO_x üretimi gerçekleşmiş ve deney süresince de yoğun olarak kültür ortamında olmakla birlikte alaşım yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasında da tespit edilmiştir. Dolayısıyla alaşım yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasının bakteriler, yoğun EPS içeriği ve MnO_x bileşiklerinden oluştuğu söylenebilmektedir (Şekil 4.40a).

Deneyin ilerleyen zamanlarında, alaşımın yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasında kahverengi birikintilerin yanı sıra, yüzeyde kahverengi bir tüberkülün oluştuğu ve tüberkül kaldırıldığında ise tüberkülün altında oyuk meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.25). Kuponların korozyon verilerini destekleyen bu oluşum sebebiyle, deneyin son örnekleme gününde, tüberkülden ve altındaki oyuktan görüntüleme ve karakterizasyon analizleri gerçekleştirilerek süreç hakkında değerlendirme yapılmıştır.

Tüberkülün altında çukurcuk korozyonunun gerçekleşmiş olması, korozyon mekanizmasını oluşturan anot ve katot bölgelerin bir arada bulunduğu galvanik çift mekanizmasını akla getirmiştir. Bakteri tarafından üretilen MnO_2 ile bakterinin tutunduğu ve biyofilmin geliştiği çökelti (Al, Zn, Mg ve Cu elementlerinden oluşan) birlikte galvanik çift oluşturmuş olabilir. Bu durumda tüberkülün oluştuğu alanda, yüzeydeki biyofilm içerisindeki MnO_2 katot olarak davranırken, bu çökelti anot olarak davranmış ve korozyon bu bölgeden başlamış olabilir.

Çukurcuğun ağız kısmında oluşan tüberkül, çukurcuk içindeki çözeltinin seyrelmesini önler ve çukurcuk içinde gelişen korozyonu güçlendirici etkileri vardır. Bununla birlikte, çukurcuk içindeki korozyonun başlaması ve sürmesi otokatalitik olarak yürütülür ve çukurcuğun içi ayrı

bir durum olarak değerlendirilir. Çukurcuk içerisinde farklı katmanlardan yapılan EDS analizleri çukurcuğun, sırasıyla yoğun miktarda O, Al ve Cu elementlerinin yanı sıra, daha düşük miktarlarda Zn ve Mg elementlerini içerdiğini göstermektedir.

Çukurcuğun içerisindeki yoğun Cu elementinin tespiti Cu'nun çözünmesi ile ilgili iki farklı olasılığı gündeme getirmiştir. Birincisi, böyle bir süreçte bakteri rol oynamış olabilir. Bakteriler, mangan oksidasyonu için gerekli olan MCO enziminin sentezi için Cu elementine ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, salgıladıkları enzimler ile Cu'nun çözünmesine neden olmuş olabilirler. İkinci olasılık, bakteri tarafından oluşturulan MnO_2 'nin elektron potansiyelinin Cu'nunkinden yüksek olması, Cu'nun anodik davranarak çözünmesine neden olmuş olabilir. Ya da her iki olasılık da beraber gerçekleşmiş olabilir. Ek olarak, çukurcuk bölgesinde tabaka şeklinde oluşan korozyon ürünlerinde Cu'nun varlığı, ilave katodik alanların ortaya çıkmasına yol açarak korozyon sürecini hızlandırmış olabilir. Al'ye göre daha soy olan Cu varlığında, Al'nin çözünmesi hızlı bir şekilde devam ederek sınır boyunca oluşan çatlaklar ile korozyon ilerlemiş olabilir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, aktif olarak sürekli uçmakta olan ve C bakımı olarak adlandırılan 1 aylık bakım sürecindeki yolcu uçağının merkez ve kanat depolarından alınan jet A-1 yakıtından izole edilen MOB'ler arasından, büyümeleri ve Mn oksitlemeleri açısından en aktif olan MOB türü seçilmiştir. Seçilen MOB türü polifazik taksonomik analizler ile tanımlanmıştır. Tanımlanan MOB türünün, uçak yakıt deposu malzemesi olarak kullanılan 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine mikrobiyolojik korozyon davranışı araştırılmıştır.

MOB'lerin izolasyonu için LBB, Mn Agar ve MnOB olmak üzere üç farklı besiyerine ekim yapılmıştır. İzolasyonda farklı besiyerlerinin kullanımının nedeni mümkün olan en yüksek sayıda MOB izolatının elde edilmesidir. Kullanılan besiyerleri daha önce farklı araştırmacılar tarafından MOB'lerin izolasyonu için kullanılan besiyerleri arasından seçilmiştir (Cerrato ve diğ., 2010; Rajasekar ve diğ., 2010; Zakharova ve Prfenova, 2007). Nitekim izolatların 3 besiyerinde de üreyebildiği gözlemlenmiştir. İzolatların bu besiyerlerinde üremesi ve/veya kahverengi koloniler oluşturması, ortamda manganın okside olduğunun bir işareti olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, izolatların üremesi manganın toksik etkisine rağmen hayatta kalarak üreyebilmesinden ve kolonideki kahverengilik de farklı elementlerin biyojenik oksitlerinin Mn oksit benzeri görünümlere sahip olabilmesinden kaynaklanıyor olabilir (Cai ve diğ., 2023). Bu nedenle, izolatların mangan okside etme yeteneğine sahip olduklarının kesin olarak ortaya konulabilmesi için Mn(III), Mn(IV), Mn(V), Mn(VI) ve Mn(VII) ile seçici olarak reaksiyona giren bir trifenilmetan bileşiği olan lökoberbelin mavisi (LBB) kullanılarak, bakterilerin ürettikleri Mn oksitlerin varlığı ortaya konulmuştur (Krumbein ve Altmann, 1973; Cavazos ve Glass, 2020).

LBB testi hem besiyeri hem de filtre kağıdı üzerinde uygulanmıştır. Besiyerlerine uygulanan LBB test sonuçları, Mn Agar ve MnOB besiyerlerinde tüm izolatlar için pozitif iken, LBB besiyerinde az sayıda izolat hariç hepsi için negatif olarak tespit edilmiştir. Yüksek Mn konsantrasyonuna sahip Mn Agar (2 g/l) ve MnOB (3 g/l) besiyerlerindeki tüm sonuçların pozitif olması, besiyerlerindeki Mn'nin kimyasal oksidasyonu sebebiyle yalancı pozitifliğin oluştuğunu düşündürmüştür. Bu nedenle steril Mn Agar ve MnOB besiyerleri, herhangi bir inokülasyon yapılmadan standart inkübasyon süresi (3 hafta) boyunca 30°C'lik etüvde bekletilmiştir. Mn Agar besiyerinin inkübasyon süresince okside olmadığı, ancak daha uzun

süre tutulduğunda okside olmaya başladığı; MnOB besiyerinin ise inkübasyon süresinin ilk 3 gününde okside olarak renk değiştirdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle araştırma kapsamındaki deneylerde MnOB besiyeri kullanılmamıştır. Ayrıca, LBB testinin Mn Agar içeriğindeki yüksek Mn konsantrasyonu sebebiyle hatalı sonuç vermemesi için LBB ayırıcı, besiyerindeki koloni üzerine direkt uygulama yerine filtre kağıdına alınan koloni üzerine damlatılmıştır. Filtre kağıdı yöntemi ile uygulanan LBB testinin sonucunda, daha önce besiyerinde gerçekleştirilen LBB testinde pozitif sonuç veren 14 izolattan sadece üç tanesi (izolat 1, izolot 2, izolot 3) pozitif sonuç vererek MOB olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, MOB'lerin tespiti için tek başına bir besiyerinin kullanılmasının gerçek sonuçları yansıtmayacağı gibi yeterli de olmayacağını göstermiştir. Nitekim, Yılmaz (2019) hidroelektrik santralden MOB tespit ettiği çalışmasında, mevcut tez çalışmasına benzer şekilde besiyeri çeşitliliğinin yanı sıra, LBB testi uygulamasının besiyeri yerine filtre kağıdı üzerinde uygulanmasının da önemini ortaya koymaktadır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılmak üzere MOB izolatları (izolat 1, izolot 2, izolot 3) arasından büyümesi ve beraberinde Mn oksit üretmesi açısından en aktif olan izolot seçilmiştir. Bu izolatin tespitinde, Mn Agar ve LBB besiyerleri kullanılmıştır. Bu besiyerlerinin 2 g/l final Mn konsantrasyonu içeren sıvı formları ile izolatların büyüme eğrileri elde edilmiş ve Mn oksitleme aktiviteleri tespit edilmiştir. Büyüme eğrileri, her bir izolatin Mn içeren farklı besiyerlerinde farklı büyüme davranışı sergilediğini ve Mn varlığında izolatların duraklama fazına daha geç girdiğini ortaya koymuştur (Liu ve diğ., 2022; Ou-yahia ve diğ., 2024). Bununla birlikte Mn'nin varlığı izolot 2'nin büyümesini her iki besiyerinde de teşvik etmiş ve diğer izolatlara göre hem en yoğun büyümeyi hem de en fazla MnO_x üretimini izolot 2'nin gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, mikrobiyolojik korozyon deneyleri izolot 2 ile gerçekleştirilmiş ve tez çalışmasının ileriki tüm analizlerinde izolot 2, JETA1-E2 kodu ile ifade edilmiştir.

MOB izolatları arasında en yüksek aktiviteyi gösteren JETA1-E2 suşunun tür düzeyinde tanımlanması için polifazik taksonomik yaklaşım benimsenmiştir. Bu kapsamda, klasik taksonomik yöntemler (hücre ve koloni morfolojisi, spor oluşturma özelliği, hareketlilik, büyüme özellikleri, fizyolojik ve biyokimyasal testler), genotipik analizler (tüm genom analizi, 16S rRNA gen dizilerine ve tüm genom dizilimine dayalı filogeniler, gDNA G+C içeriği, yakın ilişkili türlerle dDDH ve ANI değerleri açısından değerlendirme) ve kemotaksonomik analizler (hücresel yağ asidi, poliamin, kinon, polar lipid, tüm hücre şekerleri ve diaminopimelik asit

analizleri) gerçekleştirilmiştir. JETA1-E2 suşunun klasik taksonomik özellikleri araştırıldığında, izolatu R2A, TSA ve LB besiyerlerinde iyi, NA besiyerinde ise zayıf ürettiği ve tüm besiyerlerinde sarı koloniler oluşturduğu gözlenmiştir. R2A besiyerindeki kolonilerin 1 mm çapında, yuvarlak, sarı, düz kenarlı olduğu belirlenmiştir. Mikroskopik incelemelerde hücrelerin farklı uzunluklarda, düzgün çomak şeklinde ve hareketli olduğu gözlenmiştir. Suşa ait hücrelerin ayrıca, “Gram-belirsiz (Gram-indeterminate)” olduğu ve 3 günlük inkübasyondan sonra spor oluşturduğu da saptanmıştır.

JETA1-E2 suşunun büyümesi için aerobik koşullar zorunludur. Bakterinin fizyolojik özellikleri değerlendirildiğinde, 20-42°C sıcaklık ve 6-9 pH değerleri aralığında üreyebildiği ve optimum büyüme koşullarını ise 30°C sıcaklık ve 7 pH değerlerinde gösterdiği belirlenmiştir. Bulgular, bakterinin mezofilik ve asidik koşullara toleransının çok düşük olduğuna, bununla birlikte alkali koşulları sevdiğine işaret etmektedir. JETA1-E2 suşunun %12 NaCl (w/v) konsantrasyonlarına kadar olan tuz miktarlarını tolere edebildiği ve optimum olarak %2 ve %4 NaCl (w/v) konsantrasyonlarında büyüdüğü belirlenmiştir. Bununla birlikte bakterinin izole edildiği Jet A-1 yakıt örneğinden gerçekleştirilen tuzluluk ölçümünde, yakıtta tuz tespit edilememiştir. Bu nedenle, korozyon deneylerinde deney ortamına tuz ilavesi yapılmamıştır.

JETA1-E2 suşunun genotipik özelliklerini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen analizlerde, suşun 1377 baz uzunluğundaki kısmi 16S rRNA gen dizilerinin *Sphingomonas paucimobilis* (MT367853) (%99.42), *Sphingomonas sanguinis* (MF319771) (%99.34) ve *Sphingomonas pseudosanguinis* (HE716953) (%99.27) ile yüksek çift yönlü benzerlik değerleri gösterdiği saptanmıştır. Bu değerler prokaryotik organizmalarda tür düzeyinde tanımlama için eşik değer olan ≥ 98.5 değerinin üzerindedir (Munn, 2020). Bu benzerlik değerleri JETA1-E2 suşunun *Sphingomonas* cinsine ait olduğunu gösterse de, tür düzeyinde bir tanımlama sağlamamıştır. Sadece 16S rRNA genlerine dayalı araştırmaların yakın akraba türleri ayırt etmede düşük bir çözümleme kapasitesine sahip olduğu iyi bilinmektedir (Achtman ve Wagner, 2008; Pei ve diğ., 2010; Rossi-Tamisier ve diğ., 2015; Jovel ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2016). Örneğin, *Sphingomonas* cinsine yeni bir bakteriyi tanımladıkları çalışmalarında Kämpfer ve diğ. (2007), *Sphingomonas sanguinis* (%99.2), *Sphingomonas yabuuchiae* (%99.2) ve *Sphingomonas parapaucimobilis* (%99.1) ile yüksek benzerlik oranlarına sahip olmasına rağmen, yeni izolatu *Sphingomonas pseudosanguinis* türü olarak tanımlanmış ve *Sphingomonas* cinsinin tanınan diğer tüm türleri ile daha düşük benzerlik oranı (<98) rapor etmişlerdir. Dolayısıyla, JETA1-

E2 suşunu fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dayalı olarak tür düzeyinde tanımlamak için API analizleri (API 20NE, API 20E, API 50CHB ve API ZYM) gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, kısmi 16S rRNA gen dizilerine göre filogenetik olarak ilişkili olduğu bakterilerin tip türlerine (*Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098^T, *Sphingomonas sanguinis* DSM 13885^T ve *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512^T) ait literatürde yer alan API test sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Yabuuchi ve diğ., 1990; Takeuchi ve diğ., 1993; Kämpfer ve diğ., 2007; Xue ve diğ., 2018) (Tablo 4.4). API testlerinde, JETA1-E2 suşunun, *Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098^T, *Sphingomonas sanguinis* DSM 13885^T ve *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512^T tip suşlarından farklı olarak nitrat indirgemesi testinde pozitif sonuç verdiği, malat asimilasyonu ve arbutinden asit üretimi için ise negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Enzimatik aktivite açısından değerlendirildiğinde, suşlar arasında sadece JETA1-E2 suşunun α -kimotripsin, β -galaktosidaz ve α -glukosidaz enzim aktivitesi açısından negatif olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, oksidaz testi negatif olan *Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098^T'nin aksine, JETA1-E2 suşunun oksidaz testi zayıf pozitif olarak belirlenmiştir. JETA1-E2 suşunun genotipik açıdan yüksek oranda benzerlik gösterdiği *Sphingomonas* tip türleri ile fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından farklılık gösterdiği, dolayısıyla da bu bakteri türlerinden birine ait olmadığı tespit edilmiştir. JETA1-E2 suşunun tür düzeyinde tanımlanabilmesi için ileri moleküler ve kemotaksonomik analizlerin gerekli olduğu belirlenmiştir.

JETA1-E2 suşunun *Sphingomonadaceae* ailesi içerisindeki filogenetik yerleşimini doğru bir şekilde belirleyebilmek için suşun bütün 16S rRNA gen dizisine ve tüm genom dizilimine ait filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. 16S rRNA gen dizisine dayalı TYGS filogenetik ağacı JETA1-E2 suşunun *Sphingomonas* cinsi içerisinde ayrı bir dal oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.14). Filogenetik ağaç ile yeni suşun en yakın olduğu türlerin *Sphingomonas paucimobilis* NBRC 13935 (DSM 1098^T) (99.10%), *Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100 (98.52%), *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512^T (98.92%), *Sphingomonas sanguinis* NBRC 13937 (DSM 13885^T) (99.29%) ve *Sphingomonas zeae* DSM 100049 (97.86%) olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, tüm genom dizilimine ait filogenetik ağaç, yeni suşun *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde *Sphingomonas* ve *Sphingobium* cinsleri ile uzak bir şekilde kümelenerek farklı bir monofiletik grup oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.15). Böylece, JETA1-E2 suşunun filogenetik ağaçtaki ayırt edici dallanma modeli, yeni suşun *Sphingomonadaceae* ailesinde yeni bir cins olduğunu ortaya koymaktadır. 16S rRNA gen dizisine ve tüm genomu dayalı filogenetik analiz sonuçları, 16S rRNA gen dizisine dayalı

filogeninin *Sphingomonadaceae* ailesindeki bakterileri sadece tür düzeyinde değil, cins düzeyinde de tanımlamak için yetersiz olduğunu açık bir şekilde ortaya koymuştur. Nitekim Hördt ve diğ. (2020), *Alphaproteobacteria* sınıfında yer alan aile ve cinslere ait bakteriler için benzer durumu bildirmişlerdir.

JETA1-E2 suşu, 3,872,561 bç genom büyüklüğüne sahip olup, 3581 kodlayıcı gen, 3 rRNA geni, 57 tRNA geni ve 1 CRISPR içermektedir ve DNA G+C içeriği 66.3 %mol'dur. JETA1-E2 suşunun, filogenetik olarak yakın ilişki olduğu, *Sphingobium terrigena* EO9, *Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100, *Sphingomonas zeae* DSM 100049, *Sphingomonas sanguinis* NBRC 13937, *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512 ve *Sphingomonas paucimobilis* NBRC 13935 ile arasındaki dDDH değerleri sırasıyla %24.40, 28.30, 27.20, 27.50, 28.60 ve 28.00 olup, bu değerler prokaryotik tür ayrımı için %70 olan eşik değerinden oldukça düşüktür (Goris ve diğ., 2007). *Sphingobium terrigena* EO9, *Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100, *Sphingomonas zeae* DSM 100049, *Sphingomonas sanguinis* NBRC 13937, *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512 ve *Sphingomonas paucimobilis* NBRC 13935 ile arasındaki OrthoANI değerleri ise sırasıyla %74.48, 84.43, 83.69, 84.25, 84.66 ve 84.34 olup prokaryotik tür ayrımı için önerilen %95-96 eşiğinden daha düşüktür (Lee ve diğ., 2016). Bulgular, JETA1-E2 suşunun potansiyel olarak *Sphingomonadaceae* ailesine ait yeni bir cinsi temsil ettiğini desteklemektedir. Genom dizisi JAVSCQ000000000 erişim numarası altında NCBI Gen Bankası'nda saklanmıştır.

JETA1-E2 suşunun hücre duvarı herhangi bir diaminopimelik asit enantiyomeri içermemektedir. Tam hücre hidrolizatı ramnoz, riboz, fukoz, mannoz ve az miktarda glukoz ve galaktoz içermektedir. JETA1-E2 suşundaki baskın izoprenoid kinonun Q-10 olduğu, az miktarlarda ise Q-8, Q-9 ve Q-11 içerdiği belirlenmiştir. Nitekim Q-10, *Sphingomonadaceae* ailesine ait bakterilerde en sık tanımlanan solunum kinonudur (Glaeser ve Kämpfer, 2014).

JETA1-E2 suşunun polar lipidleri difosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol, fosfatidilkolin, aminofosfolipid, tanımlanamayan glikolipid ve tanımlanamayan iki sfingoglikolipidden oluşmaktadır. Suşun polar lipid profili *Sphingomonas* (*Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100, *Sphingomonas zeae* DSM 100049, *Sphingomonas sanguinis* NBRC 13937, *Sphingomonas pseudosanguinis* DSM 19512 ve *Sphingomonas paucimobilis* NBRC 13935) ve *Sphingobium* (*Sphingobium terrigena* EO9) cinslerinin tip türlerindeki farklılık göstermiştir. Aminofosfolipidin sadece JETA1-E2 suşunda bulunduğu belirlenmiştir.

Ayrıca JETA1-E2 suşunun, *Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100 hariç *Sphingomonas* cinsindeki yakın ilişkili olduğu tüm tip suşları ve *Sphingobium terrigena* EO9 suşunun ortak bir özelliği olan fosfolipidi içermediği de saptanmıştır (Kämpfer ve diğ., 2007; Park ve diğ., 2019). JETA1-E2 suşundaki baskın (toplam yağ asitlerinin %10'undan fazlası) yağ asitleri, C_{16:0} (%19.3) ve C_{18:1ω7c} (%62.9) olarak belirlenmiş ve hidroksillenmiş tek yağ asidinin ise 2-hidroksimiristik asit (C_{14:0} 2-OH) olduğu saptanmıştır. Nitekim, *Sphingomonadaceae* ailesi üyelerinde karakteristik baskın yağ asidi C_{18:1ω7c}'dir ve çoğunlukla C_{14:0} 2-OH olmak üzere 2-hidroksi yağ asitleri yaygın olarak bulunmaktadır (Busse ve diğ., 1999; Takeuchi ve diğ., 2001; Maruyama ve diğ., 2006; Huang ve diğ., 2009; Chen ve diğ., 2010; Liang ve Lloyd-Jones, 2010; Uchida ve diğ., 2012; Kämpfer ve diğ., 2012).

JETA1-E2 suşunun yağ asit bileşimi *Sphingomonas* ve *Sphingobium* cinslerinin tip türlerinininkilerden farklılık göstermiştir (Kämpfer ve diğ., 2007; Park ve diğ., 2019; Kämpfer ve diğ., 2015). Yakın akraba olduğu tüm tip suşların ortak özelliğinin aksine, JETA1-E2 suşunun C_{18:1ω5c}'den yoksun olduğu ve C_{19:0} içerdiği belirlenmiştir (Kämpfer ve diğ., 2007; Kämpfer ve diğ., 2015; Park ve diğ., 2019). Yağ asidi bileşimlerindeki ve polar lipid profillerindeki farklılıklar JETA1-E2 suşunu *Sphingomonadaceae* ailesinde yer alan *Sphingomonas* ve *Sphingobium* cinslerinin üyelerinden ayırmıştır.

JETA1-E2 suşunda tespit edilen tek poliamin, az miktardaki putresindir. Bununla birlikte JETA1-E2 suşu homospermidin ve/veya spermidin içermemektedir. Spermidin ve/veya homospermidin *Sphingomonadaceae* ailesindeki karakteristik baskın poliaminler olduğundan (Glaeser ve Kämpfer, 2014), bu poliaminlerin yokluğu suşun *Sphingomonadaceae* ailesi içinde yeni bir cins olduğunu göstermektedir. Nitekim Uchida ve diğ. (2012), *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde yeni bir cins olarak valide ettikleri *Parasphingopyxis* cinsinin, benzer şekilde hem spermidin hem de homospermidinden yoksun olduğunu bildirmişlerdir.

Polifazik taksonomik yaklaşımla yapılan identifikasyon çalışmaları, JETA1-E2 suşunun *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde yeni bir cins ve tür olduğunu ortaya koymaktadır ve suş, validasyonu sağlanarak taksonomiye kazandırılacaktır. Günümüze kadar uçak yakıtlarını kontamine eden çeşitli mikroorganizmalar rapor edilmiştir (Denaro ve diğ., 2005; Rauch ve diğ., 2006; Wallace ve diğ., 1985). Bu mikroorganizmaların, uçak yakıtlarının temasta bulunduğu malzeme olan 7xxx serisi alüminyum alaşımı üzerine mikrobiyolojik korozyon etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Vejar ve diğ., 2016). Dahası, uçak

yakıtlarının kontaminasyonundan sorumlu olduğu belirtilen bazı bakterilerin (*Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* vb.), farklı çalışmalarda Mn okside ederek enerji elde etme yeteneğine sahip olduğu da rapor edilmesine rağmen (Li ve diğ., 2016; Cerrato ve diğ., 2010; Ridge ve diğ., 2007), jet A-1 yakıtından izole edilen bakterilerin Mn oksitleme yeteneklerinin ve MIC'inin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında uçak yakıtından izole edilerek yeni bir cins olduğu tanımlanan ve mangan okside etme yeteneği belirlenen JETA1-E2 suşunun, uçak yakıt deposu malzemesi olan 7175-T7351 alüminyum alaşımı üzerine MIC'i araştırılmıştır.

Besiyerinin içeriği ve Mn konsantrasyonu, bakterinin büyümesini ve MnO_x üretim yeteneğini dolayısıyla da korozyon davranışını etkileyeceğinden MIC çalışmaları için öncelikle uygun besiyerinin ve Mn konsantrasyonunun seçimi gerçekleştirilmiştir. 2 g/l Mn konsantrasyonu ile hazırlanan Mn Broth ve LBB besiyerleri ile gerçekleştirilen deneylerde JETA1-E2 suşunun, LBB besiyerinde daha yoğun büyüme gösterirken, Mn Broth besiyerinde ise daha fazla MnO_x ürettiği tespit edildiğinden, bu deneyler ile seçim yapılamamıştır. MIC deneylerinde kullanılacak besiyeri ve içeriğindeki Mn konsantrasyonunu belirleyebilmek amacıyla, farklı Mn konsantrasyonları (0, 0.5, 1, 2, 3 g/l) ile hazırlanmış Mn Broth ve LBB besiyerlerinde JETA1-E2 suşunun büyüme yoğunluğu ve MnO_x üretme miktarı karşılaştırılmıştır.

JETA1-E2 suşunun, Mn Broth besiyerinde 3 g/l Mn konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarında, LLB besiyerinde ise tüm konsantrasyonlarında 85. güne kadar büyüme eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Mn varlığında bakterinin 85 gün gibi uzun bir süre canlı kalabilmesi, hatta büyümesinin teşvik edilmiş olması, bakterinin enerji kaynağı olarak Mn kullandığının bir göstergesi olarak, potansiyel bir kemolitotrofik yaşam tarzına işaret etmektedir. Dahası deney süresince devam eden ve genel olarak artış eğiliminde olan MnO_x üretimi de bu bulguyu desteklemektedir. Nitekim Yu ve Leadbetter (2020), multidisipliner teknikler kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, bakteriyel büyüme ve Mn oksidasyonu arasındaki ilişkiyi ve bu metabolik süreçte yer alan moleküler yolları ve proteinleri ortaya koyarak, bakterinin Mn oksidasyonunu enerji kaynağı olarak tercih ettiği bir kemolitotrofik süreç içerisinde bulunabildiğini ortaya koymuştur. Araştırma, Mn(II)'yi oksitleyen bakterilerin Mn(II) oksidasyonu ile eş zamanlı olarak üstel büyüme sergilediğini ve Mn tüketimi ile büyüme arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Dahası, bakterilerde Mn(II) kemolitotrofisine dâhil olabilecek genler tanımlanarak ve Mn oksidasyonunun CO_2 fiksasyonu yoluyla enerji

metabolizmasını ve biyokütle üretimini yönlendirdiği gösterilerek, Mn tüketiminin bu metabolik süreçle bağlantılı olduğu fikri desteklenmiştir (Yu ve Leadbetter, 2020).

Mn Broth ve LBB besiyerlerinin Mn konsantrasyonlarındaki farklılığın, JETA1-E2 suşunun büyüme yoğunluğu ve MnO_x üretme miktarına etkisi değerlendirildiğinde, her iki besiyerinin 2 ve 3 g/l Mn konsantrasyonlarında da, bakterinin Mn'siz ortamlarına göre daha uzun süre lag fazında kaldıkları belirlenmiştir. Bu durum, bu iki konsantrasyonun bakteri için toksik etkili olabileceğine işaret etmektedir. Nitekim, topraktan izole ettikleri ve Mn oksitleyebilen *Pseudomonas taiwanensis* suşları ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında Liu ve diğ. (2022), 0.12 g/l Mn konsantrasyonuna kadar çalışılan konsantrasyonlarda mikroorganizma büyümesinin güçlü bir şekilde etkilenmediği ve Mn konsantrasyonu 0.24 g/l ulaştığında ise suşların neredeyse büyümediğini ve lag fazının da bu toksik olmayan konsantrasyona göre 1 gün geciktiğini rapor etmişlerdir. Petrol üretim suyundan izole edilen ve Mn oksitleme yeteneği belirlenen *Bacillus zhangzhouensis* bakterisi ile yürütülen farklı bir çalışmada ise tez çalışmasındakine benzer şekilde, 2 ve 3 g/l Mn konsantrasyonlarının bakteriye toksik etki gösterdiği ve toksik olmayan konsantrasyonlarda da (0.15, 0.5 ve 1 g/l), artan Mn konsantrasyonunun bakterinin logaritmik faza girmesini geciktirdiği rapor edilmiştir (Ou-Yahia ve diğ., 2024). Bahsedilen çalışmalar ve tez çalışmasındaki MOB'lerin farklı Mn konsantrasyonlarına tolerans göstermeleri, bakteri cinslerinin ve izole edildikleri ortamların farklılığından kaynaklanabileceği gibi, araştırmalarda kullanılan besiyerlerinin farklılığından da kaynaklanabilir. Besiyeri içeriğindeki farklılıklar, aynı bakteri suşunun aynı Mn konsantrasyonlarında farklı büyüme davranışları sergilemesine yol açabilmektedir. Nitekim tez çalışmasında, yüksek Mn varlığında, bakterinin LBB besiyerindeki lag fazı süresi Mn Broth besiyerine göre belirgin şekilde daha uzun sürmüştür. Bununla birlikte deneyin ilerleyen günlerinde bakteri her iki ortamda da bu toksisite ile başa çıkarak, deney sonuna kadar büyümeye devam edebilmiştir. Nitekim, başta *Sphingomonas panacis* olmak üzere *Sphingomonas* cinsine ait çeşitli türlerin Mn'nin toksik etkisini tolere edebildiği (Singh ve diğ., 2015), dahası *Sphingomonadaceae* ailesinde yer alan *Sphingomonas* ve *Sphingopyxis* gibi cinslere ait MOB türlerinin, bulundukları ortamlardaki Mn'yi okside ederek biyojenik Mn oksitler (BMO) üretebildikleri ve bu BMO'ların arsenik gibi bazı ağır metallerin biyoremediasyon işlemlerinde potansiyel uygulamalara sahip olduğu literatürde yer almaktadır (Piazza ve diğ., 2019; Wang ve diğ., 2020; Yang ve diğ., 2021).

Besiyerleri, bakterinin MnO_x üretimi açısından değerlendirildiğinde, JETA1-E2 suşunun ilk MnO_x üretiminin her iki besiyeri için de 3. günde başladığı, deney süresince devam ettiği ve MnO_x üretim miktarının deney sonuna kadar artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, $p<0.01$ ve $p<0.01$). Dahası, JETA1-E2 suşunun 0.5 g/l ve 3 g/l Mn içeren Mn Broth ve LBB besiyerlerindeki kültürlerinde oluşan MnO_x miktarlarının deney süresince genel olarak benzer değerlerde olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, 1 g/l ve 2 g/l Mn konsantrasyonlarındaki MnO_x miktarlarında belirgin bir farklılık olduğu ve bu konsantrasyonlardaki Mn Broth besiyerindeki kültürde, LBB besiyerindeki kültüre göre, daha yoğun miktarda MnO_x oluştuğu belirlenmiştir (sırasıyla, $p<0.01$ ve $p<0.01$) (Şekil 4.20).

JETA1-E2 suşunun mangan oksidasyon aktivitesi sonucu MnO_x çökeltilerinin oluşumu ve miktarı, 7175-T7351 alüminyum kuponlarının korozyon mekanizmasının incelenmesi açısından önemli bir parametre olması sebebiyle, korozyon çalışmalarında, yoğun miktarda MnO_x oluşumunun tespit edildiği Mn Broth besiyerinin kullanılmasına karar verilmiştir. MnO_x üretimi açısından belirgin olarak diğer konsantrasyonlara göre daha verimli olan 1 ve 2 g/l Mn konsantrasyonları arasından bakterinin büyümesini en fazla teşvik eden 1g/l değeri seçilmiştir. Böylece, ilk gerçekleştirilen korozyon deneylerinde (deney düzeneği 1), deney ortamı olarak 1 g/l final Mn konsantrasyonuna sahip Mn Broth besiyeri kullanılmıştır.

Final Mn konsantrasyonu 1 g/l olan laboratuvar ölçekli düzenekte yapılan bakteriyolojik analizlerde, ilk örnekleme saatinde (0. gün) koloni sayımı ile belirlenen bakteri sayısının, ikinci örnekleme gününde (4. gün) belirgin şekilde düştüğü ve ilerleyen örnekleme günlerinde 60. güne kadar artış gösterse de, ilk örnekleme gününden daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum, 7175-T7351 alüminyum alaşımlarının varlığının JETA1-E2 suşunun büyümesini olumsuz etkilendiğine işaret etmektedir. Daha sonraki örnekleme zamanlarında kültürel bir yöntem olan koloni sayımı ile üreme gözlenmemiş, ancak EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarının artıp azalarak değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, final Mn konsantrasyonu 1 g/l olan deney ortamına, düzenek içerisindeki alüminyum kuponların korozyonu sonucu toksik Al iyonlarının da eklenmesinin, bakteri için stres kaynağı oluşturabileceğini ve bakterinin hayatta kalma stratejisi olarak da VBNC (Viable But Not Culturable = canlı ama kültüre edilemeyen) formuna geçmiş olabileceğini düşündürmüştür. VBNC formu, olumsuz çevresel koşullarına (pH, sıcaklık, toksik bileşiklerin varlığı vb.) maruz kalan bakterilerin hayatta kalma stratejisi olarak kabul edilmektedir. Bu forma giren bakteriler,

kültüre edilemeseler de metabolik aktivitelerine devam edebilmektedirler (Pinto ve diğ., 2013). Nitekim, deney düzeneğindeki bazı parametrelerin (MnO_x , Mn^{+2} ve pH değerleri) araştırılması sonucunda elde edilen veriler de, deney düzeneğinde JETA1-E2 suşunun metabolik faaliyetlerinin devam ettiğini destekler niteliktedir. Dahası, deney düzeneğinde JETA1-E2 suşuna maruz bırakılan kuponların ağırlık kaybı değerlerinin ve korozyon hızının, kontrol düzeneğindeki kuponlara göre anlamlı derecede yüksek olduğunun belirlenmesi (sırasıyla, $p<0.05$ ve $p<0.01$) ve hatta korozyon hızı oranının (deney/kontrol) deney sonunda, ilk örnekleme günü olan 4. gündeki orana göre 2 kat yüksek olduğunun belirlenmesi de, JETA1-E2 suşunun metabolik faaliyetlerinin bir başka göstergesidir.

Deney ve kontrol düzeneklerinden elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, final Mn konsantrasyonu 1 g/l olan düzenekler ile gerçekleştirilen deneyde, Mn okside eden JETA1-E2 suşunun çoğalabildiği ve Mn oksitleme aktivitesini gerçekleştirebildiği belirlenmiştir. Bununla birlikte hem büyüme yoğunluğunun hem de Mn oksitleme aktivitesinin, alüminyum kupon içermeyen ortamlarda gerçekleştirilen ön çalışmalarda sonuçlara kıyasla belirgin oranda düşük olması, bakterinin etkinliğini sınırlandırıcı faktörlerin varlığına işaret etmektedir. Bu durum, alüminyum kuponlardan kaynaklanabilir. Alüminyum kuponların, ilk örnekleme gününden itibaren korozyona uğradığı deney sonuçları ile net bir şekilde ortaya konulmaktadır. Bu doğrultuda, JETA1-E2 suşunun mikrobiyal etkinliğinin azalması, alüminyum kuponların korozyonu sonucu deney ortamına katılan Al iyonların, bakteriye inhibitör etki göstermesinden kaynaklanabilir. Nitekim kültürel yöntemler ile bakteri sayısının tespit edilememesi ve bakterinin VBNC fazında olabileceği ihtimali de bu hipotezi güçlendirmektedir. Bununla birlikte bu durum, gerçekleştirilen deney koşullarında JETA1-E2 suşunun mikrobiyal etkinliğinin az olmasından kaynaklı, mikrobiyal korozyonun dolayısıyla alüminyum kuponlardaki ağırlık kaybının daha düşük olarak tespit edilmiş olmasına yol açmış olabilir. Bu nedenle, Al'nin JETA1-E2 suşu üzerine toksik etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla, deney düzeneğinde kültür ve biyofilm ile kontrol düzeneğinde besiyeri ve film içeriğindeki Al konsantrasyonları ICP- MS analizi ile tespit edilmiştir. ICP-MS sonuçları doğrultusunda final konsantrasyonları 0.004 - 4 g/l aralığındaki Al ve final konsantrasyonları 0, 0.5, 1 ve 2 g/l Mn ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) deneyleri gerçekleştirilmiştir. Böylece bu iyonların JETA1-E2 suşunun büyümesine etkisi araştırılmıştır.

MİK deneylerinden elde edilen veriler, kuponlardan çözünen Al'nin JETA1-E2 suşu üzerinde tek başına toksik bir etkisinin olmadığını ortaya koyarken, Al ve Mn'nin bir arada olması ile belirgin bir antibakteriyel etkinin olduğu tespit edilmiştir. Dahası, Mn konsantrasyonu arttıkça, antibakteriyel etkinin de arttığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, 1 ve 2 g/l Mn konsantrasyonlarının tercih edileceği düzeneklerde, kuponlardan çözünecek Al'nin de etkisi ile JETA1-E2 suşunun korozyon etkisinin araştırılmasının mümkün olamayacağını açıkça ortaya koymuştur. Bu nedenle, deney düzeneğinde deney ortamı olarak final Mn konsantrasyonu 0.5 g/l olan Mn Broth besiyerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Final Mn konsantrasyonu 0.5 g/l olan laboratuvar ölçekli düzenekte (deney düzeneği 2) gerçekleştirilen deneylerde, deneyin ilk örnekleme gününden itibaren kuponların yüzeyinde gözle görülebilen, ince ve yüzeyden kolayca alınabilen bir biyofilm tabakası olduğu, deneyin ilerleyen sürecinde ise kuponların yüzeyinde kahverengi birikintiler ve tüberkül oluşumu gözlemlenmiştir. Deney düzeneğindeki bakteri sayıları değerlendirildiğinde, JETA1-E2 suşuna ait planktonik bakteri sayısının, her örnekleme gününde, sesil bakteri sayısından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). Literatürde bu bulguya benzer şekilde planktonik bakterilerin sesil olanların sayısından yüksek olduğu rapor edilen çalışmalar bulunmaktadır (Ilhan-Sungur ve diğ., 2007; Arkan ve diğ., 2016). Bununla birlikte literatürde, bu durumun tersi olan (Singh ve diğ., 2011) veya iki formun sayılarının birbirine yakın (Lata ve diğ., 2012) olarak rapor edildiği çalışmalar da bulunmaktadır. Bu farklılığın sebebi, çalışılan bakteri türü, deney koşulları ve üzerinde biyofilmin olduğu malzeme tipindeki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Deney ve kontrol düzeneklerindeki MnO_x ölçümleri LBB kolorimetrik boyası ile yapılmıştır. Deney düzeneğinde hem kültürden hem de kültüre maruz bırakılan kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasından ölçümler yapıldığında, kültürdeki MnO_x oranının biyofilmdekinden belirgin şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kültürdeki MnO_x miktarının sürekli artıp azalarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bunun sebebi üretilen MnO_x tipinin çözülebilir bir oksit tipi olması ve bakteri tarafından çözülmüş formdaki Mn'nin tekrar okside edilmiş olması olabilir (Zhou ve Fu, 2020). JETA1-E2 suşunun 6. günden itibaren MnO_x üretmeye başladığı ve deney süresince kültürdeki MnO_x miktarının steril Mn Broth besiyerinde tespit edilenden daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Dahası, yüksek miktardaki MnO_x miktarının, steril ortamda 60. günden, bakteri varlığında ise 13. günden itibaren ölçülmüş olması, bakterinin MnO_x üretim sürecini hızlandırdığının bir göstergesidir.

Nitekim Zhang ve diğ. (2015), toprak kaynaklı bir MOB olan *Escherichia coli* bakterisindeki MCO enziminin, hücre yüzeyinde Mn(II) oksidasyonunu katalize ederek Mn(III) ve Mn(IV) oksitlerin oluşumuna yol açmasındaki rolünü araştırdıkları 14 günlük çalışmalarında, bakteri varlığında MnO_x üretim oranının kültürün ilk 5 günü boyunca istikrarlı bir şekilde arttığı ve deney boyunca da yüksek seviyelerde kaldığını rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, *Proteobacteria*'nın α -4 alt grubunda ve *Erythrobacter* cinsinin üyeleriyle yakından ilişkili olan bir MOB suşunun izolasyon, karakterizasyon ve Mn(II) oksidasyonunun araştırılan Francis ve diğ. (2001) ise 7 gün süresince bakterinin MnO_x üretimini takip etmiş ve gözle görülür kahverengi MnO_x çökeltilerinin genellikle 3-4 günlük büyümenin ardından durağan fazın başlangıcında meydana geldiğini ve Mn(II)'nin kendisinin veya oksidasyonunun suşun genel büyüme verimini arttırdığını rapor etmişlerdir. Her iki çalışma da, bakterinin ilk MnO_x üretimi ve büyüme ile ilişkisi hakkında bulgular rapor etmiş olmasına rağmen, bakterilerin varlığında MnO_x üretim hızının nasıl değiştiğini yorumlayabilmek söz konusu değildir.

Deney süresince, deney ve kontrol düzeneklerindeki ortamların Mn⁺² miktarlarının değişiklik gösterdiği ve kontrol düzeneğindeki değerlerin deney düzeneğindeki kilerden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum mangan okside etme yeteneğindeki JETA1-E2 suşunun, metabolik aktivitesini sürdürebilmek için ortamdaki serbest Mn⁺² iyonlarını kullandığının bir göstergesi olabilir. Üstelik bakteri kültüründeki MnO_x miktarının steril Mn Broth besiyerinde tespit edilenden daha fazla olması ($p < 0.05$) da bu durumu desteklemekte, hatta bakterinin varlığının MnO_x üretim sürecini hızlandığını da ortaya koymaktadır. Nitekim MOB'ler, oksijenin de yardımı ile suda serbest halde bulunan Mn⁺² iyonlarını, MnO₂ ve ilgili bileşiklere okside ederler (Lewandowski ve Beyenal, 2009; Little ve Lee, 2007; Linhardt, 2010). MOB'ler varlığında, oksijen aracılı gerçekleşen oksidasyon oranından birkaç kat yüksek oksidasyon oranına sahip MOB aracılı oksidasyon daha hakim olmaktadır (Cai ve diğ., 2023).

Deney düzeneğindeki 7175-T7351 alüminyum kuponların ağırlık kaybı değerlerinin zamanla arttığı ($r = 0.970$, $p < 0.01$) ve ağırlık kaybı artıkça da korozyon hızının arttığı belirlenmiştir ($r = 0.883$, $p < 0.01$). Deney süresince korozyon hızının ise 25. güne kadar azaldığı, sonrasında ise deney sonuna kadar artarak 80. günde 21.78 ± 2.02 $\mu\text{m/y}$ değerine ulaştığı tespit edilmiştir. Çalışmadaki korozyon hızı hesabının, ağırlık kaybı yöntemine göre gerçekleştirilmesi nedeniyle kuponlardaki korozyon, birim zamandaki korozyon hızından yararlanılarak

değerlendirilmiştir. Ağırlık kaybında gözlenmeyen ama korozyon hızında gözlenen bu değişikliğin sebebi de bu durumdur.

Deney düzeneğindeki kuponların ağırlık kayıplarının ve korozyon hızlarının deney süresince kontrol düzeneğindikilerden daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup, korozyon hızı verileri açısından bu farkın anlamlı olduğu ($p<0.01$) ve deney sonunda kontrol düzeneğinden 2.15 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Gravimetrik analiz çalışmaları sonucunda, JETA1-E2 suşunun 7175-T7351 alüminyum alaşımını korozyona uğrattığı tespit edilmiştir.

Deneyin ilk 6 günlük sürecinde ağırlık kaybının, deney ve kontrol düzeneklerindeki kuponlarda aynı miktarda gerçekleştiği tespit edilirken, bakteri kültürünün 6. günde MnO_x üretim aktivitesinin başlaması ile birlikte ağırlık kaybının da kontrole göre artması ve deney süresince de daha yüksek değerlerde olması, 7175-T7351 alüminyum alaşımının mikrobiyolojik korozyonunda JETA1-E2 suşunun Mn oksidasyon aktivitesinin ve bu aktivite sonucunda üretilen MnO_x 'lerin rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim, MOB'lerin çözünmüş $Mn(II)$ 'yi metal yüzeylerde biriken çözünmez Mn oksitlere dönüştürebildiği ve bu birikintilerin yerel ortamı değiştirerek, metal üzerinde çukur oluşumu için koşullar yaratabildiği rapor edilmiştir (Palanichamy ve diğ., 2002). 1990'lı yıllardan beri, MOB'lerin metallerin MIC'i üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Genellikle paslanmaz çelik ve karbon çelik ile gerçekleştirilen bu çalışmalarda, MOB varlığın metalin korozyon potansiyelinde kayda değer bir artışın olduğu ve metal üzerinde MnO_x 'lerin biriktiği rapor edilmiştir (Linhardt, 1994; Dickinson ve diğ., 1997; Olesen ve diğ., 2000; Ashassi-Sorkhabi ve diğ., 2002). Bu bakterilerin aktif metabolizmalarının bir sonucu olarak yüzeyde biriken MnO_x 'lerin, diferansiyel havalandırma hücrelerinin oluşumuna neden olarak, mikrobiyolojik korozyondan sorumlu SRB'lerin ve diğer anaeroplara çoğalmasını teşvik ettiği de rapor edilmiştir (Wiatr, 2008; Dickinson ve Wiatr, 2013). MOB ve SRB aktivitesinin kombinasyonu ise çeşitli ortamlarda metal korozyonunu önemli ölçüde hızlandırabilmektedir. Literatürde yer alan bu bilgilerin yanı sıra, bir MOB suşunun 7175-T7351 alüminyum alaşımının mikrobiyolojik korozyonundaki etkisi ilk kez bu tez çalışması ile rapor edilmektedir.

JETA1-E2 suşunun, 7175-T7351 alüminyum alaşımına MIC etkisi gravimetrik analizin yanı sıra, görüntüleme ve karakterizasyon analizleri ile de değerlendirilmiştir. 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların yüzeyinden gerçekleştirilen EDS analizleri, alaşımın yapısında bulunan çökeltilerin yoğunlukla Al, Zn, Mg ve Cu elementlerinden oluştuğunu ortaya

koymuştur (Şekil 3.4 ve Şekil 4.40a). Literatürde ikinci faz olarak geçen bu çökelti alüminyum matrisine kimyasal olarak heterojendirler ve çukur korozyonuna karşı duyarlılığı artırma eğilimindedirler (Piotrowski, 1994; Ilevbare ve diğ., 2004). Korozyon çukurları ya ikinci fazın kendisindeki çözünme ya da yakınındaki matrisin çözünmesi ile oluşmaktadır ve olası senaryo fazların elementel kompozisyonuna göre değişmektedir. Tez çalışmasındaki EDS bulgularına benzer şekilde, Mg, Zn ve Si içeren faz genellikle Al matrisinden daha yüksek elektrokimyasal aktiviteye sahiptir ve korozyon genellikle ikinci fazın kendisinin çözünmesiyle başlamaktadır (Chen ve diğ., 2021).

Deneyin ilerleyen zamanlarında, alaşım yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasında kahverengi birikintilerin yanı sıra, yüzeyde kahverengi bir tüberkülün oluştuğu ve tüberkül kaldırıldığında ise tüberkülün altında oyuk meydana geldiği gözlemlenmiştir. EDS analizleri, kuponların yüzeylerinde oluşan korozyon ürünlerinin O ve Al elementlerine ek olarak genellikle Zn, Mg, Cu, Mn ve Si elementleri içerdiğini göstermiştir. Yüzeyde oluşan tüberkülün ise O, Al ve C yanı sıra, düşük miktarlarda Zn, Mn ve Si elementleri içerdiği tespit edilmiştir. Tüberkülde C'nun tespit edilmiş olması, canlıya veya onun sentezlediği bir ürüne işaret edebilir (Martinez ve diğ., 2022). Bununla birlikte, detaylı ve tekrarlı yapılan SEM analizlerinde, tüberkülün hiçbir noktasında bakteriye rastlanılmamıştır. Bu durum, C'nun besiyerinden gelmiş olabileceğine işaret edebilir. Nitekim kontrol düzeneğindeki kuponların yüzeyinde oluşan film tabakasında da C tespit edilmiştir. Bununla birlikte, tüberkülün besiyeri ile direkt temasta olmayan iç kısmında da C'nun tespit edilmiş olması, canlılık aktivitesinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Dahası tüberkülün içeriden büyüdüğüne de işaret etmektedir.

Tüberkülün altında çukurcuk korozyonunun gerçekleşmiş olması, bakteri tarafından üretilen MnO_2 ile bakterinin tutunduğu ve biyofilmin geliştiği çökeltinin (Al, Zn, Mg ve Cu elementlerinden oluşan) birlikte galvanik çift oluşturmuş olabileceğine işaret etmektedir. Bu durumda tüberkülün oluştuğu alanda, yüzeydeki biyofilm içerisindeki MnO_2 katot olarak davranırken, bu çökelti anot olarak davranmış ve korozyon bu bölgeden başlamış olabilir. Bu mekanizma, Linhardt (2004, 2010)'ın önerdiği MOB kaynaklı korozyon mekanizmasından tamamen farklılık göstermektedir. Bu tez çalışması ile Linhardt (2004, 2010)'ın paslanmaz çelikte MOB ile gerçekleştirdiği çalışmanın bir sonucu olarak ortaya koyduğu mekanizmadan farklı bir mekanizma ortaya konulmuş olması, çalışmada alüminyum alaşımı kullanılmasından

ve metallerin birbirinden tamamen farklı özelliklerde olmalarından kaynaklanmış olabileceği gibi MOB türlerindeki farklılıktan da kaynaklanıyor olabilir.

Çukurcuğun ağız kısmında oluşan tüberkül, çukurcuk içindeki çözeltinin seyrelmesini önleyerek çukurcuk içinde korozyonu güçlendirici etkilere yol açabilir. Bununla birlikte, çukurcuk içindeki korozyonun başlaması ve ilerlemesi otokatalitik olarak yürütülür ve çukurcuğun içi ayrı bir durum olarak değerlendirilir (Doruk, 2014). Tüberkülün altında oluşan oyuğun çok sayıda katman içerdiği, korozyon ürünleri ve yoğun miktardaki bakterilerin her katmanda iç içe olduğu gözlenmiştir. Oyuğun farklı katmanlarından yapılan EDS analizleri ile korozyon ürünlerinin yüksek miktarlarda O ve Al'nin yanı sıra Cu, daha düşük miktarlarda ise Zn ve Mg içerdiği saptanmıştır. Çukurcuğun içerisindeki yoğun Cu elementinin tespiti Cu'nun çözünmesi ile ilgili iki farklı olasılığı gündeme getirmiştir. Birinci olasılıkta, bakteri süreçte doğrudan rol oynayarak, Mn(II) oksidasyonu için gerekli olan MCO enziminin sentezi için ihtiyaç duyduğu Cu'yu salgıladığı hücre dışı enzimler aracılığıyla metalden sağlamış olabilir. Nitekim, MCO enzimi ile Mn(II) oksidasyonu gerçekleştiren mikroorganizmalarda, Cu iyonlarının gerekli olduğu ortaya konmuştur (van Waasbergen ve diğ., 1996, Larsen ve diğ., 1999, Brouwers ve diğ., 2000). Çok çeşitli bir enzim ailesi olan MCO'lar, çeşitli organik ve inorganik substratları oksitlemek için kofaktör olarak birden fazla Cu iyon türünü kullanmaktadır (Solomon ve diğ.,1996). Dahası, Larsen ve diğ. (1999) çalışmalarında Cu iyonlarının ortama eklendiği durumlarda, Mn oksidasyonunun arttığını ve bu ilişkinin Cu iyon konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. İkinci olasılıkta ise bakteri tarafından oluşturulan MnO_2 'nin elektron potansiyelinin Cu'nunkinden yüksek olması, Cu'nun anodik davranarak çözünmesine neden olmuş olabilir. Ya da her iki olasılık da beraber gerçekleşmiş olabilir. Dahası, Cu-zengin bölgeler katodik bölgelerdir (Meng ve Frankel, 2004) ve çukurcuk bölgesinde tabaka şeklinde oluşan korozyon ürünlerinde Cu'nun varlığı, ilave katodik alanların ortaya çıkmasına yol açarak korozyon sürecini hızlandırmış olabilir.

XPS analizinden elde edilen sonuçlar, bakterili ve steril ortamlara maruz bırakılan 7175-T7351 alüminyum alaşımlı kuponların yüzeylerindeki korozyon ürünlerinin farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. MnO_2 , Mn_2O_3 ve Mn_3O_4 bileşikleri sadece bakterili ortamda tespit edilmişlerdir ve literatürde rapor edilen biyogenik MnOx'ler arasında yer almaktadırlar (Zhou ve Fu, 2020). Tespit edilen oksitli Mn bileşikleri, JETA1-E2 suşunun bulunduğu düzenekte Mn oksidasyonunu gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda ulaşılan sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

1. Jet A-1 tip uçak yakıtından, mangan okside etme yeteneğinde bir bakteri izole edilmiş ve *Sphingomonadaceae* ailesi içerisinde yeni bir cins ve tür olduğu belirlenmiştir.
2. Bu tez çalışması ile uçak yakıtı jet A-1'den izole edilen *Sphingomonadaceae* ailesi içerisindeki bir bakterinin, mangan okside etme yeteneğine sahip olduğu ilk kez rapor edilmiştir.
3. JETA1-E2 suşunun varlığında MnO_x üretimi, bakterisiz ortama göre daha hızlı gerçekleşmektedir.
4. Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri içerisinde, JETA1-E2 suşu en yoğun büyümeyi LBB besiyerinde gerçekleştirirken, en yüksek MnO_x üretimini ise Mn Broth besiyerinde yapmaktadır. Bu nedenle, MOB'lerin büyümesinin ve Mn oksitleme yeteneklerinin incelendiği çalışmalarda birden fazla MOB spesifik besiyerinin kullanılması önerilmektedir.
5. Tez deneylerindeki gibi laboratuvar ölçekli sistemlerde toksik ağır metal içeren metalik alaşımlı malzemeler ile yürütülecek korozyon deneyleri için deney koşulları belirlenirken, büyüme ve aktiviteye yönelik ön çalışmaların hem kuponsuz hem de kupon varlığında gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Böylece, kuponların korozyonu sonucu ortama salınabilecek metal iyonların toksik etkisi MIC deneyleri öncesinde belirlenebilir.
6. Mangan okside eden JETA1-E2 suşu, 7175-T7351 alüminyum alaşımını mikrobiyolojik olarak korozyona uğratmaktadır.
7. MOB'un 7175 serisi bir alüminyum alaşımında neden olduğu MIC mekanizması, literatürde MOB'ler için önerilen mekanizmalardan farklılıklar gösteren yeni bir korozyon mekanizmasıdır.
8. MIC'in en doğru şekilde değerlendirilebilmesi için gravimetrik, yüzey görüntüleme ve karakterizasyon analizlerinin birlikte yapılması önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdolahi, A., Hamzah, E., Ibrahim, Z. and Hashim, S., 2015, Localised corrosion of mild steel in presence of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *Corrosion Engineering, Science and Technology*, 50(7), 538–546.
- Achtman, M. and Wagner, M., 2008, Microbial diversity and the genetic nature of microbial species., *Nature reviews microbiology*, 6(6), 431-440.
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V. and Polz, M.F., 2004, Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rRNA operons, *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2629-2635.
- Aktas, D. F., Sorrell, K. R., Duncan, K. E., Wawrik, B., Callaghan, A. V. and Suflita, J. M., 2017, Anaerobic hydrocarbon biodegradation and biocorrosion of carbon steel in marine environments: the impact of different ultra low sulfur diesels and bioaugmentation, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 118, 45-56.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Archibald, A. R. and Baddiley, J., 1967, *The teichoic acids*, *Advances in carbohydrate chemistry*, 21, 323-375.
- Arkan, S., Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., 2016, Corrosive Metabolic Activity of *Desulfovibrio* sp. on 316L Stainless Steel, *Journal of Material Engineering and Performance*.
- Arun, D., Vimala, R. and Devendranath Ramkumar, K., 2020, Investigating the microbial-influenced corrosion of UNS S32750 stainlesssteel base alloy and weld seams by biofilm-forming marine bacterium *Macroccoccus equipericus*, *Bioelectrochemistry*, 135, 107546.
- Ashassi-Sorkhabi, H., Moradi-Haghighi, M. and Zarrini, G., 2012, The effect of *Pseudoxanthomonas* sp. as manganese oxidizing bacterium on the corrosion behavior of carbon steel, *Materials Science and Engineering: C*, 32(2), 303-309.
- ASTM-G1-03., 2017, *Standard practice for preparing, cleaning, and evaluating corrosion test specimens*, ASTM: West Conshohocken, PA.
- ASTM G46 – 94, 2018, *Standard guide for examination and evaluation of pitting corrosion*.
- Auch, A.F., Klenk, H.P. and Göker, M., 2010, Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Standards in Genomic Science* 2, 142–148.

- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Bonaventura, G.D., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O. and Sternberg, C., 2017, Critical review on biofilm methods, *Critical Review in Microbiology*, 43(3), 313-351.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, S. A., Lesin, M. V., Nikolenko, I. S., Pham, S., Prjibelski, D. A., Pyshkin, V. A., Sirotkin, V. A., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, A. M. and Pevzner, A. P., 2012, SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19, 455-477.
- Barton, L.L. and Hamilton, W.A., 2007, *Sulphate-reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*, Cambridge University Press, New York.
- Basera, P., Lavania, M. and Lal, B., 2019, Potential of dynamic bacterial communities in the bio-corrosion process: a proof study with surface morphology of metal coupons, *RSC Advances*, 9, 17040–50.
- Beale, D.J., Karpe, A.V., Jadhav, S., Muster, T.H. and Palombo, E.A., 2016, Omics-based approaches and their use in the assessment of microbial-influenced corrosion of metals, *Corrosion Reviews*, 34, 1-15.
- Beech, I.B. and Sunner, J., 2004, Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals, *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 181-186.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Wheeler, D.L., 2005, GenBank, *Nucleic Acids Research*, 33, 34-38.
- Beveridge, T.J., 1989, Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, *Annual Review of Microbiology*, 43, 147-171.
- Bonifay, V., Wawrik, B., Sunner, J., Snodgrass, C.E., Aydın, E., Duncan, E.K., Callaghan, V.A., Oldham, A., Liengen, T. and Beech, I., 2017, Metabolomic and metagenomic analysis of two crude oil production pipelines experiencing differential rates of corrosion, *Frontiers in Microbiology*, 8, 99.
- Bono, N., Pennetta, C., Bellucci, M.C., Sganappa, A., Malloggi, C., Tedeschi, G., Candiani, G. and Volonterio, A., 2019, Role of Generation on Successful DNA Delivery of PAMAM-(Guanidino)Neomycin Conjugates, *ACS Omega*, 4(4), 6796-6807.
- Boțilă, L.N., 2020, *Considerations regarding aluminum alloys used in the aeronautic/aerospace industry and use of wire arc additive manufacturing WAAM for their industrial applications*, *Welding Material Testing, Test 4*, 1-16.
- Bremer, P.J. and Geesey, G.G., 1991, Laboratory-based model of microbiologically induced corrosion of copper, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1956– 1962.

- Brouwers, G.J., Corstjens, P.L.A.M., de Vrind J.P.M, Verkamman A, de Kuyper M, de Vrind-de Jong EW. 2000. Stimulation of Mn^{2+} oxidation in *Leptothrix discophora* SS-1 by Cu^{2+} and sequence analysis of the region flanking the gene encoding putative multicopper oxidase MofA. *Geomicrobiology Journal*, 17:25–33
- Brouwers, G.J., de Vrind J.P.M., Corstjens, P., Cornelis, P., Baysse, C., DeJong, E., 1999, cumA, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn^{2+} oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1762–1768.
- Busse, J. and Auling, G., 1988, Polyamine Pattern as a Chemotaxonomic Marker within the Proteobacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, 11, 1-8.
- Busse, H.J., Kämpfer, P. and Denner, E.B.M., 1999, Chemotaxonomic characterisation of *Sphingomonas*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(4-5), 242-251.
- Cai, Y., Yang, K., Qiu, C., Bi, Y., Tian, B. and Bi, X., 2023, A review of manganese-oxidizing bacteria (MnOB): Applications, future concerns, and challenges, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(2), 1272.
- Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G. and Roques, C., 2002, Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1469-1474.
- Camacho, C., Coulouris, G, Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, L.T., 2009, BLAST+: architecture and applications, *BMC Bioinformatics*, 10, 421.
- Carteni-Farina, M., Porcelli, M., Cacciapuoti, G., De Rosa, M., Gambacorta, A., Grant, W.D. and Ross, H.N.M., 1985, Polyamines in halophilic archaeobacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 323-327.
- Cerrato, J.M., Falkinham, J.O., Dietrich, A.M., Knocke, W.R., McKinney, C.W. and Pruden, A., 2010, Manganese-oxidizing and -reducing microorganisms isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems, *Water Research*, 44(13), 3935-3945.
- Cavazos, A. R. and Glass, J. B., 2020, Simul-staining manganese oxides and microbial cells, *Limnology and Oceanography: Methods*, 18(7), 362-373.
- Chen, S.Y., Huang, C.Y. and Lin, C.S., 2021. Microstructure inhomogeneity of the constituent particles of 7075-T6 aluminum alloy after alkaline cleaning and desmutting. *Corrosion Science*, 184, 109354.
- Chen, S.Y., Huang, C.Y. and Lin, C.S., 2021. Microstructure inhomogeneity of the constituent particles of 7075-T6 aluminum alloy after alkaline cleaning and desmutting. *Corrosion Science*, 184, 109354.
- Chen, C., Zheng, Q., Wang, Y. N., Yan, X. J., Hao, L. K., Du, X. and Jiao, N., 2010, *Stakelama pacifica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Sphingomonadaceae* isolated from the Pacific Ocean, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2857-2861.

- Christopher, J., Perry, I.V., Thomas, D., Ryan, L., Ktisen, B., James, D. and Ralph, M., 2005, Corrosion of Aluminum Alloy 2024 by Microorganisms Isolated from Aircraft Fuel Tanks, *Biofouling*, 21, 257-265.
- Chu, S., Zhang, D., Wang, D., Zhi, Y. and Zhou, P., 2017, Heterologous expression and biochemical characterization of assimilatory nitrate and nitrite reductase reveals adaption and potential of *Bacillus megaterium* NCT-2 in secondary salinization soil, *International journal of biological macromolecules*, 101, 1019-1028.
- Chun, J. and Rainey, F.A., 2014, Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_2), 316-324.
- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B. and Bork, P., 2006, Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life, *Science*, 311, 1283-1287.
- Clarridge, J.E., 2004, Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of 507 bacteria on clinical microbiology and infectious diseases, *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 840-862.
- Cojocaru, A., Prioteasa, P., Szatmari, I., Radu, E., Udrea, O. and Visan, T., 2016, EIS study on biocorrosion of some steels and copper in Czapek Dox medium containing *Aspergillus niger* fungus, *Revista de Chimie*, 67, 1264-1270.
- Collins, M.D., 1994, *Isoprenoid quinones*. Modern Microbial Methods, Chemical Methods in Prokaryotic Systematics, In: Goodfellow, M. and O'Donnel, A.G. (eds.), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom, 265-311.
- Collins, M.D. and Jones D., 1981, Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication, *Microbiological Reviews*, 45(2), 316-354.
- Colomban, P., 2011, *Potential and drawbacks of Raman (Micro)spectrometry for the understanding of iron and steel corrosion*. New Trends and Developments in Automotive System Engineering, In: Marcello C. (ed.), Rijeka, Rijeka.
- Costas, M. 1992, *Classification, identification and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns*, *Advances in electrophoresis*, 5, 351-408.
- Costas, M., On, S.L.W., Owen, R.J., Lopez-Urquijo, B. and Lastovica, A.J., 1993, Differentiation of *Helicobacter* Species by Numerical Analysis of their One-Dimensional Electrophoretic Protein Patterns, *Systematic and Applied Microbiology*, 396-404.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G., 1994, Biofilms, the customized microniche, *Journal of bacteriology*, 176(8), 2137.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M., 1995, Microbial biofilms, *Annual Review of Microbiology*. 49, 711-745.

- Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, G.K., 1978, How bacteria stick, *Scientific American*, 238, 86-95.
- Cragolino, G.A., 2020, *Corrosion Fundamentals and characterization techniques*, In: Techniques for Corrosion Monitoring, In: Yang, L. (ed.), Woodhead Publishing Series in Metals and Surface Engineering, Elsevier, UK.
- Çotuk, A., Anđ-Küçüker, M., 1995, Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Çotuk, A., İlhan-Sungur, E., 2014, Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Dai, X., Wang, H., Ju, L. K., Cheng, G., Cong, H. and Newby, B. M. Z., 2016, Corrosion of aluminum alloy 2024 caused by *Aspergillus niger*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 115, 1-10.
- Dang, Y.T.H., Power, A., Cozzolino, D., Dinh, K.B., Ha, S.B., Kolobaric, A., Vongsivut, J., Truong K.V. and Chapman, J., 2022, Analytical characterisation of material corrosion by biofilms, *Journal of Bio- and Tribo- Corrosion*, 8, 50.
- De Bruyn, E., 1992, *Microbial ecology of sulphide-producing bacteria in water cooling systems*, Thesis (PhD), University of Pretoria.
- Denaro, T.R., Chelgen, S.K., Lang, M.J.G. and Strobel, E.M., 2005, *DNA Isolation of Microbial Contaminants in Aviation Turbine Fuel via Traditional Polymerase Chain Reaction (PCR) and Direct PCR Preliminary Results*, Air Force Research Laboratory, University of Dayton Research Institute.
- De Weger, L.A., Jann, B., Jann, K. and Lugtenberg, B., 1987, Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification, *Journal of Bacteriology*, 169(4), 1441-1446.
- Denaro, T.R., Chelgen, S.K., Lang, M.J.G. and Strobel, E.M. 2005, *DNA Isolation of Microbial Contaminants in Aviation Turbine Fuel via Traditional Polymerase Chain Reaction (PCR) and Direct PCR, Preliminary Results*, Air Force Research Laboratory, University of Dayton Research Institute.
- Dickinson, W. H., Caccavo, F., Olesen, B. and Lewandowski, Z., 1997, Ennoblement of Stainless Steel by the Manganese-Depositing Bacterium *Leptothrix discophora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2502-2506.
- Dickinson, W.H. and Lewandowski, Z., 1996, Manganese biofouling and the corrosion behavior of stainless steel, *Biofouling*, 10(1-3), 79-93.
- Dickinson, W.H. and Wiatr, C.L., 2013, Manganese Related Corrosion and Fouling In Water Systems, *The Analyst*, 20, 1-30.

- Divekar, M., 2010, *Isolation and characterization of a manganese oxidizing bacterium from the Mediterranean marine sponge Suberites domuncula*, PhD Thesis, der Johannes Gutenberg-Universität.
- Dockens, K., Demeter, M., Johnston, S. and Leong, S., 2017, Comparison of planktonic and sessile bacteria counts using ATP and DNA based methods, *CORROSION 2017*, (All Days).
- Dong, Y., Jiang, B., Xu, D., Jiang, C., Li, Q. and Gu, T., 2018, Severe microbiologically influenced corrosion of S32654 super austenitic stainless steel by acid producing bacterium *Acidithiobacillus caldus* SM-1. *Bioelectrochemistry*, 123, 34-44.
- Dong, Y., Lekbach, Y., Li, Z., Xu, D., El Abed, S., Koraichi, S. I. and Wang, F., 2020, Microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel caused by an alga associated bacterium *Halomonas titanicae*, *Journal of Materials Science & Technology*, 37, 200-206.
- Donlan, R. M., 2001, Biofilms and device-associated infections, *Emerging infectious diseases*, 7(2), 277.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W., 2002, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Doruk, M., 2014, *Metalik Malzemeler ve Korozyon*, Türkiye Korozyon Derneği, Ankara.
- Dou, W., Pu, Y., Han, X., Song, Y., Chen, S. and Gu, T., 2020, Corrosion of Cu by a sulfate reducing bacterium in anaerobic vials with different headspace volumes, *Bioelectrochemistry*, 133, 107478.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Dupree, E.J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B.A. and Darie, C.C., 2020, A critical review of bottomup proteomics: the good, the bad, and the future of this field, *Proteomes*, 8, 14.
- Dursun, T. and Soutis, C., 2014, Recent developments in advanced aircraft aluminium alloys, *Materials and Design*, 56, 862–871.
- Edwards, T., 2003, Liquid Fuels and Propellants for Aerospace Propulsion: 1903 – 2003, *Journal of Propulsion and Power*, 19(6), 1089-1107.
- Eckert, R.B. and Skovhus, T.L., 2022, *Failure Analysis of Microbiologically Influenced Corrosion*. Boca Raton, FL: CRC Press
- Elzinga, E.J., 2011, Reductive transformation of birnessite by aqueous Mn(II), *Environmental Science and Technology*, 45: 6366-6372.

- Embley, T. M. and Wait, R., 1994, *Structural lipids of eubacteria*, Modern Microbial Methods. Chemical Methods in Prokaryotic Systematics, In: Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. (eds.), John Wiley & Sons Chichester, England, 121–163.
- Emerson, D. and Moyer, C., 1997, Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH, *Applied and environmental microbiology*, 63(12), 4784-4792.
- Fanning, S. and Mitchell, A. P., 2012, Fungal biofilms, *PLoS pathogens*, 8(4), 1–4.
- Farris, J.S., 1972, Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *American Naturalist*, 106, 645-667.
- Féron, D., Compère, C., Dupont, I. and Magot, M., 2002, *Biodétérioration des matériaux métalliques ou biocorrosion*, Corrosion des métaux et alliages, In: Béranger, G., et Mazille H (eds.), Lavoisier, Paris, 385-405.
- Fischer, W., Rösel, P. and Koch, H.U., 1981, Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Bacteriology*, 146(2), 467-475.
- Fischer, W., Koch, H.U. and Haas, R., 1983, Improved preparation of lipoteichoic acids, *European Journal of Biochemistry*, 133(3), 523-530.
- Fischer W, Koch HU, Rösel P, Fiedler F. 1980, Alanine ester-containing native lipoteichoic acids do not act as lipoteichoic acid carrier, Isolation, structural and functional characterization, *Journal of Biological Chemistry*, 255(10), 4557-4562
- Flemming, H.C., 2011, The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 251-259.
- Flemming, H.C., 1996, *Biofouling and microbiologically influenced corrosion (MIC)- an economical and technical overview*, Microbial Deterioration of Materials, In: Heitz, E., Sand, W., Flemming, H.C. (eds.), Springer, Heidelberg, ISBN: 3-527-28624-1, 514.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A. and Kjelleberg, S., 2016, Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life, *Nature Review Microbiology*, 14, 563-575.
- Ford, T. and Mitchell, R., 1990, The ecology of microbial corrosion, *Advances in Microbial Ecology*, 11, 231-262.
- Fournier, P.E. and Raoult, D., 2009, Current Knowledge on Phylogeny and Taxonomy of *Rickettsia* spp, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1166, 1-11.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, P. Jr., 1992, How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1), 166-170.

- Francis, C.A. and Tebo, B.M., 2001, Diversity of *cumA* multicopper oxidase genes from Mn(II)- oxidizing and non-oxidizing *Pseudomonas* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4272-4278.
- Forte Giacobone, A.F., Rodriguez, S.A., Burkart, A.L. and Pizarro, R.A., 2011, Microbiological induced corrosion of AA 6061 nuclear alloy in highly diluted media by *Bacillus cereus* RE 10. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65, 1161–1168.
- Fytianos, G., Tziolas, E., Papastergiadis, E. and Samaras, P., 2020, Least Cost Analysis for Biocorrosion Mitigation Strategies in Concrete Sewers, *Sustainability*, 12(11), 4578.
- Gaines, H.A., 1910, Bacterial activity as a corrosion induced in the soil, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2, 128–130.
- Gagnon, G.A. and Slawson, R.M., 1999, An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *Journal of Microbiological Methods*, 34, 203-214.
- Gándara, B., Merino, A.L., Rogel, M.A. and Martínez-Romero, E., 2001, Limited genetic diversity of *Brucella* spp, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 235-240.
- Gaylarde, C. C., Bento, F. M. and Kelley, J., 1999, Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control, *Revista de Microbiologia*, 30, 01-10.
- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C. and Sbhatu, D. B., 2019, Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms, *Heliyon*, 5(8).
- Geçkinli, E., 2002, Alüminyum Alaşımlarının Isıl işlemi, 2. *Isıl işlem Sempozyumu*, 07- 08 Şubat 2002, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Geiser, M., Avci, R. and Lewandowski, Z., 2001, Pit Initiation on 316L Stainless Steel in the Presence of Bacteria *Leptothrix discophora*, 2001 NACE CORROSION Conference Proceedings, 11-16 March 2001, Houston, Texas.
- Ghiorse, W.C. and Hirsch, P., 1979., An ultrastructural study of iron manganese deposition associated with extracellular polymers of *Pedomicrobium*-like bacteria, *Archives of Microbiology*, 123, 213-226.
- Gieg, L. M., Jack, T. R. and Foght, J. M., 2011, Biological souring and mitigation in oil reservoirs, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 263-282.
- Glaeser, S. P. and Kämpfer, P., 2014, The family *Sphingomonadaceae*, *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 641-707.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P. and Tiedje, J.M., 2007, DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 81-91.

- Gósi, P., Rátkai, S., Shetty, P., Wirth, R., Maróti, G., Oszvald, F. And Knisz, J., 2022, Prediction of long-term localized corrosion rates in a carbon steel cooling water system is enhanced by metagenome analysis, *Engineering Failure Analysis*, 141, 106–733.
- Gu, T., Jia, R., Unsal, T. and Xu, D., 2019, Toward a better understanding of microbiologically influenced corrosion caused by sulfate reducing bacteria, *Journal of materials science & technology*, 35(4), 631-636.
- Gu, T., 2012, New Understandings of Biocorrosion Mechanisms and their Classifications, *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 4, 3–6.
- Guan, F., Zhai, X., Duan, J., Zhang, J., Li, K. and Hou, B., 2017, Influence of sulfate- reducing bacteria on the corrosion behavior of 5052 aluminum alloy, *Surface and Coatings Technology*, 316, 171–179.
- Guilhen, C., Forestier, C. and Balestrino, D., 2017, Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties, *Molecular microbiology*, 105(2), 188-210.
- Guo, J., Yuan, S., Jiang, W., Lv, L., Liang, B. and Pehkonen, S.O., 2018, Polymers for combating biocorrosion, *Frontiers in Materials*, 5, 10.
- Hadley, R.F., 1948, *Corrosion by micro-organisms in aqueous and soil environments*, Corrosion handbook, In: Uhlig, H.H. (ed.), John Wiley & Sons, USA, 471895628, 466-470.
- Hakkarainen, T.J., 2003, Microbiologically influenced corrosion of stainless steel- What is required for pitting?, *Materials and Corrosion*, 54, 503-509.
- Halim, A., Gubner, R. and Watkin, E., 2011, Preliminary Study on Nitrate Injection to Control Souring Problem in Oil Reservoir: Benefits and Side Effects on Steel Material (UNS S31603), CORROSION/2011. Paper, (11229).
- Hamana, K. and Matsuzaki, S., 1990, Five types of polyamine distribution patterns in thiobacilli, *FEMS Microbiology Letters*, 40, 347-352.
- Hamilton, W.A., 1985, Sulphate reducing bacteria and anaerobic corrosion, *Annual Review of Microbiology*, 39, 195-217.
- Hansel, C.M. and Francis, C.A., 2006, Coupled photochemical and enzymatic Mn(II) oxidation pathways of a planktonic roseobacter-like bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3543–3549.
- Hansel C.M. and Learman, D.R., 2016, *Geomicrobiology of manganese*, Ehrlich's Geomicrobiology, In: Ehrlich, H.L., Newman, D.K. and Kappler, A. (eds.), 6th Edn., CRC Press, Boca Raton, FL, 403-433.

- Health Canada, 2013, *Guidance on the use of heterotrophic plate counts in Canadian drinking water supplies*,, <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/publications/healthy-living/guidance-use-heterotrophic-plate-counts-canadian-drinking-water-supplies.html>, (19 January 2023, date last accessed).
- Hedrick, H., Reynolds, R. and Crum, M., 1969, Microbiological corrosion of aircraft metal alloys, *Developments in Industrial Microbiology*, 10, 228-233.
- Hemighaus, G., Boval, T., Bacha, J., Barnes, F., Franklin, M., Gibbs, L., Hogue, N., Jones, J., Lesnini, D., Lind, J. and Morri, J., 2006, Aviation Fuels Technical Review (FTR-3), Chevron Corporation.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E., 1997, Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients, *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3233-3241.
- Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N.C., Woyke, T. And Göker, M., 2020, Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of *Alphaproteobacteria*, *Frontiers in microbiology*, 11, 468.
- Hu, D., Zeng, J., Wu, S., Li, X., Ye, C., Lin, W. and Yu, X., 2020, A survey of microbial contamination in aviation fuel from aircraft fuel tanks. *Folia Microbiologica*, 65, 371-380.
- Huang, L., Huang, Y., Lou, Y., Qian, H., Xu, D., Ma, L., Jiang, C. and Zhang, D., 2020, Pyocyanin- modifying genes *phzM* and *phzS* regulated the extracellular electron transfer in microbiologically-influenced corrosion of X80 carbon steel by *Pseudomonas aeruginosa*, *Corrosion Science*, 164, 108355.
- Huang, H. D., Wang, W., Ma, T., Li, G. Q., Liang, F. L. and Liu, R.L., 2009, *Sphingomonas sanxanigenens* sp. nov., isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 719-723
- Huang, Y., Zhou, E., Jiang, C., Jia, R., Liu, S., Xu, D., Gu, T. and Wang, F., 2018, Endogenous phenazine-1-carboxamide encoding gene *PhzH* regulated the extracellular electron transfer in biocorrosion of stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa*, *Electrochemistry Communications*, 94, 9-13.
- Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I., 2001, CotA of *Bacillus subtilis* is a copper dependent laccase, *Journal of Bacteriology*, 183, 5426-5430.
- Iannuzzi, M. and Rosales, B.M., 2003, Microbiologic Contamination and Corrosion of Aircraft Integral Fuel Tanks- Evaluation and Risk Control, *Proceedings of Materials Performance NACE*, 62-66.
- Ilevbare, G.O., Schneider, O., Kelly, R.G. and Scully, J.R., 2004, In situ confocal laser scanning microscopy of AA 2024-T3 corrosion metrology I. Localized corrosion of particles, *Journal of Electrochemical Society*, 151 (8), B453–B464.

- Ilhan-Sungur, E., 2007, *Model Bir Su Sisteminde Sülfat İnfürgeyen Bakterilerin Galvanizli Çelik Saclarda Oluşturduğu Korozyonun İncelenmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Iverson, W.P., 1987, Microbial corrosion of metals, *Advances in Applied Microbiology*, 32, 1-36.
- Iverson, W.P., 1967, A possible role for sulfate reducers in the corrosion of aluminum alloys, *Electrochemical Technology*, 5, 77-79.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L., 2007, 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Javaherdashti, R., 2011, Impact of sulphate-reducing bacteria on the performance of engineering materials, *Applied microbiology and biotechnology*, 91(6), 1507-1517.
- Javaherdashti, R., Nikraz, H., Borowitzka, M., Moheimani, N. and Olivia, M., 2009, On the impact of algae on accelerating the biodeterioration/biocorrosion of reinforced concrete: a mechanistic review, *European Journal of Scientific Research*, 36(3), 394-406.
- Javaherdashti, R., 2017, *Microbiologically influenced corrosion (MIC)*, In Microbiologically influenced corrosion, Springer, Cham., 29-79.
- Jensen, M.L., Jensen, J., Lundgaard, T. and Skovhus, T.L., 2013, *Improving risk based inspection with molecular microbiological methods*, CORROSION 2013, (OnePetro), <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR13/All-CORR13/121421>, (19 January 2023, date last accessed).
- Jia, R., Unsal, T., Xu, D., Lekbach, Y. and Gu, T., 2019, Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 137, 42–58.
- Jia, R., Yang, D., Abd Rahman, H. B. and Gu, T., 2018, An enhanced oil recovery polymer promoted microbial growth and accelerated microbiologically influenced corrosion against carbon steel, *Corrosion Science*, 139, 301-308.
- Jia, R., Yang, D., Xu, D. and Gu, T., 2017, Anaerobic corrosion of 304 stainless steel caused by the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *Frontiers in Microbiology*, 8, 2335.
- Johnson, J. L., 1991, *DNA reassociation experiments*, Nucleic acid techniques in bacterial systematics, 21-44.
- Jones, D. and Krieg, N.R., 1984, *Serology and chemotaxonomy*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, 15-18.
- Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O'Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A.L., Madsen, K.L. and Wong, G. K. S., 2016, Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics, *Frontiers Microbiology*, 7, 459.

- Kämpfer, P., Arun, A. B., Young, C. C., Busse, H. J., Kassmannhuber, J., Rossello-Mora, R., Geueke, B., Rehka, P.D. and Chen, W. M., 2012, *Sphingomicrobium lutaoense* gen. nov., sp. nov., isolated from a coastal hot spring, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt_6), 1326-133
- Kämpfer, P., Busse, H. J., McInroy, J. A. and Glaeser, S.P., 2015, *Sphingomonas zeae* sp. nov., isolated from the stem of *Zea mays*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_8), 2542-2548.
- Kämpfer, P., Meurer, U., Esser, M., Hirsch, T. and Busse, H.J., 2007, *Sphingomonas pseudosanguinis* sp. nov., isolated from the water reservoir of an air humidifier, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1342-1345.
- Katsikogianni, M. and Missirlis, Y. F., 2004, Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions, *European Cells and Materials*, 8(3), 37-57.
- Kearns, JR, Clayton C, Halada G Gillow, J.B. and Francis, A.J., 1992, The application of XPS to the study of MIC, *CORROSION* 92, 27 April- 1 May 1992, Houston, Texas, NACE-92178.
- Kibar, E., 2010, *7075 Alüminyum Alaşımlarına Uygulanan RRA Isıl İşlemlerinin Mikroyapı ve Mekanik Özelliklere Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi.
- Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C. and Chun, J., 2014, Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 346-351.
- Kip, N. and A van Veen, J., 2015, The dual role of microbes in corrosion, *The ISME Journal*, 9(3), 542–551.
- Knisz, J., Eckert, R., Gieg, L. M., Koerdts, A., Lee, J. S., Silva, E. R., Skovhus, B. A., An Stepec, B.A., Wade, S.A., 2023, Microbiologically influenced corrosion—more than just microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(5).
- Knox, K.W. and Wicken, A.J., 1973, Immunological properties of teichoic acids, *Bacteriological Reviews*, 37(2), 215-257.
- Koli, D.K., Agnihotri, G. and Purohit, R., 2015, Advanced Aluminium Matrix Composites: The Critical Need of Automotive and Aerospace Engineering Fields, *Materials Today Proceedings*, 2, 3032–3041.
- Konstantinidis, K.T. and Tiedje, J.M., 2005, Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2567-2572.
- Konstantinidis, K.T. and Tiedje, J.M., 2007, Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead, *Current Opinion in Microbiology*, 5, 504-509.

- Kotu, S.P., Mannan, M.S. and Jayaraman, A., 2019, Emerging molecular techniques for studying microbial community composition and function in microbiologically influenced corrosion, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 144, 104722.
- Kreft, L., Botzki, A., Coppens, F., Vandepoele, K. and Van Bel, M., 2017, PhyD3: A phylogenetic tree viewer with extended phyloXML support for functional genomics data visualization, *Bioinformatics*, 33, 2946-2947.
- Krohn, I., Bergmann, L., Qi, M., Indenbirken, D., Han, Y., Perez-Garcia, P., Katzowitsch, E., Hägele, B., Lübcke, T., Siry, C., Riemann, R., Alawi, M. and Streit, W.R., 2021, Deep (Meta)genomics and (Meta)transcriptome analyses of fungal and bacteria consortia from aircraft tanks and kerosene identify key genes in fuel and tank corrosion, *Frontiers in Microbiology*, 12, 722259.
- Krumbein, W. E. and Altmann, H. J., 1973, A New Method for the Detection and Enumeration of Manganese Oxidizing and Reducing Microorganisms, *Helgoland Marine Research*, 25(2), 347-356.
- Lagesen, K. and Hallin, P., 2007, RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes, *Nucleic Acid Research*, 35, 3100-3108.
- Lahme, S., Mand, J., Longwell, J., Smith, R. and Enning, D., 2021, Severe corrosion of carbon steel in oil field produced water can be linked to methanogenic archaea containing a special type of [NiFe] hydrogenase, *Applied and Environmental Microbiology*, 87(39), e01819–20.
- Lai, M.E. and Bergel. A., 2000, Electrochemical reduction of oxygen on glassy carbon: Catalysis by catalase, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 494: 30-40.
- Lane, D.J., 1991, *16S/23S rRNA sequencing*. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M (eds.), John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Lane, R.A., 2005, Under the microscope: Understanding, detecting, and preventing microbiologically influenced corrosion, *Journal of Failure Analysis and Prevention*, 5, 10-12.
- Langton, R., Clark, C., Hewitt, M., Richards, L., Moir, I. and Seabridge, A., 2009, *Aircraft Fuel Systems*, John Wiley & Sons.
- Lanneluc, I., Langumier, M., Sabot, R., Jeannin, M., Refait, P. and Sablé, S., 2015, On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99, 55–65.
- Larsen, E.I., Sly, L.I. and McEwan, A.G., 1999, Manganese (II) adsorption and oxidation by whole cells and a membrane fraction of *Pedomicrobium* sp., *Archives of Microbiology*, 171, 257-264.

- Lata, S., Sharma, C. and Singh, A., 2012, Microbial influenced corrosion by thermophilic bacteria, *Central European Journal of Engineering*, 2(1), 113-122.
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S. C. and Chun, J., 2016, OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity, *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1100-1103.
- Lefort, V., Desper, R. and Gascuel, O., 2015, FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program, *Molecular Biology and Evolution*, 32, 2798-2800.
- Lewandowski, Z., Avci, R., Geiser, M., Shi, X., Braughton, K. and Yurt, N., 2002, Biofouling and corrosion of stainless steels in natural waters, *Water Science and Technology: Water Supply*, 2(4), 65-72.
- Lewandowski, Z. and Beyenal, H., 2009, *Mechanisms of microbially influenced corrosion*, Marine and industrial biofouling, In (ed.). Springer, Berlin, Heidelberg, 35-64.
- Li, C., Wang, S., Du, X., Cheng, X., Fu, M., Hou, N. and Li, D., 2016, Immobilization of iron- and manganese-oxidizing bacteria with a biofilm-forming bacterium for the effective removal of iron and manganese from groundwater, *Bioresource Technology*, 220, 76-84.
- Li, Q., Wang, J., Xing, X. and Hu, W., 2018, Corrosion behavior of X65 steel in seawater containing sulfate reducing bacteria under aerobic conditions, *Bioelectrochemistry*, 122, 40-50.
- Li, X., Zhang, D., Liu, Z., Li, Z., Du, C. and Dong, C., 2015., Materials science: Share corrosion data, *Nature* 527, 441–442.
- Li, Y., Xu, D., Chen, C., Li, X., Jia, R., Zhang, D., Sand, W., Wang, F. and Gu, T., 2018, Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: a review, *Journal of materials science & technology*, 34(10), 1713- 1718.
- Li, Y., Kawamura, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Liu, H., Huang, X., Kobayashi, K. and Ezaki, T., 2004, *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 819-825.
- Liang, Q., and Lloyd-Jones, G., 201, *Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), 413-416.
- Liao, S., Zhou, J., Wang, H., Chen, X., Wang, H. and Wang, G., 2013, Arsenite oxidation using biogenic manganese oxides produced by a deep-sea manganese-oxidizing bacterium, *Marinobacter* sp. MnI7-9, *Geomicrobiology Journal*, 30, 150–159.
- Linhardt, P., 2004, Microbially influenced corrosion of stainless steel by manganese oxidizing microorganisms, *Materials and Corrosion*, 55(3), 158-163.

- Linhardt, P., 2010, Twenty years of experience with corrosion failures caused by manganese oxidizing microorganisms, *Materials and Corrosion*, 61(12), 1034-1039.
- Linhardt, P., 1994, Manganese-oxidizing bacteria and pitting of turbine components made of CrNi steel in a hydroelectric power plant, *Werkstoffe und Korrosion-Weinheim*, 45, 79-83.
- Lima, M., Gomes, L.C., Teixeira-Santos, R., Romeu, M.J., Valcarcel, J., Vázquez, J.A., Cerqueira, M.A., Pastrana, L., Bourbon, A.I., de Jong, E.D., Sjollem, J. and Mergulhão, F.J., 2022, Assessment of the antibiofilm performance of Chitosan-based surfaces in marine environments, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14647.
- Little, B.J., Blackwood, D.J., Hinks, J., Lauro, F.M., Marsili, E., Okamoto, A., Rice, S.A., Wade, S.A. and Flemming, H.C., 2020, Microbially influenced corrosion- Any progress?, *Corrosion Science*, 170, 108641.
- Little, B.J., Gerke, T.L., Ray, R.I. and Lee, J.S., 2015, *The mineralogy of microbiologically influenced corrosion*, Mineral Scales and Deposits, In: Amjad Z, Demadis KD (eds.), Elsevier, Amsterdam, 107–22.
- Little, B.J. and Lee, J.S., 2007, *Microbiologically influenced corrosion*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- Little, B., Lee, J. and Ray, R., 2006, Diagnosing microbiologically influenced corrosion: a state-of-the-art review. *Corrosion*, 62, 13.
- Liu, H. and Cheng, Y. F., 2020, Corrosion of initial pits on abandoned X52 pipeline steel in a simulated soil solution containing sulfate-reducing bacteria, *Journal of Materials Research and Technology*, 9(4), 7180-7189.
- Liu, M., Wang, S., Yang, M., Ning, X. and Nan, Z., 2022, Experimental study on treatment of heavy metal-contaminated soil by manganese-oxidizing bacteria, *Environmental Science and Pollution Research*, 29(4), 5526-5540.
- Liu, H., Zhong, X., Liu, H. and Cheng, Y. F., 2018a, Microbiologically-enhanced galvanic corrosion of the steel beneath a deposit in simulated oilfield-produced water containing *Desulfotomaculum nigrificans*, *Electrochemistry Communications*, 90, 1-5.
- Liu, H., Sharma, M., Wang, J., Cheng, Y. F. and Liu, H., 2018b, Microbiologically influenced corrosion of 316L stainless steel in the presence of *Chlorella vulgaris*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 129, 209–216.
- Liu, Y., Lai, Q., Du, J. and Shao, Z. 2016, *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1193-1199.
- Logan, B. E., Rossi, R. and Saikaly, P. E., 2019, Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems, *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 307-319.

- Ludwig, W., 2010, *Molecular Phylogeny of Microorganisms: Is rRNA Still a Useful Marker?* Molecular Phylogeny of Microorganisms, In: Oren, A. and Papke, R.T. (eds.), Caister Academic Press, Norfolk, U.K.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, W. A., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssman, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. and Schleifer, K.H., 2004, ARB: a Software Environment for Sequence Data, *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1363-1371.
- Lugauskas, A., Bikulčius, G., Bučinskienė, D., Selskienė, A., Pakštas, V. and Binkauskienė, E., 2016, Long-time corrosion of metals (steel and aluminium) and profiles of fungi on their surface in outdoor environments in Lithuania. *Chemija* 27, 135-142.
- Luo, A., Wang, F., Sun, D., Liu, X. and Xin, B., 2022, Formation, development, and cross-species interactions in biofilms, *Frontiers in Microbiology*, 12, 757327.
- Lv, M., Du, M., Li, X., Yue, Y. and Chen, X., 2019, Mechanism of microbiologically influenced corrosion of X65 steel in seawater containing sulfate-reducing bacteria and iron-oxidizing bacteria, *Journal of Materials Research and Technology*, 8(5), 4066-4078.
- Lv, M. and Du, M., 2018, A review: microbiologically influenced corrosion and the effect of cathodic polarization on typical bacteria, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(3), 431-446.
- Ma, Y., Zhang, Y., Zhang, R., Guan, F., Hou, B. and Duan, J., 2020, Microbiologically influenced corrosion of marine steels within the interaction between steel and biofilms: a brief view, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 515-525.
- Mand, J., Park, H.S., Okoro, C., Lomans, B.P., Smith, S., Chiejina, L. and Voordouw, G., 2016, Microbial methane production associated with carbon steel corrosion in a Nigerian oil field, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1538.
- Marbaniang, D.G., 2012, Spectrophotometric Determination of Manganese in Ground Water in Shillong City Using Bismuthate Oxidation Method, *International Journal of Environmental Protection*, 2(5), 22-26.
- Martinez, S., Ilhan-Sungur, E., Cansever, N. and Khoshnaw, F. (2022). A comparative analysis of perforation and blister features on internally corroded aged water pipeline wall. *Materials and corrosion*, 73(8), 1193-1204.
- Maruthamuthu, S., Muthukumar, N., Natesan, M. and Palaniswamy, N., 2008, Role of air microbes on atmospheric corrosion, *Current Science*, 359-363.
- Maruyama, T., Park, H. D., Ozawa, K., Tanaka, Y., Sumino, T., Hamana, K., Hiraishi, A. and Kato, K., 2006, *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 85-89.

- Maurice, L. Q., Lander, H., Edwards, T. and Harrison, W. E., 2001, Advanced aviation fuels: a look ahead via a historical perspective, *Fuel*, 80, 747-756.
- Mazza, M. G., 2016, The physics of biofilms—an introduction, *Journal of Physics D : Applied Physics*, 49(20), 203001.
- Maruthamuthu, S., Kumar, B.D., Ramachandran, S., Anandkumar, B., Palanichamy, S., Chandrasekaran, M., Subramanian, P. and Palaniswamy, N., 2011, Microbial Corrosion in Petroleum Product Transporting Pipelines, *Industrial & Engineering Chemistry*, 50, 8006-8015.
- McComb, J.P., 2009, *A metagenomic analysis of microbial contamination in aviation fuels*, Master thesis, Air University, Air Force Institute of Technology.
- McGinnis, S. and Madden, T.L., 2004, BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools, *Nucleic Acids Research*, 32, 20-25.
- Meier-Kolthoff, J.P. and Goker, M., 2019, TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genomebased taxonomy, *Nature Communications*, 10, 2182.
- Meier-Kolthoff, J.P., Goker, M., Spröer, C., and Klenk, H.P., 2013, When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Archives of Microbiology*, 195, 413-418.
- Meier-Kolthoff, J.P., Hahnke, R.L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., Rohde, C., Rohde, M., Fartmann, B., Goodwin, L.A., Chertkov, O., Reddy, T., Pati, A., Ivanova, N.N., Markowitz, V., Kyrpides, N.C., Woyke, T., Göker, M. and Klenk, H.P., 2014a, Complete genome sequence of DSM 30083(T), the type strain (U5/41(T)) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy, *Standards in Genomic Sciences* 9, 2.
- Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.P. and Göker, M., 2014b, Taxonomic use of DNA G 1 C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 352-356.
- Meier-Kolthoff, J.P., Sarda Carbasse, J., Peinado-Olarte, R.L. and Goker, M., 2022, TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes, *Nucleic Acid Research*, 50, 801-807.
- Meng, Q. and Frankel, G.S., 2004, Effect of Cu content on corrosion behavior of 7xxx series aluminum alloys, *Journal of the Electrochemical Society*, 151(5), B271.
- Miller, R., Herron, W.C., Krwrens, A.G., Cameron, L. and Terry, B.M., 1964, Microorganisms cause corrosion in air craft fuel tanks, *Materials Protection*. 3, 60-69.
- MIDI, 2008, *Sherlock Microbial Identification System*, Operating Manual, version 6.1. Newark, DE: MIDI Inc.

- Mora, R.R., 2006. *DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation*, In: Stackebrandt, E. (Ed.), *Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin.
- Mouritz, A.P., 2012, *Introduction to Aerospace Materials*, Elsevier.
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X. and Huang, T., 2020, Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches, *Frontiers in Microbiology*. 11, 928.
- Munn, C.B., 2020, *Marine Microbiology: Ecology and Applications 3rd Edition*, Taylor and Francis, ISBN:978-0-367-18356-2.
- Na'inna, A. M., Lawal, M.S. and Jemitola, P.O., 2020, A critical review on the prevention of aircraft fuel tank vapour and air explosions, *Nigerian Journal of Scientific Research*, 19(4), 240-253.
- Natarajan, K. A., 2013, Biofouling and microbially influenced corrosion of stainless steels, In *Advanced materials research*, Trans Tech Publications Ltd, 794, 539-551.
- Nelson, V. V., Maria, O. T., Mamiè, S. V. and Maritza, P. C., 2017, Microbiologically influenced corrosion in aluminium alloys 7075 and 2024, In: *Aluminium Alloys-Recent Trends in Processing, Characterization, Mechanical Behavior and Applications*, Sivasankaran, S. (Ed.), IntechOpen.
- Nicholas, K.B., 1997, GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation, *EMBnet News* 4, 14.
- Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y., Iwamoto, K., Vrind-de Jong, E.W., de Vrind, J.P. and Corstjens, P.L., 1997, Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4793-4799.
- Olesen, B.H., Avci, R. and Lewandowski, Z., 2000, Manganese dioxide as a potential cathodic reactant in corrosion of stainless steels. *Corrosion science*, 42(2), 211-227.
- Olsen, G. J. and Woese, C. R., 1993, Ribosomal RNA: a key to phylogeny, *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 7, 113-123.
- On, S.L. and Holmes, B., 1991, Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of campylobacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1785-1788.
- On, S.L. and Holmes, B., 1992, Assessment of enzyme detection tests useful in identification of campylobacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 746-749.
- Otto, M., 2013, Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity, *Annual review of medicine*, 64, 175-188

- Ou-yahia, D., Üstüntürk-Onan, M. and Ilhan-Sungur, E., 2024, Isolation and Identification of a Manganese-Oxidizing Bacterium from Produced Water: Growth and Manganese-Oxidation Ability of *Bacillus zhangzhouensis* in Different Manganese Concentrations, *Arabian Journal for Science and Engineering*, 49(1), 67-75.
- Palanichamy, S., Maruthamuthu, S., Manickam, S. T. and Rajendran, A., 2002, Microfouling of manganese-oxidizing bacteria in Tuticorin harbour waters, *Current science*, 865-869.
- Parow, H., Johnsen, R. and Skovhus, T., 2022, *MIC in the Fire Water Sprinkler System at St. Olavs Hospital*, Failure Analysis of Microbiologically Influenced Corrosion, In: Eckert RB, Torben LS (eds.), FL: CRC Press, Boca Raton, Trondheim, Norway.
- Passman, F. J., 2013, Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 88-104.
- Pavic, A., Ilic-Tomic, T., Pacevski, A., Nedeljkovic, T., Vasiljevic, B. and Moric, I., 2015, Diversity and biodeteriorative potential of bacterial isolates from deteriorated modern combined-technique canvas painting, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 97, 40-50.
- Percival, S.L., Knapp, J.S., Edyvean, R.G. and Wales, D.S., 1998, Biofilm development on stainless steel in mains water, *Water Research*, 32, 243-253.
- Pei, A.Y., Oberdorf, W.E., Nossa, C.W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E.A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., Brown, S.M., Sotero, S., Desantis, T., Brodie, E., Nelson, K. and Pei, Z., 2010, Diversity of 16S rRNA genes with in individual prokaryotic genomes, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3886-3897.
- Phan, H.C., Wade, S.A. and Blackall, L.L., 2022, Identification of microbes isolated with test kits through culture-dependent and metabarcoding techniques for assessment of microbial corrosion, *Current Research in Biotechnology*, 4, 129–37.
- Piazza, A., Ciancio Casalini, L., Pacini, V. A., Sanguinetti, G., Ottado, J. and Gottig, N., 2019, Environmental bacteria involved in manganese (II) oxidation and removal from groundwater, *Frontiers in Microbiology*, 10, 418532.
- Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C. and Van Dijck, P., 2020, Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms, *Frontiers in Microbiology*, 11, 535344.
- Piotrowski, O., 1994, The effect of NaCl concentration on the corrosion behavior of aluminum containing iron, *Corrosion Science*, 36 (10), 1789-1803.
- Pu, Y., Dou, W., Gu, T., Tang, S., Han, X. and Chen, S., 2020, Microbiologically influenced corrosion of Cu by nitrate reducing marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Materials Science & Technology*, 47, 10–19.
- Polmear, I.J., 1996, *Light Alloys: Metallurgy of the Light Metals*, J. Wiley & Sons, New York.

- Power, M.E., Van Der Meer, J.R., Harms, H. and Wanner, O., 2001, Colonization of aerobic biofilms by sulfate-reducing bacteria, *Biofouling*, 17, 275-288.
- Prabhu, T.R., 2015, An Overview of High-Performance Aircraft Structural Al Alloy-AA7085, *ACTA Met Sin*, 28, 909–921.
- Puentes-Cala, E., Tapia-Perdomo, V., Espinosa-Valbuena, D., Reyes-Reyes, M., Quintero-Santander, D., Vasquez-Dallos, S., Salazar, H., Santamaira-Galvis, P., Silva-Rodriguez, R., Castillo-Villamizar, G., 2022, Microbiologically influenced corrosion: the gap in the field, *Frontiers in Environmental Science*, 10, 924842.
- Qu, Q., Li, S., Li, L., Zuo, L., Ran, X., Qu, Y. and Zhu, B., 2017, Adsorption and corrosion behaviour of *Trichoderma harzianum* for AZ31B magnesium alloy in artificial seawater. *Corrosion Science*, 118, 12-23.
- Qu, Q., Wang, L., Li, L., He, Y., Yang, M. and Ding, Z., 2015, Effect of the fungus, *Aspergillus niger*, on the corrosion behaviour of AZ31B magnesium alloy in artificial seawater. *Corrosion Science*, 98, 249-259.
- Rajasekar, A., Babu, T.G., Pandian, S.K., Maruthamuthu, S., Palaniswamy, N. and Rajendran, A., 2007, Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer *Bacillus cereus* ACE4 in diesel transporting pipeline, *Corrosion Science*, 49, 2694–2710.
- Rajasekar, A., Anandkumar, B., Maruthamuthu, S., Ting, Y.P. and Rahman, P.S.K.M., 2010, Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines, *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 1175-1188.
- Rauch, M.E., Graef, H.W., Rozenzhak, S.M., Jones, S.E., Bleckmann, C.A. and Kruger, R.L., 2006, Characterization of Microbial Contamination in United States Air Force Aviation Fuel Tanks, *Journal of Microbial Biotechnology*, 33, 29-36.
- Rauch, M. E., 2008, *Threat of Fuel Degrading Microorganisms on US Military Fuel Supplies*, Maxwell Air Force Base, Alabama: Air University.
- Ray, R., Little, B., Wagner, P. and Hart, K., 1997, Environmental scanning electron microscopy investigations of biodeterioration, *Scanning*, 19, 98-103.
- Ray, R.I., Lee, J.S. and Little, B.J., 2010, Iron-oxidizing bacteria: a review of corrosion mechanisms In fresh water and marine environments, *CORROSION 2010*, San Antonio, Texas, Paper Number: NACE-10218.
- Refait, P., Grolleau, A-M., Jeannin, M., Rémazeilles, C. and Sabot, R., 2020, Corrosion of carbon steel in marine environments: role of the corrosion product layer. *Corrosion and Materials Degradation*, 1, 198–218.
- Revie, R.W. and Uhlig, H.H., 2008, *Corrosion and corrosion control: An introduction to corrosion science and engineering*, 4th ed., John Wiley&Sons Inc., Hoboken New Jersey, ISBN-13: 978-0471732792.

- Rhoads, W.J., Pruden, A. and Edwards, M.A., 2017, Interactive effects of corrosion, copper, and chloramines on *Legionella* and *mycobacteria* in hot water plumbing, *Environmental Science and Technology*, 51, 7065–7075.
- Richardson, L.L., Aguilar, C. and Nealson, K.H., 1988., Manganese oxidation in pH and O₂ microenvironments produced by phytoplankton, *Limnology and Oceanography*, 33, 352-363.
- Richter, M. and Rosselló-Móra, R., 2009, Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126-19131.
- Ridge, J.P., Lin, M., Larsen, E.I., Fegan, M., McEwan, A.G. and Sly, L.I., 2007, A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067, *Environmental Microbiology*, 9(4), 944-53.
- Roco, C. A., Bergaust, L. L., Shapleigh, J. P. and Yavitt, J. B., 2016, Reduction of nitrate to nitrite by microbes under oxic conditions, *Soil Biology and Biochemistry*, 100, 1-8.
- Romeu, M.J., Lima, M., Gomes, L.C., Jong, E.D., Morais, J., Vasconcelos, V., Pereira, M.F.R., Soares, O.S.G.P., Sjollem, J. and Mergulhão, F.J., 2022, The use of 3D optical coherence tomography to analyze the architecture of cyanobacterial biofilms formed on a carbon nanotube composite, *Polymers*, 14, 4410.
- Romero, M., Ortíz, R., Marquez, O. and Romero-Gonzalez, M., 2007, Use of FTIR in situ technique to evaluate MIC by SRB, *CORROSION 2007*, Nashville, Tennessee, NACE-07531.
- Rosselló-Móra, R., 2006, *DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation*, Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes, 23-50.
- Rossi-Tamisier, M., Benamar, S., Raoult, D. and Fournier, P.E., 2015, Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1929-1934.
- Rouvre, I., 2016, *Hydrogénase - Promoteur ou inhibiteur de la corrosion microbienne ?*, Thèse de doctorat, Toulouse.
- Samuel, O., Ifeanyi, O., Michael, O. and Frederick, O., 2015, Microbial contaminants in the commercial aviation fuel obtained from Benin city airport, *Nigeria University Journal of Microbiology Research*, 3, 31–35.
- San, N. O., Nazır, H. and Dönmez, G., 2012, Microbiologically influenced corrosion of NiZn alloy coatings by *Delftia acidovorans* bacterium, *Corrosion science*, 64, 198-203.
- Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke, J. C. and Murray, C. K., 2013, Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections, *BMC infectious diseases*, 13(1), 1-12.

- Sasser, M., 1990, *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*, MIDI Technical Note 101, Newark, DE: MIDI Inc; 1990.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S. and Bjarnsholt, T., 2022, The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation, *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.
- Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L.Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D.J., Madden, T.L., Maglott, D.R., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Sequeira, E., Sherry, S.T., Shumway, M., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Wagner, L., Yaschenko, E. and Ye, J., 2009 Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucleic Acids Research*, Pages D5–D15.
- Scherer, P. and Kneifel, H., 1983, Distribution of polyamines in methanogenic bacteria, *Journal of Bacteriology Research*, 154, 1315-1322.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O., 1972, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriological Reviews*, 36(4), 407-477.
- Schumann, P., 2011 Peptidoglycan structure, In: *Methods in microbiology*, Academic Press, 101-129.
- Schwarz, U. S. and Safran, S. A., 2013, Physics of adherent cells, *Reviews of Modern Physics*, 85(3), 1327–1381.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K. and de Vos, P., 1994, Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 499-510.
- Sharma M, Liu H, Tsesmetzis N., Handy, J., Place, T. and Gieg, M.L., 2022, Diagnosing microbiologically influenced corrosion at a crude oil pipeline facility leak site— a multiple lines of evidence approach, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 172, 105438.
- Singh, P., Kim, Y., Hoang, V.A., Farh, M.E.A. and Yang, D.C., 2015, *Sphingomonas panacis* sp. nov., isolated from rhizosphere of rusty ginseng, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108, 711-720.
- Singh, A., Sharma, C. and Lata, S., 2011, Microbial influenced corrosion due to *Desulfovibrio desulfuricans*, *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 58(6), 315-322.
- Siverio, F., Cambra, M., Gorris, M.T., Corzo, J. and Lopez, M.M., 1993, Lipopolysaccharides as Determinants of Serological Variability in *Pseudomonas corrugata*, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1805-1812.

- Skovhus, T. L., Eckert, R. B. and Rodrigues, E. 2017, Management and control of microbiologically influenced corrosion (MIC) in the oil and gas industry—Overview and a North Sea case study, *Journal of biotechnology*, 256, 31-45.
- Skovhus T, Højris, B., Saunders, A. and Thomsen, R.T., 2009, Practical use of new microbiology tools in oil production, *SPE Production and Operations*, 24(1), 180–186.
- Smith, W. F., 2001, (Çeviren: Erdoğan, M.), *Mühendislik Alaşımalarının Yapı ve Özellikleri Cilt II.*, Nobel Kitapevi, Ankara.
- Solano, C., Echeverz, M. and Lasa, I., 2014, Biofilm dispersion and quorum sensing, *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 96–104.
- Solomon E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996, Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96:2563-605.
- Stackebrandt, E. and Ebers, J., 2006, Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards, *Microbial Today*, 33, 152-155,
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M., 1994, Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 846-849.
- Staley, J.T., 2006, The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 361(1475), 1899-1909.
- Staley, J.T., Liu, J., Hunt, and W.H., Jr., 1997, Aluminum alloys for aerostructures, *Advanced Materials and Processes*, 152, 17–20.
- Suzuki, K., Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., 1993, *Cell envelopes and classification*, Handbook of New Bacterial Systematics, In: Goodfellow, M., O'Donnell, A.G. (Eds.), Academic Press Ltd, London, 195-250.
- Tabor, C.W. and Tabor, H., 1985, Polyamines in microorganisms, *Microbiological Reviews*, 49(1), 81-99.
- Takeuchi, M., Kawai, F., Shimada, Y. and Yokota, A., 1993, Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria: emended description of the genus *Sphingomonas* and new descriptions of *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov. and *Sphingomonas terrae* sp. nov., *Systematic and Applied Microbiology*, 16(2), 227-238.
- Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D., Verity, R. and Webb, S.M., 2004, Biogenic Manganese Oxides: Properties and Mechanisms of Formation, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 32(1), 287-328.
- Tebo, B.M., Johnson, H.A., McCarthy, J.K. and Templeton, A.S., 2005, Geomicrobiology of manganese (II) oxidation, *Trends in Microbiology*, 13(9), 421-428.

- Telegdi, J., Shaban, A. and Trif, L., 2020, Review on the microbiologically influenced corrosion and the function of biofilms, *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 9(1), 1-33.
- Thompson, C.C., Chimetto, L., Edwards, R.A. Swings, J., Stackebrandt, E. and Thompson F.L., 2013, Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* 14, 913.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., 1997, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W. and Kämpfer, P., 2010, Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.A. and Krieg, N.R., 2007, *Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics*, Methods for general and molecular microbiology, In: Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak, J.A., Marzluf, G., Schmidt T.M. and Snyder, L.R. (eds), American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 330-393.
- Trif, L., Shaban, A. and Telegdi, J., 2018, Electrochemical and surface analytical techniques applied to the investigation of MIC, *Corrosion Reviews*, 36, 349–363.
- Unsal, T., Jia, R., Kumseranee, S., Punpruk, S. and Gu, T., 2019, Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of carbon steel in hydrotest using enriched artificial seawater inoculated with an oilfield biofilm consortium, *Engineering Failure Analysis*, 100, 544–555.
- Usher, K. M., Kaksonen, A. H., Cole, I. and Marney, D., 2014, Critical review: microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 84-106.
- Vander Voort, G.F., Lucas, G.M. and Manilova, E.P., 2004, *Metallography and Microstructures of Stainless Steels and Maraging Steels*, Metallography and Microstructures, Vol 9., In: Vander Voort, G.F., ASM Handbook: ASM International.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L. and Heijnen, J. J., 1995, Biofilm structures, *Water Science and Technology*, 32(8), 35–43.
- Van Waasbergen, L.G., Hildebrand, M. and Tebo, B.M., 1996, Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *Journal of Bacteriology*, 178, 3517-3530.
- Varjani, S.J., 2017, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresource Technology*, 223, 277–286
- Vejar, N.D., Sacre, J., Collao, B., Perez-Donoso, J., Páez, M.A., Pineda, F., Worker, B. and Sancy, M., 2016, Enhanced Corrosion of 7075 Alloy by the Presence of *Bacillus megaterium*, *International Journal of Electrochemical Science*, 11, 9723-9733.

- Videla, H.A., 1996, *Manual of biocorrosion*, CRC Press, UK, ISBN: 9780873717267.
- Videla, H. A., 2002, Prevention and control of biocorrosion, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49(4), 259–270.
- Vieira, S., Huber, K.J., Neumann-Schaal, M., Geppert, A., Luckner, M., Wanner, G. and Overmann, J., 2021 *Usitatibacter rugosus* gen. nov., sp. nov. and *Usitatibacter palustris* sp. nov., novel members of *Usitatibacteraceae* fam. nov. within the order Nitrosomonadales isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evoluntary Microbiology*, 71, 004631.
- Von Wolzogen Kühr, C.A.H. and Van Der Vlugt, L.S., 1934, The graphitization of cast iron as an electrochemical process in anaerobic soils, *Water*, 18, 147-165.
- Wagner, P. and Little, B., 1993, Impact of Alloying on Microbiologically Influenced Corrosion. A Review. No. NRL/JA/7333--93-0007. Stennis Space Center, MS: Naval Research Lab.
- Wallace, W., Hoepfner, D.W. and Kandachar, P.V., 1985., AGARD Corrosion Handbook, vol 1. Aircraft Corrosion: Causes and Case Histories, AGARD: ISBN 92-835-1505-6.
- Wang, H., Ju, L.-K., Castaneda, H., Cheng, G. and Zhang Newby, B., 2014, Corrosion of carbon steel C1010 in the presence of iron oxidizing bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Corrosion Science*, 89, 250–257.
- Wang, L., Liang, J., Li, H., Cheng, L. and Cui, Z. 2021, Quantitative study of the corrosion evolution and stress corrosion cracking of high strength aluminum alloys in solution and thin electrolyte layer containing Cl-, *Corrosion Science*, 178, 109076.
- Wang, X., Yu, M., Wang, L., Lin, H., Li, B., Xue, C-X., Sun, H. and Zhang, X-H., 2020, Comparative genomic and metabolic analysis of manganese-oxidizing mechanisms in *Celeribacter manganoxidans* DY25T: its adaptation to the environment of polymetallic nodules, *Genomics*, 112, 2080–2091.
- Wang, Y., Tsang, Y.F., Wang, H., Sun, Y., Song, Y., Pan, X. and Luo, S., 2020, Effective Stabilization of Arsenic in Contaminated Soils with Biogenic Manganese Oxide (BMO) Materials, *Environmental Pollution*, 258, 113481.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.L., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Truper, H.G., 1987, Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 463-464.
- Warren, A.S., 2004 Developments and Challenges for Aluminum- A Boeing Perspective, *Materials Forum*, 28, 24–31.
- Wasim, M. and Djukic, M. B., 2020, Long-term external microbiologically influenced corrosion of buried cast iron pipes in the presence of sulfate-reducing bacteria (SRB), *Engineering Failure Analysis*, 115, 104657.

- Welikala S, Al-Saadi S, Gates, W.P., Panter, C. And Raman, R.K.S., 2022, Biofilm development on carbon steel by iron reducing bacterium *Shewanella putrefaciens* and their role in corrosion, *Metals*, 12(6), 1005.
- Wiatr, C.L., 2008, Biocorrosion in the Pulp and Paper Industry, *2008 PAPERCON Conference Proceedings*, 4-7 May 2008, Dallas, Texas, ISBN: 1-59510-172-1.
- Will, S.E., Henke, P., Boedeker, C., Huang, S., Brinkmann, H., Rohde, M., Jarek, M., Friedl, T., Seufert, S., Schumacher, M., Overmann, J., Neuman-Schaal, M. and Petersen, J., 2019, Day and night: metabolic profiles and evolutionary relationships of six axenic non-marine cyanobacteria, *Genome Biology and Evolution*, 11, 270-294.
- Woese, C.R., 1987, Bacterial evolution, *Microbiol Reviews*, 51(2), 221-271.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L., 1990, Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4576-4579.
- Wright, M.H., Farooqui, S.M., White, A.R. and Greene, A.C., 2016, Production of manganese oxide nanoparticles by *Shewanella* species, *Applied Environmental Microbiology*, 82, 5402–5409.
- Xi, G., Zhao, X., Wang, S., Yang, J., Sun, J., An, Z., Li, Y. and Qu, X., 2020, Synergistic Effect Between Sulfate-reducing Bacteria and *Pseudomonas Aeruginosa* on Corrosion Behavior of Q235 Steel, *International Journal of Electrochemical Science*, 15, 361-70.
- Xu, D., Li, Y., Song, F. and Gu, T., 2013, Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*, *Corrosion Science*, 77, 385-390.
- Xu, D., Li, Y. and Gu, T., 2016, Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria, *Bioelectrochemistry*, 110, 52-58.
- Xu, D. and Gu, T., 2014, Carbon source starvation triggered more aggressive corrosion against carbon steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91, 74-81.
- Xu, D., Jia, R., Li, Y., and Gu, T., 2017, Advances in the treatment of problematic industrial biofilms, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 97.
- Xu, L.C., Chan, K.Y. and Fang, H.H.P., 2002, Application of atomic force microscopy in the study of microbiologically influenced corrosion. *Materials Characterization*, 48, 195-203.
- Xu, Y., Dhaouadi, Y., Stoodley, P. and Reng, D., 2020, Sensing the unreachable: challenges and opportunities in biofilm detection, *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 79-84.

- Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Yamamoto, H., 1990, Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*, *Microbiology and Immunology*, 34, 99-119.
- Yamamoto, S., Shinoda, S., Kawaguchi, M., Wakamatsu, K. and Makita, M., 1983, Polyamine distribution in *Vibrionaceae*: norspermidine as a general constituent of *Vibrio* species, *Canadian Journal of Microbiology*, 29(6), 724-728.
- Yalçın, H. ve Gürü, M., 2010, *Elektrokimya ve Uygulamaları*. Palme Yayıncılık.
- Yang, H., Tang, X., Luo, X., Li, G., Liang, H. and Snyder, S., 2021, Oxidants-Assisted Sand Filter to Enhance the Simultaneous Removals of Manganese, Iron and Ammonia from Groundwater: Formation of Active MnOx and Involved Mechanisms, *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125707.
- Yang, P., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J., 1993, Polyamine patterns as chemotaxonomic markers for the genus *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 709-714.
- Yılmaz, P., 2019 *Mangan Oksitleyen Bakterilerin İzolasyonu ve Martenzitik Çelik Üzerine Korozif Etkilerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Yoon, Y., 2004, *Formation And Breakddown of Chromate Conversion Coatings on Al-Zn-Mg-Cu 7x75 Alloys*, PhD thesis, Ohio University.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Lim, J.M., Kwon, S.J. and Chun, J.A., 2017, Large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity, *Anton Leeuw*, 110, 1281-1286.
- Yu, H. and Leadbetter, J.R., 2020, Bacterial chemolithoautotrophy via manganese oxidation, *Nature*, 583(7816), 453-458.
- Yu, S., Lou, Y., Zhang, D., Zhou, E., Li, Z., Du, C., Qian, H., Xu, D. and Gu, T., 2020, Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by nitrate reducing *Bacillus cereus* in simulated Beijing soil solution, *Bioelectrochemistry*, 107477.
- Yue, Y., Lv, M. and Du, M., 2019, The corrosion behavior and mechanism of X65 steel induced by iron-oxidizing bacteria in the seawater environment. *Materials and Corrosion*, 70(10), 1852-1861.
- Yuk, S., Azam, A. H., Miyanaga, K. and Tanji, Y., 2020, The contribution of nitrate-reducing bacterium *Marinobacter* YB03 to biological souring and microbiologically influenced corrosion of carbon steel, *Biochemical Engineering Journal*, 156, 107520.
- Zakharova, I.R., and Prfenova, V.V., 2007, A method for cultivation of microorganisms oxidizing iron and manganese in bottom sediments of Lake Baikal, *Izvestiia Akademii nauk, Serii biologicheskaya / Rossiiskaia akademiia nauk*, 34(3), 290-295.

- Zech, H., Thole, S., Schreiber, K., Kalhöfer, D., Voget, S., Brinkhoff, T., Simon, M., Schomburg, D. and Rabus, R., 2009, Growth phase-dependent global protein and metabolite profiles of *Phaeobacter gallaeciensis* strain DSM 17395, a member of the marine *Roseobacter*-clade, *Proteomics*, 9, 3677-3697.
- Zhang, P., Xu, D., Li, Y., Yang, K. and Gu, T., 2015, Electron mediators accelerate the microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm, *Bioelectrochemistry*, 101, 14-21.
- Zhang, X., Bishop, P. L. and Kinkle, B. K., 1999, Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms, *Water science and technology*, 39(7), 211-218.
- Zhou, H. and Fu, C., 2020, Manganese-oxidizing microbes and biogenic manganese oxides: characterization, Mn (II) oxidation mechanism and environmental relevance, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19, 489-507.
- .

EKLER



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Simge ARKAN ÖZDEMİR
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	10.07.2012

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

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

Makale ve Bildiriler	
Makaleler: Arslan-Vatansever, D., Arkan-Ozdemir, S., Cansever, N. and Ilhan-Sungur, E., 2024, Corrosion behavior of N80 tubing steel in the produced water, <i>Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences</i>,42(2),1-11. Arkan-Ozdemir, S., Cansever, N. and Ilhan-Sungur, E., 2023, Biofilm Formation of <i>Escherichia coli</i> on Hydrophobic Steel Surface Provided by Laser-Texturing, <i>Johnson Matthey Technology Review</i> 2. Arkan-Ozdemir, S., Cansever, N. and Ilhan-Sungur, E., 2020, Impact of commonly used Ag-Cu ion doses on <i>Desulfovibrio</i> sp.: growth and microbiologically induced corrosion against stainless steel, <i>Water Science and Technology</i>, 82(5), 940-953.	

- Arkan, S.**, Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., 2017, *Desulfovibrio* sp. Bakterisinin Metabolik Aktivitesinin 316L Paslanmaz Çeliğin Mikrobiyolojik Korozyonu ile İlişkisi, *Korozyon*, 23 (1-2), 35-42.
- Arkan, S.**, Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., 2016, Corrosive Metabolic Activity of *Desulfovibrio* sp. on 316L Stainless Steel, *Journal of Material Engineering and Performance*.
- Unsal, T., Ilhan-Sungur, E., **Arkan, S.** and Cansever, N., 2016, Effects of Ag and Cu ions on the microbial corrosion of 316L stainless steel in the presence of *Desulfovibrio* sp., *Bioelectrochemistry* 110, 91-99.
- Unsal, T., Ilhan-Sungur, E., Cansever, N. and **Arkan, S.**, 2015, Soğutma Kulelerinde Kullanılan Galvanizli Çelik ve 316L Paslanmaz Çeliğin Mikrobiyolojik Korozyon Davranışları, *Korozyon*, 21 (1-3).

Bildiriler:

- Arkan-Ozdemir, S.**, Tüccar, T., Cansever, N. and Ilhan-Sungur, E., 2022, Microbiologically Induced Corrosion of Aluminum Alloy by Manganese Oxidizing Bacterium, *European Corrosion Congress-EUROCORR'2022*, 28 August-01 September, Berlin, Germany.
- Arkan, S.**, Cansever, N. and Ilhan-Sungur, E., 2018, 630 Kalite Paslanmaz Çeliğin Antiadeziv Özelliklerine Yüzey Morfolojisinin Etkisi, *15. Uluslararası Korozyon Sempozyumu- KORSEM'2018*, 26-28 Eylül, Hatay, Türkiye.
- Celebi, B.N., Yesildag, I., Altan, O., **Arkan, S.**, Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., 2017, Investigation of Anti-adhesivity Property of 630 Steel with Laser Textured Surface, *European Corrosion Congress-EUROCORR'2017*, 3-7 September, Prague, Czech Republic.
- Arkan, S.**, Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., 2016, *Desulfovibrio* sp. Bakterisinin Metabolik Aktivitesinin 316L Paslanmaz Çeliğin Mikrobiyolojik Korozyonu ile İlişkisi, *14. Uluslararası Korozyon Sempozyumu- KORSEM'2016*, 5-7 Ekim, Bayburt, Türkiye.
- Unsal, T., **Arkan, S.**, Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., 2016, Comparison of Microbiologically Induced Corrosion Behavior of 316L Stainless Steel and Galvanized Steel as Cooling Tower Materials, *18 th International Metallurgy and Materials Congress-IMMC'2016*, 29 September-01 October, Istanbul, Turkey.
- Arkan, S.**, Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., Unsal-Istek, T., 2015, Investigation of the Ag-Cu Ions' Effect on Microbial Activity of Sulphate Reducing Bacteria Leading to Corrosion, *European Corrosion Congress-EUROCORR'2015*, 6-10 September, Graz, Austria.
- Unsal-Istek, T., **Arkan, S.**, Ilhan-Sungur, E. and Cansever, N., 2014, Soğutma Kulelerinde Kullanılan Galvanizli Çelik ve 316L Paslanmaz Çeliğin Mikrobiyolojik Korozyon Davranışları, *13. Uluslararası Korozyon Sempozyumu*, 15-17 Ekim, Elazığ, Türkiye, 82-87.