



T.C.
Niğde Üniversitesi
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

BACILLUS THURINGIENSIS'İN YUMUŞAK ÇELİK ÜZERİNDEKİ AKTİVİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATİCE NUR YİŞİL

Ocak 2014

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

BACILLUS THURINGIENSIS'İN YUMUŞAK ÇELİK ÜZERİNDEKİ AKTİVİTESİ

HATİCE NUR YİŞİL

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanlar

Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

Doç. Dr. Emel BAYOL

Ocak 2014

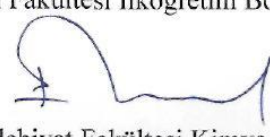
Hatice Nur YİŞİL tarafından **Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK** ve **Doç. Dr. Emel BAYOL** danışmanlığında hazırlanan “*Bacillus thuringiensis*’in Yumuşak Çelik Üzerindeki Aktivitesi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Birol ÖZKALP 
(Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü)

Üye : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK 
(Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Üye : Doç. Dr. Gazi GÖRÜR 
(Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hülya KAHYAOĞLU 
(Niğde Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü)

Üye : Doç. Dr. Emel BAYOL 
(Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü)

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Osman SİVRİKAYA
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Hatice Nur YİŞİL

ÖZET

BACILLUS THURINGIENSIS'İN YUMUŞAK ÇELİK ÜZERİNDEKİ AKTİVİTESİ

YİŞİL, Hatice Nur

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

İkinci Danışman : Doç. Dr. Emel BAYOL

Ocak 2014, 98 sayfa

Metaller üzerinde kolonize olan birçok mikroorganizma metal yüzeyinin korunmasına veya korozyonuna yol açabilir. Çoğu çalışmalarda da metaller üzerinde gelişen biyofilmin korozyonu hızlandırdığı veya engellediği gösterilmiştir. Bu çalışmada, serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ortamında *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin ($1,0 \text{ gL}^{-1}$ ve $3,0 \text{ gL}^{-1}$) yumuşak çelik üzerindeki aktivitesi oda sıcaklığı ve nötr pH'da steril koşullar altında incelenmiştir. Elektrodun yüzeyindeki bakteri sayısı tüp dilüsyon tekniği kullanılarak hesaplanmıştır. Elektrot yüzeyinde mikrobiyal aktiviteyi belirlemek için elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), lineer polarizasyon direnci (LPR) ve potansiyodinamik polarizasyon teknikleri kullanılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler 4. saat, 1. gün, 4. gün ve 7. gün aralıklarında alınmıştır. Elektrotların yüzey morfolojisindeki değişimin incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzeyde oluşan korozyon ürünleri ve değişen iyon konsantrasyonları için ise enerji dağılımlı X-ışınları (EDX) analizi yapılmıştır. Ayrıca biyofilmin yapısında karışık halde bulunan vejetatif bakteri, spor ve kristal toksin formlarının kimyasal yapısı ATR-IR ile belirlenmiştir. Sonuçlar, bakteri miktarı arttıkça, korozyon akım yoğunluğu değerlerinin azaldığını, polarizasyon direnç değerlerinin arttığını göstermektedir. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin oluşturduğu biyofilmin, elektrot yüzeyinde koruyucu olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Mikrobiyolojik korozyon, *Bacillus thuringiensis*, impedans, biyofilm, ATR-IR.

SUMMARY

MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF BACILLUS THURINGIENSIS ON MILD STEEL

YİŞİL, Hatice Nur

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

Co-Advisor : Associate Prof. Dr. Emel BAYOL

January 2014, 98 pages

Many microorganisms that colonized on metals can lead to their corrosion or protect their surfaces. The microbial biofilm on metal surfaces in corrosion induction or corrosion inhibition have been shown in many studies. In this study, effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ($1,0 \text{ gL}^{-1}$ and $3,0 \text{ gL}^{-1}$) on mild steel was investigated in isotonic NaCl solutions under sterile conditions at neutral pH and room temperature. The number of bacteria on surfaces of the electrodes was calculated by using tube dilution techniques. In order to determine the microbial activity on the surfaces of the electrodes, electrochemical impedance spectroscopy (EIS), linear polarization resistance (LPR) and potentiodynamic polarization techniques were used. Electrochemical measurements were carried out at period of time intervals (4 hr, 1st, 4rd and 7 days). The surfaces of the electrodes were characterized with SEM and EDX studies. Biofilm of the electrode surfaces were analyzed with ATR-IR. The results showed that increasing the amount of the bacterium, corrosion rate decreased and polarization resistance values increased. As a result of the study, microbial biofilm made of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, was determined to be protective for the mild steel electrode surfaces.

Keywords: Microbiological corrosion, *Bacillus thuringiensis*, empedance, biofilm, ATR-IR.

ÖN SÖZ

Metalik malzemelerde oluşan korozyonun büyük oranda mikrobiyolojik korozyondan kaynaklandığının ortaya çıkması nedeniyle mikrobiyolojik korozyon son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. Literatürde mikrobiyolojik korozyon çalışmaları tek bir bakteriyel saf kültür ya da karışık kültür olarak çalışılmış olup, bakterilerin türlerine ve bu bakterilerin fizyolojik gereksinimlerine göre korozif veya inhibitör özelliği olduğu bazı araştırmalarda ortaya konmuştur. Ancak bakterilerin fizyolojik gereksinimleri korozif olma üzerinde belirgin olması ve karışık kültürlerde korozif olmayan bakterilerin varlığında da korozif özellik göstermeleri nedeniyle genel bir tanım içerisinde heterotrofik bakterilerin inhibitör özelliği kaybolmakta ve göz ardı edilmektedir. Bu çalışma ile steril koşullarda heterotrofik özelliğe sahip aynı zamanda spor ve endotoksin özellikte protein oluşturan bakterinin biyofilm tabakasının metal üzerindeki aktivitesi araştırılmıştır.

Tez konusunun belirlenmesinden çalışmaların tamamlanmasına kadar her aşamada bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, her konuda örnek aldığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Korozyon alanında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek bu çalışmanın gerçekleşmesinde destek olan eş danışmanım Doç. Dr. Emel BAYOL'a, ATR-IR analizlerinin yapılmasında yardımcı olan Doç.Dr. Abdullah Ali Gürten'e (Korkut Ata Üniversitesi) teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasında yardımlarıyla yanımda olan arkadaşım İrfan İŞÇİ'ye ve üniversite hayatım boyunca beraber huzur ve uyum içinde çalışma ortamı sağlayan yol arkadaşım ve meslektaşım Hasan Hüseyin KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Hayatımda bir an bile maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren ve beni bu günlere getiren çok değerli AİLEM'e sabır ve anlayışları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya FEB2012/16 numaralı proje ile finansal destek sağlayan Niğde Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR	xv
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	3
2.1 Korozyonun Tanımı ve Mekanizması.....	3
2.2 Korozyonun Önemi.....	6
2.3 Korozyon Çeşitleri	7
2.3.1 Üniform korozyon (genel korozyon)	7
2.3.2 Çukur korozyonu	7
2.3.3 Galvanik korozyon.....	7
2.3.4 Çatlak korozyonu.....	8
2.3.5 Kabuk altı korozyonu.....	8
2.3.6 Filiform korozyon	8
2.3.7 Seçimli korozyon	8
2.3.8 Taneler arası korozyon.....	9
2.3.9 Erozyonlu korozyon.....	9
2.3.10 Aşınmalı korozyon.....	9
2.3.11 Stres korozyonu	9
2.3.12 Yorulmalı korozyon	10

2.3.13 Hidrojen kırılmalığı	10
2.3.14 Kaçak akım korozyonu	10
2.4 Korozyon Hızı.....	12
2.5 Korozyon Hızı Ölçme Yöntemleri.....	12
2.5.1 Kimyasal yöntemler	12
2.5.2 Elektrokimyasal yöntemler	12
2.5.2.1 Tafel eğrilerinin korozyon potansiyeline ekstrapolasyonu yöntemi ...	13
2.5.2.2 Polarizasyon direnci yöntemi.....	14
2.5.2.3 Alternatif akım (A.C.) impedansı yöntemi	15
BÖLÜM III MİKROBİYOLOJİK KOROZYON	16
3.1 Mikrobiyolojik Korozyonun Oluşumu	18
3.2 Korozyon Mekanizmasında Aerobik Oluşumlar	19
3.2.1 Kükürt/Sülfür oksitleyici bakteriler	20
3.2.2 Demir ve mangan yükseltgeyici bakteriler	20
3.2.3 Diğer aerobik bakterilerin rolü	20
3.2.4 Mantarlar.....	21
3.3 Korozyon Mekanizmasında Anaerobik Oluşumlar	21
3.3.1 Sülfat indirgeyici bakteriler (SRB)	21
3.3.2 Metanojenik bakteriler	22
3.3.3 Demir redükleyen bakteriler	22
3.4 Biyofilm	23
3.4.1 Mikroorganizmaların yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumu.....	25
3.4.1.1 Dönüşümlü tutunma.....	26
3.4.1.2 Dönüşümsüz tutunma	26
3.4.1.3 Kolonizasyon	26
3.4.1.4 Kopma	27
3.4.2 Biyofilmlerin korozyonu azaltma etkileri.....	28

3.4.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> 'nin genel özellikleri	30
BÖLÜM IV MATERYAL VE METOT	32
4.1 Materyal	32
4.1.1 Elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan elektrotlar	32
4.1.2 Kullanılan cihazlar	32
4.2 Metot	33
4.2.1 Elektrotların hazırlanması	34
4.2.2 Mikroorganizmaların geliştirilmesi	34
4.3 Deney Ortamları	35
4.3.1 Serum fizyolojik ortamı	35
4.3.2 Serum fizyolojik içerisine 1,0 g/L bakteri inoküle edilmiş ortam	35
4.3.3 Serum fizyolojik içerisine 3,0 g/L bakteri inoküle edilmiş ortam	36
4.3.4 Mikrobiyal sayının belirlenmesi	37
4.4 Elektrokimyasal Ölçümler	37
4.4.1 Alternatif akım (A.C.) impedansı yöntemiyle korozyon direncinin belirlenmesi.....	37
4.4.2 Lineer polarizasyon direnci yöntemiyle polarizasyon direncinin belirlenmesi.....	38
4.4.3 Potansiyodinamik polarizasyon eğrilerinin belirlenmesi.....	38
4.5 Yumuşak Çelik Elektrotların Yüzey Morfolojilerinin ve Yüzey Bileşimlerinin Belirlenmesi	39
4.6 Biyofilm, Vejetatif - Sporlu Bakteri ve Kristal Toksinin Yapısının ATR-IR İle Analizi.....	39
BÖLÜM V BULGULAR VE TARTIŞMA.....	40
5.1 Biyofilm Tabakasındaki Bakteri Sayım Sonuçları	40
5.2 Akım-Potansiyel Eğrileri ve Değerlendirilmesi	42
5.3 Alternatif Akım İmpedans Spektrumu Bulguları ve Değerlendirilmesi.....	49
5.4 Biyofilm, Vejetatif - Sporlu Bakteri ve Kristal Toksinin Yapısının ATR-IR Analizi ile Değerlendirilmesi.....	57

5.5 Yüzey Fotoğraflarının Değerlendirilmesi	61
BÖLÜM VI SONUÇ ve ÖNERİLER.....	68
6.1 Sonuçlar	68
6.2 Öneriler	69
KAYNAKLAR	70
ÖZ GEÇMİŞ	81
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER (MAKALE, BİLDİRİ, POSTER VB.).....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Mikrobiyolojik korozyondan en çok etkilenen sanayi dalları	17
Çizelge 4.1. Çalışma elektrotu olarak kullanılan yumuşak çeliğin kütlece % bileşimi..	32
Çizelge 5.1. Kontrol ve bakteri içeren korozyon hücrelerinde yumuşak çeliğin potansiyo dinamik polarizasyon parametreleri.....	45
Çizelge 5.2. Yumuşak çeliğin dört saat sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektro- kimyasal parametreler.....	51
Çizelge 5.3. Yumuşak çeliğin bir gün sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektro- kimyasal parametreler.....	52
Çizelge 5.4. Yumuşak çeliğin dört gün sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektro- kimyasal parametreler.....	53
Çizelge 5.5. Yumuşak çeliğin yedi gün sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektro- kimyasal parametreler.....	54
Çizelge 5.6. Elektrot yüzeylerinin EDX analiz sonuçları	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Korozyon hücresi.....	4
Şekil 2.2. Korozyon çeşitleri.....	11
Şekil 2.3. Korozyon hızının (i_{cor}) belirlenmesi için anodik ve katodik Tafel eğrilerinin korozyon potansiyeline (E_{cor}) ekstrapolasyonu.....	13
Şekil 2.4. Polarizasyon direncini belirlemek için çizilen bir akım-potansiyel eğrisi	15
Şekil 3.1. Mikrobiyolojik korozyonun oluşum mekanizması.....	18
Şekil 3.2. Biyofilm şekillenmesinde hücre kümelenmesi ve su kanallarının oluşumu.....	27
Şekil 3.3. Biyofilm yaşam döngüsü: (1) tutunma aşaması (2) kolonilerin büyümesi (3) kümelerin ayrılması	28
Şekil 5.1. 1,0 g/L bakteri içeren elektrot yüzeyindeki vejetatif ve sporlu bakteri miktarı	40
Şekil 5.2. 3,0 g/L bakteri içeren elektrot yüzeyindeki vejetatif ve sporlu bakteri miktarı	41
Şekil 5.3. Serum fizyolojikte bakteri sayımları	41
Şekil 5.4. Bakteri sayım sonuçları	42
Şekil 5.5. Dört saat sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri	43
Şekil 5.6. Bir gün sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri.....	43
Şekil 5.7. Dört gün sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri	44
Şekil 5.8. Yedi gün sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri	44
Şekil 5.9. (a) Kontrol, (b) 1,0 g/L bakterili ortam ve (c) 3,0 g/L bakterili ortamı için eşdeğer devre modelleri	50
Şekil 5.10. Yumuşak çeliğin dört saat sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri	50
Şekil 5.11. Yumuşak çeliğin bir gün sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri	52
Şekil 5.12. Yumuşak çeliğin dört gün sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri	53
Şekil 5.13. Yumuşak çeliğin yedi gün sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri	54
Şekil 5.14. Kontrol biyofilmin ATR-IR sonucu	57

Şekil 5.15. Metal yüzeyinde bakterinin oluşturduğu biyofilmin ATR-IR sonucu.....	58
Şekil 5.16. Metal yüzeyinde bakterinin oluşturduğu biyofilmin ve kontrol biyofilmin ATR-IR sonuçları	58
Şekil 5.17. Kontrol ortamındaki elektrodun SEM mikrografı ve EDX spektrumu	61
Şekil 5.18. 1,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 1.gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu.....	61
Şekil 5.19. 1,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 4.gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu.....	62
Şekil 5.20. 1,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 7.gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu.....	62
Şekil 5.21. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 1.gün SEM mikrografları ve EDX Spektrumu.....	63
Şekil 5.22. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 4.gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu.....	63
Şekil 5.23. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 7.gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu.....	64
Şekil 5.24. Kontrol ortamındaki elektrodun yüzey silindikten sonraki SEM mikrografları	66
Şekil 5.25. 1,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun yüzey silindikten sonraki SEM mikrografları	67
Şekil 5.26. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun yüzey silindikten sonraki SEM mikrografları	67

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 4.1. Besiyerine ekilmiş bakterinin görünümü	34
Fotoğraf 4.2. Serum fizyolojik ortamı	35
Fotoğraf 4.3. Serum fizyolojik + 1,0 g/Lbakteri ortamı	36
Fotoğraf 4.4. Serum fizyolojik + 3,0 g/L bakteri ortamı	36
Fotoğraf 4.5. Yüzeye tutunan mikroorganizmaların porselen kapsüle aktarılması	37
Fotoğraf 4.6. HCH Instruments Electrochemical Workstation cihazı ve deney düzeneği	38
Fotoğraf 5.1. Kontrol ve bakteri içeren ortamlar	55

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

β_c	Katodik Tafel sabiti
E_{cor}	Korozyon potansiyeli
i_{cor}	Akım yoğunluğu değerleri
n	Sabit faz katsayısı
R_{ct}	Yük transfer direnci
R_d	Difüz tabaka direnci
R_f	Film direnci
R_{lp}	Lineer polarizasyon direnci
R_p	Polarizasyon direnci
R_{por}	Por direnci
R_s	Çözelti direnci

Açıklama

Kısaltmalar

AC	Alternatif akım
ATR-IR	Attenuated total reflection
CPE	Sabit faz elementi
DPA	Dipikolinik asit
EDX	Enerji dağılımlı X-Işınları analizi
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
EPS	Ekzopolisakkarit
I	Akım
LPR	Lineer polarizasyon direnci
MIC	Mikrobiyolojik korozyon
R	Direnç
R_p	Polarizasyon direnci
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SF	Serum fizyolojik
SRB	Sülfat indirgeyen bakteri

Açıklama

BÖLÜM I

GİRİŞ

Metal ve alaşımların bulundukları ortamla reaksiyona girerek fiziksel, kimyasal ve mekanik değişikliklere uğraması sonucu aşınmasına korozyon denir (Erbil, 1985; Üneri, 1984). Korozyon, katı maddelerin çeşitli etkiler altında dıştan içe doğru ilerlemesiyle meydana gelen bir aşınma olayıdır. Bir metalin korozyonu denilince onun elementel halden, ya çözünmüş ya da yüzey tabakası halinde, bileşik haline geçmek üzere oluşan tepkimelerin tümü anlaşılmaktadır. Metaller termodinamik yasalarına göre doğadaki en kararlı bileşiklerine dönüşme eğilimi gösterirler. Bu dönüşme eğilimi korozyon olayıdır (Erbil, 1985). Korozyon kontrolü günümüzde son derece önemli bir konu olmasına rağmen uygulamada yeteri kadar üzerinde durulmamakta, endüstriyel yatırım ve üretim maliyetlerini etkilemektedir. Korozyon nedeni ile ülkelerin uğradıkları malzeme, enerji, emek ve bilgi kaybının yıllık değeri Gayri Safi Milli Gelir'in % 3,5 ile % 5'i düzeyindedir. Ülkemiz için bu amaçla çok ayrıntılı bir çalışma yapılmamış olmakla birlikte bu kaybın % 4,5 civarında olduğu tahmin edilmektedir (Erbil, 1984). Her yönüyle büyük sorun yaratan korozyonu önleme çalışmaları, özellikle gelişmiş sanayi ülkelerinde, son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Çetin, 2007).

Günümüzde önemi gittikçe artan bir diğer korozyon çeşidi de mikrobiyolojik korozyondur. Biyokorozyon olarak da ifade edilen Mikrobiyolojik Korozyon Etkisi (MIC); mikroorganizmaların varlığında anodik ve katodik reaksiyonları azaltabilmekte veya hızlandırabilmektedir ve son yıllarda giderek önem kazanmaktadır (Mansfeld, 2007; Ghafari vd., 2013; Lee vd., 2006; Moradi vd., 2013). Metalik malzemelerde oluşan tüm korozyon zararının yaklaşık % 20'sini MIC'in oluşturduğunu ileri sürülmektedir (Javaherdashti, 2008). Ortamdaki mikrobiyal gelişme sonucunda aynı mikroorganizmalar, ortam koşullarını değiştirerek korozyona neden oldukları gibi metal yüzeyinde biyofilm oluşturarak metali koruyabilmektedir. (Forte Giacobone vd., 2011; Kahyaoğlu vd., 2008). Özellikle hetetrofik özellikteki bakterilerin metal yüzeyinde oluşturdukları biyofilm tabakası sayesinde korozyona karşı koruyucu olabildikleri saptanmıştır (Ghafari vd., 2013).

Günümüze kadar yapılan mikrobiyolojik korozyon çalışmalarının çoğu, saf ve karışık bakteri kültüründen oluşan biyofilmlerin, demir, bakır, alüminyum ve onların alaşımlarından oluşan elektrotlar üzerine olup, literatürde bakteri konsantrasyonunun artışıyla nasıl bir farklılık olduğuna dair mikrobiyolojik korozyon çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada, yaygın şekilde biyokontrol ajanı olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin iki farklı konsantrasyonunun (1,0 g/L ve 3,0 g/L) yumuşak çelik üzerindeki aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ortamlarına bakterinin iki farklı konsantrasyonu ilave edilmiş ve heterotrofik bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin oluşturduğu biyofilmin yumuşak çelik üzerinde etkisi elektrokimyasal yöntemlerle, değişik bekleme sürelerinde araştırılmıştır. Ortam şartları bozulduğu zaman ölmek yerine endospor üreterek yaşam sürelerini sınırsız bir şekilde uzatan bu bakterinin aynı zamanda protein yapıda kristal toksin de üretmesi nedeniyle metal yüzeyini ne şekilde etkilediği tespit edilmiştir. Artan bakteri miktarlarıyla metal yüzeyindeki değişimlerin neler olabildiği gözlenmiştir. Deneyler sonrasında yüzey morfolojisindeki değişimin incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve yüzeyde oluşan korozyon ürünleri ve değişen iyon konsantrasyonları için ise enerji dağılımlı X-ışınları analizi (EDX) yapılmıştır. Ayrıca biyofilmin yapısında bulunan karışık vejetatif bakteri, spor ve kristal toksin formlarının kimyasal yapıları ATR-IR analiziyle aydınlatılmıştır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

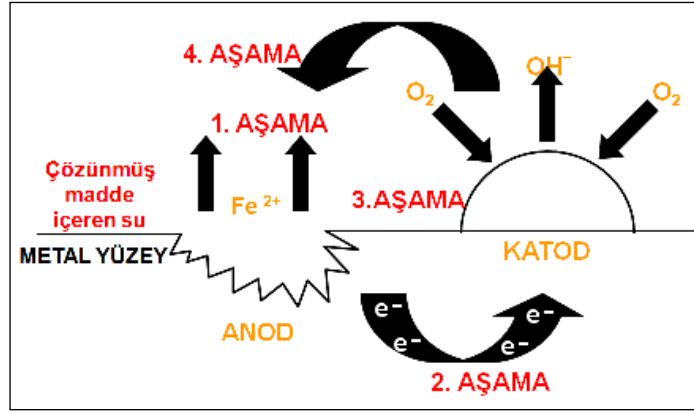
2.1 Korozyonun Tanımı ve Mekanizması

Korozyon; malzemelerin özellikle metal ve alaşımların çevreleri ile kimyasal ve elektrokimyasal tepkimeye girmeleri sonucunda aşınmaları olarak ifade edilir (Shreir vd., 2000). Kimyasal ve elektrokimyasal korozyon olmak üzere iki tür korozyon olayından söz edilir. Kimyasal korozyon, metal ve alaşımların gaz ortamlar içindeki oksitlenmesidir (kuru korozyon). Metal ve alaşımların sulu ortamlar içinde bozunmaları ise elektrokimyasal korozyon olarak adlandırılır (ıslak korozyon) (Thierry ve Sand, 2002; Videla ve Herrera, 2005).

Korozyon, bir korozyon hücresinin oluşması ile başlar ve devam eder. Bir korozyon hücresinde 4 eleman bulunur: anot, katot, elektrolit ve metal yoludur (metalik bağlantıdır) (Erbil, 1985).

Elektrokimyasal korozyon, sıfır değerlikli metalden dış elektron alıcısına elektron transferini sağlayan bir kimyasal reaksiyondur. Bu reaksiyon sonucunda ortamda metal iyonları açığa çıkar ve metal aşınmaya uğrar. Şekil 2.1’de korozyon olayının şematik gösterimine göre bu süreç bir seri yükseltgenme (anodik) ve indirgenme (katodik) tepkimesinden meydana gelir. Elektron transferi anottan katoda doğru olur ve zaman içerisinde anotta metal çözünür (San, 2012).

Katot reaksiyonu anottan gelen bu elektronları kullanarak yürüyebilir. Eğer katotta bu elektronlar kullanılamaz ise, bu durumda anottaki oksidasyon reaksiyonu da yürüyemez. Diğer taraftan eğer katot reaksiyonu için gerekli elektronlar bir dış kaynaktan verilecek olursa, anot reaksiyonu ile elektron üretilmez. Bu durumda anotta yürüyen korozyon olayı da durmuş olur (Karagöz, 2003).

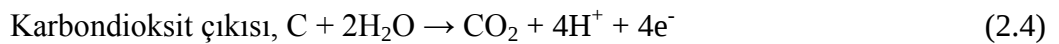
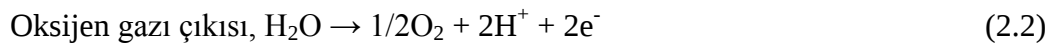
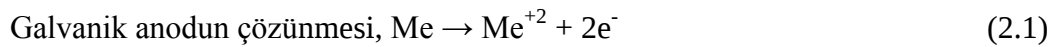


Şekil 2.1. Korozyon hücresi (Kılıçcıoğlu, 2009)

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi aşama 1’de su ile temasta olan metal, bozunmaya başlar ve elektron bırakarak su içerisine geçer. Aşama 2’de elektronlar metal içerisinde katot bölgesine transfer olur. Aşama 3’de katot bölgesinde biriken elektronlar su içerisindeki oksijenle reaksiyona girerek OH⁻ (hidroksit) iyonlarını oluşturur. Aşama 4’de ise su içerisinde çözülmüş olarak bulunan mineraller suyun elektrolit özelliğini arttırdığından, korozyon döngüsünü tamamlayarak açığa çıkan demir iyonlarının OH⁻ iyonları ile birleşmesini sağlar. Böylece korozyon mekanizması tamamlanmış olur. Bu reaksiyonlardan birisi gerçekleşmediği takdirde korozyon olmaz (Kılıçcıoğlu, 2009).

Korozyonda gerçekleşen reaksiyonlar:

Anot reaksiyonları:



Katot reaksiyonları:

Oksijen indirgenmesi (Asitli ortamlarda),



Oksijen indirgenmesi (Nötr ve bazik ortamlarda),



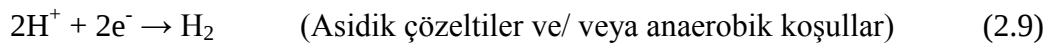
Metal iyonu indirgenmesi,



ve metal çökmesi reaksiyonundan oluşur.



Oksijenli çözeltilerde, katodik reaksiyon oksijenin indirgenmesi (elektron alma) iken oksijensiz çözeltilerde genellikle hidrojenin redüksiyonu şeklindedir (Denklem 2.9).



Anodik reaksiyon (metalin bozunması) hızı zamana bağlı olarak yavaş yavaş azalır. Çünkü oksidasyon ürünleri (korozyon ürünleri) koruyucu tabaka formunda yüzeye tutunup reaktanların difüzyonunun engellenmesini sağlayabilir. Bu koruyucu tabakaların sürekliliği onların kimyasal, morfolojik ve metalin korozyona karşı hassasiyetine bağlıdır. Anodik ve katodik reaksiyonlar elektronötralizasyonu korumak için bir dengede olmak zorundadırlar (Doğruöz, 2008).

2.2 Korozyonun Önemi

Günümüz koşullarında teknolojik olarak önüne geçilemeyen korozyon hasarlarının önlenmesi, zamanında saptanması ve ilerlemesinin kontrol altında tutulması, ayrıca bu hasarların yol açabileceği zarar ve kayıpların en alt düzeye indirilmesi önemlidir. Endüstrinin her dalında kendini gösteren korozyon olayı, atmosfer şartlarına açık tanklar, depolar, direkler, korkuluklar, taşıtlar, yeraltı boru hatları, betonarme demirleri, iskele ayakları, gemiler, fabrikalarda kimyasal madde doldurulan kaplar ve birçok makine parçası ile karşı karşıyadır (Arslan, 2006; İlhan-Sungur, 2007).

Bin bir güçlkle ve çeşitli işlemlerle üretilen metallerin korozyonu, ekonomik açıdan olduğu kadar, insan sağlığı bakımından da oldukça önemlidir. Bilindiği gibi bakırın korozyon ürünlerinin insan sağlığı için çok zararlı olması nedeni ile bakır kaplar, yüzyıllarca kalayla kaplanarak kullanılmışlardır. Korozyon ürünlerinin besin maddelerinin içine sızması oldukça tehlikeli sonuçlar doğurabilir. Korozyon sonucu dayanımını yitirmiş yapıtların, beklenmedik bir zamanda çökmesi de iş kazalarına neden olur. Özellikle nükleer santrallerde nükleer atıkların depolanması, taşınması v.b konularda korozyondan kaynaklanan ve beklenmedik anda ortaya çıkan arızalar geriye dönüşü olmayan felaketlere neden olabilir (Erbil, 1985; Yalçınkaya, 2008).

Korozyonla ömrü kısalmış metalik yapıtların değiştirilmesi ve metallerin korozyon ürünleri halinde doğaya terk edilmesi sonucu boşa giden harcamalar üretim giderlerini de arttırmaktadır. Bu tür giderler gelişmiş sanayi ülkelerince belirlenmiş ve çok büyük rakamlara ulaştığı görülmüştür. Korozyonun ülke ekonomisine zararı sadece Amerikan Endüstrisinde her yıl 150 milyar dolara mal olmaktadır. Türkiye için bu durumun 2–9 milyar dolar arasında değiştiği düşünülmektedir (Erbil, 2012).

Her yönüyle büyük sorun yaratan korozyonu önleme çalışmaları, özellikle gelişmiş sanayi ülkelerinde, son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Ülkemizde de gittikçe önem kazanmaktadır (Erbil, 1985).

2.3 Korozyon Çeşitleri

Değişik metaller ve alaşımlar, içinde bulundukları ortamın özelliklerine göre çeşitli şekillerde korozyona uğrarlar. Bu korozyon türleri birbirlerinden pratik olarak ayırt edilebilmektedir (San, 2012; Sastri, 1998; Çetin, 2007).

2.3.1 Üniform korozyon (genel korozyon)

Geniş bir yüzey ya da bütün yüzeyin her yanında kimyasal ya da elektrokimyasal tepkimenin aynı ölçüde yürümesi ile metal yüzeyinde her tarafta eşdeğer ölçüde oluşan korozyon çeşididir. Korozyon sonucunda metalin kalınlığı yüzeyin her noktasında aynı miktarda azalır. Metal giderek incelir ve zamanla kullanılamaz hale gelir. Atmosfere bırakılan metal genel olarak üniform korozyona uğrar. Mekanik açıdan en az zararlı olan korozyon çeşididir. Metal delinmeden ve kırılmadan uzun süre işletmede kalabilir. Koruma için boyama, ortama inhibitör ilavesi, kaplama ve katodik koruma uygulanabilir (Shreir, 2000; Çetin, 2007; Arslan, 2008; San, 2012).

2.3.2 Çukur korozyonu

Metal yüzeyinin bazı noktalarında çukur oluşturarak meydana gelen korozyon türüdür. Bu tip korozyon olayında anot ve katot bölgeleri birbirinden kesin şekilde ayrılmıştır. Anot, yüzeyin herhangi bir noktasında açılan çukurun içindeki dar bir bölge, katot ise çukurun çevresindeki çok geniş bir alandır. Korozyon sonucu çukur gittikçe büyüyerek metalin o noktadan kısa sürede delinmesine neden olur. Bu nedenle çukur tipi korozyon çok tehlikeli bir korozyon türü olarak kabul edilir (Arslan, 2008; Shreir, 2000).

2.3.3 Galvanik korozyon

İki farklı metalin bir korozif ortama daldırılıp elektriksel bir bağ ile birbirine bağlanması ile ileri gelen bir korozyon türüdür. Bu tip korozyona çok rastlanır. Metallerden daha soy olanı katot, daha aktif olanının anot olmasıyla bir korozyon hücresi meydana gelir. Bu hücrede yalnız anot olan metal korozyona uğrar. Galvanik korozyon için her iki metale de temas eden elektrolitin bulunması gerekir. Metal yüzeyi kuruysa galvanik korozyon söz konusu olmaz (Çetin, 2007; Arslan, 2008; San, 2012).

2.3.4 Çatlak korozyonu

Metal yüzeyinde bulunan çatlak, aralık veya cep gibi, çözeltinin durgun halde kaldığı bölgelere oksijen transferi güçleşir. Bunun sonucu olarak bu bölgeler anot, çatlağın çevresindeki metal yüzeyleri katot olur. Çatlak korozyonu yalnız metal yüzeyinde bulunan bir çatlakta değil, metal olmayan bir malzeme ile metal yüzeyi arasında da meydana gelebilir (Shreir, 2000; Çetin, 2007; Arslan, 2008).

2.3.5 Kabuk altı korozyonu

Metal yüzeyinde korozyon ürünlerinin oluşturduğu veya başka bir nedenle oluşan bir kabuk (birikinti) altında meydana gelen korozyona kabuk altı korozyonu denir. Bu korozyon kabuk altının rutubetli olmasından ve yeteri kadar oksijen alamamasından kaynaklanır. Çünkü kabuk altında sıvı hareketi yoktur. Bu durum çatlak korozyonuna benzer bir ortam yaratır. Kabuğun altı anot, kabuk çevresi ise katot olur. Örneğin, boru yüzeylerini izole etmek amacı ile sarılan cam pamuğu yağış nedeniyle ıslanırsa, bu bölgelerde şiddetli bir kabuk altı korozyonu başlar (Shreir, 2000; Arslan, 2008).

2.3.6 Filiform korozyon

Metal yüzeyinde bulunan boya veya kaplama altında meydana gelen korozyon olayıdır. Filiform korozyon, çatlak korozyonunun bir türü olarak kabul edilebilir. Filiform korozyonu kaplamanın zayıf ve suyu geçirebilen bir noktasından başlar (Shreir, 2000; Arslan, 2008; San, 2012).

2.3.7 Seçimli korozyon

Bir alaşım içinde bulunan elementlerden birinin korozyona uğrayarak uzaklaşması sonucu oluşan korozyon olayıdır. Bu tip korozyona en iyi örnek, pirinç alaşımı içinde bulunan çinkonun bakırdan önce korozyona uğramasıdır (Shreir, 2000; Çetin, 2007; Arslan, 2008; San, 2012).

2.3.8 Taneler arası korozyon

Bir metalin kristal yapısında tanelerin sınır çizgisi boyunca meydana gelen korozyona taneler arası korozyon denir. Taneler arası korozyonun en tipik örneği paslanmaz çeliklerde görülür (Shreir, 2000; Çetin, 2007; Arslan, 2008).

2.3.9 Erozyonlu korozyon

Korozif çözeltilerin metal yüzeyinden hızla akması halinde, korozyon olayı yanında erozyon da meydana gelir. Bu durum korozyon hızının da artmasına neden olur. Akışkanın akış hızı arttıkça erozyon etkisi de artar. Nedeni; oluşan korozyon ürünlerinin akışkan tarafından sürüklenerek götürülmesidir. Erozyonlu korozyon olayı daha çok hareketli akışkanların bulunduğu ekipmanlarda, (borular, dirsekler, valfler, pompalar, santrifüjler, pervaneler, karıştırıcılar, ısı değiştiriciler vb.) söz konusu olabilir (Shreir, 2000; Çetin, 2007; Arslan, 2008; San, 2012).

2.3.10 Aşınmalı korozyon

Birbiri üzerinde kayan iki yüzeyin aşınması ile birlikte yürüyen korozyon olaylarına aşınmalı korozyon denir. İki metal yüzeyi birbiri ile mekanik sürtünme yaptığında çok küçük metal parçalar yüzeyden kopar. Kopan metal parçaları kolayca oksitlenerek korozyona uğrar. Aşınmalı korozyonun oluşması için ortamda suyun bulunmasına gerek yoktur (Shreir, 2000; Çetin, 2007; Arslan, 2008; San, 2012).

2.3.11 Stres korozyonu

Metal yüzeyinde bulunan bir çukur veya çatlak, gerilim altında duyarlı hale gelerek korozyonun başlaması için uygun bir ortam yaratır. Normal halde korozyon ürünleri metal yüzeyinde koruyucu bir kabuk oluşturduğu halde, stres altında iken oluşturamaz. Bunun sonucu olarak korozyon hızla devam ederek metalin o bölgede çatlamasına neden olur. Burada söz konusu olan çekme gerilmesidir. Basınç gerilmesinin stres korozyonuna etkisi yoktur (Shreir, 2000; Arslan, 2008).

2.3.12 Yorulmalı korozyon

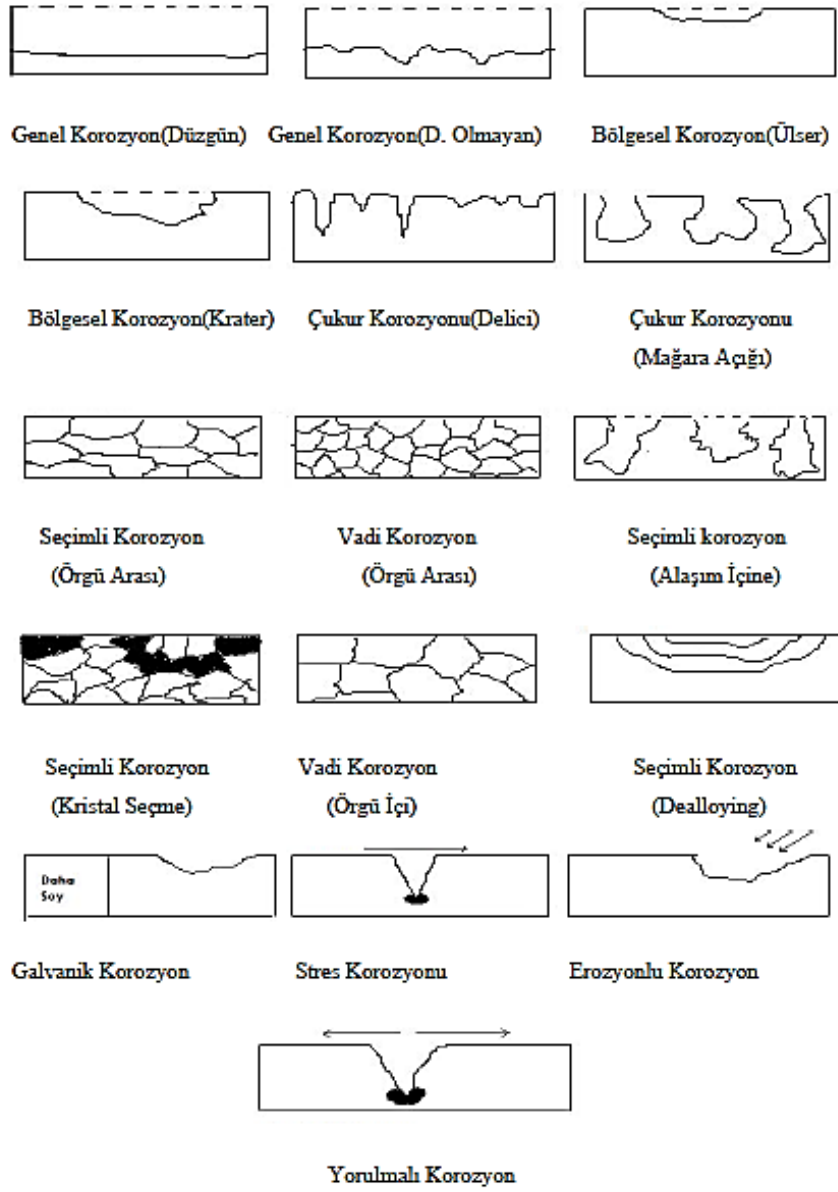
Periyodik olarak yükleme - boşaltma şeklinde etkiyen dinamik bir stres altında bulunan bir metal zamanla yorulur. Yorulmuş halde bulunan metal, normalden daha küçük gerilmelerin etkisi ile çatlayabilir. Yorulma ve korozyonun birlikte etkisi metalin kısa sürede çatlamasına neden olur (Shreir, 2000; Arslan, 2008).

2.3.13 Hidrojen kırılabilirliği

Bir korozyon reaksiyonu sonucu veya katodik koruma uygulamasında metal yüzeyinde hidrojen atomları oluşur. Bu atomların bir kısmı birleşerek H_2 gazını oluşturur ve atmosfere karışır. Bir kısmı da metal bünyesine girerek oradaki boşluklara yerleşir. Daha sonra bu hidrojen atomları da hidrojen molekülüne dönüşerek büyük bir hacim artışına neden olur. Molekül halindeki hidrojenin difüzyon özelliği yoktur. Metal içinde bulunan hidrojen molekülleri metal boşluklarında büyük bir basınç oluşturarak metalin çatlamasına neden olur (Shreir, 2000; Arslan, 2008).

2.3.14 Kaçak akım korozyonu

Doğru akımla çalışan raylı taşıt araçları, yüksek voltajlı elektrik hatları ve kaynak makineleri zemin içine kaçak akım yayarlar. Bu kaçak akım çevredeki metal yapıları etkileyerek korozyona neden olur. Örneğin; yeraltı tren hattına paralel giden bir boru hattında kaçak akım korozyonu meydana gelebilir. Akımın boru hattına girdiği bölgeler katot olur. Bu noktalardan korozyon söz konusu olmaz. Korozyon olayı akımın borudan çıktığı bölgelerde görülür (Shreir, 2000; Arslan, 2008).



Şekil 2.2. Korozyon çeşitleri (Erbil, 2012)

2.4 Korozyon Hızı

Metal ve alaşımların korozyon dayanımları hakkında fikir edinmek için her birinin nicel olarak hesaplanan korozyon hızlarına bakılmalıdır. Korozyon hızı, metalin birim zamandaki çözünme miktarıdır. Bölgesel korozyonun olduğu bölgelerde korozyon hızı, korozyonun derinliğine ilerlemesi biçiminde verilir. Korozyon hızının en kısa sürede ölçülmesi elektrokimyasal yöntemlerle mümkün olmaktadır. Bu yöntemlerde hız, akım yoğunluğu olarak verilmektedir. Elektrokimyasal olarak yürüyen korozyon olayı metal yüzeyinde veya metal/çözelti ara yüzeyinde yürür. Korozyon sırasındaki anodik ve katodik tepkimeler, tepkimenin olduğu yerler arasındaki serbest entalpi farkından dolayı yürür (Akkum, 2006; Yalçınkaya, 2008).

2.5 Korozyon Hızı Ölçme Yöntemleri

Metal ve alaşımlarının korozyon oranları, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemler kullanılarak belirlenebilir (Erbil, 2012; Shreir, 2000).

2.5.1 Kimyasal yöntemler

1. Korozyona uğrayan metal ya da alaşımın kütle kaybının ölçülmesi,
2. Korozi ortamındaki korozyon ürünlerinin miktarının ölçülmesi,
3. Korozyon reaksiyonu esnasında üretilen gazın miktarının ölçülmesi.

2.5.2 Elektrokimyasal yöntemler

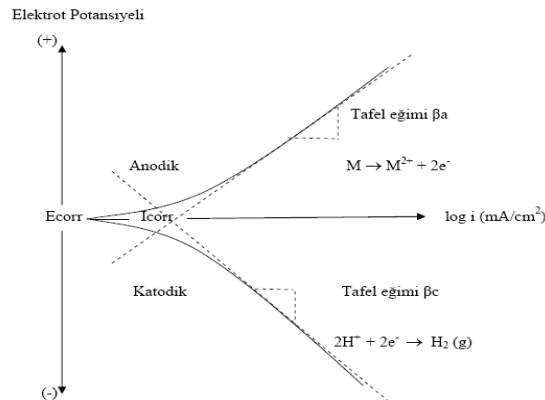
1. Tafel ekstrapolasyonu yöntemi,
2. Polarizasyon direnci yöntemi,
3. Alternatif akım (AC) impedans yöntemi (Mareci vd., 2005)

Elektrokimyasal yoldan korozyon hızının belirlenmesi, korozyona uğrayan metal üzerindeki anot ve katot yüzeyleri arasındaki akımın ölçülmesidir. Dolaylı yoldan korozyon hızı ölçülmesinin özü akım-potansiyel ölçmesidir. Akım ya da potansiyelden biri denetimli olarak uygulanarak diğerinin değişimi kaydedilir. Akımın denetimli uygulanması halinde potansiyel değişimi ölçülür ve yöntem genel olarak "Kronopotansiyometrik Yöntem" ya da

"İntensiyostatik Yöntem" olarak adlandırılır. Akımın değişik hızlarla sürekli değiştirilmesi ve buna karşılık değişen potansiyel değerlerinin sürekli kaydedilmesi de olanaklıdır. Bu durumda yöntemin adı "İntensiyodinamik Yöntem" dir. Potansiyelin denetlenerek akım değişiminin ölçülmesi ise "Kronoamperometrik Yöntem" dir. Bu yöntemin uygulanmasında da uygulanan sabit potansiyel değerlerine karşı kararlı akım değerleri ölçülür. Potansiyelin belirli hızlarda değiştirilerek bunu karşılayan akım şiddetinin ölçülmesi de "Potansiyodinamik Yöntem"dir. Akım-potansiyel eğrisi elde edilirken çalışılacak potansiyel aralığı, korozyon hızının belirleneceği yönetime göre seçilir (Erbil, 1984).

2.5.2.1 Tafel eğrilerinin korozyon potansiyeline ekstrapolasyonu yöntemi

Korozyon potansiyelinden başlayarak anodik ve/veya katodik yönde çizilen yarı-logaritmik akım-potansiyel eğrileri Tafel eğrileri olarak bilinir ve Tafel eğrilerinin çizgisel kısımları geriye doğru ekstrapole edildiğinde korozyon potansiyelinde kesişirler. Korozyon potansiyelinde kesiştikleri noktanın belirlendiği akım korozyon akımıdır. Tafel eğrilerinin ekstrapole edilecek doğrusal kısmı çok önemlidir ve bu bölgenin güvenli olması için, korozyon potansiyelinden en az 40–50 mV sonra başlaması ve akımın en az 10 kat artmasına kadar sürmelidir. Akımın 10 kat artmasını sağlayacak potansiyel aralığı eğrinin doğruluğu içindir. Korozyon potansiyeli dolayındaki potansiyel aralığı ise; anodik eğrideki katodik akımın ya da katodik eğrideki anodik akımın katkısını en aza indirmek içindir. Tafel eğrilerinin ekstrapolasyonu yöntemi, aktivasyon denetimli tepkimeler için geçerlidir. Difüzyon denetimli tepkimelerde, korozyon akımı katodik sınır akımı büyüklüğündedir. Metalin pasif olduğu koşullarda ise korozyon akımı pasiflik akımına eşittir. Sözü edilen son iki durumda korozyon hızının ölçülmesi için, sırasıyla katodik sınır akımının ya da pasiflik akımının ölçülmesi yeterlidir (Erbil, 1984).



Şekil 2.3. Korozyon hızının (i_{cor}) belirlenmesi için anodik ve katodik Tafel eğrilerinin korozyon potansiyeline (E_{cor}) ekstrapolasyonu (Erbil, 1984)

2.5.2.2 Polarizasyon direnci yöntemi

Elektrokimyasal yöntemlerle korozyon hızının belirlenmesi için Tafel eğrilerinin korozyon potansiyeline ekstrapolasyonu yöntemi, laboratuvar koşullarında kolayca uygulanabildiği halde uygulamada bazı zorlukları vardır. Akım-potansiyel eğrilerinin çizimi için gerekli düzen kurulsa bile, eğrilerin çizimi sırasında büyük akım geçeceğinden işletme koşullarında doğrudan uygulanması sakıncalıdır. Oysa Stern ve Geary'ye göre akım-potansiyel eğrilerinin korozyon potansiyeli dolaylı çizgiseldir. Çizgisel olan $\pm 7\text{mV}$ 'luk aralığın eğimi ile korozyon akımı arasında aşağıdaki bağıntı vardır (2.10):

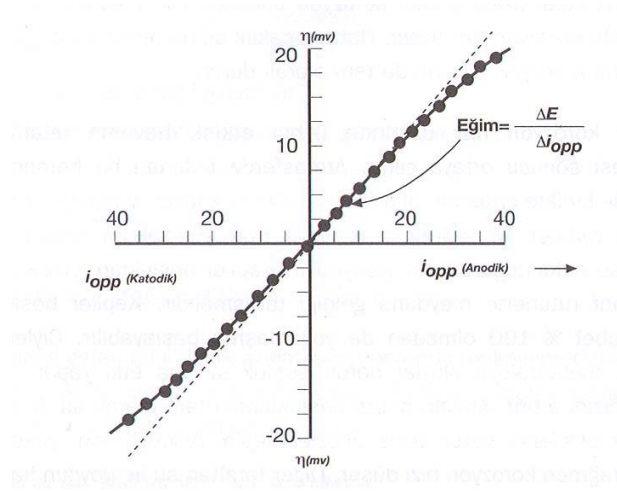
$$\Delta E / \Delta i = (1/i_{\text{kor}}) [(b_a \cdot b_c) / 2,3(b_a + b_c)] \quad (2.10)$$

$$B = (b_a \cdot b_c) / 2,3(b_a + b_c) \quad (2.11)$$

$$R_p = (1/i_{\text{kor}}) \cdot B \quad (2.12)$$

$$i_{\text{kor}} = B \cdot R_p^{-1} \quad (2.13)$$

Bu bağıntıda R_p , polarizasyon direnci (2.12), B ise anodik (b_a) ve katodik (b_c) Tafel eğimlerine bağlı bir sabittir (2.13). $\Delta E / \Delta i$ ise akım-potansiyel eğrisinin eğimidir (2.10). Polarizasyon direnci yöntemiyle korozyon hızı belirlenmesi çok kolay ve hızlı bir yöntemdir. Deney elektrotu ile karşılaştırma elektrotu arasında ilk ölçülen potansiyel, korozyon potansiyelidir. Bir üreteçten değişken bir direnç yardımıyla, deney elektrotu ile karşı elektrot arasına belirli akımlar uygulanır ve her akım uygulanmasından sonra potansiyelin korozyon potansiyelinden sapan miktarı kaydedilir. Korozyon potansiyeli, sıfır noktası kabul edilerek 2 ya da 3 nokta daha belirlenirse (yaklaşık 10 mV aralığında) hepsinden geçen ortalama bir doğru çizilerek eğimi hesaplanır. Aynı işlem hem anodik hem de katodik yönde uygulanır. Hesaplanan polarizasyon direnci, çizilen eğrinin eğimidir. Bu nedenle iki yönde de aynı potansiyel aralığında çalışma zorunluluğu yoktur (Erbil, 1985).



Şekil 2.4. Polarizasyon direncini belirlemek için çizilen bir akım-potansiyel eğrisi (Erbil, 1985)

2.5.2.3 Alternatif akım (A.C.) impedansı yöntemi

Korozyon hızı belirleme yöntemlerinden birisi de elektrodun yüzey yapısını bozmayan elektrokimyasal bir teknik olan alternatif akım (AC) impedans tekniğidir. AC impedans yöntemi ile metal yüzeyine uygulanan küçük genlikli alternatif akım, yüzey yapısını fazla değiştirmeyeceğinden daha doğru sonuç vermesi beklenmektedir. Ayrıca yüksek dirençli ortamlarda da ölçme yapılabilmesi, diğer yöntemlere göre bir üstünlük sağlamaktadır. Yöntemin özü, metal/çözelti ara yüzeyinde oluşan çift tabakaya uygulanan alternatif akım impedansının ölçülmesine dayanmaktadır. Elektrot yüzeyine değişik frekans aralığında küçük genlikli, düşük frekanslı alternatif akım belli sürelerde uygulanmaktadır. AC yöntemiyle değişik ortamlarda elde edilen kompleks diyagramlar incelendiğinde genel olarak yarım daireden sapan koniklerin elde edildiği görülür. Sapma daha çok düşey eksen boyunca gösterilen kompleks impedans üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yapay elektronik bir eşdeğer devre yardımıyla elde edilen kompleks diyagramlar teoriden beklenen yarım daire biçimine tam uymakta, alüminyum ile elde edilen diyagramlar ise yarım daireye çok yaklaşmaktadır. Yapay hücrelerde gerçek kondansatörler kullanılmakta, alüminyum yüzeyinde oluşan ince oksit filmi de gerçek bir kondansatöre yakın özellik göstermektedir. Alüminyum yüzeyindeki ince oksit filmi dışında kalan poröz oksit ve difüz tabakanın toplam kapasiteye katkısı önemsiz kalmaktadır. AC impedans spektroskopisi, laboratuvar koşullarında yaygın bir şekilde, korozyon hızının belirlenmesi yanında, çukur korozyonu, kaplama ve korozyon inhibitörlerinin etkilerinin incelenmesinde sıkça kullanılan bir tekniktir (Erbil, 1988).

BÖLÜM III

MIKROBİYOLOJİK KOROZYON

Mikrobiyolojik korozyon (MIC), mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu hem doğrudan hem de dolaylı olarak meydana gelen korozyon ile metalin bozunması olayıdır. MIC ayrıca biyolojik korozyon, biyolojik olarak desteklenen korozyon ve biyokorozyon olarak da adlandırılmaktadır (Borenstein 1994).

Mikroorganizmaların mikrobiyal aktiviteleri, korozyon reaksiyonlarına yol açabilmekte veya arttırabilmektedir (Ford ve Mitchell, 1990). MIC'in ekonomik ve çevresel açıdan önemli olması, biyokorozyon mekanizmalarını açıklayan kapsamlı çalışmalar yapılmasını sağlamıştır (Beech, 2004). MIC, petrol ve gaz endüstrisinde kullanılan boru hatlarında, gemi karınalarında, uçakların mazot tanklarında, soğutma kulelerindeki ısı değiştiricilerde, lağım ana borularında ve enerji endüstrisindeki soğutma sistemlerinde çok büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Thierry ve Sand, 2002). Flemming (1996), metalik malzemelerde oluşan tüm korozyon zararının yaklaşık olarak % 20'sini MIC'in oluşturduğunu ileri sürmektedir. Bununla birlikte Booth (1964), İngiltere'de, borularda oluşan korozyonun % 50'sinin MIC'den kaynaklandığını ileri sürmüş ve bu zararın yılda yaklaşık olarak 300–500 milyon sterlin olduğu hesaplanmıştır (Hamilton, 1985). Amerika Birleşik Devletleri ise mikrobiyolojik korozyon hasarına yıllık olarak yaklaşık 2 milyar dolar harcamaktadır (Thierry ve Sand, 2002; Javaherdashti, 2008).

MIC, özellikle enerji ve petrol sanayinde, mikrobiyolojik korozyondan kaynaklanan yangın problemleri gibi zaman zaman ciddi hasarlarla sonuçlanan birçok soruna yol açmaktadır. Çizelge 3.1'de MIC'den en çok etkilenen sanayi alanları verilmiştir. Mikrobiyolojik korozyonda mikroorganizmaların gelişmesi sonucu asitler ve sülfürler gibi bazı bileşenler ortaya çıkmaktadır. Bu bileşenler de korozyon hızını artırıcı rol oynar. Bazı durumlarda mikroorganizmalar doğrudan doğruya elektrokimyasal tepkimelere de katılabilir. Mikrobiyolojik korozyon, metal yüzey, abiyotik korozyon ürünleri, bakteri hücreleri ve onların metabolitleri (organik, inorganik asitler ve amonyak, hidrojen sülfür gibi uçucu bileşikler) arasındaki birbirini destekleyen etkileşimler sonucu ortaya çıkmaktadır. Mikroorganizmaların fiziksel varlığı ve metabolik aktiviteleri, yüzeylerin elektrokimyasal özelliklerini değişikliğe uğratırlar.

Metal yüzeylere tutunan bu mikroorganizmalar çoğalır ve koloni oluştururlar. Bunun sonucunda da yüzeylerde lokal anotlar, katotlar ve farklı konsantrasyon hücrelerini meydana getirerek MIC oluşumuna neden olurlar (Kjellerup vd., 2005).

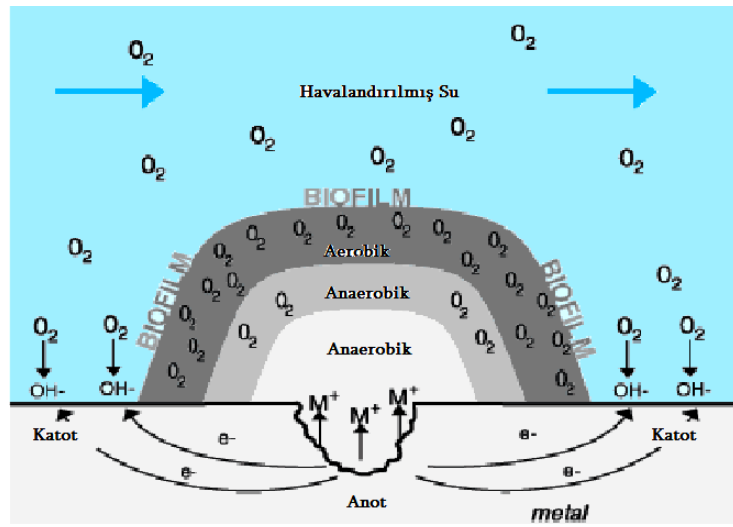
Çizelge 3.1. Mikrobiyolojik korozyondan en çok etkilenen sanayi dalları (Richard, 2005)

Alanlar	Sorunlu Alanlar	Mikroorganizmalar
Petrol hatları depolama tankları (su, atık sular, gaz, yağ)	Durgun alanların iç tarafları Yanan petrol hatlarının ve tanklarının dış tarafı özellikle ıslak nemli kil ve balçık bölgelerinde	Aerobik ve Anaerobik asit üretenler Sülfat indirgeyen bakteriler Demir/Mangan oksitleyici bakteriler Kükürt oksitleyici bakteriler
Soğutma Sistemleri	Soğutma kuleleri Isı değiştiriciler Depolama tankları	Aerobik ve Anaerobik bakteriler Metal oksitleyici bakteriler Suyun yüzeyinde duran ince bakteri tabakaları Algler Mantarlar
Rıhtım, iskele ve diğer sucul yapılar	Sıçratma zonları Deniz alçalması alanlarında	Sülfat indirgeyen bakteriler
Uzun yakıt tankerleri	Durgun alanları	Mantarlar
Enerji üreten tesisler	Isı değiştiriciler	Anaerobik bakteriler Sülfat indirgeyen bakteriler
Yangın söndürücü sistemler	Durgun alanlar	Anaerobik bakteriler Sülfat indirgeyen bakteriler

3.1 Mikrobiyolojik Korozyonun Oluşumu

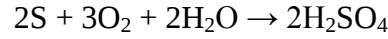
Mikrobiyolojik korozyon, normal korozyon olaylarından farklı yapıda olmayıp bazı mikroorganizmaların korozyon hızını artırması ile gerçekleşmektedir. Biyokorozyon üç faktörün gelişmesiyle ortaya çıkar. Bu faktörler;

1. Sulu bir ortam
2. Ortamın etkisinde kalmış bir malzeme
3. Çeşitli türdeki mikroorganizmalar (Feron, 2005)

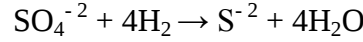


Şekil 3.1. Mikrobiyolojik korozyonun oluşum mekanizması (Borenstein, 1994)

Korozyona neden olan biyofilm bağımsız organizmaların, genel olarak da mikroorganizmaların, yüzeyde birikmesiyle gelişme göstermekte ve sonuçta ortamdaki oksijen konsantrasyonu içinde metal ve biyofilm tabakanın etkileşimleri biyokorozyon oluşumuna neden olmaktadır. Biyokorozyon, bir metalin elektrokimyasal olarak çözünmesidir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar Şekil 3.1’de olduğu gibi, metalle yüzeydeki biyolojik yapının karşılıklı etkileşimi ile birçok aşamada gerçekleşmektedir (Kurugöl, 2007). Mikroorganizmaların gelişmesi sürecinde asitler ve sülfürler oluşur. Sülfür bileşikler bakteriler tarafından elementel kükürt veya sülfata kadar oksitlenebilir. Bazıları da bunun tersi reaksiyonu gerçekleştirir. *Thiobacillus thiooxidans* gibi bazı aerobik bakteriler, her çeşit sülfür bileşimini ve elementel kükürdü sülfata oksitler. Reaksiyon sonucu sülfürik asit oluşur (San, 2012).



Anaerobik bakterilerden olan *Desulfovibrio* hidrojeni kullanarak sülfatı indirger.



Oluşan sülfür iyonları H_2S haline dönüşerek korozyon hızını artırıcı etki yapar. Bu nedenle mikrobiyolojik korozyon ürünlerinde daima sülfür bileşiklerine rastlanır. Normalde korozyon olayının rastlanmadığı yerlerde mikrobiyolojik korozyona çok ender rastlanır (San, 2012).

Biyokorozyonun ilk aşaması zorunlu olarak metal yüzeyinde gelişen film formasyonundan başlamaktadır. Bununla birlikte bir biyofilm tabakası her zaman için bir biyokorozyon nedeni değildir. Biyotabaka ile biyokorozyon arasında her zaman bir ilişki de olmayabilir. Korozyona neden olan bakteriler farklı metabolik özelliklere sahiptir. Bununla birlikte ortamın fizikokimyasal özellikleri de biyokorozyon aktivitelerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Farklı ortamların sahip oldukları sıcaklık, pH ve oksijen değerleri, içerdikleri organik ürünler, nem miktarları gibi fizikokimyasal kompozisyonlar mikrobiyolojik formasyonların gelişimlerinde etkili olmaktadır. Hemen hemen tüm metaller steril olmayan ortamlarda biyolojik bir film tabakasıyla kaplanırlar ve zamanla biyokorozyon mekanizmaları geliştirirler. Metal yüzeyine mikroorganizmalarca oluşturulmuş ve çeşitli bölgelere dağılmış biyofilm koloni formasyonları, yüzeyde farklı havalanma bölge şekilleri oluştururlar. Dolayısıyla bu bölgeler ile koloniler arasında farklı oksijen derişimleri meydana gelir ve kolonilerin merkezinde de metale temas sonucu oksitlenme meydana gelir. Metalin iki bölgesindeki bu farklı oksijenlenme, potansiyel elektrik farklılığına ve korozyon akımına neden olur (Kurugöl, 2007).

3.2 Korozyon Mekanizmasında Aerobik Oluşumlar

Aerobik korozyon oluşumlarında oksijen, hidroksitleri oluşturmak için katodik bölgelerde elektron alıcısı gibi davranır. Aerobik korozyon mekanizması üzerine mikroorganizmaların etkisi hakkında sınırlı ölçüde bilgi bulunmaktadır (Ford ve Mitchell, 1990).

3.2.1 Kükürt/ Sülfür oksitleyici bakteriler

Kükürt / Sülfür oksitleyici bakteriler, aerobik bakterilerdir. Bu bakteriler, elementel kükürtü veya kükürt içeren bileşikler yükseltgeyerek sülfürik asit oluşumuna yol açarlar. Sülfürik asit, pek çok metal için korozyon açısından oldukça tehlikelidir. *Thiobacillus*, *Thiodendron*, *Beggiatoa* ve *Sulfolobus* bilinen aerobik kükürt yükseltgeyici bakterilerdir. Beton tesisler ve borular, genellikle *Thiobacillus* bakterisinin üremesiyle hızla korozyona uğrarlar (Roberts vd., 2002; Feron, 2005).

3.2.2 Demir ve mangan yükseltgeyici bakteriler

Demir ve/veya mangan yükseltgenmesi, hem oksijensiz (anaerob) hem de oksijenli ortamda (fakültatif aerob) yaşayabilen mikroorganizmalarca gerçekleştirilir. Bu grup bakteriler mangan (Mn-IV) ve demiri (Fe-III) indirgemektedirler (Little vd., 1998). *Gallionella*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix* ve *Crenothrix* gibi demir ve mangan yükseltgeyici bakteriler ya çözeltide çözünmüş olarak ya da yüzeyde çökelek halde bulunan Fe^{+2} iyonunu Fe^{+3} iyonuna yükseltgerler. Oluşan Fe^{+3} iyonu, klorür iyonlarının bulunduğu ortamda demir klorür oluşturur ve demir klorür oldukça koroziv bir bileşik olup ortamın pH'sının yaklaşık 1 gibi çok düşük seviyelere inmesine sebep olur. Bir kısım Fe^{+2} iyonu ve oluşan Fe^{+3} iyonu da, aerobik bakteri şartlarında oksijenin indirgenmesi sonucu oluşan OH^- iyonu ile $FeO(OH)$, $FeO(OH)_2$ gibi pas denilen pasif korozyon ürününü de oluşturmaktadır. Ayrıca bu bakteriler Mn^{+2} iyonunu da Mn^{+4} iyonuna yükseltgeyebilir ve böylece metal yüzeylerde mangan dioksit (MnO_2) oluşumuna sebep olurlar. Bu tip bakterilerin sebep oldukları birikimler klorür açısından zengindir ve tankların, boruların alt yerlerinde bulunurlar (Javaherdashti, 2008).

3.2.3 Diğer aerobik bakterilerin rolü

Açıklanan bakterilerin yanı sıra, *Pseudomonas* cinsi mikroorganizmaların da korozyona yol açtığı çalışmalarla gösterilmiştir. Bazı *Pseudomonas* türleri Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyerek, koruyucu Fe^{+3} tabakasının çözünmesine ve çözünür özellikte olan Fe^{+2} bileşiklerinin oluşumuna yol açarlar. *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Aerobacter* ve *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar metal yüzey üzerinde kolonize olarak yapışkan bir tabaka oluştururlar ve ortamdaki oksijeni tüketirler (Iverson, 1987).

Yapışkan tabaka, oksijenin alt kısımlara ulaşmasını engellediği için, korozyona yol açan oksijen konsantrasyon hücresi oluşmaktadır. Ayrıca oksijensiz ortam ve mikrobiyal korozyon olayında önemli rol oynayan anaerobik SRB'nin çoğalmasına da olanak sağlamaktadır (Iverson, 1987).

3.2.4 Mantarlar

Mantarlar, metabolik aktiviteleri sonucu ürettikleri organik asitler ile ortamın pH değerini düşürerek korozyona neden olabilmektedirler. *Hormoconis resinæ* ve *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi mantarların bazı türlerinin, benzindeki hidrokarbonları kullanarak organik asit ürettikleri ve alüminyum uçak benzin depolarında ve benzin saklama tanklarında korozyona yol açtıkları rapor edilmiştir. Ayrıca klorlu çözeltilerdeki alüminyum ve alaşımları için en etkili korozyon inhibitörü olarak düşünülen nitrat anyonları, *H. resinæ* türü mantarlar tarafından tüketildiği için çözeltideki korozyon inhibitörü seviyesi azalır ve klorür/inhibitör oranı artar. Bu durum 2024 ve 7075 alüminyum alaşımlarında oyuklanma tarzında korozyona neden olmaktadır (Bento ve Gaylerde, 1996).

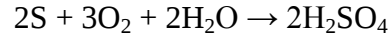
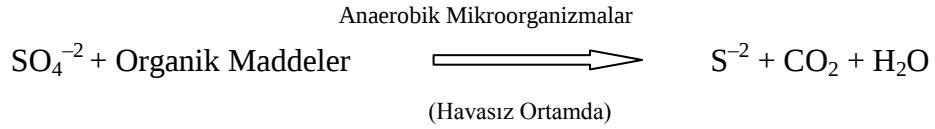
3.3 Korozyon Mekanizmasında Anaerobik Oluşumlar

SRB, anaerobik korozyon ile ilişkili olan ekonomik açıdan en önemli ve en yaygın mikroorganizma grubu olarak kabul edilmektedirler (Ford ve Mitchell, 1990; Lee vd., 1995). Anaerobik biyokorozyonda rol oynayan diğer mikroorganizma grupları ise; metan üreten bakteriler, demir redükleyen bakteriler ve hidrojen üreten bakterilerdir (Boopathy ve Daniels, 1991).

3.3.1 Sülfat indirgeyici bakteriler (SRB)

Sülfat indirgeyici bakteriler, ihtiyaç duydukları enerjiyi organik besin maddelerinden elde ederler. Genellikle anaerobik bakteriler olup, oksijene alternatif olarak sülfatı kullanırlar ve sülfatı sülfüre indirgerler. Bu tür bakteriler, toprak ve her türlü suda yaşayabilirler (pH 5 – 9,5 arasında). En çok tercih ettikleri yerler, uzun süre kapalı kalan boru içleri gibi, suyun durgun olduğu bölgelerdir (Javaherdashti, 2008).

Mikrobiyolojik korozyonda en çok karşılaşılan SRB türü bakteriler: *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* ve *Desulfotomaculum* bakterileridir (Borenstein, 1994). SRB'ler oksijensiz ortamlarda bulunan ve gelişen, sülfat, sülfür, tiyosülfat gibi kükürt bileşiklerini indirgeyen bakterilerdir. Genel olarak elektron alıcısı gibi sülfatları, elektron verici gibi yüzeydeki birçok kalıntıları yada karbon kaynaklarından; asitleri (laktik, fumarat, asetat), hidrojeni, alkollerden (metanol, etanol, propanol), doymuş hidrokarbürlerin büyük moleküllü yağ asitlerini, basit aromatik bileşiklerini (fenol, benzen) ve şekerleri (fruktoz) kullanmaktadır (Chevrou ve Rodiere, 2004; Haras, 2005). Sülfat indirgeyen bakteriler; korozyon ortamındaki hidrojen iyonunu (hidrojenaz enzimi ile), sülfatı sülfüre çevirmek için kullanır ve böylece yüzeyin katodik depolarizasyonuna sebep olurlar. SRB'lerin etkisi sonucu oluşmuş temel korozyon ürünleri demir sülfür bileşiğidir (FeS). S^{-2} bakteri metabolizmasından ve Fe(II) metal yüzeyinin anodik reaksiyonundan ileri gelmektedir. Metal yüzeyinde FeS'ün varlığı galvanik bir hücre yaratmaktadır ki, burada Fe sistemin anodu, FeS ise katodunu oluşturmaktadır. Bazı durumlarda (hidrojene bağlı olarak) katodun etkinliğinde ve korozyonda azalmalar görülebilir (Kurugöl, 2007).



3.3.2 Metanojenik bakteriler

Metanojenik bakteriler, anaerobik koşullarda H_2 'i elektron vericisi, CO_2 'yi ise elektron alıcısı olarak kullanarak metanı (CH_4) oluştururlar. Genellikle metanojenik bakteriler SRB'ye yakın yerlerde bulunurlar ve biyokorozyonda rol oynarlar (Madigan vd., 2002; Javaherdashti, 2008).

3.3.3 Demir redükleyen bakteriler

Demir redükleyen bakteriler Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgemektedirler. Fe^{+3} , düşük pH değerleri haricinde çözünmez formdadır ve Fe^{+3} tuzları metal yüzeyini kimyasal aktivite

yüzünden daha ileri korozyondan korumaktadır. Fe^{+2} tuzları çoğunlukla çözülebilir özelliktedir ve bu nedenle Fe^{+3} tuzlarının redüksiyonu metal yüzey üzerindeki koruyucu Fe_2O_3 filminin ortadan kalkması ile sonuçlanmaktadır. Böylece demir redükleyen *Pseudomonas* ve *Shewanella* cinsi bakteriler dolaylı olarak korozyonun ilerlemesine yardımcı olmaktadır (Madigan vd., 2002).

3.4 Biyofilm

Biyofilm, elverişli ortam koşullarında birbirlerine ve/veya bir yüzeye yapışmış, organik polimerik matriks içerisine gömülü halde yaşayan mikroorganizma topluluğudur (Costerton vd., 1995; Dunne, 2002; İlhan-Sungur, 2007).

Biyofilmler, suyla temas eden bütün yüzeylerde meydana gelebilmektedir. Sudaki bakterilerin % 99'u biyofilm içinde, yani sesil formda yaşamaktadırlar. Biyofilm heterojenik bir yapıya sahiptir ve içeriği de çevresel koşullara ve varolan mikroorganizmalara bağlı olarak değişmektedir (Beech vd., 2000).

Biyofilm tabakası mikroorganizma, yüzey ve matriks olarak üç temel bileşenden oluşmaktadır. Eğer bu temel bileşenlerden biri olmazsa biyofilm tabakasından söz edilemez. Sözü edilen matriks, yani EPS, terminolojide “hücre dışı polimerik maddeler”, “ekzopolisakkaritler” ya da “ekzopolimerler” terimlerinin karşılığıdır. EPS, biyofilm tabakasında bakterilerin hücre dışına salgıladıkları ve aracısız olarak tüm katı yüzeylere tutunmayı sağlayan maddelerdir (Zang vd., 1999).

Su, biyofilmin en önemli bileşenidir ve toplam matriksinin % 97'sini teşkil etmektedir. Su, bakteri hücrelerinin EPS'si içinde bağlanabilir veya bir çözücü olarak var olabilir. Bu nedenle biyofilm tabakası jelatinimsi ve kaygan yapıdadır (Sutherland, 2001). Su tutma özelliğinden dolayı biyofilm, mikroorganizmaları kuruluğa karşı korur. Biyofilimde EPS ve mikroorganizmaların yanısıra iyonlar da bulunabilmektedir. Herhangi bir biyofilmin spesifik içeriği, biyofilmdaki mikroorganizmaların genotipine ve fizyolojik durumlarına, ortamın türüne, suyun akış dinamiğine, yüzeye ve fiziksel koşullara göre değişmektedir (Allison, 2003; İlhan-Sungur, 2007).

EPS, biyofilm kompleksinde iskelet vazifesi gördüğü için biyofilmin en temel yapısal bileşenidir. EPS polisakkarit, lipid, nükleik asit ve proteinden oluşmaktadır. Bu makromoleküllerin EPS'deki miktarları, bakterilerin türüne ve büyüme koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte EPS'de en fazla miktarda karbonhidratlar bulunmakta olup, EPS'nin % 65'ni teşkil etmektedirler (Beech ve Cheung., 1995).

Polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler, lipidler ve diğer maddelerden oluşan bu hücre dışı matriksin, bakteriyel hücreleri biyofilm tabakası içinde bir arada tutmak, biyofilme dayanıklılık ve esneklik sağlamak, biyofilmin büyümesi için gerekli besinleri yakalamak ve hücreleri kurumadan ve anti mikrobiyal ajanların etkilerinden korumak gibi çok önemli görevleri olduğu kabul edilmektedir (Beech ve Cheung, 1995; Zhang ve vd., 1999). EPS'nin bir diğer önemli özelliği de metal iyonları ile kompleks oluşturma yeteneğidir (Mittleman ve Geesey., 1985).

Bakteriler, suda serbest dolaşmak yerine bir yüzeye tutunmayı tercih eder. Bu durumun sebebi, tutunduğu yüzeyin besin kaynağı olması, suyun akışıyla tutunduğu yere besin maddesi taşınması ya da su akışı sayesinde bol oksijen bulunması olabilir (Melo ve Bott, 1997). Biyofilm tabakasının oluşumunda yüzeye ilk tutunan ve çoğalan bakterinin türü de önemlidir. Yerleşik bir biyofilm tabakasının varlığı yeni bakteri türlerinin girişini engellemektedir. Çünkü yerleşik mikroorganizmalar elektrik yükü farklılığı, besin rekabeti ya da saldırgan kimyasal maddeler ile diğer mikroorganizmaları uzaklaştırabilir (Pompermayer ve Gaylarde, 2000).

Mikroorganizmaların bazıları yüzeylere tutunurken, bazıları da su içinde serbest halde dağılmış olarak bulunurlar. Serbest formdaki mikroorganizmalar hareketlerini yavaşlatarak yüzeye yaklaşırlar, yüzeye veya yüzeye daha önceden tutunmuş olan organik maddelerle ya da diğer mikroorganizmalarla geçici bir ilişki kurarlar. Bu geçici ilişki, bakterilere yüzeyde kendilerine uygun bir yer bulma olanağı sağlar. Yüzeye tutunan bakteriler, hücre dışına salgıladığı polimerlerle diğer mikroorganizmaların da o bölgeye yapışmasını sağlayarak biyofilm tabakasını oluşturmaya başlar. EPS, bakterileri sarar. Onları antimikrobiyal ajanlardan, besinsizlikten, pH dalgalanmalarından, oksijen radikallerinden, toksinlerden, bakteriyofajlardan ve protozoonlardan korur, hücreleri bir arada tutar, iz miktardaki organik molekülleri, iyonları ve besin maddelerini biriktirir (Cloete ve Brözel, 1992; Codony vd., 2002; Chapman, 2003).

Ayrıca tabaka, zengin gen havuzu sayesinde kolay gen transferi, mekanik destek sağlama ve kanallar yardımıyla hızlı madde transferi gibi avantajlar sağlar. EPS tabakası negatif yüklü olup, bir iyon değişim maddesi gibi davranarak büyük miktarlarda besin moleküllerini kendilerine bağlar (Anwar vd., 1992). EPS tamamen geçirimsiz bir tabaka değildir, ancak kimyasal ajanların difüzyonunu yavaşlatır ve konsantrasyonlarını düşürür. EPS birikmesi, su ile temasta bulunan yüzeylerde kirliliğin en önemli basamağıdır. Olgun biyofilm tabakasında mikrobiyal çoğalma hiçbir zaman durmaz. Özellikle suyun akış gücü ile kopan hücre ya da hücre birliklerinin yeri hemen doldurulur. Özellikle besinin bol bulunduğu sularda biyofilm tabakası çok hızlı gelişirken, düşük düzeyde besin bulunan sularda bu süreç yavaştır, çünkü düşük düzeyde besin maddesinin bulunduğu ortamda bakteri üremekten çok hücre canlılığının devamı için mücadele eder. Biyofilm tabakası ısı değiştiricilerde, su ve yakıt ileten borularda, gemi karinalarında, diş ünitelerinde, bina duvarlarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde biyofouling olarak da adlandırılan istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara yol açarak önemli derecede ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Gomez-Suarez vd., 2002; Cloete, 2003; Türetgen, 2004).

3.4.1 Mikroorganizmaların yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumu

En basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Yapılan birçok çalışmada, biyofilmlerin biyolojik dönüşümlerini tamamladıkları gösterilmiştir (O'Toole vd., 2000). Biyofilmin oluşum basamaklarını; tutunma evresi, olgunlaşma evresi ve kopma evresi oluşturur (Wood vd., 2011). Tutunma evresi mikroorganizmanın yüzeye yaklaşmasıyla başlamaktadır. Ancak bunun öncesinde yüzeyin yapışmaya uygun hale gelmesi gerekmektedir. Bu aşamada sudaki cansız parçacıklar, elementler, organik ve/veya inorganik moleküller yüzeye yapışır ve ince bir film tabakası oluşturarak mikrobiyal biyofilm oluşumu için yüzeyi hazır hale getirir. Bu film tabakası malzemenin yüzey özelliklerini değiştirerek mikrobiyal tutunmayı kolaylaştırır. Mikroorganizmalar difüzyon, Brown hareketi, aktif hareket ya da su akışı ile tutunacağı yüzeye yaklaşır flagella, fimbria veya kapsül gibi dış yapıları ile yüzeye tutunmaya çalışırlar (Melo and Bott, 1997). Tutunma zamana bağlı bir oluşumdur. Dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak iki basamakta incelenmektedir.

3.4.1.1 Dönüşümlü tutunma

Dönüşümlü tutunmada, bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bunlar elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri olup zayıf etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür (Costerton vd., 1995; Poulsen, 1999). Yüzeye ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür. Hücreler bu fazda, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Dönüşümlü tutunma durumu, yapışan ve durgun haldeki hücreler arasındaki dengeli dağılımın bir sonucu olabilir. Burada mikroorganizma yüzeyin yakınındadır, ama henüz yüzeye temas etmemiştir (Lindsay ve Von Holy, 2006).

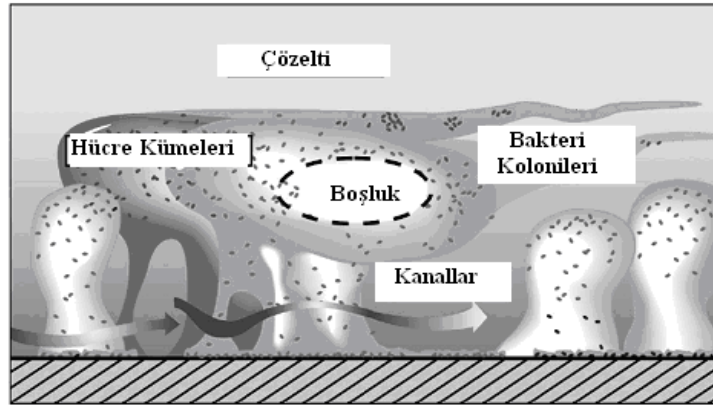
3.4.1.2 Dönüşümsüz tutunma

Dönüşümsüz tutunmada ise yüzeye kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri oluşmaktadır. Mikroorganizmalar dönüşümlü olarak bağlanırken, yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesi olup olmadığını araştırır. Bakteri hücreleri flagella ve pili gibi organelleri ile ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler. Katyonlar, çeşitli makromoleküller ve koloidal materyaller boru hattında tutulduğunda, mikroorganizmalar öncelikle organik materyale dönüşümlü olarak, sonra da flagella ve fimbriaları ile dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, membrana bağlı proteinlerden EPS üretir. Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yüzeylere bağlanabildiği belirtilmektedir. Dönüşümsüz basamakta, hücrelerin yüzeylerden uzaklaştırılması fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılmasını gerektirmektedir (Poulsen, 1999).

3.4.1.3 Kolonizasyon

Biyofilm oluşumunun son aşaması yüzey kolonizasyonudur. Tutunan bakteri gelişir ve daha sonra bölünür. EPS ile diğer planktonik hücrelerin yakalanması sağlanır. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeye diğer bakterilerde koloni oluşturur (ikincil koloni) (Poulsen, 1999).

Daha sonraki evrede ise, mikrokoloniler büyürler ve kompleks mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için görev yapan su kanalları bulunmaktadır. Yüzeyde kolonileşme malzeme ve ortama göre değişik zamanlarda görünebilir. Örneğin deniz suyunda paslanmaz çeliklerde birkaç saat, akıcı tatlı su içindeki çelikte 7 gün, tatlı su ortamında ise birkaç ayda meydana gelebilmektedir (Poulsen, 1999).



Şekil 3.2. Biyofilm şekillenmesinde hücre kümelenmesi ve su kanallarının oluşumu (Little ve Lee, 2007)

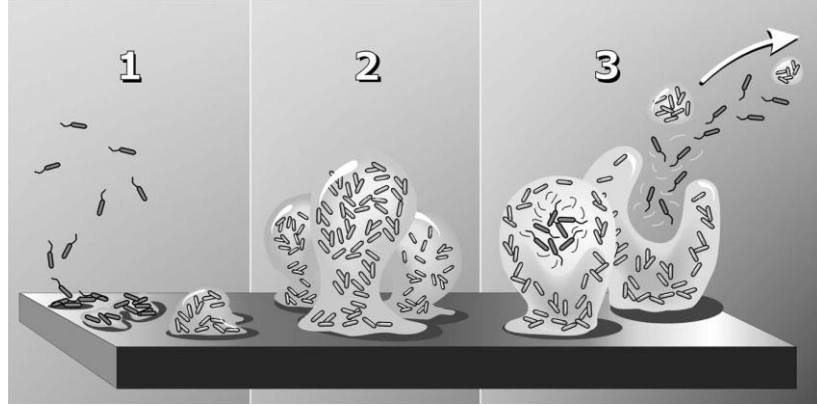
Tutunma gerçekleşince bakteri bir takım adaptasyon evreleri geçirir. Bunlar içinde EPS üretimi ve antimikrobiyal ajanlara direnç gelişimi en önemli olanlarıdır. Biyofilm ile ilgili yapılmış çalışmalarda en iyi incelenmiş tür olan *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri, hücre-hücre haberleşmesiyle (quorum-sensing) üremelerini durdurma özelliğine sahiptir (Kjelleberg ve Molin, 2002).

Biyofilmin üst tabakasındaki aerobik bakterilerin solunum yapmasından dolayı biyofilm içerisinde bir oksijen gradyanı meydana gelir. Bu biyofilm tabakası 10–25µm kalınlığa ulaştığı zaman, alt kısımlarında anaerobik koşullar oluşur. Böylece biyofilm, yüksek miktarda tür çeşitliliğine ve stabilizeye sahip olgunlaşma durumuna yaklaşır (Hamilton, 1985; Little ve Lee, 2007).

3.4.1.4 Kopma

Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde, tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Besin azlığı veya oksijen

seviyesine göre çevresel koşullar değişse bile biyofilm belli bir gelişim sonrası dağılmaya başlar (Poulsen, 1999).



Şekil 3.3. Biyofilm yaşam döngüsü : (1) tutunma aşaması (2) kolonilerin büyümesi (3) kümelerin ayrılması (Little ve Lee, 2007)

Metal malzeme yüzeylerinde oluşan biyofilmdeki mikrobiyal aktivite, anodik ve /veya katodik reaksiyonlardan etkilenmekte ve koruyucu tabakalardan herhangi birinin kimyasını önemli ölçüde değiştirerek korozyonun hızlanmasına ya da yavaşlamasına yol açmaktadır.

3.4.2 Biyofilmlerin korozyonu azaltma etkileri

Yapılan çalışmalarda mikroorganizmaların her zaman korozyona sebep olmadıklarını çeşitli bakterilerin farklı metallerin ve alaşımların koroziv ortamlardaki korozyon hızını azalttığı ifade edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada Bazı *Shewanella* suşlarının oluşturduğu biyofilmin, yapay deniz suyunda, alüminyum 2024, çelik ve pirinçte çukur korozyonu oluşumunu engellediği belirtilmiştir. *Shewanella ana* ve *S. algae* bulunan ortamlarda korozyon potansiyeli daha negatif değerlere kaymaktadır. *Shewanella* suşlarının metal yüzeyinde oksijen konsantrasyonunu azaltıp anaerobik bir ortam oluşturmamasından dolayı korozyon inhibisyonunu gerçekleştirdikleri ileri sürülmüştür (Mansfeld, 2007).

Korozyonun önlenmesiyle ilgili yapılan bir başka çalışmada ise *Bacillus subtilis*'in bulunduğu yapay deniz suyuna bırakılan Al metalinin korozyon davranışı, antibiyotik

eklendikten sonraki korozyon davranışı ve canlı biyofilmin önemi incelenmiştir. *Bacillus subtilis*' in bulunduğu ortamda biyofilm varlığından dolayı Ecor değerlerinin azaldığı ve çukur korozyonunun önlendiği gözlenmiştir. Biyofilmdeki bakterileri yok etmek amacıyla yapay deniz suyuna antibiyotik eklenmesiyle kısa bir süre sonra çukur korozyonunun meydana geldiği belirlenmiştir (Zuo vd., 2005).

Stadler vd. (2008), metal malzemelerin korozyondan korunması için mikrobiyal ekstrasellüler polimerik maddelerin (EPS) etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada sülfat indirgeyen bakterilerin değişik türleri ve *Pseudomonas* kültürü elde edilmiş ve bu bakterilerin EPS'leri toplanmıştır. EPS' nin farklı metal maddeler üzerinde aşındırıcılıkları test edilmiştir. Elektrokimyasal sonuçlara göre anaerobik koşullar altında karbon çelik ve saf demir üzerinde *Desulfovibrio vulgaris* ve *D. indonesiensis*'in biyofilminin aşındırıcı etki gösterdiği bulunurken *D. alaskensis*'in EPS'si ile korozyon aşınması görülmemiştir. *D. alakensis*'in EPS'sinin korozyonu önlemek için inhibitör madde olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

İsmail vd. (2002), *Pseudomonas fragi* K monokültüründe yumuşak çeliğin korozyon aktivitesini aerobik koşullar altında, elektrokimyasal impedans spektroskopisini (EIS) kullanarak araştırmışlardır. Örnekler üzerinde biyofilm oluşumundan sonra, yumuşak çelikte korozyon hızının azaldığını belirtmişlerdir. Lazer tarayıcı mikroskobu, *P. fragi* K suşu tarafından üretilen biyofilmin çok hızlı oluştuğunu doğrulamıştır. Bakteri bulunan test hücrelerinde örneklerin her birinde açık renkli biyofilm tabakası görülmüştür. Yumuşak çelik üzerinde gelişen *P. fragi* K suşunu öldürmek için besiyerine tetrasiklin eklenmiş ve yüzeyde film tabakasının oluşumu incelenmiştir. Tetrasiklinin, biyofilm içerisindeki *P. fragi* K suşunun sayısını azaltmasından dolayı yumuşak çelikte korozyon önemli derecede azalmıştır. Sonuçta biyofilm, korozyon ürünlerinin difüzyonuna engel olmuş ve dolayısıyla metal çözünmesini önlenmiştir. Elektrot yüzeyinde oksijen konsantrasyonunun azalması ve bakterilerin ürettiği metabolik ürünler, yumuşak çelikte korozyon inhibitörü olarak rol oynamıştır.

Gunasekaran vd. (2004), biyofilm formasyonlarının korozyonu engellemede bakteri etkisini araştırmışlardır. Yumuşak çelik kuponları *Pseudomonas flava* ve *Pseudomonas stutzeri* isimli iki bakteri kültürü içinde ayrı ayrı inkübe edilmiştir. Kontrol ortamı olarak trisodyum sitrat içeren ve glukoz içermeyen tuz solüsyonu kullanılmıştır.

Zamanla bakterilerin çoğaldığı ve *P. flava* ile *P. stutzeri* varlığında yumuşak çelik üzerinde korozyon oranının azaldığı gözlenmiştir. Korozyon oranındaki maksimum azalma 7 gün sonra *P. flava* bulunan ortamdaki test kuponlarında gözlenmiştir. Yumuşak çelik yüzeyinde koruyucu tabaka formlarının korozyonu önlediği rapor edilmiştir.

3.4.3 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin genel özellikleri

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* heterotrof, Gram pozitif özellikte, endospor oluşturan, fakültatif anaerob gelişme özelliğine sahip, toprak kökenli bir bakteridir. İlk defa 1901 yılında Ishiwata tarafından ölü ipekböceği larvasından izole edilmiştir. Bu bakteriler tarafından üretilen protein yapıdaki parasporal kristallerin insektisidal aktivitelerini, böcek larvalarının alkali pH'ya sahip barsak sistemlerinde kazandığı ve bu protein yapının alkali pH'da bir kaç oligopeptide ayrılarak çeşitli barsak proteazları tarafından insektisidal aktivite gösteren toksine dönüştürüldüğü bulunmuştur (Lacey ve Undeen, 1986; Porter vd., 1993).

B.thuringiensis'e ait suşların 100'den fazla Lepidoptera üyesi böcek larvasına, Diptera ve Coleoptera üyelerinin çeşitli türlerine karşı patojenik etki gösterdiği belirlenmiştir. *B.thuringiensis* suşlarının alfa ekzotoksin, beta ekzotoksin ve delta endotoksin olmak üzere temelde üç tip toksini sentezlediği ve toksin tiplerinin her birinin biyokimyasal yapısının ve aktivitesinin suştan suşa değişebildiği bulunmuştur. Bununla birlikte şimdiye kadar izole edilen *B.thuringiensis* alt türlerine ait suşların her birinin, farklı böcek türlerine patojen olabildiği de gösterilmiştir *Bacillus thuringiensis* serotiplerinin toksin bileşimlerinin farklı böcek türlerinde farklı şekilde reaksiyonlar verdiği ve bu durumun böceğin barsak kimyası ile de ilgili olduğu belirlenmiştir (Porter vd., 1993).

B.thuringiensis'in hayvan ve insan sağlığı açısından güvenilirliğinin test edildiği çalışmalarda hedefin dışındaki canlılara toksik olmadığı belirlenmiştir. Fare, sıçan, tavşan ve kobay üzerinde, *B.t.thuringiensis*, *B.t.kurstaki* ve *B.t.israelensis* preparasyonlarının oral, deri, derialtı, intraperitonal, damar içi, göz içi ve teneffüs yoluyla yapılan uygulamaları sonucunda, 10^7 - 10^8 bakteri/hayvan düzeyindeki preparasyonların akut veya kronik toksisiteye ya da enfeksiyona neden olmadığı, sadece 10^6 canlı bakteri/fare düzeyinde, fare beynine yapılan bir enjeksiyonun ölüme neden

olduğu bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda, bu bakterinin kristal toksinlerine maruz kalan balık, kurbağa gibi diğer vertebratların, sivrisinek predatörü olan artropodların (eklembacaklıların), yumuşakçalar ve diğer su canlılarının olumsuz yönde etkilenmediği ortaya çıkarılmıştır (Krieg ve Miltenburger, 1984; Bauce vd., 2006).

B.thuringiensis preparatlarının saha etkinliğinin tespitiyle ilgili çalışmalarda, *B.thuringiensis* suşlarının doğada kalım süresini etkileyen faktörler de araştırılmıştır. Böyle bir çalışmada tuzun (NaCl) ve kısa süreli gün ışığına maruz kalmanın *B.thuringiensis* (H14)'ün aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir. Bununla beraber, UV radyasyonuna maruz bırakılan *B.thuringiensis* sporlarının ölmesine karşın, kristal toksinlerinin halen aktif olduğu da gösterilmiştir. *B.thuringiensis*'in topraktaki kalım süresinin immünofloresan yöntemiyle belirlenmesinin hedeflendiği bir çalışmada, canlı vejetatif hücrelerinin topraktan çok hızlı bir şekilde (ilk 24 saatte % 91'inin) yok olduğu, buna karşın sporların daha uzun süre (25 °C'de 91 gün) değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Fakat bu süre zarfında bakteri sporlarında herhangi bir şekilde germinasyonun olduğu gözlenmemiştir (West vd., 1984).

Yapılan bir çalışmada steril edilmiş topraklara besin ilavesi yapılmış, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* ve bu iki bakterinin karışık kültürleri inoküle edilerek 30 aylık bekleme süresi sonunda yumuşak çelik kuponları üzerindeki korozyon oranı ve yüzdece kütle kaybı besin içermeyen ortamlara göre karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. *Bacillus thuringiensis*'in *Bacillus cereus*'a ve karışık kültüre göre yumuşak çelik kuponlar üzerinde korozyonu engellediği belirlenmiştir (Hussain vd., 2013)

BÖLÜM IV

MATERYAL VE METOT

4.1 Materyal

4.1.1 Elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan elektrotlar

Çalışma Elektrodu: Aşağıda kütlece yüzde bileşimi verilen yumuşak çelik elektrot, çalışma elektrotu olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Çalışma elektrodu olarak kullanılan yumuşak çeliğin kütlece yüzde bileşimi

Element	%	Element	%	Element	%
Karbon (C)	0,344	Silisyum (Si)	0,194	Mangan (Mn)	0,584
Fosfor (P)	0,024	Kükürt (S)	0,020	Krom (Cr)	0,053
Molibden (Mo)	0,014	Nikel (Ni)	0,072	Alüminyum (Al)	0,008
Kobalt (Co)	0,010	Bakır (Cu)	0,273	Niobyum (Nb)	0,031
Titanyum (Ti)	0,010	Vanadyum (V)	0,016	Kalay (Sn)	0,005
Demir (Fe)			Kalan (98,341)		

Karşı Elektrot: 1 cm² yüzey alanına sahip platin levha elektrot karşı elektrot olarak kullanılmıştır.

Referans Elektrot: Gümüş-gümüş klorür (Ag, AgCl/Cl⁻) elektrot referans elektrot olarak kullanılmıştır.

4.1.2 Kullanılan cihazlar

HCH Instruments Electrochemical Workstation cihazı: Deneyler boyunca A.C. impedans eğrileri, açık devre potansiyeli, polarizasyon direnci ve akım – potansiyel eğrilerinin elde edilmesinde HCH Instruments Electrochemical Workstation cihazı ve CHI660B programı kullanılmıştır.

Hassas terazi: Çözelti hazırlanırken kimyasal maddelerin tartım işlemlerini yapmak için Radwag marka hassas terazi kullanılmıştır.

Pastör fırını: Deneyler boyunca cam malzemeleri steril etmek amaçlı Elektromag M42 markalı pastör fırını kullanılmıştır.

Otoklav: Deneyler boyunca çözeltilerin ve diğer malzemelerin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla WiseClave Wac- 47 markalı otoklav kullanılmıştır.

Etüv: Deneyde kullanılan mikroorganizmanın inkübasyonu Heraeus markalı etüv kullanılarak sağlanmıştır.

Santrifüj cihazı: Deneyde kullanılan mikroorganizmanın sıvı ortamdan ayrılmasında Nüve NF615 Markalı santrifüj cihazı kullanılmıştır.

Metal parlatma cihazı: Elektrotun çözelti ile temas eden yüzeyini 220, 600 ve 1000 grid kalınlıkta zımpara kağıdı ile temizlemek ve parlatmak amacıyla kullanılmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM-EDX): Elektrotların, yüzey morfolojilerini belirlemede Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan Leo 440 model taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır.

ATR-IR: Biyofilm, vejetatif- sporlu bakteri ve kristal toksinin yapısının aydınlatılmasında Korkut Ata Üniversitesi laboratuvarında bulunan Perkin Elmer spektrometre marka Spektrum 65 model cihaz kullanılmıştır.

4.2 Metot

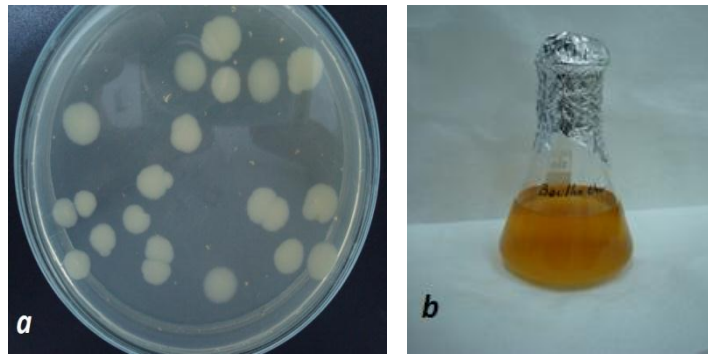
Tüm elektrokimyasal işlemlerin gerçekleştirilmesinde, çalışma elektrodu olarak yumuşak çelik elektrot, karşılaştırma elektrodu olarak platin levha ve referans elektrot olarak gümüş-gümüş klorür (Ag , AgCl/Cl^-) elektrotun kullanıldığı üç elektrot tekniğinden yararlanılmıştır.

4.2.1 Elektrotların hazırlanması

Deneylerde çalışma elektrotu olarak yumuşak çelik elektrot kullanılmıştır. Elektrokimyasal yöntemlerde kullanmak üzere hazırlanan çalışma elektrotları silindirik metal çubuklardan 5 cm uzunluğunda kesilmiş, taban alanlarından bir tanesi delinerek iletkenliği sağlamak için bakır tel geçirilmiştir. Elektrolit etkisinde kalacak yüzey önce epoksiyle örtülmüş ardından da polyester reçine içine gömülerek kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan 0,8 cm çaplı silindir bakır elektrotun yüzey alanı 0,5024 cm²'dir. Her deneyden önce elektrot 220-600-1000 gridlik zımpara ile temizlenip alumina ile parlatılmış, distile su ile yıkanıp, aseton ile silinmiştir. Her çalışma öncesinde elektrotların steril olması için %70'lik alkolde yarım saat bekletilmiştir.

4.2.2 Mikroorganizmaların geliştirilmesi

Çalışmada kullanılan Bacillaceae familyasına ait olan *Bacillus* cinsinin *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* T03A001 suşu Ankara Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Gram pozitif bakteri *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin geliştirilebilmesi için öncelikle Nutrient agar (İdg) katı besiyerine ekim yapılmış ve tek düşen kolonisi alınıp iki gün süre ile Nutrient broth (Difco) sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır (Fotoğraf 4.1). Bu şekilde saf olarak aktiveleştirilip üretilmesi sağlanan hetetrofik aerobik-mezofilik bakteri türü deney ortamına aseptik koşullarda inoküle edilmiştir. Deneyde kullanmak üzere istenilen miktarının (1,0 g/L ve 3,0 g/L) hazırlanması ise, Nutrient broth sıvı besiyerinde bakterinin zenginleştirilmesi sağlandıktan sonra aseptik koşullarda santrifüj tüplerine aktarılan besiyerinden santrifüj edilerek toplanmıştır.



Fotoğraf 4.1. Besiyerine ekilmiş bakterinin görünümü

a. Nutrient agar besiyerinde tek düşürülmüş bakterinin görünümü

b. Bakterinin Nutrient broth besiyerinde görünümü

4.3 Deney Ortamları

Korozyon deneyleri için serum fizyolojik içeren (SF) korozyon hücrelerine (test ortamı) 1,0 g/L ve 3,0 g/L olmak üzere iki farklı bakteri konsantrasyonu uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri içermeyen serum fizyolojik ortamlar kullanılmıştır. Korozyon hücresinde serum fizyolojik 200 ml olarak kullanıldığından bakteri konsantrasyonları 0,2 g/200 ml ve 0,6 g/200 ml olarak belirlenmiştir.

4.3.1 Serum fizyolojik ortamı

Çalışmaların ilk aşamasında kontrol grubu için SF (% 0,9 luk sodyum klorür) ortamı hazırlanarak 4 adet deney düzeneği kurulmuştur. Aseptik koşullarda beherler içerisine %70'lik alkolde yarım saat bekletilen, biri bakteriyel sayım diğer ikiside elektrokimyasal ölçüm almak için birbirlerine paralel olması amacıyla 3'er adet elektrot daldırılmıştır. Ölçümler 4. saat, 1. gün, 4. gün ve 7. günlerde alınmıştır.



Fotoğraf 4.2. Serum fizyolojik ortamı

4.3.2 Serum fizyolojik içerisine 1,0 g/L bakteri inoküle edilmiş ortam

SF + 1,0 g/L bakteri ortamında, kontrol ortamında olduğu gibi 4 adet düzenek kurulmuştur. Ölçüm grubunun herbirine, Nutrient broth sıvı besiyerinde gelişip santrifüj edilerek elde edilen steril saf bakterinin 1,0 g/L'ı ilave edilmiştir.



Fotoğraf 4.3. Serum fizyolojik + 1,0 g/L bakteri ortamı

4.3.3 Serum fizyolojik içerisine 3,0 g/L bakteri inoküle edilmiş ortam

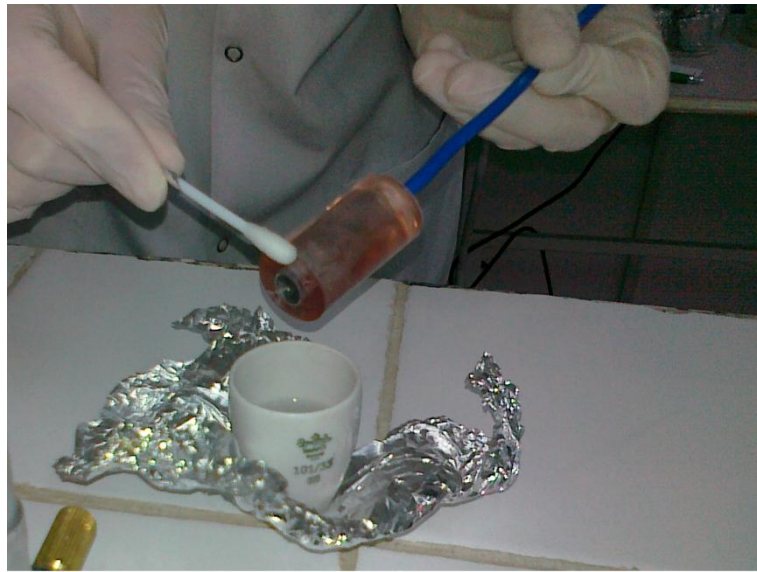
SF + 3,0 g/L bakteri ortamında, kontrol ortamında olduğu gibi 4 adet düzenek kurulmuştur. Ölçüm grubunun her birine Nutrient broth sıvı besiyerinde gelişip santrifüj edilerek elde edilen steril saf bakterinin 3,0 g/L'ı ilave edilmiştir.



Fotoğraf 4.4. Serum fizyolojik + 3,0 g/L bakteri ortamı

4.3.4 Mikrobiyal sayının belirlenmesi

Deneyler boyunca elektrot yüzeyine tutunan ve biyofilm oluşturan mikroorganizma sayısını belirlemek için ölçüm yapmadan önce her bir beherden bir elektrot alınmıştır. Alınan elektrot steril porselen kapsülde aseptik koşullarda pipet yardımı ile 10 mL serum fizyolojik ile yıkanmış ve elektrot yüzeyi üzerindeki tabaka eküvyon (swap) yardımıyla kazınarak porselen kapsül içerisine aktarılmıştır. Mikroorganizma sayısı tüp dilüsyon tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Ekimler Nutrient agar besiyeri içeren petrilere yapılmıştır. Sayımlar 4. saat, 1. gün, 4. gün ve 7. günlerde yapılmıştır.



Fotoğraf 4.5. Yüzeye tutunan mikroorganizmaların porselen kapsüle aktarılması

4.4 Elektrokimyasal Ölçümler

4.4.1 Alternatif akım (A.C.) impedansı yöntemiyle korozyon direncinin belirlenmesi

Elektrokimyasal ölçümler 4. saat, 1. gün, 4. gün ve 7. gün periyodu süresince yapılmıştır. Yumuşak çelik elektrodun elektrokimyasal davranışı, üç elektrot tekniği ile atmosfere açık koşullarda; serum fizyolojik, serum fizyolojik + 1,0 g/L bakteri ortamında ve serum fizyolojik + 3,0 g/L bakteri ortamında AC İmpedans yöntemiyle belirlenmiştir.

Karşı elektrot platin (Pt), çalışma elektrotu (yumuşak çelik), referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot daldırılmıştır. Çalışılan deney düzeneği Fotoğraf 4.6’da gösterilmiştir.



Fotoğraf 4.6. HCH Instruments Electrochemical Workstation cihazı ve deney düzeneği

Çalışma elektrodunun referans elektroda karşı denge potansiyeli belirlenerek, 5 mV genlikte ve 10^5 Hz ile 0,00255 Hz frekans aralığında Nyquist diyagramları oluşturulmuştur.

4.4.2 Lineer polarizasyon direnci yöntemiyle polarizasyon direncinin belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde, çalışma elektrotu olarak yumuşak çelik, karşı elektrot olarak platin (Pt) ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl daldırılmıştır. Yumuşak çeliğin referans elektroda karşı açık devre potansiyeli belirlenmiştir. 0,1 mV/s tarama hızıyla, ± 10 mV’luk potansiyel değişimi sağlanarak, akım potansiyel (I-E) grafikleri oluşturulmuştur. Cihazdan elde edilen direnç değerleri elektrotun yüzey alanı ($0,5024 \text{ cm}^2$) ile çarpılmıştır.

4.4.3 Potansiyodinamik polarizasyon eğrilerinin belirlenmesi

Yumuşak çelik elektrotun referans elektroda karşı açık devre potansiyeli ölçüldükten sonra, 1 mV/s tarama hızıyla önce katodik yöne doğru (-300 mV), daha sonra anodik

yöne doğru (+300 mV) tarama yapılmıştır. Cihazdan elde edilen $\log i$ değerleri elektrotun yüzey alanına ($0,5024 \text{ cm}^2$) bölünerek yarı logaritmik [$\log i (\text{A.cm}^{-2})$] akım yoğunluğu değerleri belirlenmiştir. Korozyon potansiyelleri (E_{cor}) doğrudan cihazdan okunarak bu eğrilerden, korozyon potansiyelleri (E_{cor}), Tafel ekstrapolasyon yöntemi ile akım yoğunluğu (i_{cor}), katodik Tafel sabiti ($-\beta_c$) değerleri belirlenmiştir.

4.5 Yumuşak Çelik Elektrotların Yüzey Morfolojilerinin ve Yüzey Bileşimlerinin Belirlenmesi

1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ve içermeyen SF ortamlarında yedi gün bekletilen yumuşak çelik elektrotların yüzey morfolojileri SEM ve kütlece yüzey bileşimi EDX analizleri ile belirlenmiştir.

4.6 Biyofilm, Vejetatif- Sporlu Bakteri ve Kristal Toksinin Yapısının ATR-IR Analizi İle Belirlenmesi

Metal yüzeyinde bakterinin oluşturduğu biyofilmi elde etmek için; SF + 3,0 g/L bakteri içeren test ortamında yedi gün bekletilen elektrot, çözeltiden çıkarılıp 10 ml SF ile yıkandıktan sonra oluşan çözelti 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Kontrol biyofilmi için, saflaştırılıp zenginleştirilen 15 günlük bakteri kültürü 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek elde edilmiştir. Bakteri peleti 3 kez SF ile yıkanmıştır. Santrifüj edilerek toplanan peletler etüvde bekletilip kurutulduktan sonra analizi yapılmıştır.

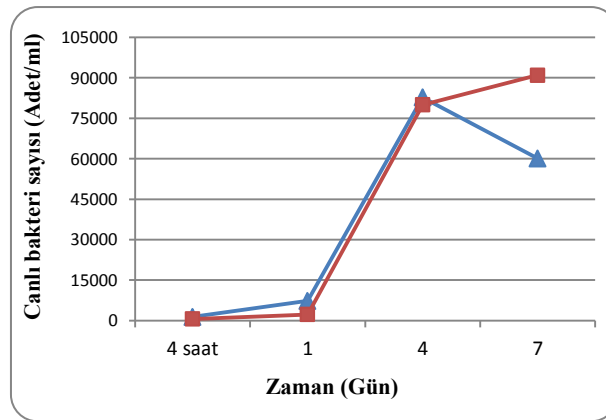
BÖLÜM V

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* suşunun steril serum fizyolojik solüsyonu (izotonik, SF), kontrol ortamı olarak kullanılmış olup, SF + 1,0 g/L bakteri ve SF + 3,0 g/L bakteri ortamlarında yumuşak çelik üzerindeki korozyon aktivitesi 4 saat, 1. 4. ve 7. gün sonunda karşılaştırmalı olarak elektrokimyasal korozyon hızı ölçme yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışma sürelerinin sonunda mikroorganizmanın kültürel sayımı ile birlikte çalışılan bütün ortamlarda SEM ve EDX analizleri yapılmıştır. Ayrıca SF + 3,0 g/L bakteri içeren ortamda 7 gün bekletilen elektrot yüzeyinden alınan biyofilm örneğinin ve kontrol bakterinin ATR-IR ile analizi yapılmıştır.

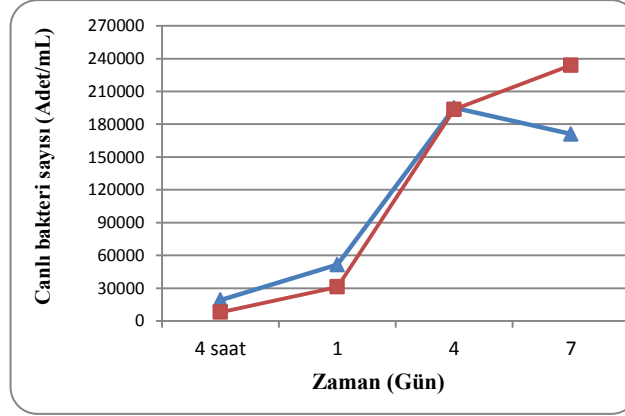
5.1 Biyofilm Tabakasındaki Bakteri Sayım Sonuçları

Korozyon hücresindeki elektrot yüzeyinde bakterinin gerçekleştirdiği aktivitenin değerlendirilebilmesi için SF ortamında bakterinin davranışı ve canlı bakteri sayısı kültürel sayımla belirlenmiştir. SF ortamına inoküle edilmiş 1,0 g/L bakterinin elektrot yüzeyindeki sayımı tüp dilüsyon yöntemiyle hesaplanmıştır. Elektrot yüzeyine tutunan ve biyofilm oluşturan bakteri sayısını belirlemek için elektrot yüzeyi üzerindeki tabaka, eküvyon (swap) yardımıyla kazınıp 10 mL SF ile yıkanarak porselen kapsüller içerisine aktarılmıştır. Kapsüller içerisindeki çözeltiden bakteri sayımı yapılmıştır. 1,0 g/L bakteri içeren elektrot yüzeyindeki sayım sonuçları Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



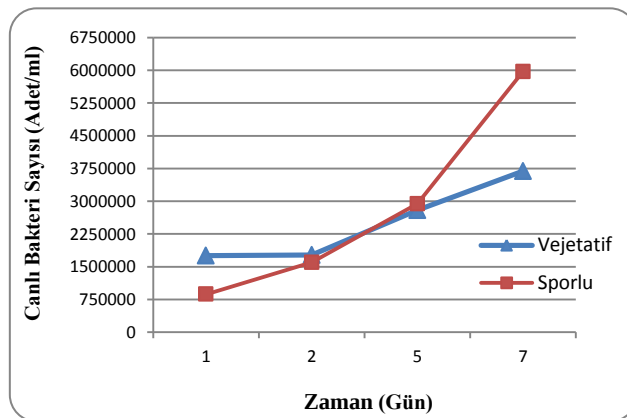
Şekil 5.1. 1,0 g/L bakterili ortamda bulunan elektrot yüzeyindeki bakteri miktarı (▲ : vejetatif bakteri formu, ■ : sporlu bakteri formu)

SF ortamına inoküle edilmiş 3,0 g/L bakterinin elektrot yüzeyindeki sayımı da tüp dilüsyon yöntemiyle hesaplanmış ve sayım sonuçları Şekil 5.2’de gösterilmiştir.

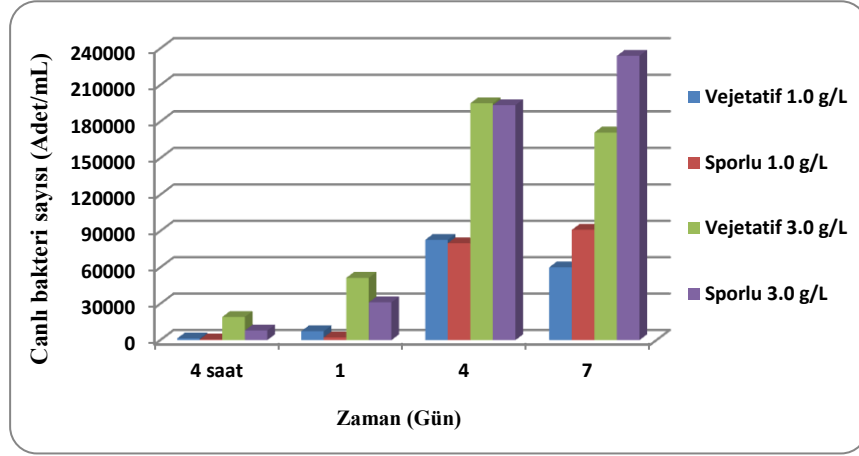


Şekil 5.2. 3,0 g/L bakterili ortamda bulunan elektrot yüzeyindeki bakteri miktarı (▲: vejetatif bakteri formu, ■: sporlu bakteri formu)

Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’de görüldüğü gibi elektrot yüzeyinden yapılan bakteri sayımlarında vejetatif formdaki bakteri sayısı 4. saatten itibaren artıp 4. günden sonra azalmaya başlamış, sporlu formdaki bakteri sayısı ise 4. saatten itibaren giderek artmıştır. Bu durum her iki bakteri konsantrasyonları (1,0 g/L ve 3,0 g/L) içinde aynı olmuştur. Literatürde *Bacillus thuringiensis* gibi hetetrofik bakterilerin gelişimlerini uygun besiyerlerinde sürdürmelerine karşın bu tez çalışmasında serum fizyolojik ortamında da bakterilerin belli bir süre gelişmeye ve çoğalmaya devam ettiği, elektrot içermeyen serum fizyolojik ortamından sayım yapılarak tespit edilmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Serum fizyolojikte bakteri sayımları



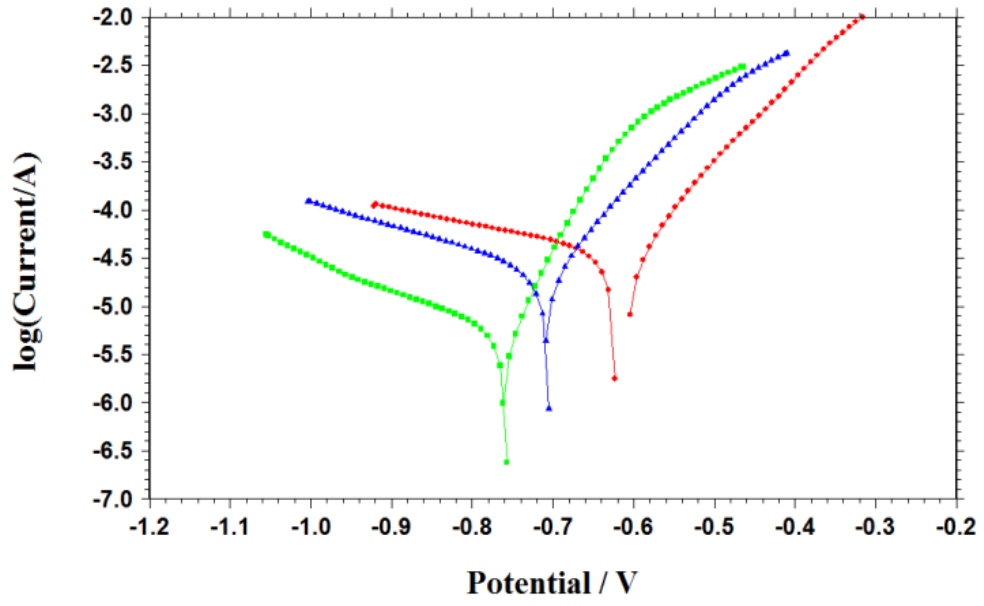
Şekil 5.4. Bakteri sayım sonuçları

Şekil 5.4'den görüldüğü gibi her iki bakteri konsantrasyonunda da 4. günden sonra elektrot yüzeyinden vejetatif bakteri sayısı azalırken sporlu bakteri sayısı artmıştır. *B.t.kurstaki*'nin sporlu bir bakteri olması nedeniyle ortam koşullarının yaşamaya elverişli olmadığı durumda sporlanarak kendi varlığını koruması, yüksek olan sporlu bakteri sayısını açıklayabilmektedir (Nicholson vd., 2000).

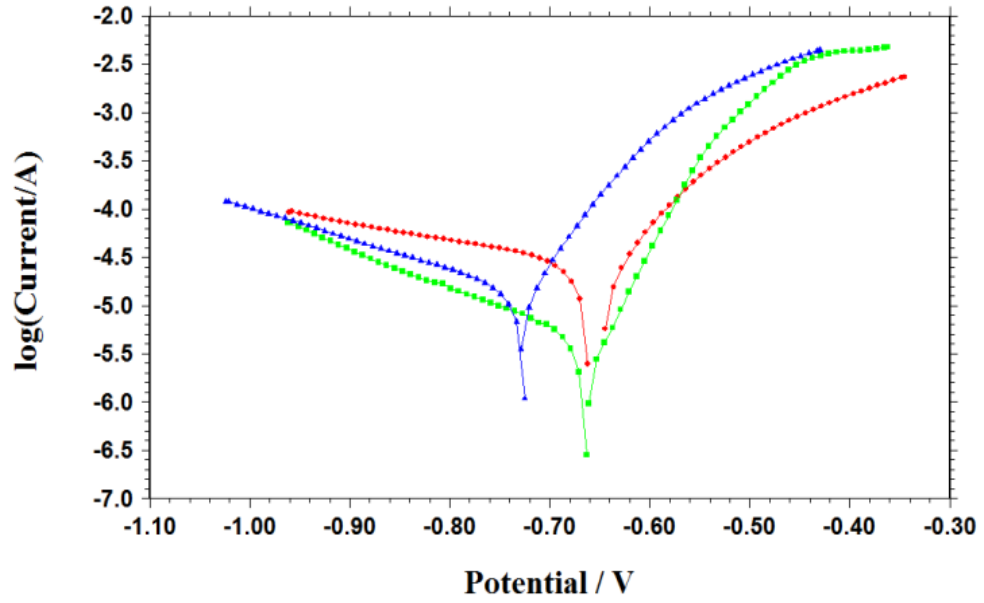
Zamana bağlı olarak yüzeye tutunan vejetatif mikroorganizmaların yerini sporlu mikroorganizmalara bırakması, elektrot yüzeyinde biyofilm oluşturan vejetatif bakterilerin, ortamdaki besin eksikliğinden, ortamdaki atık maddelerden veya elektrottaki ağır metallerden olumsuz şekilde etkilendiğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

5.2. Akım-Potansiyel Eğrileri ve Değerlendirilmesi

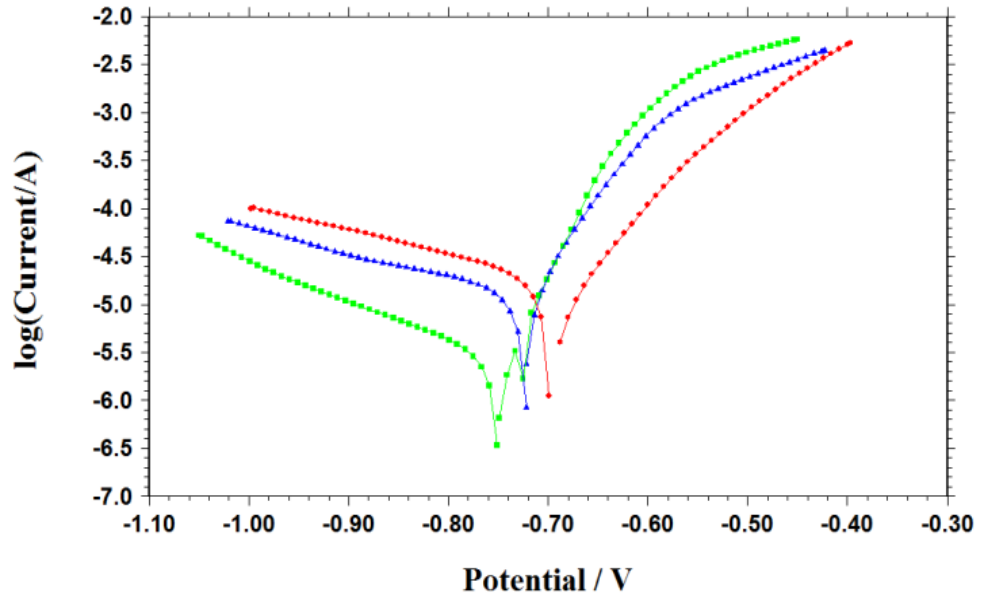
Kontrol (bakteri içermeyen ortam), 1,0 g/L bakteri, 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda yumuşak çeliğin dört saat, bir gün, dört gün ve yedi gün bekletildikten sonra önce katodik daha sonra anodik akım potansiyel eğrileri elde edilmiş ve Şekil 5.5 - 5.8'de verilmiştir. Bu eğrilerden bulunan korozyon potansiyelleri (E_{cor}), katodik Tafel sabiti (β_c) ve akım yoğunluğu değerleri (i_{cor}) değerleri Çizelge 5.1'de verilmiştir.



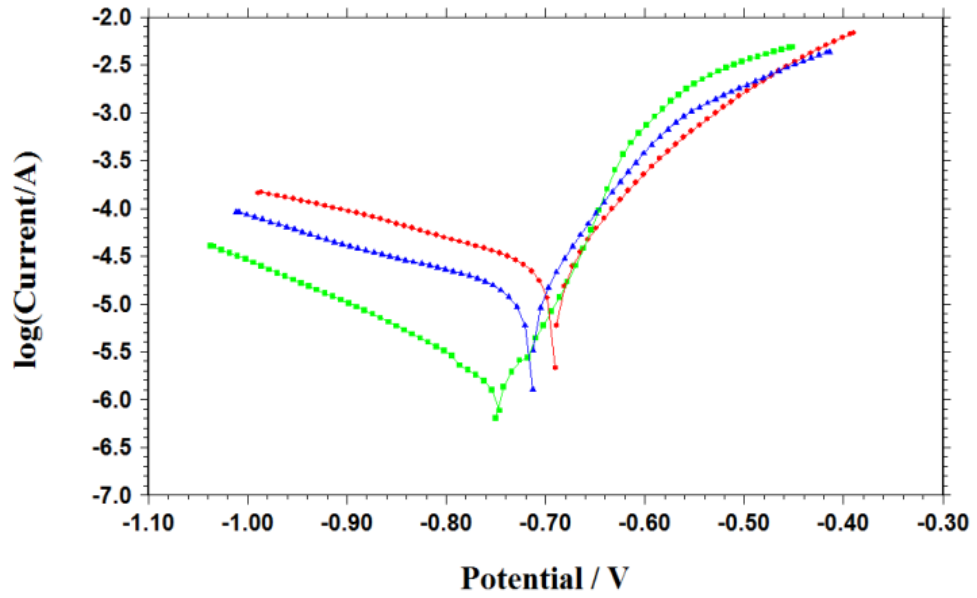
Şekil 5.5. Dört saat sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri
(● : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakteri, ■ : 3,0 g/L bakteri)



Şekil 5.6. Bir gün sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri
(● : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakteri, ■ : 3,0 g/L bakteri)



Şekil 5.7. Dört gün sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri
(● : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakteri, ■ : 3,0 g/L bakteri)



Şekil 5.8. Yedi gün sonunda elde edilen anodik ve katodik polarizasyon eğrileri
(● : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakteri, ■ : 3,0 g/L bakteri)

Çizelge 5.1. Kontrol ve bakteri içeren korozyon hücrelerinde yumuşak çeliğin potansiyodinamik polarizasyon parametreleri

		E_{cor} (V)	$-\beta_c$ (mV/dec)	i_{cor} ($\mu A/cm^2$)
Kontrol	4 saat	-0,623	590	35,53
	1. gün	-0,662	557	26,79
	4. gün	-0,699	402	18,75
	7. gün	-0,690	390	25,16
1,0 g/L bakteri	4 saat	-0,705	404	23,00
	1. gün	-0,725	315	13,69
	4. gün	-0,722	388	12,00
	7. gün	-0,713	354	12,63
3,0 g/L bakteri	4 saat	-0,757	294	4,79
	1. gün	-0,663	251	4,32
	4. gün	-0,751	244	2,65
	7. gün	-0,738	208	1,65

Dört saat sonunda kontrol ve bakteri içeren ortamlarda elde edilen anodik ve katodik akım potansiyel eğrileri Şekil 5.5’de verilmiştir. Kontrol ortamda E_{cor} değeri -0,623 V iken 1,0 g/L bakterili ortamda -0,705 V ve 3,0 g/L bakterili ortamda -0,757 V olmuştur. Kontrol ortamında $-\beta_c$ değeri 590 mV/dec iken 1,0 g/L bakterili ortamda 404 mV/dec ve 3,0 g/L bakterili ortamda 294 mV/dec olmuştur (Çizelge 5.1). Bakteri içeren ortamlarda korozyon potansiyeli değerleri daha negatif değerlere ve katodik tafel sabiti değerleri daha pozitif kaymıştır. Ortama ilave edilen bakteri katodik polarizasyon eğrisini etkilemiştir. Kontrol ortamında akım yoğunluğu değeri 35,53 $\mu A/cm^2$ iken 1,0 g/L bakterili ortamda 23,00 $\mu A/cm^2$ ve 3,0 g/L bakterili ortamda 4,79 $\mu A/cm^2$ olmuştur. Bakterili ortamlarda korozyon akım yoğunluğu değerleri kontrol ortamından daha düşük olmuştur.

Bir gün sonunda kontrol ve bakteri içeren ortamlarda elde edilen anodik ve katodik akım potansiyel eğrileri Şekil 5.6’da verilmiştir. Kontrol ortamında E_{cor} değeri -0,662 V iken 1,0 g/L bakterili -0,725 V ve 3,0 g/L bakterili ortamda -0,663 V olmuştur. Kontrol ortamında $-\beta_c$ değeri 557 mV/dec iken 1,0 g/L bakterili ortamda 315 mV/dec ve 3,0 g/L bakterili ortamda 251 mV/dec olmuştur (Çizelge 5.1). Bakteri içeren ortamlarda korozyon potansiyeli değerleri daha negatif değerlere ve katodik tafel sabiti değerleri daha pozitif kaymıştır. Ortama ilave edilen bakteri katodik polarizasyon eğrisini

etkilemiştir. Kontrol ortamda akım yoğunluğu değeri $26,79 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ iken $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $13,69 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ve $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $4,32 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ olmuştur. Bakterili ortamlarda korozyon akım yoğunluğu değerleri kontrol ortamında bulunanlardan daha düşük olmuştur.

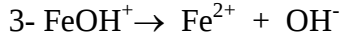
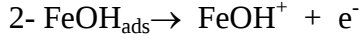
Dört gün sonunda kontrol ve bakteri içeren ortamlarda elde edilen anodik ve katodik akım potansiyel eğrileri Şekil 5.7’de verilmiştir. Kontrol ortamında E_{cor} değeri $-0,699\text{V}$ iken $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $-0,722 \text{ V}$ ve $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $-0,751 \text{ V}$ olmuştur. Kontrol ortamında $-\beta_c$ değeri 402 mV/dec iken $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda 388 mV/dec ve $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda 244 mV/dec olmuştur (Çizelge 5.1). Bakterili ortamlarda korozyon potansiyeli değerleri daha negatif değerlere ve katodik tafel sabiti değerleri daha pozitif kaymıştır. Ortama ilave edilen bakteri katodik polarizasyon eğrisini etkilemiştir. Kontrol ortamında akım yoğunluğu değeri $18,75 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ iken, $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $12,00 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ve $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $2,65 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ olmuştur. Bakterili ortamlarda korozyon akım yoğunluğu değerleri kontrol ortamında bulunanlardan daha düşük olmuştur.

Yedi gün sonunda kontrol ortamda elde edilen anodik ve katodik akım potansiyel eğrileri Şekil 5.8’de verilmiştir. Kontrol ortamda E_{cor} değeri $-0,690\text{V}$ iken $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $-0,713 \text{ V}$ ve $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $-0,738 \text{ V}$ olmuştur. Kontrol ortamda $-\beta_c$ değeri 390 mV/dec iken $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda 354 mV/dec ve $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda 208 mV/dec olmuştur (Çizelge 5.1). Bakterili ortamlarda korozyon potansiyeli değerleri daha negatif değerlere ve katodik tafel sabiti değerleri daha pozitif kaymıştır. Ortama ilave edilen bakteri katodik polarizasyon eğrisini etkilemiştir. Kontrol ortamında akım yoğunluğu değeri $25,16 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ iken $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $12,63 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ve $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda $1,65 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ olmuştur. Bakteri içeren ortamlarda korozyon akım yoğunluğu değerleri kontrol ortamında bulunanlardan daha düşük olmuştur.

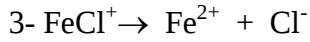
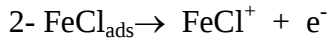
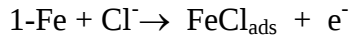
Korozyon akım yoğunluğu değerleri $1,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda 4. saatte $23 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ iken 1. günün sonunda $13,69 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ olmuş, 4. ve 7. günün sonunda fazla değişmemiştir. $3,0 \text{ g/L}$ bakterili ortamda 4. saatte $4,79 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ iken bekleme süresinin artması ile azalmış ve 7. günün sonunda $1,65 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ olmuştur.

Demirin çözünmesinde, metal yüzeyinde adsorplanmış iyonların ve su moleküllerinin önemli rol oynadığı literatürlerde vurgulanmıştır. Hidroksit ve klorür iyonlarının metalin çözünmesindeki etkileri aşağıda verilen mekanizma ile açıklanır.

Hidroksit mekanizması;

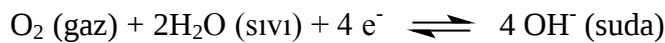


Klorür mekanizması;

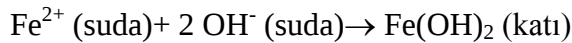


Hidroksit mekanizması, hidratize demir hidroksit oluşumunda, demirin çözünmesini katalizleyen aradaki adsorplanmış hidroksit iyonlarını kapsar. Yüzey aktif klorür iyonları varlığında, klorür ve hidroksit iyonları arasında yarışmalı bir adsorpsiyon söz konusudur. Klorür adsorpsiyonu, yüksek klorür ve düşük hidroksit derişimlerinde hidroksit adsorpsiyonundan daha kolay olmaktadır. Buna göre, demir yüzeyinde oksit tabakası bozulmakta ve korozyon hızlanmaktadır (Bayol, 2005).

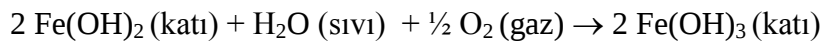
Oksijen içeren nötr veya hafif bazik ortamlarda katodik tepkime:



Tepkime sonucunda oluşan OH^- iyonları, Fe^{2+} iyonları ile demir(II) hidroksite dönüşür.



Demir(II) hidroksit,



Çalışılan bütün zaman dilimlerinde katodik akım yoğunluğu ve i_{cor} değerleri 3,0 g/L bakterili ortamlarda daha düşük olmuştur. Bu ortamlarda aerobik bir bakteri olan

B.thuringiensis ortamdaki oksijen derişimini azalttığından ve katodik oksijen indirgeme reaksiyonun olmasını engellediğinden dolayı korozyon hızını azlatmaktadır. Benzer sonuçlar literatürde verilmiştir (Bao vd., 2012; Mansfeld, 2007, Kuş vd., 2007). Ayrıca bakteri yumuşak çelik yüzeyinde biyofilm oluşturarak klorür iyonlarının elektrot yüzeyine difüzyonunu da engellemektedir.

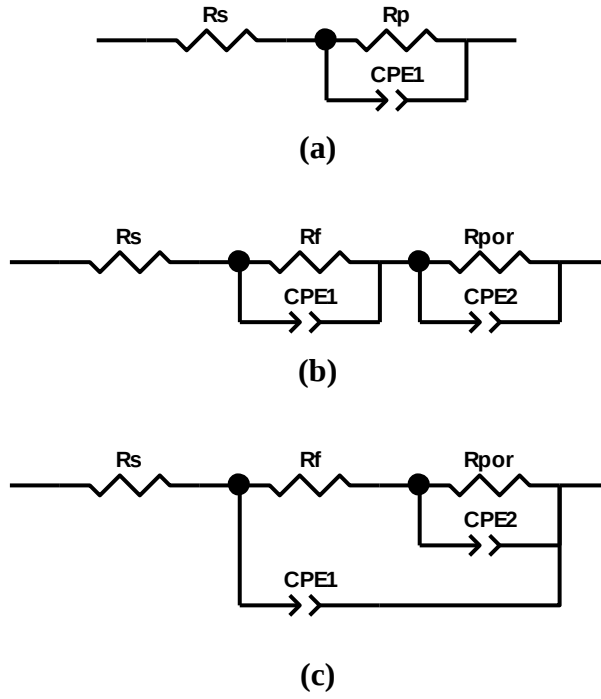
Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas marginalis* ve *Desulfomonas pigra* bakterilerinin yumuşak çelik üzerinde tek başına ve karışık kültür olarak yapmış olduğu etkiler incelenmiştir. 21 gün sonunda yüzeyi temizlenmiş yumuşak çelik kuponundan, steril GYM besi ortamından (kontrol) ve *P. marginalis*, *D. pigra* ve bunların karışık kültürlerinden yapılan elektrokimyasal ölçüm sonuçlarına göre temizlenmiş yumuşak çelik kupon aktif anodik çözünme gösterirken ($E_{corr} = 628,9$ mV), steril GYM ortamına maruz bırakılan yumuşak çelik kuponunda korozyon potansiyeli daha az negatif değere kaymıştır ($E_{corr} = -460,9$ mV). *P. marginalis* veya *D. pigra* ortamlarındaki kuponların polarizasyon eğrileri katodik tafel bölgesine kaymıştır ($E_{corr} = -576,0$ mV ve $E_{corr} = -575,0$ mV). Bakterilerin karışık kültüründe ise polarizasyon eğrileri daha çok katodik tafel bölgesine kaymıştır. Sonuç olarak kontrol ile karşılaştırıldığında *P. marginalis* veya *D. pigra* 'nın tek başlarına olan kültürlerinde korozyon hızı artarken karışık kültürlerinde korozyon hızı azalmıştır. Karışık kültürdeki bakterilerin yumuşak çelik üzerindeki korozyon davranışındaki karşılıklı etkileri tek başlarına olan etkilerinden tamamen farklı olabilir. Kupon yüzey üzerindeki biyofilmin oluşması genel korozyonu ve bölgesel korozyonu azaltabilir (Ghazy, 2013).

Anodik akım potansiyel eğrilerinin çakıştığı görölmektedir ki bu durum bakteri içeren korozyon ürünü filmlerinin anodik çözünme mekanizmasını etkilemediği ve yumuşak çelikteki demir iyonlarının yükselgenmesinin temel olarak yük transfer mekanizmasıyla olduğu şeklinde belirlenmiştir (Qian vd., 2013).

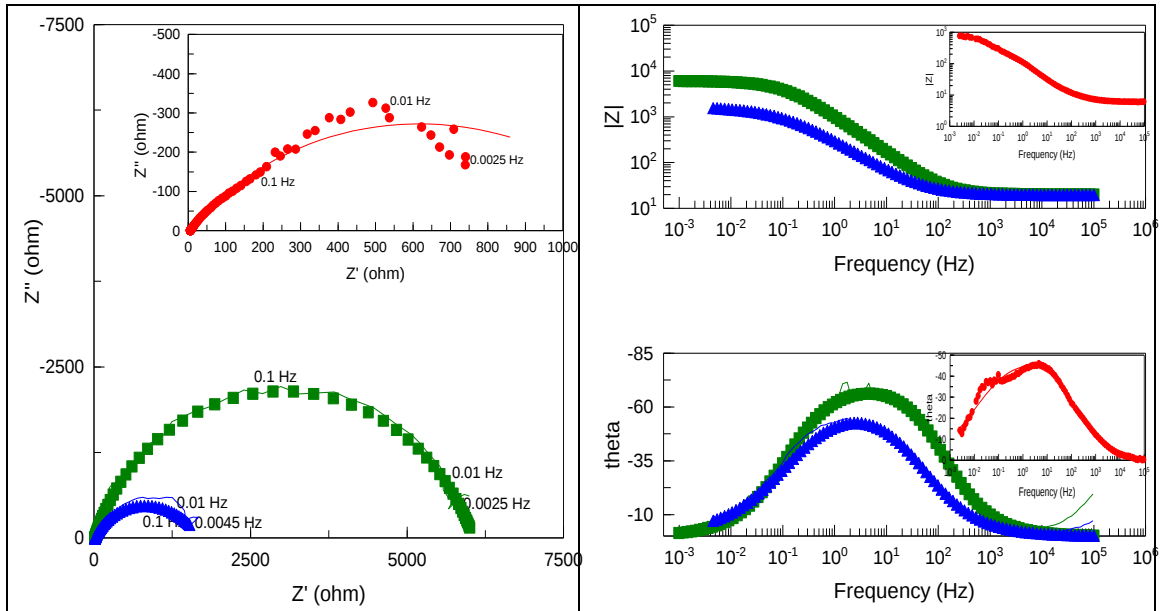
5.3 Alternatif Akım İmpedans Spektrumu Bulguları ve Değerlendirilmesi

Metal yüzeyine uygulanan küçük genlikli alternatif akım, yüzey yapısını fazla değiştirmedeği için alternatif akım impedans spektroskopisi yöntemi metallerin korozyon performansının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Metal/çözelti ara yüzeyinde oluşan elektrokimyasal çift tabakadaki, çift tabaka kapasitesi ve metal yüzeyi ile çözelti derinliklerinde meydana gelen dirençlerin oluşturduğu elektronik eşdeğer devre tasarlanarak polarizasyon direnci belirlenebilir. Gerçek elektrokimyasal sistemlerde metal/çözelti ara yüzeyi yük geçişinden dolayı ideal kapasitör davranışından sapma gösterir. Gerçek bir kondansatörün plakalarında yükler elektron hareketi ile denetlenirken, metal/çözelti ara yüzeyinde iyonlar çözelti tarafını elektronlar ise metal tarafını denetlemektedir. İdeal kapasitör davranışından sapmaların nedeni elektron ve iyonların büyüklük ve hareketlilik bakımından farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Alternatif akım impedans spektroskopisi yöntemiyle elde edilen polarizasyon direnci yüksek ve orta frekans bölgelerinde yük transfer direnci (R_{ct}) ve difüz tabaka direncinin (R_d) toplamından oluşan por direnci (R_{por}) ve düşük frekans bölgesinde film direnci (R_{film}) içerir. Belirtilen dirençlerin $\log f-\theta$ ve $\log f-\log Z$ diyagramları şeklinde verilen Bode diyagramlarından belirlenmesi Nyquist diyagramlarının belirlenmesinden daha kolaydır. Sistemin faz açısı değerleride $\log f-\theta$ grafiklerinden belirlenebilir. İdeal bir kapasitörde faz açısı değeri 90° iken bu değer azalması yüzeyin ideal kapasitörden saptığını gösterir. Faz açısının 45° olması yüzeyde oluşan birikintilerin kararlı bir tabaka oluşturduğunu ve difüzyon kontrollü bir korozyonun gerçekleştiği direnç değerini gösterir. Faz açısı değerinin 45° 'nin altına inmesi yüzeyde oluşan kararlı tabakanın bozulmaya başladığını ve korozyonun difüzyon kontrolünden uzaklaştığını gösterir (Erbil, 1987).

Bu çalışmada kontrol, 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakterili ortamlarda yumuşak çeliğin dört saat, bir gün, dört gün ve yedi gün bekletildikten sonra Nyquist, Bode, faz açısı-log (frekans) eğrileri Şekil 5.10 - 5.13'de verilmiştir. Şekil 5.9'da verilen eşdeğer devre modellerine göre bu eğriler fit edilmiş (uyarlanmış) ve elde edilen elektrokimyasal parametreler Çizelge 5.2 - 5.5'de verilmiştir.



Şekil 5.9. (a) Kontrol, (b) 1,0 g/L bakterili ortam ve (c) 3,0 g/L bakterili ortam için eşdeğer devre modelleri



Şekil 5.10. Yumuşak çeliğin dört saat sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri • : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakterili, ■ : 3,0 g/L bakterili

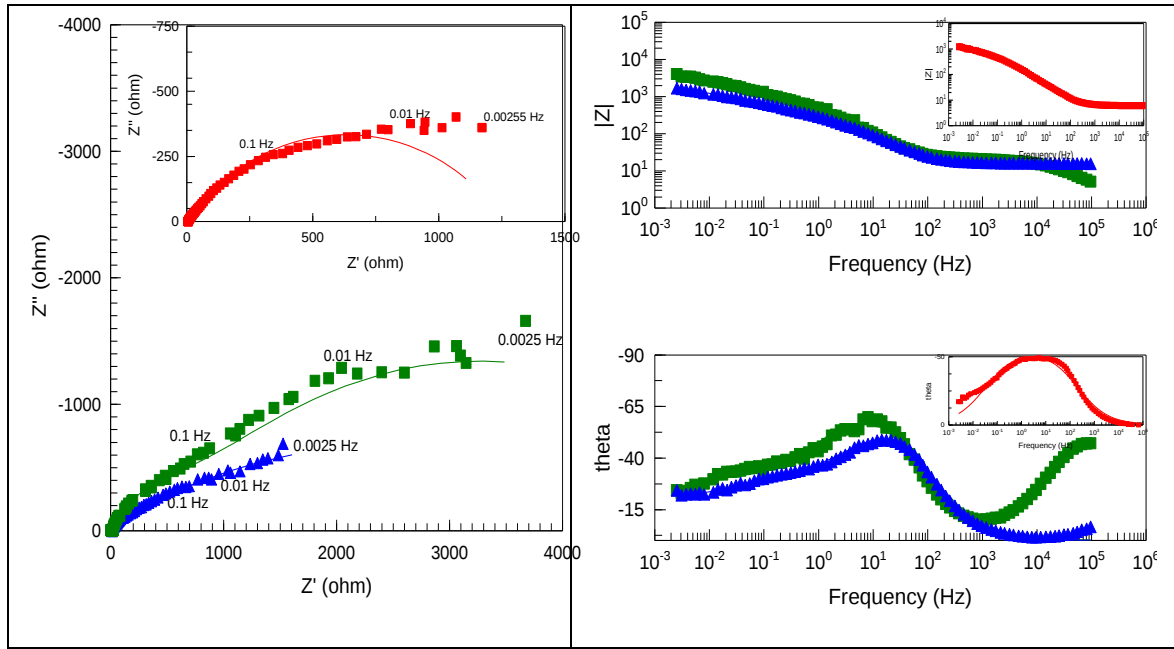
Çizelge 5.2. Yumuşak çeliğin dört saat sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektrokimyasal parametreler

	R_s	n	$CPE \mu F/cm^2$	R_f	R_{por}	R_p	R_{lp}^*
Kontrol	5,75	0,57	3341	-	1018	1018	1125
1,0 g/L bakteri	19,6	0,75	947	108	1626	1734	1756
3,0 g/L bakteri	20,00	0,82	200	2821	3230	6071	5645

* R_{lp} : Lineer polarizasyon direnci

Kontrol ortamında dört saat bekleme sonunda polarizasyon direnci 1018 ohm iken 1,0 g/L bakteri içeren ortamda 1734 ohm ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamda 6071 ohm olmuştur. Sabit faz katsayısı (n) değeri kontrol ortamında 0,57 iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla 0,75 ve 0,82 olmuştur. Sabit faz elementi (CPE) değerleri kontrol ortamında $3341 \mu F/cm^2$ iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla $947 \mu F/cm^2$ ve $200 \mu F/cm^2$ olmuştur. Faz açısının maksimum olduğu değerler kontrol ortamında 45° iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla 55° ve 71° olmuştur. Ortama bakteri ilave edildiğinde; polarizasyon direncindeki artış, CPE değerlerindeki azalış ve faz açısı değerlerindeki artış bazı araştırmacıların da belirttikleri gibi bakterinin elektrot yüzeyinde oluşturduğu koruyucu biyofilm tabakasından kaynaklanmaktadır.

Kontrol, 1,0 g/L bakteri ve 3,0 g/L bakteri ortamlarında yumuşak çeliğin bir gün bekletildikten sonra elde edilen Nyquist, Bode, faz açısı-log(frekans) eğrileri Şekil 5.11 ve bu eğrilerden elde edilen elektrokimyasal parametreler Çizelge 5.3’de verilmiştir.



Şekil 5.11. Yumuşak çeliğin bir gün sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri • : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakterili, ■ : 3,0 g/L bakterili

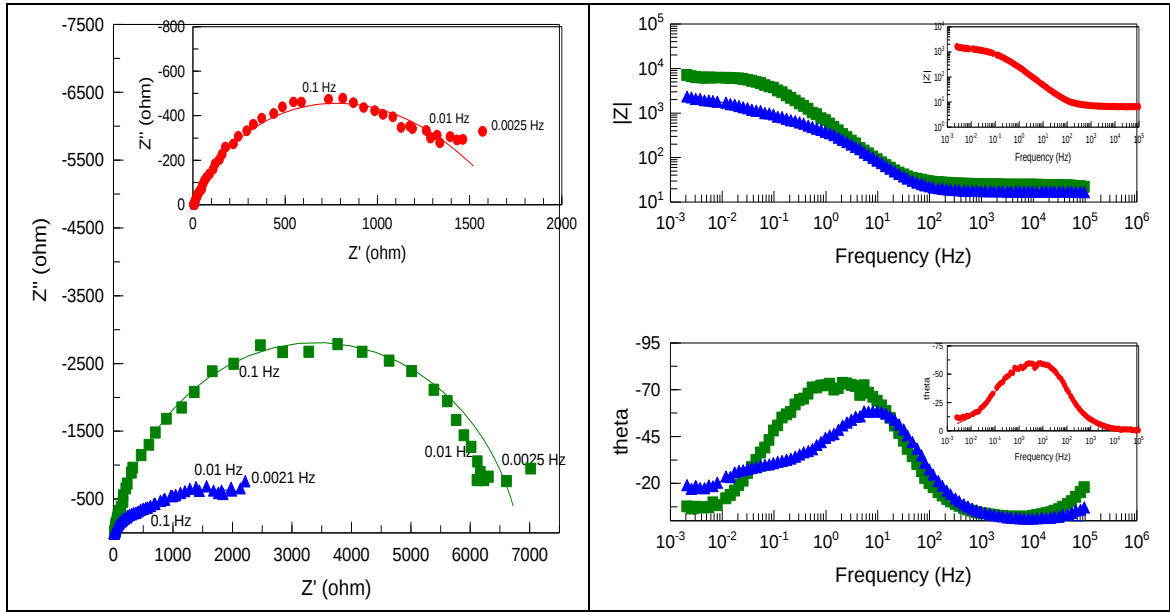
Çizelge 5.3. Yumuşak çeliğin bir gün sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektrokimyasal parametreler

	R_s	n	$CPE \mu F/cm^2$	R_f	R_{por}	R_p	R_{lp}^*
Kontrol	5,6	0,62	2087	-	1253	1750	1339
1,0 g/L bakteri	15,4	0,77	580	261	1834	2095	2165
3,0 g/L bakteri	15,9	0,77	443	949	5014	5979	4974

* R_{lp} : Lineer polarizasyon direnci

Kontrol ortamında bir günlük bekleme sonunda R_p değeri 1750 ohm iken 1,0 g/L bakteri içeren ortamda 2095 ohm ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamda 5979 ohm olmuştur. n değeri kontrol ortamında 0,62 iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda 0,77 olmuştur. CPE değerleri kontrol ortamında 2087 $\mu F/cm^2$ iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla 580 $\mu F/cm^2$ ve 443 $\mu F/cm^2$ olmuştur. Faz açısının maksimum olduğu değerler kontrol ortamında 49° iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla 49° ve 60° olmuştur.

Kontrol, 1,0 g/L bakteri ve 3,0 g/L bakteri ortamlarında yumuşak çeliğin dört gün bekletildikten sonra elde edilen Nyquist, Bode, faz açısı-log(frekans) eğrileri Şekil 5.12 ve bu eğrilerden elde edilen elektrokimyasal parametreler Çizelge 5.4'te verilmiştir.



Şekil 5.12. Yumuşak çeliğin dört gün sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri ● : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakterili, ■ : 3,0 g/L bakterili

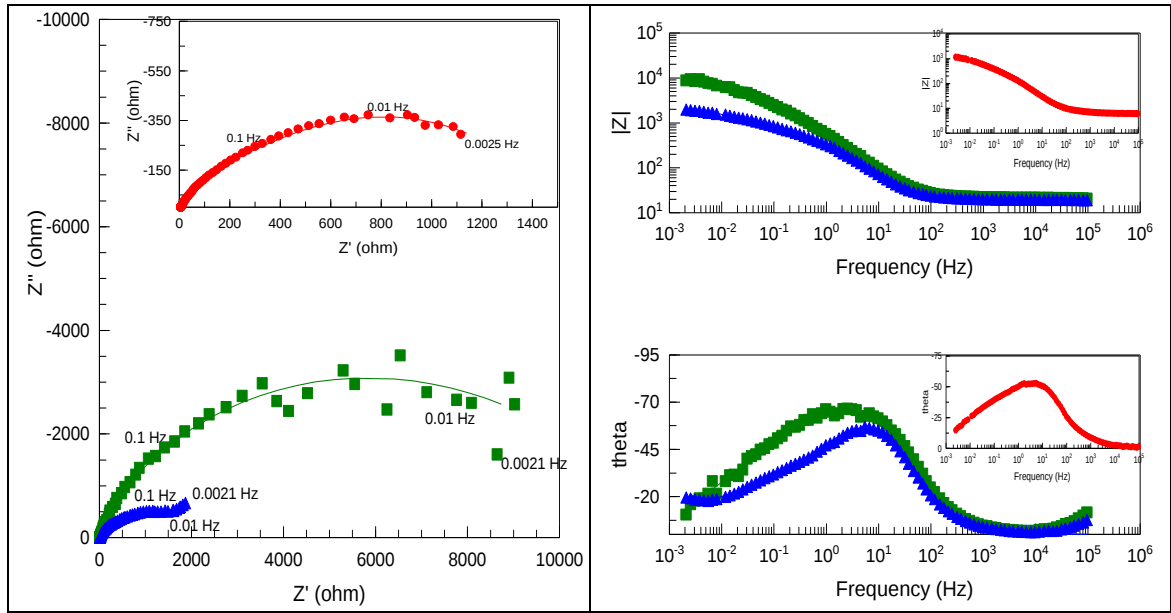
Çizelge 5.4. Yumuşak çeliğin dört gün sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektrokimyasal parametreler

	R_s	n	$CPE \mu F/cm^2$	R_f	R_{por}	R_p	R_{lp}^*
Kontrol	6,43	0,74	1039	-	1453	1453	1143
1,0 g/L bakteri	16,9	0,87	492	451	2112	2563	2326
3,0 g/L bakteri	24,54	0,90	314	2500	4400	6925	6789

* R_{lp} : Lineer polarizasyon direnci

Kontrol ortamında dört günlük bekleme sonunda R_p değeri 1453 ohm iken 1,0 g/L bakteri içeren ortamda 2563 ohm ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamda 6925 ohm olmuştur. n değeri kontrol ortamında 0,74 iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla 0,87 ve 0,90 olmuştur. CPE değerleri kontrol ortamında $1039 \mu F/cm^2$ iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla $492 \mu F/cm^2$ ve $314 \mu F/cm^2$ olmuştur. Faz açısının maksimum olduğu değerler kontrol ortamında 59° iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarında sırasıyla 58° ve 74° olmuştur.

Kontrol, 1,0 g/L bakteri ve 3,0 g/L bakteri ortamlarında yumuşak çeliğin yedi gün bekletildikten sonra elde edilen Nyquist, Bode, faz açısı-log(frekans) eğrileri Şekil 5.13 ve bu eğrilerden elde edilen elektrokimyasal parametreler Çizelge 5.5'te verilmiştir.



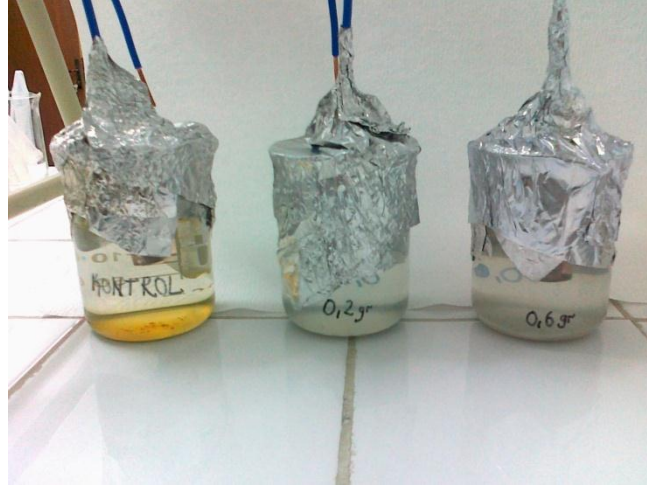
Şekil 5.13. Yumuşak çeliğin yedi gün sonunda elde edilen Nyquist, faz açısı – log (frekans) ve Bode eğrileri • : kontrol, ▲ : 1,0 g/L bakterili, ■ : 3,0 g/L bakterili

Çizelge 5.5. Yumuşak çeliğin yedi gün sonunda EIS sonuçlarından belirlenen elektrokimyasal parametreler

	R_s	n	$CPE \mu F/cm^2$	R_f	R_{por}	R_p	R_{lp}^*
Kontrol	6,1	0,64	2630	-	1229	1229	1300
1,0 g/L bakteri	19,2	0,85	704	458	1782	2240	2042
3,0 g/L bakteri	21,51	0,85	343	1756	10895	12673	7850

* R_{lp} : Lineer polarizasyon direnci

Kontrol ortamında yedi günlük bekleme sonunda R_p değeri 1229 ohm iken 1,0 g/L bakteri içeren ortamda 2240 ohm ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamda 12673 ohm olmuştur. n değeri kontrol ortamında 0,64 iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda 0,85 olmuştur. CPE değerleri kontrol ortamında $2630 \mu F/cm^2$ iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda sırasıyla $704 \mu F/cm^2$ ve $343 \mu F/cm^2$ olmuştur. Faz açısının maksimum olduğu değerler kontrol ortamında 53° iken 1,0 g/L ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarında sırasıyla 56° ve 67° olmuştur.



Fotoğraf 5.1. Kontrol ve bakteri içeren ortamlar

Fotoğraf 5.1'den görüldüğü gibi kontrol ortamında demir korozyonu sonucu oluşan hidroksit ve oksitler gözle görülür halde belirginleşmiştir. Bakteri içeren ortamlarda bu oluşumlar gözlenmemektedir.

Dördüncü saatten 7. güne kadar bekleme süresinin artmasıyla kontrol ortamlarında direnç değerlerinde çok fazla değişim gözlenmemiştir. Kontrol ortamında polarizasyon direnci değerlerinin zamanla fazla değişmemesi, yüzeyde koruyucu olmayan doğal korozyon ürünlerinin oluştuğunu göstermektedir (Doğruöz, 2008). pH'nın nötre yakın olduğu NaCl ortamında metalin çözünmesi sonucu yüzeyde demir hidroksitler oluşmaktadır.

Ortama 1,0 g/L bakteri ilave edildiğinde polarizasyon direnci 1734 ohm'dan 2240 ohm'a yükselmiştir. 1,0 g/L bakteri içeren ortamda direnç değerleri kontrol ortamına göre biraz daha yüksek çıkmıştır. Polarizasyon direnci değerlerinin çok az artması yüzeyde korozyon ürünlerini içeren poröz bir tabakayla birlikte ince bir biyofilm tabakasının oluşmasından kaynaklanıyor olmalıdır. Juzeliunas ve arkadaşlarının; çinko, yumuşak çelik ve alüminyum ile *Bacillus mycoides* içeren ortamda yaptıkları çalışmada mikroorganizmanın yumuşak çeliğin korozyonunu kontrol ortamına göre fazla değiştirmediğini bulmuşlardır (Juzeliunas vd., 2006).

Ortama 3,0 g/L bakteri ilave edildiğinde polarizasyon direnci 6071 ohm'dan 12673 ohm'a artmıştır. Direncin kontrol grubuna ve 1,0 g/L bakteri içeren ortama göre bu kadar artması, metal yüzeyinde biyofilm içeren poröz tabakanın dışında yoğun bir biyofilm tabakasının oluşmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Bakteri içeren ortamlarda direnç değerlerinin artması (a) biyofilmin korozyon ürünlerinin difüzyonuna bir engel olarak hareket etmesi ve böylece metal çözünme sürecini baskılaması, (b) elektrot yüzeyine ulaşan oksijen konsantrasyonunun azalması ve/veya (c) bakterinin ürettiği metabolik ürünlerin yumuşak çelik için korozyon inhibitörü olarak etki etmesi sonuçlarının biri ve ya birden fazlasının olmasından kaynaklanabilir (Chongdar vd., 2005).

Kontrol ortamına bakteri inoküle edildiğinde n değerlerinin artması yüzeydeki pürüzlülüğün azalması şeklinde yorumlanabilir. SEM mikrograflarında bu düşüncüyü desteklemektedir. Mikroorganizma içeren ortamlarda kontrol ortamına göre kapasitans değerlerinin azalması, metal yüzeyinde mikroorganizmanın adsorpsiyonu sonucu elektriksel çift tabakanın kalınlığının artması ve /ve ya dielektrik sabitinin azalması ile açıklanabilir (Moradi vd., 2013).

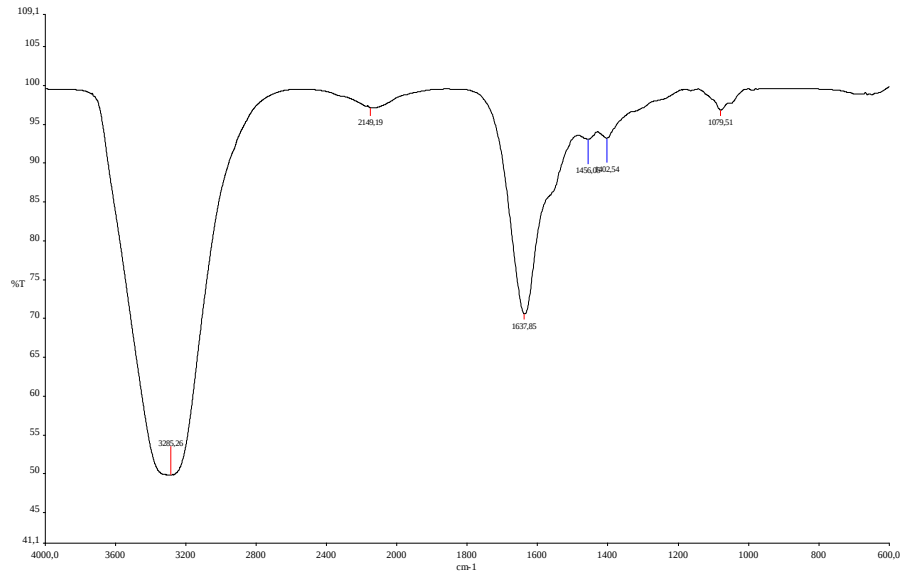
Aynı zaman dilimlerinde mikroorganizma ortamında faz açısı-log (frekans) değerleri kontrol ortamlarına göre daha yüksek olması metal yüzeyinde mikroorganizmaların tutunmasından kaynaklanmaktadır (López vd., 2003; Mert vd., 2011).

Bakterinin varlığında çeliğin yüzeyinde oluşan yoğun biyofilm tabakası ve korozyon ürünleri metal yüzeyi ve çözelti arasında iyi bir mekanik bariyer oluşturarak korozyon prosesini inhibe etmektedir (Juzeliunas vd., 2006).

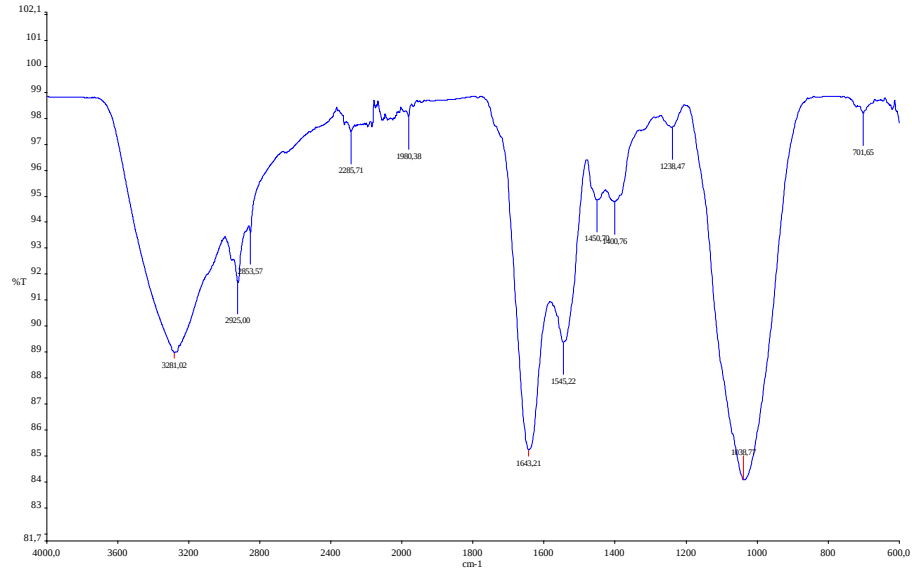
Lineer polarizasyon direnci yöntemiyle belirlenen direnç değerleride impedans yöntemiyle belirlenenlerle uyumlu olmuştur.

5.4. Biyofilim, Vejetatif - Sporlu Bakteri ve Kristal Toksinin Yapısının ATR-IR Analizi ile Değerlendirilmesi

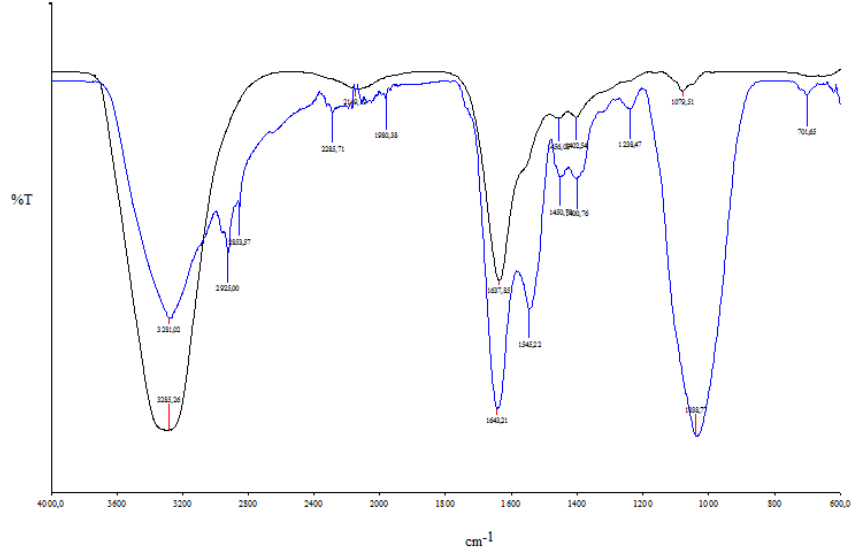
ATR-IR çalışması için kontrol olarak 15 günlük bakteri kültürü, kontrol biyofilim olarak kullanılmıştır. Kontrol biyofilimin ATR-IR sonuçları olarak, 3285 cm^{-1} , 2149 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} ve 1079 cm^{-1} pikleri elde edilmiştir (Şekil 5.14). 3285 cm^{-1} deki pikin OH/NH geriliminden kaynaklandığı, 1637 cm^{-1} amid I kaynaklı, 1456 cm^{-1} ve 1402 cm^{-1} deki piklerin COO⁻dan kaynaklandığı, 1079 cm^{-1} pikin P-O-C geriliminden kaynaklandığı belirtilmiştir. Korozyon hücresinden alınan biyofilimde 2285 cm^{-1} ve kontrol bakterideki 2149 cm^{-1} pikin ne olduğu tespit edilememiştir. *Bacillus thuringiensis* sporlanma aşamasında protein yapıda bir kristal toksin üretmektedir. Kristal toksin yanı sıra çeşitli ekzotoksinler ve enzimler ürettiği de saptandığından bu konuda daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği açıktır.



Şekil 5.14. Kontrol biyofilimin ATR-IR sonucu



Şekil 5.15. Metal yüzeyinde bakterinin oluşturduğu biyofilmin ATR-IR sonucu



Şekil 5.16. Metal yüzeyinde bakterinin oluşturduğu biyofilmin ve kontrol biyofilmin ATR-IR sonuçları

Literatürde 3000 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} bant aralığının adsorbe edilmiş su molekülleri ve OH/NH gruplarının varlığından kaynaklandığı belirtilmiştir (Ghafari vd., 2013). Şekil 5.15’de görüldüğü gibi 3281 cm^{-1} pikinin N-H titreşim eğilmesinden veya O-H gerilmesinden kaynaklandığı, hatta bu aralıklardaki bantların hidrokarbonlu bileşiklerden kaynaklandığı da belirtilmektedir (San vd., 2011).

Birikintilerin organik ve inorganik maddelerin karışımıyla kurulması biyofilm varlığının en iyi göstergesidir ve bu pikler absorpsiyondan (tutunmadan) kaynaklanmaktadır.

Biyofilm yüzeyindeki organik asit ve inorganik maddelerin karışımından kaynaklanan birikintiler biyofilm varlığının kanıtı olarak 2950 cm^{-1} ve 2880 cm^{-1} bant aralığında pik vermiştir (Filip vd., 2004; San vd., 2011). Literatürdeki gibi, Şekil 5.15’de hidrokarbonlardan dolayı 2853 cm^{-1} görülen pik alifatik CH_2 simetrik geriliminden, 2925 cm^{-1} görülen pik ise CH_2 asimetrik geriliminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

2367 cm^{-1} ve 2344 cm^{-1} piklerinin karboksilik asiti işaret ettiği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Şekil 5.14’de 2285 cm^{-1} pikinin de karboksilik asit olabileceği düşünülmektedir (Sunkar ve Vallı-Nachıyar, 2013). Literatürde protein varlığına bağlı olarak $1626\text{ cm}^{-1} - 1656\text{ cm}^{-1}$ bant aralığının amid I grubuna ait olduğu, ayrıca $1900\text{ cm}^{-1} - 1980\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki piklerin CO bağlı sitokromlardaki C=O gerilimden kaynaklandığı belirtilmiştir (Dzwolak vd., 2002; Huang, 2011; San vd., 2011). Bu çalışmadaki 1980 cm^{-1} pikin, sporlanma aşamasına geçen hücrenin sporangiyumunun parçalanması sonucunda ortaya çıkan sitokromlardaki C=O gerilimden kaynaklandığı, yine aynı nedenle proteinlere ait olduğu düşünülen 1643 cm^{-1} pikinin amid I’in C=O geriliminden kaynaklandığı düşünülmektedir. 1545 cm^{-1} pikinin ise amid II’nin C-N grubuna ait olduğu ve polipeptid yapısından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Huang 2011; San vd., 2011). $1200\text{ cm}^{-1} - 1250\text{ cm}^{-1}$ arasındaki piklerin amid III grubuna ait P=O fosfodiester ve monoester fosfat olduğu belirtilmiş olup, 1238 cm^{-1} pikinin de amid III grubuna ait olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca $900 - 1200$ bant aralığının P-O-C ve C-O-C bağlarına ait olduğu ve oligo ve polisakkaritlere işaret edildiği belirtilmiştir. Şekil 5.14’de 1038 cm^{-1} piki de bu bant aralığında bulunmaktadır (San vd., 2011; Forrester vd., 2009; Ngo-Thi, 2003).

Bacillus cinsine ait bakterilerin vejetatif hücre ve endospor olarak iki farklı fizyolojik durumlarında tanımlayıcı olarak ATR-IR çalışmaları yapıldığında, endospora özgü olan kalsiyum dipikolinat piklerinin ayırt edici olduğu belirlenmiştir (Stöckhel vd., 2010). Dipikolinik asit, sporulasyon sırasında bakterinin ürettiği bir organik bileşik olup spor yapısında kalsiyumla birlikte kelat olarak bulunmaktadır. Literatürde 1400 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} piklerinin protein zincirindeki COO- geriliminden kaynaklandığı belirtilmiş olup (Chauhan ve Gunasekaran, 2007), bir çalışmada ise $1400\text{ cm}^{-1} - 1570\text{ cm}^{-1}$ civarındaki piklerin piridin vibrasyonuna veya kalsiyum dipikolinik asite ait olduğu da tespit edilmiştir. Buna göre, Şekil 5.15’deki 1400 , 1450 ve 1545 cm^{-1} pikleri bu bant

aralığında bulunmakta olup biyofilm yapısı içerisindeki endosporlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Stöckel vd., 2010).

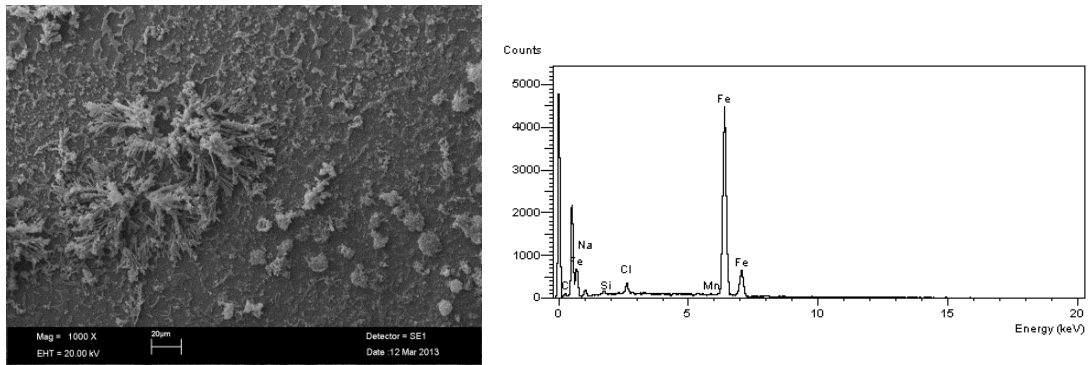
Bu çalışmada kontrol olarak kullanılan Şekil 5.14’de varlığı görülmeyen fakat Şekil 5.15’de görülen 701 cm^{-1} pikinin elektrot yüzeyinden toplanan biyofilmin ATR-IR spektrumunda kalsiyum dipikolinatı işaret ettiği tespit edilmiş olup, korozyon hücresinde elektrot üzerinden yapılan vejetatif ve endosporlu bakteri sayımlarında dördüncü günden sonra endosporlu bakteri sayısının arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla 7. günde elektrot üzerinden alınan bakteri biyofilminde endosporun varlığı kanıtlamaktadır (Valentine vd., 2007).

Mikrobiyolojik korozyon ile ilgili yapılan çalışmalarda bakteriyel biyofilmden elde edilen ATR-IR sonuçlarında demir ile biyofilm arasında kimyasal bir kompleks olduğu ve 450 cm^{-1} ile 700 cm^{-1} aralığındaki piklerin Fe_2O_3 ’ten kaynaklandığı belirtilmiştir. *Pseudomonas* türlerinin kullanıldığı çalışmada, biyofilmden demir oksit varlığı 793 cm^{-1} piki olarak gösterilmiştir (Chongdar vd., 2005). Bir başka çalışmada boru hatlarında farklı istasyonlardan bakteri izolasyonları yapılmış ve elde edilen bakterilerin demir bakterileri, mangan biriktiren bakteriler ve bazılarının heterotrofik bakteriler olduğu saptanmıştır. Bu bakterilerin bulunduğu istasyonlardaki biyofilmlerden alınan ATR-IR analiz sonuçlarında korozyon sonucu elde edilen demir oksit piki 604 cm^{-1} ve 605 cm^{-1} bantları olarak tanımlanmıştır (Maruthamuthu vd., 2005). Bir başka çalışmada ise, süt fermentasyon ürünlerinin atık suyundaki bakteri biyofilminde 743 cm^{-1} piki demir oksit piki 626 cm^{-1} piki ise karbon klorür piki olarak belirlenmiştir (Ramesh Babu vd., 2006). Biyofilmden Fe piki tespit edilen çalışmaların büyük bölümünde SEM görüntüleriyle de çukur korozyonu gösterilmiştir.

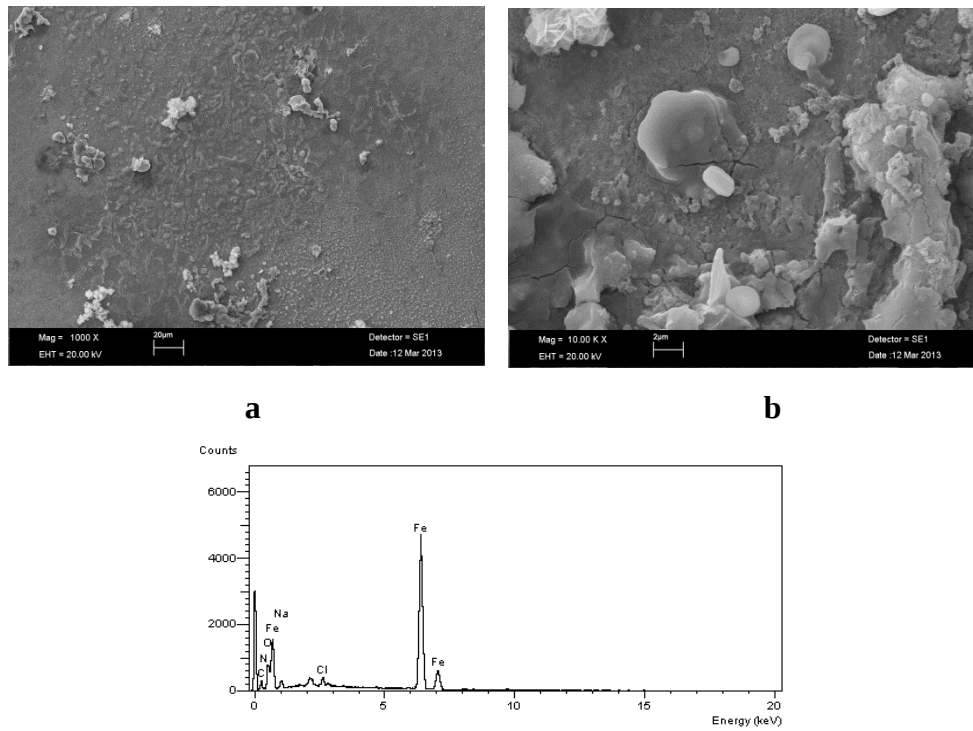
Korozif özellikteki *Desulfovibrio* biyofilmleriyle yapılan çalışmalarda metabolik aktivite nedeniyle bakteriyel korozyon ürünü olarak demir bileşiklerine rastlanmış ayrıca bu tip bakteriyel biyofilmlerden elde edilen EPS ürünlerinin de demir bağladığı tespit edilmiştir (Beech ve Sunner 2004; Kakooei vd., 2012). 701 cm^{-1} ’de görülen pik sporlanmadan kaynaklanan piktir. Demir biyofilm kompleksine ait pik görülemediğinden biyofilmin yüzeyde fiziksel olarak tutunduğu sonucuna varılmıştır.

5.5 Yüzey Fotoğraflarının Değerlendirilmesi

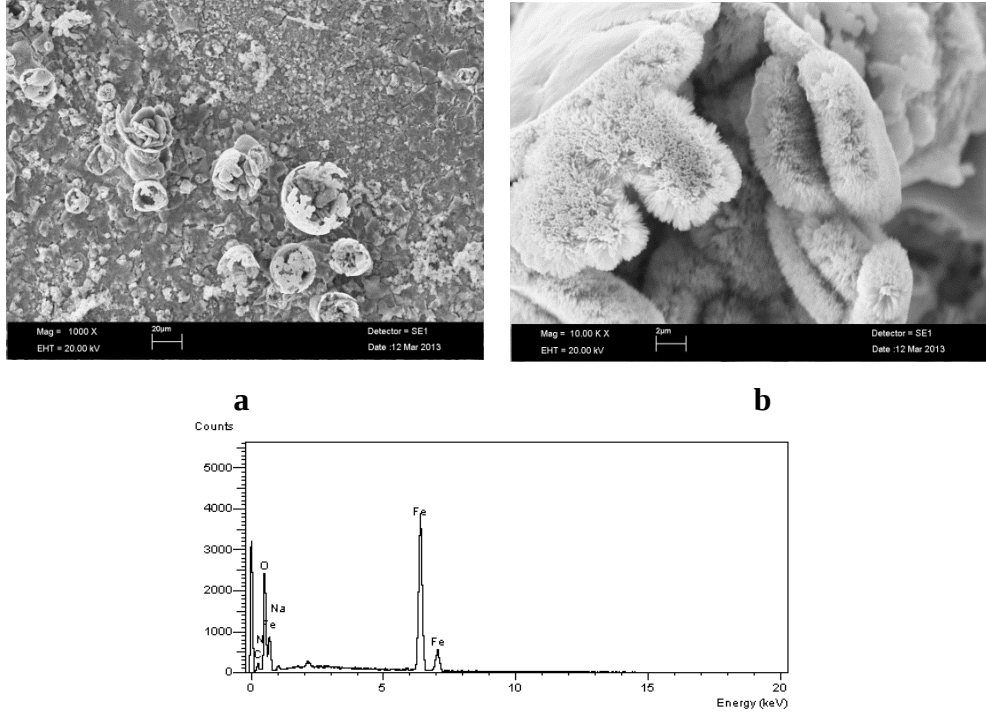
Elektrotların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasını ve korozyon ürünlerini belirlemek için kontrol ortamında 7. gün sonunda, 1,0 g/L bakteri ve 3,0 g/L bakteri içeren ortamlarda ise 1., 4. ve 7. günlerin sonunda elektrot yüzeylerinin mikrografları SEM ile görüntülenmiş ve kütlece yüzey bileşimi EDX ile analizi belirlenmiştir (Şekil 5.17 - 5.23).



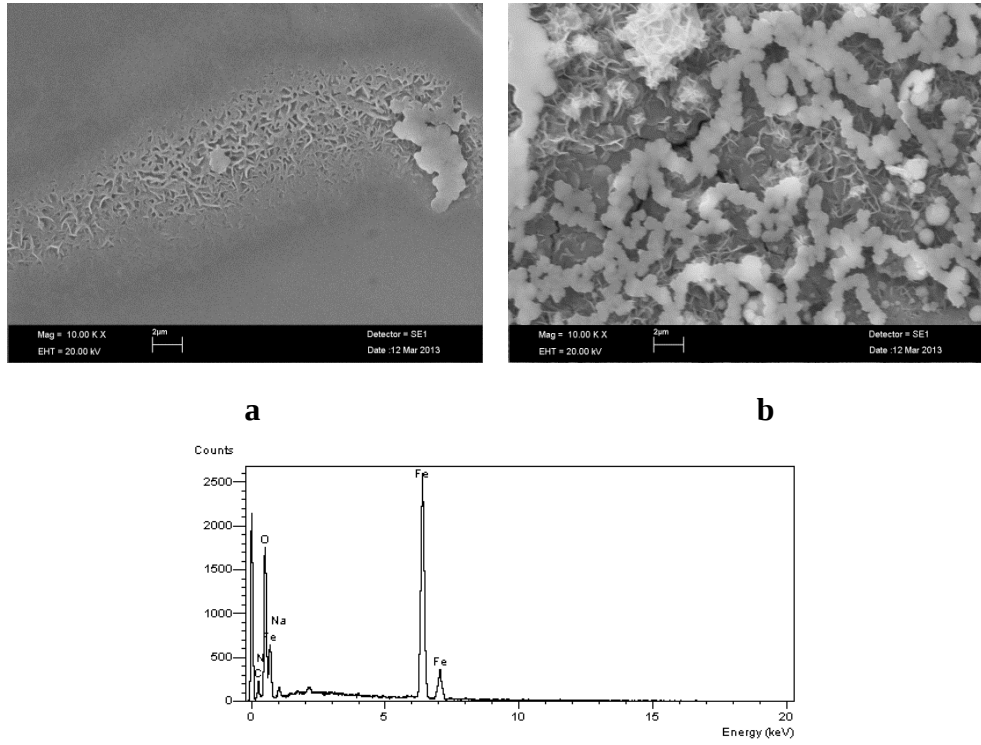
Şekil 5.17. Kontrol ortamındaki elektrodun SEM mikrografı (1000x) ve EDX spektrumu



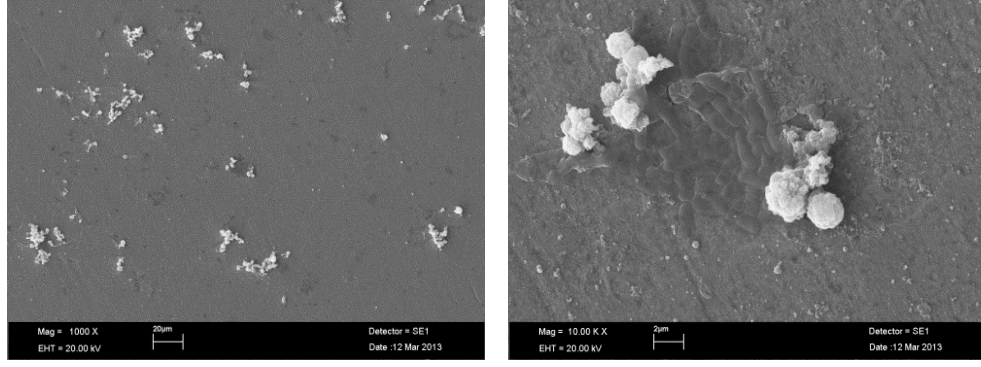
Şekil 5.18. 1,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 1. gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu (a: 1000 x, b: 10000 x)



Şekil 5.19. 1,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 4. gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu (a: 1000 x, b: 10000 x)

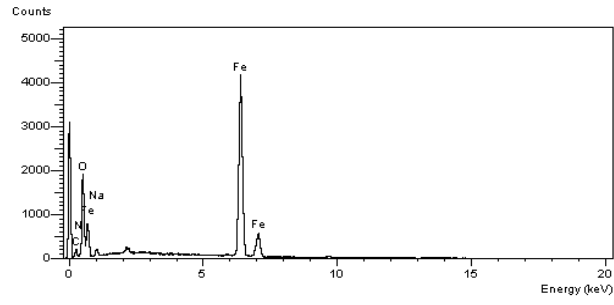


Şekil 5.20. 1 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 7. gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu (a: 1000 x, b: 10000 x)

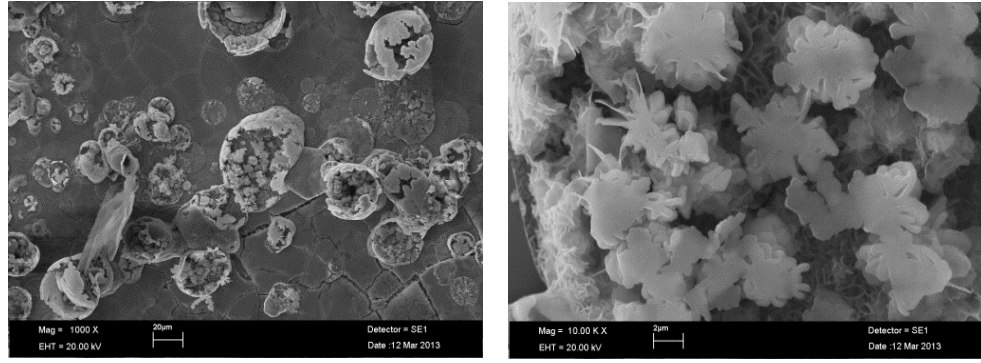


a

b

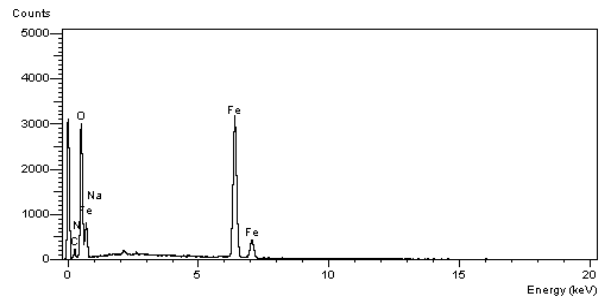


Şekil 5.21. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 1. gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu (a: 1000 x, b: 10000 x)

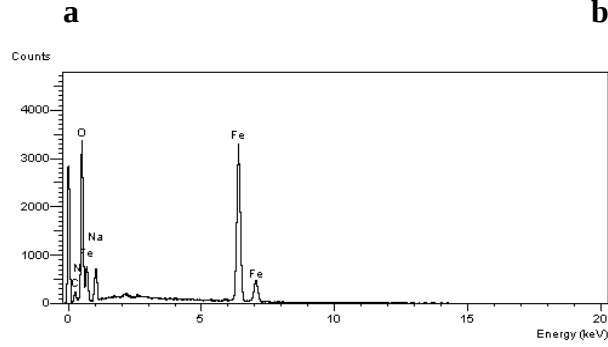
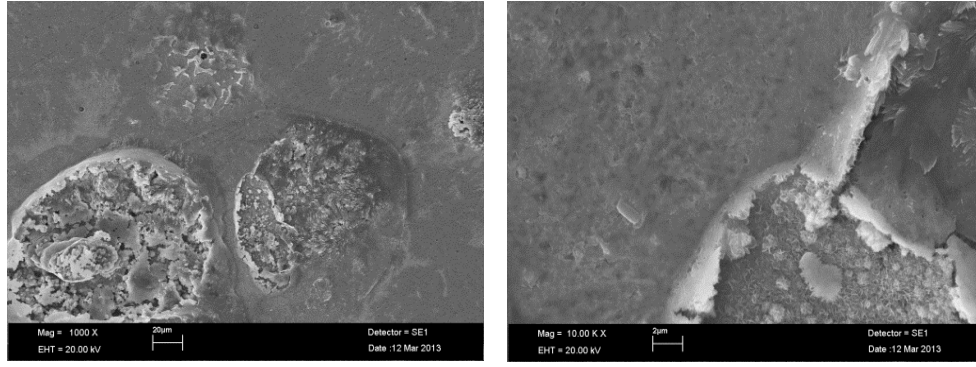


a

b



Şekil 5.22. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 4. gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu (a: 1000 x, b: 10000 x)



Şekil 5.23. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun 7. gün SEM mikrografları ve EDX spektrumu (a: 1000 x, b: 10000 x)

Kontrol ortamında elektrot yüzeyine tutunmuş tuz kristalleri gözlenirken (Şekil 5.17), mikroorganizma içeren ortamlarda elektrot yüzeyinde bakterilerin tuz kristalleriyle birikim oluşturdıkları ve bakterinin, yüzeyi tuz örtüsü ile birlikte tamamen kapladığı ve 7. güne kadar daha düzgün bir görünüm oluşturduğu görülmektedir (Şekil 5.18, 5.19, 5.20). Ayrıca 3,0 g/L bakterili elektrot yüzeyinde biyofilm tabakasının ve buna bağlı tuz birikimlerinin daha yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 5.21, 5.22, 5.23). Bu mikrograflarda elektrotun yüzeyine bakterilerin tutunup biyofilm oluşturdıkları ve yüzeyi kapladıkları tespit edilmiştir.

Ayrıca bakterinin biyokorozyon üzerindeki etki mekanizması hakkında fikir vermesi açısından SEM analizinden sonra EDX analizleri de yapılmıştır. Bu verileri destekler nitelikte yüzeyde bakterinin oluşturduğu biyofilm ve tuz birikintileri C, O, N ve Na elementlerinden dolayı net bir biçimde görülmektedir.

Çizelge 5.6. Elektrot yüzeylerinin EDX analiz sonuçları

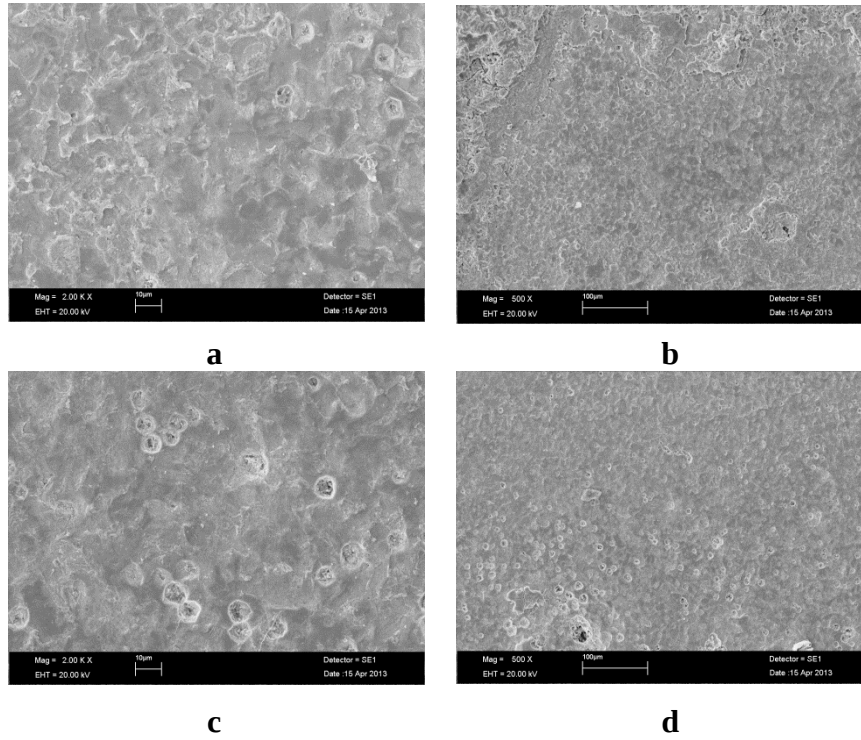
% Element	Kontrol	1,0 g/L bakteri			3,0 g/L bakteri		
	7. gün	1.gün	4.gün	7.gün	1.gün	4.gün	7.gün
C	13,90	22.15	14.56	15.91	15.17	13.65	13.83
N	-	10.58	10.95	11.66	10.97	11.27	10.26
O	-	21.92	48.40	48.82	42.03	55.54	52.96
Na	6,07	3.35	1.01	1.60	2.01	0.13	5.61
Cl	2,25	1.15	-	-	-	-	-
Fe	76,39	40.85	25.09	22.00	29.82	19.42	17.34
Si	1,02	-	-	-	-	-	-
Mn	0,37	-	-	-	-	-	-

EDX analiz bulgularına göre kontrol ortamında yedi gün bekletilen elektrodun yüzeyinde oksijen ve azot görülmemektedir. 1,0 g/L bakterili ortamda 1, 4 ve 7. günün sonunda yapılan EDX analiz sonuçlarına göre kütlece azot miktarı 10,58, 10,95 ve 11,66 ve kütlece oksijen miktarı 21,92, 48,40 ve 48,82 olmuştur. 3,0 g/L bakterili ortamda 1, 4 ve 7. günün sonunda yapılan EDX analiz sonuçlarında ise kütlece azot miktarı 10,97, 11,27 ve 10,26 ve kütlece oksijen miktarı 42,03, 55,54 ve 52,96 olmuştur. Bakterili ortamda N ve O olması beklenen bir sonuçtur. Çünkü oluşan biyofilm EPS içermektedir. EPS'nin yapısında da protein vardır. Bütün canlılarda en fazla bulunan makro moleküller karbon, oksijen ve azottur. Bu çalışmada elektrot yüzeyinde bakteriyel biyofilm nedeniyle bu elementlerin değerleri Çizelge 5.6'da görüldüğü gibi yüksek oranlarda çıkmıştır.

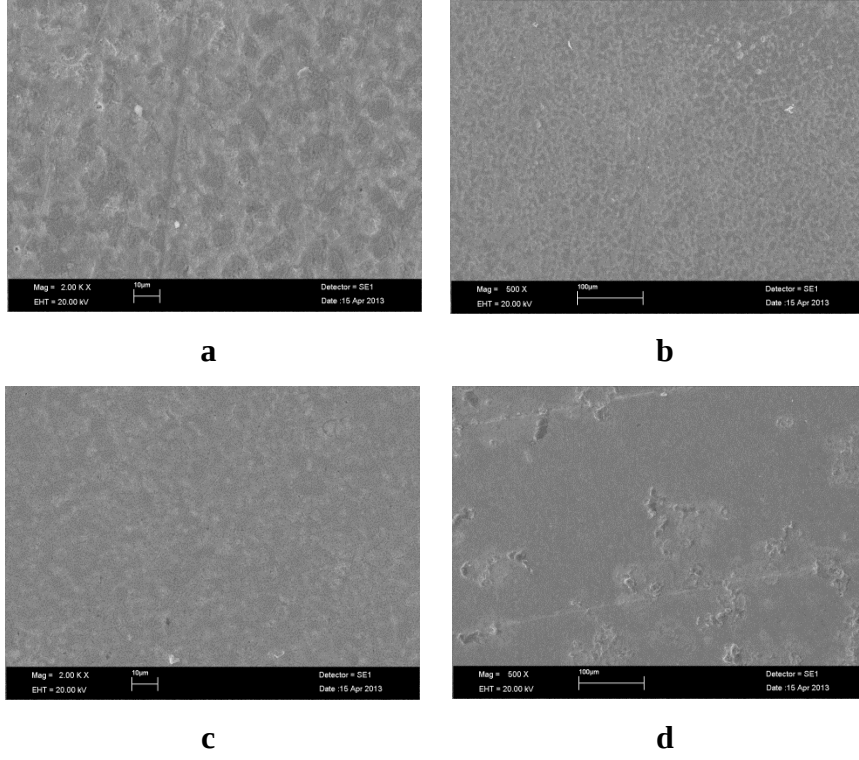
Ayrıca kontrol ortamında 7. günün sonunda % Fe miktarı 76,39 iken 1,0 g/L bakteri içeren ortamda 1, 4 ve 7. günün sonunda sırasıyla 40,85, 25,09, 22,00 ve 3,0 g/L bakterili ortamda sırasıyla 29,82, 19,42 ve 17,34 olarak bulunmuştur. Bu verilerden 3,0 g/L bakteri içeren ortamda çözünen demir miktarının daha az olması elektrot yüzeyinin biyofilmle kaplanması sonucu korozyonun inhibe olduğunu göstermektedir.

Kontrol ve bakteri içeren ortamlarda yedi gün bekletilen elektrotların yüzeylerindeki biyofilm tabakası temizlenmiş ve elektrotların SEM analizi ile 500 ve 2000x büyütülerek alınan yüzey mikrografları Şekil 5.24 - Şekil 5.26'de verilmiştir. Bu mikrograflardan kontrol ortamındaki elektrotta yüzeyin genel olarak bozulduğu, çukurcuk ve çatlakların oluştuğu gözlenmektedir (Şekil 5.24).

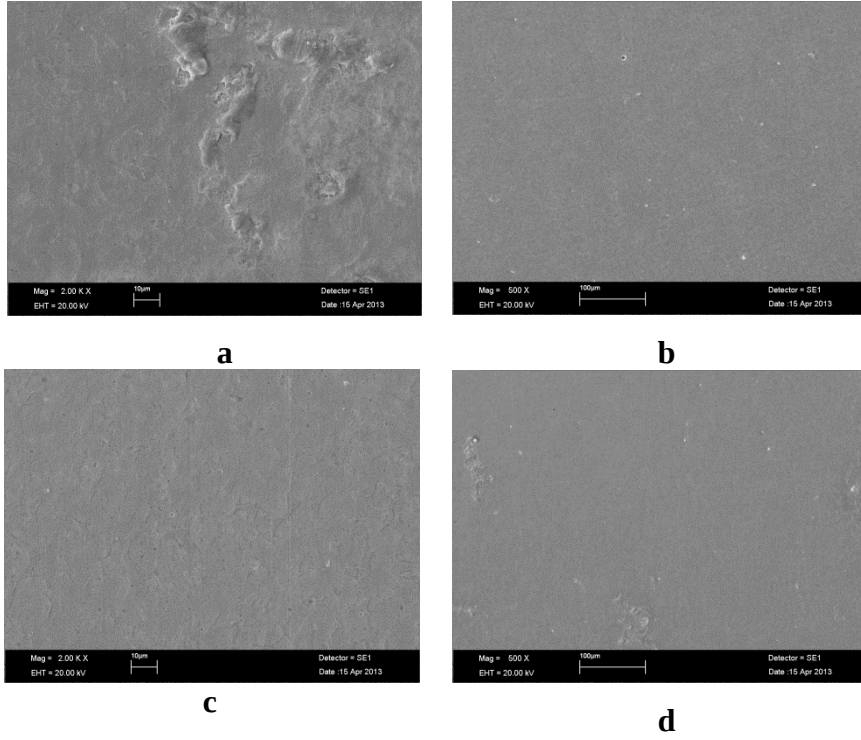
Ortama eklenen bakterinin derişimi arttıkça biyofilm oluşumundan dolayı yumuşak çelik ve agresif ortam arasındaki contağın azalmasıyla çatlakların ve çukarların kaybolduğu ve yüzeylerin daha düz bir görünüm aldığı görülmektedir (Şekil 5.25 - Şekil 5.26).



Şekil 5.24. Kontrol ortamındaki elektrodun yüzey silindikten sonraki SEM mikrografları (a: 2000 x, b: 500x, c: 2000 x, d:500x)



Şekil 5.25. 1,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun yüzey silindikten sonraki SEM mikrografları (a: 2000 x, b: 500x, c: 2000 x, d:500x)



Şekil 5.26. 3,0 g/L bakteri ortamındaki elektrodun yüzey silindikten sonraki SEM mikrografları (a: 2000 x, b: 500x, c: 2000 x, d:500x)

BÖLÜM VI

SONUÇ ve ÖNERİLER

Serum fizyolojik ortamda (% 0,9 NaCl) *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin iki farklı konsantrasyonunun (1,0 g/L ve 3,0 g/L) yumuşak çelik üzerindeki aktivitesi 4. saat, 1. gün, 4. gün ve 7.gün sonunda elektrokimyasal korozyon hızı ölçme yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca yüzey morfolojisi SEM, yüzeyin kütlece yüzde bileşimi EDX analizi ve biyofilmin yapısı ATR-IR ile araştırılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

6.1 Sonuçlar

- 1) Elektrot yüzeyinden yapılan bakteri sayımlarında vejetatif formdaki bakteri sayısı 4. saatten itibaren artıp 4. günden sonra azalmaya başlamış, sporlu formdaki bakteri sayısı ise 4. saatten itibaren giderek artmıştır. Bu durum her iki bakteri konsantrasyonları içinde aynı olmuştur.
- 2) Literatürde *Bacillus thuringiensis* gibi hetetrofik bakterilerin gelişimlerini uygun besiyerlerinde sürdürmelerine karşın bu tez çalışmasında elektrot içermeyen serum fizyolojik ortamından sayım yapılarak bakterilerin, bu ortamda da belli bir süre gelişmeye ve çoğalmaya devam ettiği tespit edilmiştir.
- 3) Çalışılan bütün zaman dilimlerinde korozyon potansiyeli değerleri negatife kaymış, katodik akım yoğunluğu ve i_{cor} değerleri özellikle 3,0 g/L bakterili ortamlarda daha düşük olmuştur.
- 4) Kontrol ortamlarında 4. saatten 7. güne kadar bekleme süresinin artmasıyla direnç değerlerinde çok fazla değişim gözlenmezken, ortama 1,0 g/L bakteri ilave edildiğinde direnç değerleri kontrol ortamına göre biraz daha yüksek çıkmıştır. Ortama 3,0 g/L bakteri ilave edildiğinde ise direnç değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

5) ATR-IR sonuçları elektrot yüzeyinde vejetatif bakteri ve spor, kristal toksin karışık formlarının birlikte bir biyofilm tabakası oluşturduğu ve demirle kompleks yapmadığı için yüzeye fiziksel olarak bağlandığı sonucunu göstermektedir.

6) Taramalı elektron mikroskobu (SEM) sonuçlarında; kontrol ortamında elektrot yüzeyine tutunmuş tuz kristalleri gözlenirken, 1,0 g/L bakteri içeren ortamdaki elektrot yüzeyinde bakterilerin tuz kristalleriyle birikim oluşturdukları gözlenmiştir. 3,0 g/L bakteri içeren ortamdaki elektrot yüzeyinin ise biyofilm tabakasının yoğun olduğu ve buna bağlı olarak daha yoğun tuz birikimleriyle kaplandığı görülmüştür. Bu mikrograflarda elektrotun yüzeyine bakterilerin tutunup biyofilm oluşturdukları ve buna bağlı olarak tuzu yüzeylerinde biriktirdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca yüzeyi silinmiş elektrotlardan alınan SEM mikrograflarında ise kontrol ortamındaki elektrotta yüzeyin genel olarak bozulduğu, çukurcuk ve çatlakların olduğu gözlemlenmiş olup, bakteri konsantrasyonu arttıkça çatlakların ve çukurların kaybolduğu, yüzeylerin daha düz bir görünüm aldığı görülmektedir.

7) EDX analiz sonuçlarında; kontrol ortamında bekletilen elektrodun yüzeyinde oksijen ve azot görülmezken, bakterili ortamlarda canlılığın yapısı, yüzeyde oluşturduğu biyofilm ve tuz birikintilerinden dolayı C, O, N ve Na elementleri net bir biçimde görülmektedir. Ayrıca kontrol ortamına göre bakteri miktarı arttıkça, elektrot yüzeyinin biyofilmle kaplanmasından dolayı ortamda çözünen demir miktarı, daha az miktarlarda çıkmıştır.

6.1 Öneriler

1) *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin farklı metaller üzerinde artan konsantrasyonları ile herhangi bir inhibitör madde kullanılarak karşılaştırmalı olarak etkisinin belirlenebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Akkum, V., Galvanik Anotla Yapılan Katodik Koruma Uygulamalarında Anot Verimliliğinin Belirlenmesi ve Ölçülmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, s.2, 2006.

Allison, D.G., “The biofilm matrix”, **Biofouling**, 19, 139-150, 2003.

Anwar, H., Strap, J.L. and Costerton, J.W., “Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy”, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 36, 1347-1351, 1992.

Arslan, Ö., Enstrümental Analitik Yöntemler Laboratuvar Deney Raporu, **İTÜ Kimya Bölümü**, İstanbul, 2006.

Arslan, F.K., Mikrobiyolojik Korozyon, Doktora Tezi, **Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, s.10, 2008.

Bao, Q., Zhang, D., Lv, D. and Wang, P., “Effects of two main metabolites of sulphate-reducing bacteria on the corrosion of Q235 steels in 3.5 wt. % NaCl media”, **Corrosion Science**, 65, 405-413, 2012.

Bauce, E., Carisey, N. and Dupont, A., “Carry over effects of the entomo pathogen *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* on *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) progeny under various stressful environmental conditions”, **Agricultural and Forest Entomology**, 8, 63-76, 2006.

Bayol, E., Hekzametilentetramin’in klorürlü ve sülfatlı ortamlarda çeliğin korozyon davranışına etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, **Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Niğde, 5-6, 2005.

Beech, I. B. and Sunner, J., "Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals", *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 181-186, 2004.

Beech, I. B., "Corrosion of technical materials in the presence of biofilms-current understanding and state-of-the art methods of study", *International biodeterioration and biodegradation*, 53, 177-183, 2004.

Beech, I.B. and Cheung, C.W.S., "Interactions of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metal ions", *International biodeterioration and biodegradation*, 35, 59-72, 1995.

Beech, I.W., Bergel, A., Mollica, A., Flemming, H.C., Scotto, V. and Sand, W., "Simple methods for the investigation of the role of biofilms in corrosion", *Biocorrosion*, 00-02, 2000.

Bento, F.M. and Gaylerde, C., "Microbial contamination of stored diesel oil in Brazil", *Review of microbiology*, 27, 192-196, 1996.

Boopathy, R. and Daniels, L., "Effect of pH on anaerobic mild steel corrosion by methanogenic bacteria", *Applied and environmental microbiology*, 57(7), 2104-2108, 1991.

Booth, G.H., "Sulphur bacteria in relation to corrosion", *Journal of applied bacteriology*, 27, 174-181, 1964.

Borenstein, S.W., Microbiologically influenced corrosion handbook, *Woodhead Publishing Limited*, Cambridge, England, 1994.

Chapman, J.S., "Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and coresistance", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 271-276, 2003.

Chauhan, L.R. and Gunasekaran, G., "Corrosion inhibition of mild steel by plant extract in dilute HCl medium", *Corrosion Science*, 49, 1143-1161, 2007.

Chevrou, M. and Rodiere, A., “Les Biofilms Ecole Nationale Superieure de Chimie de Rennes”, **Option Methodologies d'analyses Projet Binome**, 2004.

Chongdar, S., Gunasekaran, G. and Kumar, P., “Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm”, **Electrochimica Acta**, 50(24), 4655-4665, 2005.

Cloete, T.E. and Brözel, V.S., “Practical aspects of biofouling control in industrial water systems”, **International Biodeterioration & Biodegradation**, 29, 299-341, 1992.

Cloete, T.E., “Biofouling control in industrial water systems: What we know and what we need to know”, **Materials Corrosion**, 54, 520-526, 2003.

Codony, F., Morato, J., Ribas, F. and Mas, J., “Effect of chlorine, biodegradable dissolved organic carbon and suspended bacteria on biofilm development in drinking water systems”, **Journal of Basic Microbiology**, 42, 311-319, 2002.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M., “Microbial biofilms”, **Annual review of microbiology**, 49, 711-745, 1995.

Çetin, D., Ham Petrol Sahalarından İzole Edilen Sülfat İndirgeyen Bakterilerin Korozyon Etkisinin Belirlenmesi ve Önlenmesi, Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, s.5-8, 2007.

Çetinkaya, G., Öztürk, A. and Çakmakçı, M.,L., “The persistence time of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals on the leaf surfaces”, **Acta Microbiologica Polonica**, 44(1), 91-97, 1995.

Doğruöz, N., Soğutma Sistemindeki Bakır Yüzeylerde Biyofilm Oluşumu ve Mikrobiyolojik Korozyonun İncelenmesi, Doktora Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, s.3-6, 2008.

Dunne, M.W., “Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?”, **Clinical Microbiology Reviews**, 15, 155-166, 2002.

Dzwolak, W., Kato, M. and Taniguchi, Y., “Fourier transform infrared spectroscopy in high-pressure studies on proteins”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595, 131-144, 2002.

Erbil, M., Korozyon İnhibitöleri ve İnhibitör Etkinliklerinin Saptanması, *Segem*, Ankara, 3-146, 1984.

Erbil, M., Korozyon-1, *Segem*, Ankara, 1985.

Erbil, M., Alternatif Akım (A.C.) İmpedansı Yöntemiyle Korozyon Hızı Belirlenmesi, *Doğa*, TU Kim. D.C., 11(3), 100-111, 1987.

Erbil, M., “The determination of corrosion rates by analysis of AC impedance diagrams”, *Chimica Acta Turcica*, 1, 59-70, 1988.

Erbil, M., Korozyon (İlkeler - Önlemler), *Poyraz Ofset*, Ankara, 1-3, 2012.

Feron, D., “Comportement des Aciers en Environnement Naturel: cas des Aciers Inoxydables en eau de Mer”, *Matériaux & Techniques*, 93, 43-58, 2005.

Filip, Z., Herrmann, S. and Kubat, J., “FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Bacillus subtilis*”, *Microbiological Research*, 159, 257-262, 2004.

Flemming, H.C., Biofouling and microbiologically influenced corrosion (MIC) an economical and technical overview. In: Heitz, E., Sand, W., Flemming, H.C (eds.), *Microbial Deterioration of Materials*, 5-14, Springer, Heidelberg, 1996.

Ford, T. and Mitchell, R., “The ecology of microbial corrosion”, *Advances in microbial ecology*, 11, 231-262, 1990.

Forrester, J. B., Valentine, N. B., Su, Y. F. and Johnson, T. J., “Chemometric analysis of multiple species of *Bacillus* bacterial endospores using infrared spectroscopy: Discrimination to the strain level”, *Analytica Chimica Acta*, 651, 24-30, 2009.

Forte Giacobonea, A.F., Rodriguez, S.A., Burkarta, A.L. and Pizarro, R.A., "Microbiological induced corrosion of AA 6061 nuclear alloy in highly diluted media by *Bacillus cereus* RE 10", ***International Biodeterioration & Biodegradation***, 65, 1161-1168, 2011.

Ghafari, M.D., Bahrami, A., Rasooli, I., Arabian, D. and Ghafari, F. "Bacterial exopolymeric inhibition of carbon steel corrosion", ***International Biodeterioration & Biodegradation***, 80, 29-33, 2013.

Ghazy, E.A., Elmokadem, M.T., Gadallah, M., Mahmoud, M.N., Abdel Ghany, N.A. and Abo Elsoud, M.M., "Investigation Of Active Corrosion Sites Of Biofilm Formed At Mild Steel Electrolyte Interface Induced By Mixed Bacterial Culture", ***International Journal of ChemTech Research***, 5(1), 409-417, 2013.

Gomez-Suarez, C., Pasma, J., Van der Borden, A.J., Wingender, J., Flemming, H.C., Busscher, H.J. and Van der Mei, H.C., "Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces", ***Microbiology***, 148, 1161-1169, 2002.

Gunasekaran, G., Chongdar, S., Goankar, S.N. and Kumar, P., "Influence of Bacteria on Film Formation Inhibiting Corrosion", ***Cor. Sci.***, 46(8), 1953-1967, 2004.

Hamilton, W.A., "Sulphate reducing bacteria and anaerobic corrosion", ***Annual review of microbiology***, 39, 195-217, 1985.

Haras, D., "Biofilms et Alteration des Materiaux: de L'Analyse du Phenomene aux Strategies Marines", ***Materiaux et Techniques***, 93, 27-41, 2005.

Huang, Y., "Non-thermal Plasma Inactivation of *Bacillus Amylolyticus* spores", Masters Theses, ***University of Tennessee***, 40, 2011.

Hussain, A., Shah Bano, A. and Iqbal Qazi., "Corrosion of Mild Steel Simulating Long Term Soil Burial Field Conditions Differing in Nutritional and Biotic Components", ***World Applied Sciences Journal***, 22(7), 985-990, 2013.

Iverson, W.P., “Microbial corrosion of metals”, **Advances in applied microbiology**, 32, 1-36, 1987.

İlhan-Sungur, E., Model bir su sistemindeki sülfat indirgeyen bakterilerin galvanizli çelik saclarda oluşturduğu korozyonun incelenmesi, Doktora Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, 3-4, 2007.

İsmail, K.M., Gehring, T., Jayaraman, A., Wood, T.K., Trandem, K., Arps P. J. and Earthman, J.C., “Corrosion Control of Mild Steel by Aerobic Bacteria Under Continuous Flow Conditions”, **Corrosion Science**, 58(5), 417-423, 2002.

Javaherdashti, R., Microbiologically influenced corrosion: an engineering insight Handbook, **Springer**, Verlag London, 2008.

Juzeliunas, E., Ramanauskas, R., Lugauskas, A., Leinartas, K., Samulevičienė, M. and Sudavičius, A., “Influence of wild strain *Bacillus mycoides* on metals: From corrosion acceleration to environmentally friendly protection”, **Electrochimica Acta**, 51, 6085-6090, 2006.

Kahyaoğlu, H., Çelik, L., Somuncuoğlu, C. ve Öztürk A., “Aerobik Mezofilik Bakterilerin Yapay Deniz Suyunda Çelik Malzemeler Üzerine Korozyon Etkisinin Araştırılması”, **Mersin Sempozyumu**, Mersin, 19-22 Kasım, 2008.

Kakooei, S., Ismail, M. C. and Ariwahjoedi, B., “Mechanisms of Microbiologically Influenced Corrosion: A Review”, **World Applied Sciences Journal**, 17(4), 524-531, 2012.

Karagöz S., “Yoğun Korozyon Etkisindeki Betonarme Yapı ve Endüstriyel Konstrüksiyonlarda Katodik Karuma Sistemlerinin Uygulanması”, **Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü**, Kocaeli, 2003.

Kılıçcıoğlu, F., “Su Soğutmalı Santrallerde Korozyon ve Birikinti Oluşumunun Engellenmesi İçin Uygulanan Kimyasal Koşullandırma Programları”, **IX. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi**, 18, 4-6, 2009.

Kjelleberg, S. and Molin, S., “Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?”, **Current Opinion in Microbiology**, 5, 254-258, 2002.

Kjellerup, B.V., Thomsen, T.R., Nielsen, J.L., Olesen, B.H., Frolund, B. and Nielsen, P.H., “Microbial diversity in biofilms from corroding heating systems”, **Biofouling**, 21 (1), 19-29, 2005.

Krieg, A. and Miltenburger, H.G., “Bioinsecticides: I. *Bacillus thuringiensis*”, **Adv. Biotech. Proc.**, 3, 273-290, 1984.

Kurugöl, S., “Metal Malzemedede Biyofilm ve Mikrobiyolojik Korozyon”, **Metal Dünyası Dergisi**, 167, 36-37, 2007.

Kuş, E., Nealson, K. and Mansfeld, F., “The effect of different exposure conditions on the biofilm/copper interface”, **Corrosion Science**, 49(8), 3421-3427, 2007.

Lacey, L.A. and Undeen, A.H., “Microbial control of black flies and mosquitoes”, **Ann. Rev. Entomol.**, 31, 265-296, 1986.

Lee, A.K., Buehler, M.G. and Newman, D.K., “Influence of a dual-species biofilm on the corrosion of mild steel”, **Corrosion Science**, 48, 165-178, 2006.

Lee, W., Lewandowski, Z., Nielsen, P.H. and Hamilton, W.A., “Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: A review”, **Biofouling**, 8, 165-194. 1995.

Lindsay, D. and Von Holy, A., “Bacterial Biofilms Within the Clinical Setting: What Healthcare Professionals Should Know”, **J Hosp Infect**, 64(4), 313-325, 2006.

Little, B. J. and Lee, J. S., Microbiologically Influenced Corrosion, **Wiley**, New Jersey, 2007.

Little, B., Wagner, P., Hart, K., Ray, R., Lavoie, D., Nealson, K. and Aguilar, C., “The Role of Biomineralization in Microbiologically Influenced Corrosion”, **Biodegradation**, 9, 1-10, 1998.

López, D. A., Simison, S.N. and Sánchez, S.R., “The influence of steel microstructure on CO₂ corrosion. EIS studies on the inhibition efficiency of benzimidazole”, *Electrochimica Acta*, 48(7), 845-854, 2003.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., Brock Microbiology of Microorganisms, tenth ed., Prentice Hall, *Upper Saddle River*, 2002.

Mansfeld, F., “The Interaction of Bacteria and Metal Surface” *Electrochimica Acta*, 7670-7680, 2007.

Mareci, D., Nemtoi, G., Aelenei, N. and Bocanu, C., “The Electrochemical Behaviour of Various Non-Precious Ni and Co Based Alloys in Artificial Saliva”, *European Cells and Materials*, 10, 1-7, 2005.

Maruthamuthu, S., Mohanan, S., Rajasekar, A., Muthukumar, N., Ponmarippan, S., Subramanian, P. and Palaniswamy, N., “Role of corrosion inhibitor on bacterial corrosion in petroleum product pipelines”, *Indian Journal of Chemical Technology*, 12, 567-575, 2005.

Melo, L.F. and Bott, T.R., “Biofouling in water systems”, *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14, 375-381, 1997.

Mert, B., Mert, M.E., Kardaş, G. and Yazıcı, B., “The role of *Spirulina platensis* on corrosion behavior of carbon steel”, *Materials Chemistry and Physics*, 130, (1-2), 697-701, 2011.

Mittleman, M.W. and Geesey, G.G., “Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium”, *Applied and environmental microbiology*, 49, 846-851, 1985.

Moradi, M., Duan, J. and Du, X., “Investigation of the effect of 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one inhibition on the corrosion of carbon steel in *Bacillus* sp. inoculated artificial seawater”, *Corrosion Science*, 69, 338-345, 2013.

Ngo-Thi, N.A., Kirschner, C. and Naumann, D., “Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry”, ***Journal of Molecular Structure***, 661-662, 371-380, 2003.

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P., “Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments”, ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, 64(3), 548-572, 2000.

O’Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R., “Biofilm Formation as Microbial Development”, ***Annu. Rev. Microbiol***, 54, 49-79, 2000.

Pompermayer, D.M.C. and Gaylarde, C.C., “The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene”, ***Food Microbiology***, 17, 361-365, 2000.

Porter, A.G., Davidson, E.W. and Liu, J.W., “Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes”, ***Microbiol. Rev***, 57(4), 838-861, 1993.

Poulsen, L.V., “Microbial Biofilm in Food Processing, Lebensm”, ***Wiss. Techn.***, 32(6), 321-326, 1999.

Qian, B., Hou, B. and Zheng, M., “The inhibition effect of tannic acid on mild steel corrosion in seawater wet/dry cyclic conditions”, ***Corrosion Science***, 72, 1-9, 2013.

Ramesh Babu, B., Maruthamuthu, S., Rajasekar, A., Muthukumar, N. and Palaniswamy, N., “Microbiologically influenced corrosion in dairy effluent”, ***Int. J. Environ. Sci. Technol***, 3(2), 159-166, 2006.

Richard A.L., “Understanding, Detecting and Preventing Microbiologically Influenced Corrosion”, ***Chemistry and Materials Science***, 10-12, 2005.

Roberts, D.J., Nica, D., Zuo, G. and Davis, J.L., “Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies”, ***International biodeterioration and biodegradation***, 49, 227-234, 2002.

San, N.O., Nazır, H. ve Dönmez, G., “Microbial corrosion of Ni-Cu alloys by *Aeromonas eucrenophila* bacterium”, ***Corrosion Science***, 53, 2216-2221, 2011.

San, N.O., Aerobik Bakterilerin Nikel Alaşımlarının Korozyonuna Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, ***Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü***, Ankara, 37-40, 2012.

Sastri, V.V., Corrosion Inhibitors, Principles and Applications, ***John Wileyand Sons, Inc.***, İngiltere, 10-24, 33-46, 1998.

Shreir, L.L., Jarman, R.A., and Burnstein, G.T., Corrosion Volume I Metal/Environment Reactions, ***Butterworth-Heinemann Press***, ISBN 0-7506-1077-8 London, 2000.

Stadler, R., Fuerbeth, W., Harneit, K., Grooters, M., WoellBrink, M. and Sand, W., “First Evaluation of the Applicability of Microbial Extra Cellular Polmeric Substances for Corrosion Protection of Metal Subsrates”, ***Electrochimica Acta***, 54(1), 91-99, 2008.

Stöckel, S., Schumacher, W., Meisel, S., Elschner, M., Rösch P. and Popp J., “Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores”, ***Applied and Environmental Microbiology***, 76(9), 2895-2907, 2010.

Sunkar, S. and Vallı Nachıyar, C., “Endophytic Fungi Mediated Extracellular Silver Nanoparticles As Effective Antibacterial Agents”, ***International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences***, 5(2), 2013.

Sutherland, I.W., “The biofilm matrix - an immobilised but dynamic microbial environment”, ***Trends in microbiology***, 9(5), 222-227, 2001.

Thierry, D. and Sand, W., Microbially influenced corrosion. In: P. Marcus and J. Oudar, Editors, ***Corrosion mechanism in the theory and practice***: second edition, Marcel Dekker, New York, 563-605. 2002.

Türetgen, İ., “Comparison of free residual chlorine and monochloramine for efficacy against biofilms in model and full scale cooling towers”, ***Biofouling***, 20, 81-85, 2004.

Üneri, S., Korozyon İnhibitörlerinin Prensipleri ve Pratiği, ***Segem***, Ankara, 121, 1984.

Valentine, N., Johnson, T., Su, Y. F. and Forrester, J., “Rapid bacterial identification with medical and security applications”, ***The International Society for Optical Engineering***, 2007.

Videla, H.A. and Herrera, L.K., “Microbiologically influenced corrosion: looking to the future”, ***International Microbiology***, 8, 169-180, 2005.

West, A.W., Crook, N.E. and Burges, H.D., “Detection of *Bacillus thuringiensis* in soil by immuno fluorescence”, ***J. Inverteb. Pathol***, 43, 150-155, 1984.

Wood, T.K., Hong, S.H. and Ma, Q., “Engineering biofilm formation and dispersal” ***Trends Biotechnology***, 29(2), 87-94, 2011.

Yalçınkaya, S., “Poli (Pirrol-Ko-O-Toluidin)’in Elektrokimyasal Sentezi Karakterizasyonu ve Demirli Malzemeler Üzerinde Korozyon Performansının Belirlenmesi”, Doktora Tezi, ***Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, s.2, 2008.

Zhang, X., Bishop, P.L. and Kinkle, B.K., “Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms” , ***Water Science and Technology***, 39(7), 211-218, 1999.

Zuo, R., Kus, E., Mansfeld, F. and Thomas, K., “Wood “The importance of live biofilms in corrosion protection”, ***Corrosion Science***, 47, 279-287, 2005.

ÖZ GEÇMİŞ

01.04.1990 yılında Konya’da doğan Hatice Nur YIŞIL ilköğretim ve lise öğretimini Konya’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden 2011 yılında mezun oldu. Niğde Üniversitesi Biyoloji bölümünde 2011 yılında başladığı yüksek lisans eğitimini 2014 yılında tamamladı.

TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER (MAKALE, BİLDİRİ, POSTER VB.)

Bu tez çalışmasından, 1 (bir) adet poster bildirisi üretilmiştir. Bu üretilen çalışma aşağıda sunulmuştur.

Yişil, H.N., Bayol, E. and Öztürk, A., “ Microbiological Activity of *Bacillus thuringiensis* on Mild Steel”, **10th International Electrochemistry Meeting**, Konya, TURKEY, 53, 4-8 September, 2013.