T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Doktora Tezi

Bdellovibrio bacteriovorus'un BİYOFİLM ve MİKROBİYAL KOROZYON ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nahdhoit AHAMADA RACHID

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Gökhan ÖZER

Ocak, 2025

İSTANBUL

Bu çalışma, 31.01.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Alptekin KISASÖZ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Serhat ACAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 39338 numaralı projesi ile desteklenmiştir. Bu tez, 122Z079 numaralı TÜBİTAK 1002 projesi ile desteklenmiştir

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Öncelikle, özel hayatımda olduğu kadar akademik yolculuğumda her zaman maddi ve manevi yanımda olan, her zaman beni cesaretlendiren, hayatım boyunca emeklerinin ve bana olan sevgisinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim sevgili danışman hocam **Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR**'e en derin teşekkürlerimi sunarım. Onun engin bilgisi, sabrı ve rehberliği, bu çalışmanın şekillenmesinde en büyük etken olmuştur.

İhtiyaç duyduğum her an bana kapılarını açan değerli ikinci tez danışman hocam **Doç. Dr. Gökhan ÖZER**'e de içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca, Tez İzleme Komitesi üyeleri değerli **Prof. Dr. Alptekin KISASÖZ** ve **Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU** hocalarıma, bu sürecin her aşamasında bana sağladıkları rehberlik ve katkılar için teşekkür ederim. Onların değerli yorumları ve önerileri, araştırmamın gelişmesinde önemli bir rol oynamıştır.

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD Başkanı **Sayın Prof. Dr. Ayten KİMİRAN**'a nezaketi ve sürekli desteği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamla ilgili her türlü sorunla başa çıkmamda destekleri ve katkıları sağladığı olan **Sayın Prof. Dr. Engin KAPTAN**, **Prof. Dr. Ayşegül MÜLAYİM, Prof. Dr. Muharrem BALCI, Doç. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI, Dr. Öğr. Üyesi Orkun YAYCILI** hocalarıma da teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında bana yardımcı olan değerli laboratuvar arkadaşlarım **Sena GÜLER, Hilal ERDOĞAN**, **Batu ÇOLAK**, **Suna BEKTAŞ** ve **FSM Vakıf Üniversitesi**'ndeki tüm **ALUTEAM** ekibine minnettarım.

Bu çalışmayı, bu yurtdışı yolculuğunda beni kollarını açarak karşılayan **Doç. Dr. Mine KOÇYİĞİT AVCI ve Doç. Dr. Nihal GÖREN SAĞLAM** hocalarım başta olmak üzere tüm hocalarıma, **Temel ve Endüstriyel Mikkrobiyoloji ABD'**nın araştırma laboratuvarındaki arkadaşlarıma, uluslararası dostlarıma ve tüm iyi insanlara ithaf ediyorum.

Bu tezi, kendime olan inancımı kaybettiğim zamanlarda bile bana her zaman inanan, motivasyon kaynağım olan, bana olan sevgi ve desteklerini her zaman gösteren sevgili annem **ECHATA**'ya, sevgi dolu babam **AHAMADA**'ya, canım kardeşlerim **Rachid** ve **Rayid**'e, sevgili eşim **Said Mohamed**'e ve tüm değerli aileme adıyorum.

Ocak 2025 Nahdhoit AHAMADA RACHID

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. BİYOFİLM 3
2.1.1. Biyofilm Oluşumu 3
2.1.2. Biyofilm Matriksi 6
2.1.3. Biyofilmin Çevre Üzerindeki Etkileri 7
2.2. SU SOĞUTMA KULELERİ 8
2.3. MİKROBİYOLOJİK KOROZYON (MİK) 10
2.3.1. 316L Paslanmaz Çelik ve MİK 12
2.3.2. Mikrobiyal Korozyon İnhibisyonu (MİKİ) 12
2.4. *BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS* 15
2.4.1. Özellikleri ve Yaşam Döngüsü 15
2.4.2. *Bdellovibrio bacteriovorus*'un Enzimatik Profili 18
2.4.3. *Bdellovibrio bacteriovorus*'un Predasyon Yeteneğini Etkileyen Faktörler 20
2.4.4. *B. bacteriovorus*'un Önemi 22
3. MALZEME VE YÖNTEM **24**
3.1. 316L PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARIN HAZIRLANMASI 24
3.2. DENEY DÜZENEĞİ 24
3.2.1. Su Soğutma Sistemlerinin Simülasyonu ve Sistemlerin Hazırlanması 24
3.2.2. Kupon Taşıycıları 25
3.2.3. *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 Kültürünün Hazırlanması 25
3.2.4. Deney Sistemlerin Kurulması ve Deneyin Başlatılması 26
3.3. FİZİKSEL VE KİMYASAL ANALİZ 27

3.4. MİKROBİYOLOJİK ANALİZ 27
3.4.1. Sistem Sularındaki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi 28
3.4.2. Kupon Üzerinde Oluşan Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi 28
3.4.3. Paslanmaz Çelik Kuponlarda Oluşan Biyofilmin Kristal Viyole Boyama Yöntemi ile Kantitatif Tayini 29
3.4.4. Biyofilmin DNA İzolasyonu, Metagenomik Analizi ve Biyoinformatik 29
3.4.4.1. DNA İzolasyonu 29
3.4.4.2. 16S Amplikon Dizileme ve Biyoinformatik Analizler 29
3.5. EPS ANALİZİ 30
3.5.1. EPS Eldesi 31
3.5.1. EPS İçeriğindeki Total Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi 31
3.5.1.1. Dubois'in Fenol Sülfirik Asit Yöntemi 31
3.5.1.2. Kalibrasyon Eğrisi 31
3.5.2. EPS İçeriğindeki Total Protein Miktarının Belirlenmesi 32
3.5.2.1. EPS'nin Diyalizi: 32
3.5.2.2. Bradford Eğrisinin Kalibrasyonu ve Analizi: 33
3.6. DİJİTAL MİKROSKOP, TARAMALI ELEKTRON MİKROSOP (SEM) VE ENERJİ DAĞILIM SPEKTROFOTOMETRE (EDS) ANALİZLERİ 34
3.7. 316L PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARIN KOROZYON ANALİZİ 34
3.7.1. Kuponların Ağırlık Kaybının Belirlenmesi 35
3.8. KONTROL DÜZENEĞİ 35
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 35
3.10. BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER 36
3.10.1. Reasoner 2 Agar (R2A) Besiyeri 36
3.10.2. Seyretilmiş Nutrient Besiyeri (DNB) 36
3.10.2. 25mM $CaCl_2$. $2H_2O$ Çözeltisi 37
3.10.3. 30mM $MgCl_2$. $3H_2O$ Çözeltisi 37
3.10.4. 10X Fosfat Tamponu (PBS) 37
3.10.5. Bradford Reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250) 37
3.10.6. Nitrik Asit Çözeltisi 38
3.10.7. %0,1'lik Kristal Viyole Boyası 38
3.10.8. Aseton: Etanol Çözeltisi 38
3.10.9. 1mg/1ml Ayarlanmış Stok Bovin Serum Albumin (BSA) Çözeltisi 38
3.10.10. 100mg/100ml Ayarlanmış Stok Glukoz Çözeltisi 38

4. BULGULAR **39**
4.1. 316L PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARIN KARAKTERİZASYONU 39
4.2. KANTİTATİF BİYOFİLM TAYİNİ 42
4.3. BİYOFİLMDEKİ AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİ SAYISI 42
4.4. DENEY SİSTEM SULARINDAKİ AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİ SAYISI 43
4.5. EPS'NİN KARAKTERİZASYONU 45
4.5.1. EPS İçeriğindeki Toplam Karbonhidrat Miktarı 45
4.5.2. EPS İçeriğindeki Toplam Protein Miktarı 45
4.5.3. EPS İçeriğindeki Total Karbonhidrat Miktarı, Protein Miktarı ve Biofilmin Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı Arasındaki Korelasyon Analizleri 48
4.6. BİYOFİLMİN BAKTERİ ÇEŞİTLİLİĞİ 49
4.6.1. Alfa Çeşitliliği 49
4.6.2. Beta Çeşitliliği 50
4.6.3. Biyofilmlerin Bakteriyel Taksonomisi 52
4.7. KOROZYON ANALİZLERİ 58
4.9. DİJİTAL VE ELEKTRON MİKROSKOPLA GÖRÜNTÜLEME VE ANALİZ 60
4.9.1. SEM-EDS Analizi 60
4.9.2. 3D-Optik Profilometre ile Biyofilm Analizi 64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **67**
KAYNAKLAR **79**
EKLER **93**
ÖZGEÇMİŞ **94**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Biyofilm Oluşumu: Eski Model (5 adımlı) (Rather ve diğ., 2021). 3

Şekil 2.2: Biyofilm Oluşumu: Yeni model. Bu model, biyotik veya abiyotik yüzeyde oluşan biyofilm, yüzeye tutunmayan biyofilm ve mikroorganizmaların zaman ve yüzeyden bağımsız olarak eklenmesi dahil tüm biyofilm formlarını göstermektedir (Sauer ve diğ., 2022). 6

Şekil 2.3: Nehir Suyu Kullanılan Soğutma Sistemi Diyagramı (Kuznietsov ve Biedunkova, 2023). 9

Şekil 2.4: Deniz Suyu Kullanılan Soğutma Sistemi Diyagramı (Chaal ve diğ., 2021). 9

Şekil 2.5: Bdellovibrio ve Benzeri Bakterilerin Hücre İçi Yaşam Döngüsü (Ezzedine ve diğ., 2022).....17

Şekil 2.6: Bdellovibrio ve Benzeri Bakterilerin Hücre Dışı Yaşam Döngüsü (Ezzedine ve diğ., 2022). 17

Şekil 3.1: Kullanma Hazır Olan Kuponlar: Laminar flow kabininde UV Altında Sterilizasyon İşlemi Sırasında. 24

Şekil 3.2: Epifloresan Mikroskop Altında Gözlemlenen *Bdellovibri bacteriovorus* HD100'nin Görüntüsü: A, Serbest Formu (Vibrio Şeklinde); B, *E. coli* İçinde Bulunan Av Bakteri (Bdelloplast Formu). 26

Şekil 3.3: Deney ve Kontrol Sistemlerin Özeti 27

Şekil 3.4: Bakteri Hücrelerinin Yoğunlaştırılması için 'Manifold-Su Pompası' Sistem ile Sistem Suların Filtrelenmesi.....28

Şekil 3.5: Karbonhidrat Kalibrasyon Eğirisi. 32

Şekil 3.6: EPS'nin Protein Diyalizi İçin Kullanılan Sistemler. 33

Şekil 3.7: Protein Miktarının Standart Eğrisi. 34

Şekil 4.1: Üç Sistem Arasında pH, TÇM ve Sıcaklık Değerlerinin Farklıklarını Gösteren ANOVA Testi (*:p<0,01).....41

Şekil 4.2: Sistemlerin Zamanla Gözlemlenen pH, Sıcaklık, ve TÇM Değerleri. 41

Şekil 4.3: Aylara Göre Gözlemlenen Biyofilm Miktarının Kantitaif Analizi. 42

Şekil 4.4: Aylara Göre Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı. 43

Şekil 4.5: Aylara Göre P ve D Sistem Sularındaki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı. 44

Şekil 4.6: TÇM ve Sistem Sularındaki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı ilişkiyi gösteren Pearson Korelasyon Analizi. 44

Şekil 4.7: D ve P sistem Biyofilmlerinin EPS İçerikleriğindeki Total Karbonhidrat Miktarı. 45

Şekil 4.8: Aylara göre P ve D Sistem Biyofilmlerinin EPS İçerikleriğindeki Total Protein Miktarları. 46

Şekil 4.9: D Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Kantitatif Biyofilm Miktarı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001). 47

Şekil 4.10: P Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Kantitatif Biyofilm Miktarı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001). 47

Şekil 4.11: D Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001). 49

Şekil 4.12: P Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001). 49

Şekil 4.13: İki Sistemin Shannon_Endeksi (D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem). 50

Şekil 4.14: "Unweighted-Unifrac" PCoA (D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem; Rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir. 52

Şekil 4.15: "Unweighted-Unifrac" PCoA (D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem. 52

Şekil 4.16: Gözlemlenen Baskın Filumlar; (D *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem; Rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir). 55

Şekil 4.17: Belirlenen Baskın Sınıflar; (D *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem; Rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir). 56

Şekil 4.18: Belirlenen Baskın Familyalar; (D *B. bacteriovorus* HD100 içermeyen sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 içeren sistem; rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir). 57

Şekil 4.19: Kontrol (K), *B. bacteriovorus* HD100 içermeyen (D), ve *B. bacteriovorus* HD100 İçeren (P) Sistem Kuponlarının Ağırlık Kayıpları. En yüksek ağırlık kaybı D sisteminde gözlenmiş, ardından P sistemi ve K sistemi gelmiştir. 59

Şekil 4.20: Sistemler Arasında Ağırlık Kaybı ANOVA test ile Karşılaştırması (*:p<0,05; **:p<0,001). K: Steril Sistem; D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Non Steril Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Steril Sistem 59

Şekil 4.21: D sistemin 8. ay Kuponundaki Korozyon Hasarlarının SEM Görüntüsü. 61

Şekil 4.22: D Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş Biyofilm. 61

Şekil 4.23: D Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş EPS (A) ve EDS Analizi (B). 62

Şekil 4.24: P sistemin 8. ay Kuponundaki Korozyon Hasarlarının SEM Görüntüsü. 62

Şekil 4.25: P Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş Biyofilm. 63

Şekil 4.26: P Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş EPS (A) ve EDS Analizi (B). 63

Şekil 4.27: D Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin Optik Profilometre Görüntüsü. 65

Şekil 4.28: D Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin 3 Boyutlu Optik Profilometre Görüntüsü Şekli. 65

Şekil 4.29: P Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin 3 Boyutlu Optik Profilometre Görüntüsü. 66

Şekil 4.30: P Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin Optik Profilometre ile Görüntüsü. 66

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Sistemlerde Kullanılan Karışımlar. 26

Tablo 3.2: Heterotrofik Bakterilerin Sayımı İçin Kullanılan R2A Besiyerinin Bileşimi. 36

Tablo 3.3: *B. bacteriovorus* HD 100 Çoğaltmak İçin Kullanılan Besiyeri. 36

Tablo 4.1: Kullanılan 316L Kuponların kimyasal bileşimi (% ağ.) 39

Tablo 4.2: Sistemlerin Sıcaklık, pH, ve TÇM Değerleri. 39

Tablo 4.3: D ve P sistemlerinde bulunan 316L paslanmaz çelik kuponlardan toplanan biyofilmin alfa çeşitliliği. 50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
kob/ml	: Mililitrede koloni oluşturan birim
kob/cm^2	: Santimetrekarede koloni oluşturan birim
µg/ml	: Mikrogram per mililitre
mg/cm^2	: Miligram per santimetrekare
°C	: Santigrat derece
l	: Litre
ppm	: Milyonda bir (Parts Per Million)

Kısaltmalar	Açıklama
MİK	: Mikrobiyolojik korozyon
MİKİ	: Mikrobiyolojik korozyon inhibisyonu
EPS	: Hücre dışı polimerik maddeler
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
EDS	: Enerji dağılım spektrofotometre
TÇM	: Toplam çözünmüş madde
NRB	: Nitrit indirgeyen bakteriler
SRB	:Sülfür indirgeyen bakteriler
DNB	: Dilüye nütrient brot
IOB	:Demir okside eden bakteriler
Hbs	: Heterostrofik bakteri sayısı

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Bdellovibrio bacteriovorus'un BİYOFİLM VE MİKROBİYAL KOROZYON ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nahdhoit AHAMADA RACHID

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

II. Danışman : Doç. Dr. Gökhan ÖZER

Mikrobiyal korozyon, mikroorganizmaların neden olduğu veya hızlandırdığı metallerin bozulmasından oluşan bir süreçtir. Bu mikrobiyolojik olay önemli endüstriyel ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle, bu endüstriyel sorunun kontrolüne yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmekte ve avcı bakterilerin kullanımının bu sorunla mücadelede potansiyel bir biyolojik alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bu avcı bakterilerin potansiyel olarak diğer mikroorganizmalarla beslenerek metal yüzeyinde korozyona neden olan bakterilerin gelişimini veya metabolik faaliyetlerini engellediği düşünülmektedir. *Bdellovibrio bacteriovorus*, çoğalmak için diğer bazı bakterileri avlama özelliğiyle oldukça iyi bilinen avcı bakterilerden biridir.

Bu çalışmanın amacı, *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100'ün biyofilm oluşumunu engellenmesi ve paslanmaz çeliğin mikrobiyal korozyonu üzerindeki etkisini araştırmaktır. 316L paslanmaz çelik, çeşitli endüstrilerde, boru hattı ekipmanlarında ve tıbbi cihazlarda kullanılan yüksek korozyon direncine sahip metallerden biridir. Bu çalışmada, bir su soğutma kulesini simüle eden üç paralel model su sirkülasyon sistemi tasarlanmış ve 316L paslanmaz çelik kuponlar 8 aylık bir süre boyunca sistemlere yerleştirilmiştir. Çalışmamızda steril çeşme suyu içeren bir kontrol sistemi, steril olmayan çeşme suyu içeren bir sistem ve *B. bacteriorovus* HD100 içeren steril olmayan çeşme suyu içeren üçüncü bir sistem kullanılmıştır.

Avcı bakteri içeren sistem ve içermeyen sistemdeki kuponlar her ay düzenli olarak çıkarılarak, paslanmaz çelik yüzeyde oluşan kantitatif biyofilm miktarı, EPS bileşenleri olan karbonhidrat ve protein miktarı, aerobik heterotrofik bakteri sayısı belirlenmiştir. Bunun yanında Illumina MiSeq dizeleme yöntemi kullanılarak biyofilmdeki bakteri toplulukları belirlenmiş ve oluşan biyofilm 3D optik profilometre altında görselleştirilmiştir. Ayrıca, sistemlerdeki fiziko-kimyasal parametreler ve sudaki aerobik heterotrofik bakteri sayısı da her ay belirlenmiştir. Mikrobiyal korozyonu değerlendirmek için bu kuponların ağırlık kayıpları hesaplanmış ve kuponlarda oluşan korozyon hasarları SEM/EDS analizleri ile incelenmiştir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde üç sistemdeki toplam çözünmüş madde miktarının ve iki bakteriyel sistem biyofilmlerinde bulunan aerobik heterotrofik bakteri sayılarının önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca avcı bakteri içeren sistemdeki EPS içeriğindeki toplam protein miktarının diğer bakteri içeren sisteme göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Biyoinformatik analizle desteklenen metagenomik sonuçlar, avcı bakteri içeren sistemin diğer bakteri içeren sisteme göre daha düşük bakteri bolluğuna ve çeşitliliğine sahip olduğunu göstermiştir. Öte yandan, *B. bacteriovorus* içermeyen bakterili sisteme yerleştirilen kuponlarda daha yüksek bir ağırlık kaybı gözlenirken, en düşük ağırlık kaybı steril sisteme yerleştirilen kuponlarda gözlenmiştir. SEM/EDS analizleri ile kuponların bölgesel korozyona uğradığını göstermiştir.

Bu çalışma, *B. bacteriovorus* HD100'ün çevresel biyofilm oluşumu ve 316L paslanmaz çeliğin mikrobiyal korozyonunun engellenmesi üzerindeki etkisine ilişkin ilk verileri temsil etmektedir. Sonuçlarımız, 316L paslanmaz çelik bazlı ekipmanların biyolojik kontrolünde *B. bacteriovorus* HD100'ün kullanılmasına yönelik bir katkı sağlayabilir. Son olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler, mikroorganizmaların neden olduğu endüstriyel sorunların çevre dostu yöntemlerle çözülmesine katkıda bulunabilir.

Ocak 2025, 110 sayfa.

Anahtar kelimeler: Avcı bakteriler, *B. bacteriovorus*, Biyofilm, Metagenomik, MİK, MİKİ

SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF INHIBITORY EFFECT OF *Bdellovibrio bacteriovorus* ON BIOFILM AND MICROBIAL CORROSION

Nahdhoit AHAMADA RACHID

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Gökhan ÖZER

Microbial corrosion is a process consisting of the deterioration of metals caused or accelerated by microorganisms. This microbiological event is the cause of important industrial and economic losses. In this fact, various control of this industrial problem is developed and the use of predatory bacteria is thought to be a potential biological alternative to fight against this issue. By potentially feeding on the other microorganisms, these predators are thought to inhibit the development or metabolic activities of the corrosion causing bacteria on the metal surface. *Bdellovibrio bacteriovorus* is one of the best known predator bacteria, known for its specificity to prey on some other bacteria for its multiplication.

The aim of this study was to investigate the effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 on the inhibition of biofilm formation and microbial corrosion of stainless steels. 316L stainless steel is one of the highly corrosion resistant metals used in various industries, pipeline equipment and medical devices. In this study, three parallel water circulation systems simulating a water cooling tower were designed and coupons of 316L stainless steel were placed in each system for a period of 8 months. A control system containing sterile tap water, a system containing non-sterile tap water and a third system containing non-sterile tap water with *B. bacteriorovus* HD100. Coupons in non-sterile systems , with or without predator bacteria, were removed

monthly and amount of formed biofilm, EPS components including carbohydrate and protein quantity, and aerobic heterotrophic bacterial cell count were determined. Besides, bacterial communities in the biofilm were determined by using the Illumina MiSeq sequencing method and the formed biofilm was visualized by using 3D optical profilometer. In addition, physico-chemical parameters and number of aerobic heterotrophic bacterial cells of the water in the systems were monthly determined. Weight loss measurements of these coupons and SEM/EDS analysis were carried out to assess microbial corrosion damages.

The total dissolved solids in the three systems were significantly different. The aerobic heterotrophic bacterial cell counts in the biofilm collected from the two bacterial systems were also significantly different. In addition, while the amount of biofilm formed in the two bacterial systems was not different, the system containing the predator bacterium had a lower amount of total protein in the EPS than the other bacterial system. The metagenomic results, supported by bioinformatic analysis, showed that the bacterial system containing the predator bacterium had low bacterial richness and diversity than the other bacterial system. On the other hand, a significant and increasing weight loss was observed in the coupons placed in the bacterial system without *B. Bacteriovrous* and the lowest weight loss was observed in the coupons placed in the sterile system. SEM/EDS analysis showed the formation of localised corrosion on the coupons.

This study represents the first data on the effect of *B. bacteriovorus* HD100 on the formation of environmental biofilm and the inhibition of microbial corrosion of 316L stainless steel. Our results can serve for using *B. bacteriovorus* HD100 in biological control of 316L stainless steel based equipment. Finally, the data obtained from this study can contribute to solve industrial problems caused by microorganisms with eco-friendly based methods.

January 2025, 110 pages.

Keywords: *B. bacteriovorus*, Biofilm, Metagenomics, MIC, MICI, Predator bacteria

1. GİRİŞ

Sıvı ortamlarda mikroorganizmaların varlığı sadece sağlık sorunlarına neden olmaz aynı zamanda endüstriyel sektörlerde ciddi ekipman hasarlarına yol açarak ekonomik kayıplara da sebep olabilir.

Metal korozyonu, metalin (bulunduğu ortama bağlı olarak) tahrip olmasıyla sonuçlanan kimyasal veya elektro-kimyasal reaksiyonlardan oluşur (Wadood ve diğ., 2015; Lou ve diğ., 2021). Fiziko-kimyasal ve biyolojik faktörlerin, özellikle de mikroorganizmaları içeren çevre koşullarının metallerin korozyon sürecini etkilediği bilinmektedir. Mikroorganizmalar, biyofilm oluşturmak için doğrudan metal yüzeye yapışarak ve çevresel fiziko-kimyasal koşulları değiştirerek metal korozyonunun başlatılması, hızlandırılması veya kolaylaştırılmasında rol oynayabilir. Bu korozyon, mikrobiyal korozyon/biyokorozyon olarak isimlendirilir (Lou ve diğ., 2021; Li ve diğ., 2022; Qian ve diğ., 2022).

Su veya sıvı ekosistemlerdeki mikroorganizma sayılarının, ortamdaki besin maddelerinin azalmasıyla düştüğü belirlenmiştir. Bununla birlikte, mikroorganizmalar sıvılarla temas halinde olan metal veya silikon gibi katı malzemelerin yüzeyine yapışıp hücre dışı polimerik madde (EPS) olarak bilinen organik polimerik matriks salgılayarak sayılarını arttırıp biyofilm oluştururlar (Iroha ve diğ., 2005; AlSalhi ve diğ., 2023). Biyofilm tabakasının oluşmasına yol açan EPS salgılandığında, biyofilmin oluştuğu yüzeyin bozulmasına neden olur ve böylece korozyondan söz edilir. Korozyon ürünleri organik ve inorganik bileşikleri içerir (AlSalhi ve diğ., 2023). Oluşan korozyon sadece metali veya mikroorganizmaların tutunduğu yüzeyi etkilemekle kalmaz, aynı zamanda metali çevreleyen ortamın da kirlenmesine neden olur.

Mikrobiyal korozyonun (MİK), tüm korozyon maliyetlerinin %20'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir (Basera ve diğ., 2019; Kokilaramani ve diğ., 2021). MİK, petrol ve gaz boru hatları, su arıtma ve dağıtım sistemleri, deniz taşımacılığı ve gemi gövdeleri gibi son derece özelleşmiş endüstrileri etkilemenin dışında soğutma kuleleri, ısı değiştiriciler, lavabo sifonları, duş başlıkları, diş implantları, su ve yakıt depoları vb. ekipmanlara da zarar vermektedir (Costa ve diğ., 2021; Fu ve diğ., 2021; Kokilaramani ve diğ., 2021; AlSalhi ve diğ., 2023). Aslında, korozyon ile mücadele etmek için birden fazla çözüm üzerinde çalışılmaktadır. Bu çözümlerden biri, metal yüzeyde hücre gelişimini ve tutunmasını engellemek için geliştirilen antibiyotikler

ve anti-biyofilmler gibi kimyasallardan oluşmaktadır (Liu ve diğ., 2018a; El-Shamy, 2020). Bununla birlikte, bu maddelerin çoğu sentetiktir ve çevre kirliliğine, antimikrobiyal ve ağır metal dirençliliği gibi önemli etkilere neden olabilir veya metalin kimyasal yapısını değiştirebilir.

Bu nedenle, biyofilm oluşumunu engelleyebilen mikroorganizmaları kullanarak biyokorozyonla mücadele için yeni stratejiler ilginç ve etkili görünmektedir. Bazı mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi daha yüksek organizasyonlu organizmalarda herhangi bir enfeksiyona neden olmadan diğer mikroorganizmalarla beslenmektedir (Lou ve diğ., 2021). Bu tür mikroorganizmalar, farklı ortamlarda istenmeyen mikroorganizmaların çoğalmasını kontrol etmek için kullanılabilir. Bdellovibrio ve Benzeri Organizmalar (BALO), su ve toprak gibi farklı ekosistemlerde yaşayan Gram-negatif bakteri grubudur (Negus ve diğ., 2017). Bulundukları ortamlarda hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere saldırabilen avcı bakterilerdir. Bu bakterilerin kullanıldığı biyokontrol çalışmaları, et gibi gıdalarda *E.coli* gelişimini engelleme yeteneklerini göstermiştir (Ottaviani ve diğ., 2020). Başka bir çalışma ile de *Bdellovibrio bacteriovorus*'un hem mikrobiyolojik korozyona neden olan sülfat indirgeyen bakterilerin (SRB) çoğalmasını hem de metal korozyonunu azalttığı ortaya konmuştur (Qui ve diğ., 2016). Bu nedenle, Bdellovibrio Benzeri Organizmaların metal üzerinde biyofilm oluşumunun engellenmesinde ve dolayısıyla mikrobiyal kaynaklı korozyonun önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

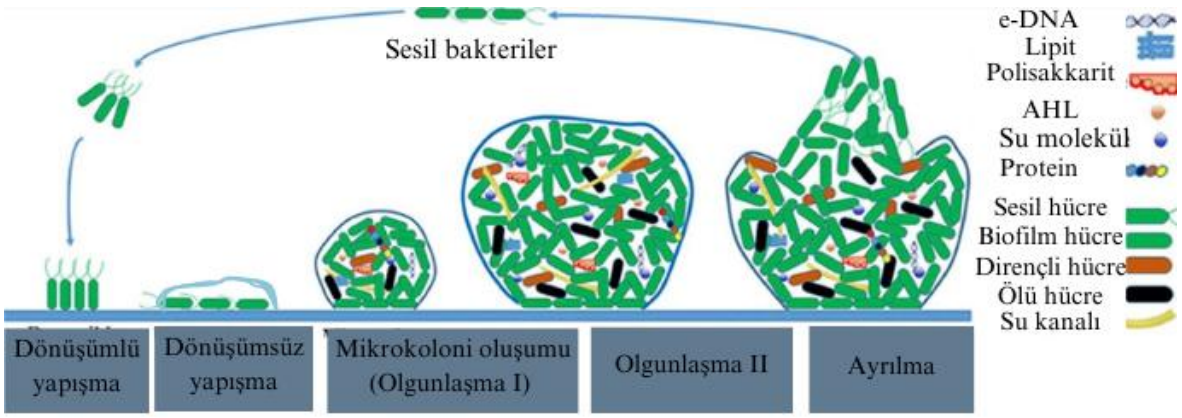
Bu tezin amacı, predatör bakteri türü *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100'ün su soğutma sistemlerinde yoğun olarak kullanılan 316L paslanmaz çelik üzerinde oluşan biyofilm ve mikrobiyal korozyona karşı etkilerini araştırmaktır. Bu bağlamda, simüle edilmiş 3 adet soğutma sistemi (biri predatör bakteri içeren) aracılığıyla, paslanmaz çelik üzerinde oluşan biyofilmlerin bakteriyel çeşitliliği, biyofilm matriksi içinde yer alan ekzopolimerik maddenin protein ve karbonhidrat miktarları ile 316L paslanmaz çeliğin mikrobiyal korozyonu araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOFİLM

Mikroorganizmalar akuatik ortamlarda planktonik veya sesil hücreler olarak bulunabilirler. Sesil hücreler materyallerin yüzeyine tutunur, sayılarını arttırıp hücre dışı polimerik maddeler (EPS) üreterek biyofilm yapısı oluşturur (Rumbaugh ve Sauer, 2020, Rather ve diğ., 2021; Sauer ve diğ., 2022). Biyofilm, kendi ürettiği matriks içine gömülü, yüzeye bağlı bir mikrobiyal topluluk olarak tanımlanabilir (Rather ve diğ., 2021; Sauer ve diğ., 2022). Mikroorganizmalar açlık, kimyasallar, antimikrobiyaller, elverişsiz sıcaklık, pH ve sürekli su akışı gibi çevresel stresler nedeniyle biyofilm oluşturur (Castiblanco ve Sundin, 2016; Rather ve diğ., 2021). Rather ve diğ. (2021), biyofilmin genel olarak %2-5 oranında mikrobiyal hücre, yaklaşık %97 su, %1-2 oranında polisakkarit, <%1-2 oranında enzimler dahil proteinler ve <%1-2 oranında nükleik asit moleküllerinden (DNA ve RNA) oluştuğunu göstermiştir.

2.1.1. Biyofilm Oluşumu



Şekil 2.1: Biyofilm Oluşumu: Eski Model (5 adımlı) (Rather ve diğ., 2021).

Genel olarak, biyofilm oluşumu 3 ya da 4 aşamadan oluşur. İlk aşama, mikroorganizmanın materyal yüzeyine tutunmasıdır. 'Yapışma' olarak isimlendirilen aşamada, planktonik bakteriler konak yüzeyi ile etkileşime girer ve sıkı bir tek tabaka oluşturur. Bu aşama geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz bağlanmayı içerir (Rather ve diğ., 2021; Sauer ve diğ., 2022). Bu tek tabaka, polar ve iyonik etkileşimler ve hidrofobik özellik gibi çevresel fizikokimyasal

değişkenlerden etkilenir (Tuson ve Weibel, 2013; Mahamuni-Badiger ve diğ., 2020). Mikroorganizma hücrelerinde pili, flagella ve fimbria gibi uzantıların varlığı, hücrelerin yüzeye tutunmasına yardımcı olur (Mahamuni-Badiger ve diğ., 2020).

İkinci aşamada, mikroorganizmaların bölgesel olarak çoğalmasına neden olan mikrokoloniler oluşur. 'Mikrokoloni oluşumu' ya da 'Olgunlaşma I' olarak adlandırılan bu aşamada, mikroorganizmalardan ekzopolimerik maddelerin (EPS) salgılanması başlar. Bu organizasyon, ekzopolisakkaritlerin (EPS bileşenlerinden biri) yapısı, mikrobiyal yüzey bileşenleri arasındaki etkileşim ve moleküllerden oluşan yapışkan matriks tarafından kolaylaştırılır (Rabin ve diğ., 2015; Rather ve diğ., 2021; Sauer ve diğ. 2022).

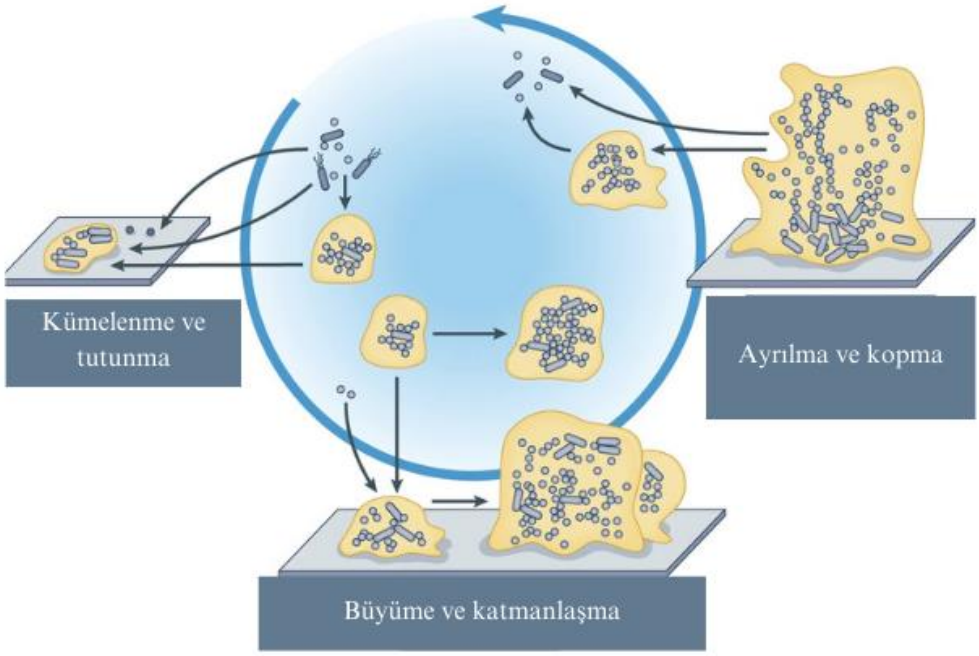
Üçüncü aşama, mikrokolonilerin çok katmanlı biyofilm haline dönüşmesi yani hücre adaptasyonu ve gelişiminden oluşan 'biyofilm olgunlaşması'dır. Olgun bir biyofilm, flagella, pili, amino asitler ve ekzopolisakkaritlerin tutunduğu yüzey olan iç katman, mikroorganizmaların oluşturduğu orta katman ve biyofilmden ayrılmaya hazır mikroorganizmaların planktonik formunun yaşadığı dış katmandan oluşur (Zhao ve diğ., 2017; Rather ve diğ., 2021).

Dördüncü ve son aşama 'dağılma' veya 'ayırlma' adını alır. Bu süreç, sıcaklık, oksijen ve besin bileşimindeki değişim gibi çevresel koşullardan veya EPS bileşenlerinden kaynaklanan bazı enzimatik reaksiyonlardan ya da hidrodinamik kuvvetlerden kaynaklanmaktadır. Bu faktörlerin etkisi, hücrelerin biyofilmden ayrılmasına neden olur. Ardından ayrılan mikroorganizmaların yeniden bir yüzeye tutunmasıyla yeni bir biyofilm gelişim döngüsüne kapı açılır (Şekil 2.1) (Percival ve diğ., 2015; Mahamuni-Badiger ve diğ., 2020; Rather ve diğ., 2021).

Ancak Sauer ve diğ. (2022) göre bu adımlar biyofilm oluşumunun sınırlı ve basit bir şeklini göstermektedir. Bu model *Pseudomonas aeruginosa*'nın in vitro çalışmalarına dayanmaktadır ve gerçek çevresel ortamlardaki biyofilm gelişiminin çeşitliliğini tam olarak yansıtmayabilir. Bu temsil, model türler olarak kabul edilen *P. aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* dışındaki biyotik veya abiyotik yüzeylerde oluşan biyofilmlerin gelişim sürecini de içermemektedir. Bunun yanında sürekli kolonize olan hücrelerin bulunduğu çevresel sistemlerde oluşan biyofilm de bu modelde gösterilmemiştir. Son olarak, bu model sistemi, laboratuvar ortamı

dışındaki karmaşık sistemlerde meydana gelen önemli mekanizmalar olan hareketli veya hareketsiz hücrelerin birleşme ve ayrılma aşamalarını göstermemektedir. Ortamın çevresel koşulları da bu modelde dikkate alınmamıştır. Oysa akış hızı, yüzey malzemeleri gibi çeşitli parametreler biyofilm oluşumunu önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Ayrıca herhangi bir yüzeye tutunmaksızın gelişen biyofilm örneklerinin de olduğu unutulmamalıdır. Askıda biyofilm olarak tanımlanan bu yapı, biyofilmlerle ilişkili birçok kronik bakteriyel enfeksiyonda da gözlenmiştir (Worlitzsch ve diğ. 2002; Qvist ve diğ., 2015; Sauer ve diğ., 2022). Örnek olarak, deniz, nehir, göl habitatları veya atık su arıtma tesislerinde yaygın olarak 'Marine snow' olarak adlandırılan çeşitli bakteri kümeleri gözlemlenmiştir (Flemming ve diğ., 2019; Trego ve diğ. 2021; Sauer ve diğ., 2022). Yüzeye tutunan mikroorganizmaların biyofilmden ayrılmaları nasıl zor ve sınırlı ise, benzer şekilde mikroorganizmaları çevreleyen 'şeffaf ekzopolimer partiküller' adı verilen EPS yapısı içinde birbirine tutunan askıda mikroorganizma topluluklarının ayrılması ve kopması da zor ve sınırlıdır (Zetsche ve diğ, 2020). Ayrıca, tıpkı yüzeyde oluşan biyofilmde olduğu gibi askıda kalmış mikroorganizma topluluklarının oluşturduğu biyofilmde de hem aerobik hem anaerobik metabolizmaya sahip mikroorganizmaların bir arada olabilmeleri oksijen, pH, substrat ve metabolit yoğunluk değişimleri ile desteklenir (Wilén ve diğ., 2018).

Sonuç olarak, farklı ortamların tüm ekolojik kompleksini içeren biyofilm oluşumunun yeni kavramsal modeli, Sauer ve diğ. (2022) tarafından Şekil 2.2'de görüldüğü gibi üç adımda incelenmiş ve yeniden oluşturulmuştur. İlk aşama, kümelenme ve tutunmadır. Bu aşamada, mikrobiyal hücreler yüzeylere ya da tutunacak bir yüzey olmadığında birbirlerine tutunur. İkinci aşama, çevredeki hücrelerin çoğalması ve eklenmesi yoluyla mikrobiyal kümelerin genişlemesinden ve büyümesinden oluşur. Bu olay büyüme ve birikme/katmanlaşma olarak adlandırılır. Biyofilmin bu yapılanma modelinin son adımında, mikroorganizmalar ayrılır. Akış hızı ve mikroorganizmaların birbirine tutunarak oluşturdukları agregatların çevresindeki farklı faktörlere bağlı olarak, mikroorganizmaların ayrılması kümeler veya tek hücreler halinde olabilir.



Şekil 2.2: Biyofilm Oluşumu: Yeni model. Bu model, biyotik veya abiyotik yüzeyde oluşan biyofilm, yüzeye tutunmayan biyofilm ve mikroorganizmaların zaman ve yüzeyden bağımsız olarak eklenmesi dahil tüm biyofilm formlarını göstermektedir (Sauer ve diğ., 2022).

2.1.2. Biyofilm Matriksi

Laboratuvarda oluşturulan ortamlar dışında, bir biyofilm yapısındaki mikrobiyal topluluğun tek bir mikroorganizmadan oluşması olası değildir. Bu mikroorganizmalar, çekirdek algılama (Quorum sensing) mekanizması aracılığıyla iletişim kurabilir ve farklı karmaşık matriksler oluşturabilir (Karygianni ve diğ., 2020; Rather ve diğ., 2022). Çevresel fiziko-kimyasal koşulların yanı sıra mikrobiyal topluluğa bağlı olarak EPS'nin proteinler, polisakkaritler, lipitler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerden oluştuğu belirlenmiştir (Flemming ve diğ., 2016). Karygianni ve diğ. (2020) biyofilm matriksinin biyomolekül bileşimini, hücre uzantıları ve hücre dışı salgılanan moleküller gibi hücre yüzeyi ile ilişkili biyomoleküller olarak gruplandırmıştır. Bu bileşim, biyofilmin yapısal özellikleri kadar önemli ve temel işlevsel bir rol oynamaktadır. Matriks, mikroorganizmaların biyotik veya abiyotik yüzeye yapışmasını ve biyofilm yapısındaki mikrobiyal hücrelerin flagella, tip IV pili, proteinler veya diğer moleküller dahil olmak üzere hücre yüzeyi ile ilişkili uzantılarıyla mikroorganizmalar arasındaki etkileşimi veya kohezyonu sağlar (Karygianni ve diğ., 2020; Mahamuni-Badiger ve diğ., 2020). Buna ek olarak, biyofilmin matriks yapısı, biyofilm oluşturan hücreler tarafından salgılanan ve çözünmez amiloid agregatları oluşturan proteinler aracılığıyla güçlendirilir. Bu proteinler, biyofilmin yapısal stabilitesini arttırarak matriksin dayanıklılığını destekler. Biyofilmlerin

mekanik direnci, bakteriyel ekzopolisakkaritler, proteinler ve çevresel DNA (eDNA) tarafından sağlanan EPS'nin viskoelastisite özelliğiyle de güçlendirilir (Flemming ve diğ., 2016; Bowen ve diğ., 2018; Karygianni ve diğ., 2020). EPS bileşimi ve yapısı, biyofilmleri oluşturan mikroorganizmaların türü, ortamın stres koşulları ve biyofilmin tek tür veya çok tür özellikleri gibi farklı faktörlerden etkilenir (Flemming ve diğ., 2016; Karygianni ve diğ., 2020).

2.1.3. Biyofilmin Çevre Üzerindeki Etkileri

Biyofilmlerle ilgili en önemli sorunlardan biri antimikrobiyal dirençtir. Biyofilmlerdeki bu direnç farklı görüşlerle açıklanmaktadır. Donlan (2000), antimikrobiyal ajanın taşınma sınırının, antimikrobiyal moleküllerin biyofilm matriksi boyunca difüzyonunun olmamasından veya bu moleküllerinin matriks tarafından oluşturulan moleküller tarafından inaktive edilmesinden kaynaklanabileceğini göstermiştir. Ayrıca, planktonik forma kıyasla sesil hücre formunda gözlemlenen mikroorganizmaların yavaş büyüme oranlarının antimikrobiyal ajanın alımını azaltabileceği tahmin edilmektedir. Bunun yanında, biyofilmin olgunlaştığını gösteren EPS'nin daha fazla üretilmesi, bazı antimikrobiyal ajanların etkisini sınırlayabilecek besin ve oksijen girişini azaltabilir (Donlan, 2000). Matriks, ekstraselüler polimerik maddelerin karmaşık bir şekilde düzenlenmesiyle oluşurken, EPS'yi oluşturan ve/veya matriksi çevreleyen ortamdan gelenler de dahil olmak üzere kimyasal ve işlevsel olarak çeşitli biyomoleküllerin tamamı olarak tanımlanır (Karygianni ve diğ., 2020).

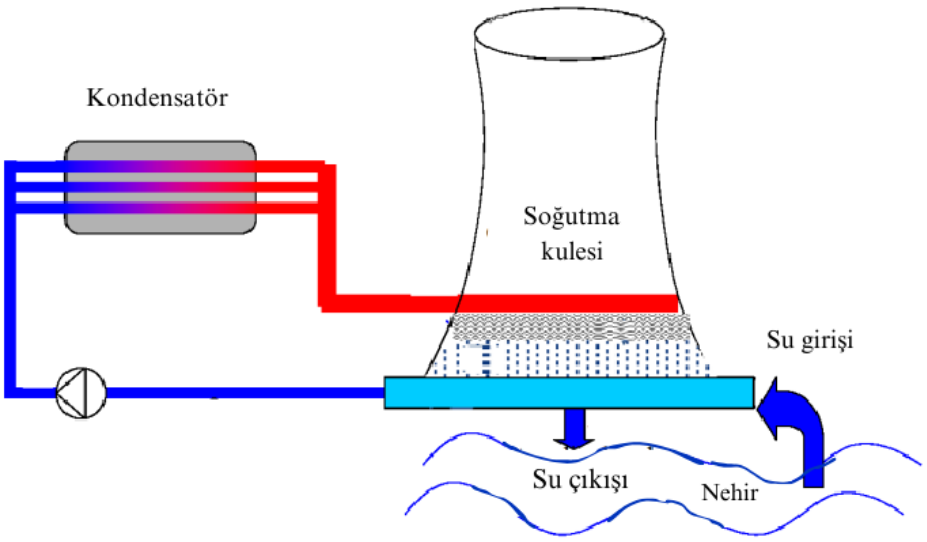
Biyofilm oluşumunda yer alan hücrelerdeki fenotipik değişiklikler, biyofilmde antibiyotiklere ya da farklı stres faktörlerine dirençli hücrelerin varlığı, biyofilmin iç dinamiklerini düzenleyen quorum sensing molekülleri, matriksteki e-DNA molekülleri aracılığıyla dirençli genlerin yatay gen transferi, post translasyonel modifikasyon veya genetik mutasyon yoluyla antibiyotik hedef değişikliği gibi mekanizmalar çok sayıdaki araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Wright, 2005; Soto, 2013; Schroeder ve diğ., 2017; Alav ve diğ., 2018; Singh ve diğ, 2021). Bu nedenle, mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kabiliyetlerinin virülans faktörleri arasında olduğu kabul edilmektedir (Gupta ve diğ., 2016; Wall ve diğ., 2019). Bu bağlamda, biyofilmlere karşı antimikrobiyal bileşiklerin kullanımı karmaşık olmaktan çok daha fazlasıdır.

Biyofilmler hem endüstriyel hem de biyomedikal alanlarda ciddi sorunlara yol açmaktadır. Biyomedikal cihazlarda oluşan biyofilmler, kronik enfeksiyonlara neden olabilirken; gaz ve

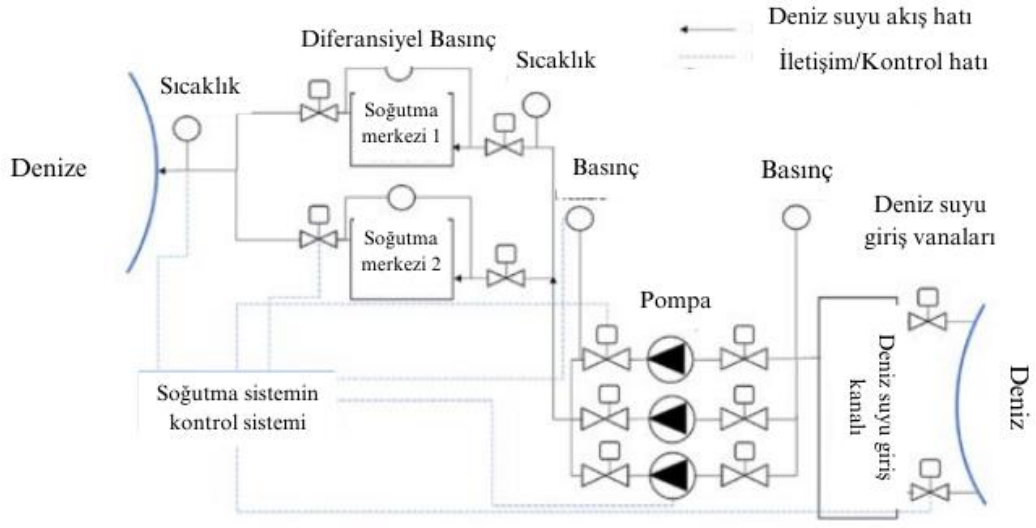
petrol endüstrileri, su arıtma süreçleri ve ısı transfer sistemlerinde kullanılan ekipmanların tahrip olmasına ya da kullanım ömrünün kısalmasına sebep olabilmektedir. Ayrıca, gıda endüstrisinde de biyofilmler, gıda ve süt ürünlerinin bozulmasına etki edebilirler (Vishwakarma, 2020). Biyofilmler, pH ve oksijen konsantrasyonu gibi çevresel koşulların değişmesine neden olur. Bu değişiklikler, biyofilmlerin oluştuğu malzemelerin özelliklerini olumsuz yönde etkiler. Örneğin, mikroplastiklerin mikroorganizmalar tarafından parçalanmasının, yüzeylerine tutunabilen ve bu hidrokarbonları karbon kaynağı olarak kullanan bakterilerle daha etkili olduğu düşünülmektedir (Han ve diğ., 2020). Ayrıca, türü ne olursa olsun metal biyokorozyonu, hücrenin metal yüzeyine yapışması (biyofilm oluşumu) ve elektrokimyasal reaksiyonları tetiklemesinden kaynaklanabilir (Yang ve diğ., 2021).

2.2.SU SOĞUTMA KULELERİ

Soğutma su sistemleri, iklimlendirme sistemleri, enerji santralleri ve gıda işleme gibi çoğu endüstride kullanılmaktadır. Nehir ve deniz suyunun kullanıldığı soğutma kuleleri de nükleer santral ve gemi sistemleri gibi endüstriyel proseslerin soğutma işlemi için kullanılmaktadır (Nourani ve diğ., 2019) (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). Soğutma kulesi çalışma prensibi, endüstriyel sistemlerin çalışması esnasında oluşan fazla ısıyı sistem içindeki borularda dolaşan suya transfer edip ısınan suyu soğutmak ve sistemin soğutulmasında yeniden kullanmak üzere kulelere göndererek suyun soğutulmasına dayanır (Nourani ve diğ., 2019; Gupta ve diğ., 2022). Isı transfer yöntemlerine göre, soğutma kuleleri ıslak ve kuru soğutma kule sistemleri olarak sınıflandırılmaktadır. Islak soğutma kulelerinde sıcak su kondansatörden soğutma kulesinin dağıtım sistemine gelir ve bu sistem suyu dolgu adı verilen bir dizi yatay çıta veya çubuğa püskürtür. Bu sistemin çalışma sürecinde suyun sisteme püskürtülmesi ve daha fazla suyun buharlaştığı görülmekte ve bu özellikler bu sistem tipinin dezavantajı olarak kabul edilmektedir (Li ve diğ., 2017). İkinci sistem, sıcak su akışının dolgu malzemelerinden geçmek yerine soğuk hava ile temas eden borulardan geçerek soğutulduğu kuru sistemden oluşmaktadır. Kuru soğutma kuleleri daha fazla alan gerektirir. Ayrıca sıcaklık artışının yüksek olması dolayısıyla soğutmanın yetersiz kalması daha az verimliliğe neden olur. Bu sistem tiplerinin dezavantajlarını elimine etmek için üçüncü bir sistem tipi geliştirilmiştir. Bu sistem, kuru-ıslak hibrit soğutma kuleleri olarak adlandırılan iki sistemin birleşiminden meydana gelir. İki paralel hava ve su yolu serisinden oluşmaktadır (Ma ve diğ., 2018).



Şekil 2.3: Nehir Suyu Kullanılan Soğutma Sistemi Diyagramı (Kuznietsov ve Biedunkova, 2023).



Şekil 2.4: Deniz Suyu Kullanılan Soğutma Sistemi Diyagramı (Chaal ve diğ., 2021).

Sistem suyunun pH derecesi nötr değere yakın, sıcaklığı 25-35 °C olan soğutma su sistemleri, mikrobiyal büyüme ve yaşam için elverişli bir ortam sağlar (Liu ve diğ., 2009). Mikroorganizmalar sistemlere hava ve su akışı yolu ile girmektedir (Liu ve diğ., 2011; Di Pippo ve diğ., 2018). Planktonik hücrelerin korunmak, besin ve metabolit alışverişi için kule sistemlerinin yüzeylerine tutunmayı tercih ettiği bilinmektedir. Soğutma sistemlerindeki biyofilm dağılımı, hidrolik etkiler, besin varlığı, dezenfektan kalıntıları, korozyon etkileri ve sedimantasyon gibi çeşitli faktörler tarafından desteklenmektedir (Pippo ve diğ., 2018). Biyofilm oluşumu, akış hızının düşük olduğu yerlerde önemlidir. Soğutma kulelerinde besin,

esas olarak su kaynağının (deniz suyu, yeraltı suyu ve tatlı su) içerdiği karbon, azot ve fosfor ile kulelerin korozyonuna ve kireçlenmesine karşı kullanılan kimyasallardır (Liu ve diğ., 2009; Liu ve diğ., 2011; Di Pippo ve diğ., 2018). Su soğutma sistemlerindeki biyofilm oluşumu, biyofilmin neden olduğu mikrobiyal korozyon sonrasında önemli ölçüde ekonomik kayba yol açmaktadır. Ayrıca, biyofilmler yüzeyler arasındaki ısı transfer oranını düşürmekte ve hidrolik sistemleri tıkayarak enerji kayıplarına neden olabilmektedir (Rao, 2012). Endüstriyel kayıplara ek olarak, bu sistemler patojen bakterilerin çevreye yayılarak salgın hastalıklara sebep olmalarından sorumlu olabilir. Örneğin eğer sistemde *Legionella pneumophila* bakterisi bulunuyorsa, ısınan suyun havaya püskürtülerek soğutulması esnasında çevreye yayılan ve içerisinde bu bakteriyi içeren aerosoller, soluma yoluyla akciğerlerde kolonize olabilir. Bu olay, atipik pnömoni olarak tanımlanan ve konağın bağışıklık sistemine bağlı olarak ölümcül olabilen lejyonelloz (Lejyoner Hastalığı) enfeksiyonuna sebep olur (Brouse ve diğ., 2017).

2.3.MİKROBİYOLOJİK KOROZYON (MİK)

MİK, metal veya alaşım yüzeylerde oluşan metabolik reaksiyonlar sonucu meydana gelen bozulma sürecidir. Metal üzerinde oluşan biyofilm, metal yüzeylere doğru kimyasal maddelerin taşınımını değiştirerek, metal yüzeyde oksijenin eşit dağılımına engel olarak, çözelti ve metal yüzeyler arasındaki oksidasyon-redüksiyon süreçlerinde koşul değişikliklerine neden olarak, pasif tabakaların inorganik yapısını değiştirip kırılganlaştırarak, parçalanması ile koruyucu filmlerin uzaklaşmasını sağlayarak metal korozyonunun hızlanmasına neden olur (Pal ve Lavanya, 2022). Mikroorganizmaların türü, metabolik reaksiyonları, pH, sıcaklık, besin mevcudiyeti, metal türü gibi çevresel koşullar ve biyofilm yapısına yeni türlerin eklenmesi metalin MİK'i üzerinde önemli etkilere sahiptir (Procópio, 2019; Pal ve Lavanya, 2022).

Farklı bakteri gruplarının, metal korozyonunu indükleme yetenekleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Gram negatif sülfat indirgeyici bakteriler (SRB), anaerobik koşullar altında metal korozif özellikleriyle bilinir ve metal korozyonunda çalışılan bakteri gruplarının başında gelir. Metal üzerindeki karışık biyofilm yapısında, üst katmanların aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler tarafından kolonize edilmesi nedeniyle SRB'nin oksijen seviyesinin daha düşük olduğu alt katmanda yaşadığı bulunmuştur (Jia ve diğ., 2019). SRB tarafından indüklenen çelik korozyonu, sülfat içeren ortamlarda hidrojen sülfür (H_2S) üretiminden kaynaklanmaktadır. Sülfür çeliğin yüzeyinde oksitlenir ve çukur korozyonunu aktive eden

tiyosülfatı üretir (Kokilaramani ve diğ., 2021). Dou ve diğ. (2018) tarafından yürütülen çalışmada, SRB tarafından bakırın mikrobiyal olarak etkilenerek korozyona uğramasının nedeninin, enerji üretimi için elektron toplamalarından ziyade sülfür üretmeleri olduğu gösterilmiştir. MİK üzerinde yaygın olan SRB örnekleri arasında *Desulfovibrio* türleri bulunmaktadır (Little ve Lee, 2014).

Jia ve diğ. (2019) tarafından bildirildiği üzere, demir oksitleyici bakteriler (IOB), metabolik enerjilerini sağlamak için demir (II) iyonlarını demir (III) iyonlara oksitleyebilen ve terminal alıcı olarak oksijen kullanan bir grup bakteridir. Bu reaksiyon, hücre dışı demir hidroksit birikimine neden olur (Jia ve diğ., 2019). IOB korozyona neden olan ajanlar olarak bilinir ve SRB ile birlikte metallerin mikrobiyal korozyonunu arttırdığı yapılan çalışma ile tespit edilmiştir (Li ve diğ., 2015). Bunun nedeni, aerobik ve fakültatif İOB'nin metaller üzerinde oluşan biyofilmde oluşturdukları oksijensiz ortamdır (Jia ve diğ., 2019). Deniz ortamlarından izole edilen *Pseudomonas* ve *Pseuodalteromonas*'ın deniz sistemlerinde demir hidroksitlerin çökelmesinde önemli bir rolü olduğu bildirilmektedir (Sudek ve diğ., 2009). Yapılan çalışmalar SRB ve IOB ile oluşturulan biyofilmin sırasıyla Q235 karbon ve X65 çeliklerinin korozyonu üzerindeki etkilerini ortaya konmuştur (Yue ve diğ. 2019; Qi ve diğ. 2023).

Nitrat indirgeyen bakteriler (NRB) bir diğer aşındırıcı bakteri grubudur. Başlangıçta NRB, metallerin korozyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu bilinen SRB'nin gelişimine karşı mücadele etmek için kullanılmıştır. Nitratı, düşük oksijen ortamında son elektron alıcısı olarak kullanan NRB'nin çoğalmasını teşvik etmek için petrol ve gaz endüstrilerine nitrat enjekte edilmiştir (Fida ve diğ., 2016; Jia ve diğ., 2019). Bununla birlikte, demir oksidasyonu ile nitrat indirgemesi arasındaki reaksiyon çifti uygun bir termodinamik reaksiyon oluşturur. Bu reaksiyonlar NRB'nin MİK'teki rolünü vurgulamaktadır. Pekin toprağından izole edilen *Bacillus cereus* bir nitrat indirgeyicidir ve 304 paslanmaz çelikler üzerinde hızlandırıcı bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Yu ve diğ., 2020). Ayrıca Fu ve diğ. (2021), topraktan izole edilen NRB'nin X80 boru hattı çeliği üzerindeki oyuklanma korozyonunu hızlandırdığını gözlemlemiş ve çalışmalarında elde ettikleri verilerle NRB'nin boru hattı delinmesinde ve sızıntısındaki sorumluluğunu doğrulamışlardır. Asit üreten bakteriler, mantarlar, metanojenler gibi diğer grupların da metaller üzerinde korozif rolü olduğu gözlemlenmiştir (Jia ve diğ., 2019; Kokilaramani ve diğ., 2021).

2.3.1. 316L Paslanmaz Çelik ve MİK

Bilindiği gibi MİK'e giden süreç metal yüzeye mikroorganizmaların tutunması ile başlar. Mikrobiyal adezyon metal bileşimi ve yüzey hidrofobikliği gibi metalin özelliklerinden etkilenmektedir. Paslanmaz çelik, korozyona karşı iyi direnç göstermesi nedeniyle çeşitli ortamlarda tercih edilen metaller arasında olup ilaç, biyomedikal, gıda, havacılık, otomobil ve inşaat gibi endüstrilerde kullanılmak üzere yüksek oranda üretilmektedir (Liu ve diğ., 2018b). Ancak dirençli bir metal olmasına rağmen paslanmaz çeliğin farklı çalışmalarda gösterildiği gibi MİK'e karşı duyarlı olduğu da göz önüne alınmalıdır (Tran ve diğ., 2021; Wang ve diğ., 2021; Wan ve diğ., 2023). Paslanmaz çeliklerin bileşimi, mikroorganizmaların yüzeye tutunup kolonileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bileşimlerdeki değişkenlik aynı zamanda MİK ve çukur korozyonuna karşı direncin de farklılığını oluşturmaktadır. Temel olarak paslanmaz çelikler demir (Fe), manganez (Mn), krom (Cr), nikel (Ni), azot (N) ve silikon (Si) gibi alaşım elementlerinden oluşur (Tran ve diğ., 2021). Nikel alaşım elementinin bakterilerin tutunmasını azalttığı belirlenmiştir (Wang ve diğ., 2021; Yang ve diğ., 2021). Yang ve diğ. (2021), 316L paslanmaz çeliğin, yüksek azot nikel içermeyen östenitik paslanmaz çeliğe kıyasla abiyotik yapay tükürüğe daldırılıp 21 gün bekletildikten sonra daha derin çukurlara sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde *Streptocuccus mutans*'ın neden olduğu MİK değerlendirildiğinde, sonuçlar 316L paslanmaz çeliğin yüksek nitrojen nikel içermeyen paslanmaz çelikten (HNSs) daha fazla MİK'e uğradığını göstermiştir. Wan ve diğ. (2023) tarafından yapılan çalışmada, farklı paslanmaz çeliklerin özellikle *Desulfovibrio* gibi SRB varlığında MİK'e karşı dirençli olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, araştırmacılar yüksek Cr ve Mo içeriğinin MİK şiddetini azalttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, bu alaşım elementleri yarı iletken özellikleri ve yeniden pasifleştirme yetenekleri de dahil olmak üzere pasif filmlerin özelliklerini etkilemiştir (Wan ve diğ., 2023).

2.3.2. Mikrobiyal Korozyon İnhibisyonu (MİKİ)

Endüstriyel bir sorun olan mikrobiyolojik korozyon ile mücadele etmek için geleneksel yöntemler uygulanmaktadır. Lou ve diğ. (2021), gümüş gibi antibakteriyel malzemelerle metal kaplama, yüzey işlemleri ve korozyon sentetik inhibitörleri gibi bazı koruma yöntemlerini sıralamıştır. Bu teknikler MİK sorunlarının çoğunu çözse de toksik maddelerin salınımı, çevre ve halk sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açmakta ve kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu durum, endüstriyel ve mühendislik alanlarında yaşanan büyük kayıplarla mücadele edebilmek

için çevre dostu yöntemlerin acilen araştırılmasını gerekli kılmaktadır (Lou ve diğ., 2021). Önceki çalışmalar, siyah hardal *Brassia nigra*'dan elde edilen biyosit kullanımı, İmmünoglobulin A (IgA) kullanımı ve aminler, imidazolin ve kuaterner amonyum bileşiklerinin film oluşturucu karışımları gibi çevre dostu olduğu düşünülen bazı yaklaşımları göstermiştir (Videla ve diğ., 2004; Little ve diğ., 2007). Ancak bu yaklaşımlar, olgun biyofilm üzerinde doğal biyosit kullanımının sınırlılığından, IgA'nın tıbbi uygulamalarda elverişsiz kullanımına, alkil imidazolinin hayvanlar üzerindeki toksisitesinden, film oluşturan inhibitörlerin neden olduğu bölgesel korozyonun başlamasına kadar farklı şekillerde kısıtlanmaktadır (Videla ve diğ., 2004; Little ve diğ., 2007).

Mikroorganizmaların, türlerine, çevresel koşullara ve metal çeşidine bağlı olarak korozyon sürecinde ikili bir role sahip olduğu, bazı mikroorganizmaların metallerin korozyonunu arttırıp hızlandırırken, bazılarının da MİK'i engellediği belirlenmiştir (Lou ve diğ., 2021). Bu süreç mikrobiyolojik korozyon inhibisyonu (MİKİ) olarak adlandırılır. Mikroorganizmalar korozyonu engellemek için farklı mekanizmalarla hareket eder. Lou ve diğ. (2021), MİKİ mekanizmalarını mikrobiyal solunum, rekabet, salgılanan korozyon inhibitörleri, EPS koruması ve mineralizasyon olmak üzere beş kategoriye ayırmıştır. Mikrobiyal solunum mekanizması, metal yüzeyinde bulunan ve biyofilm oluşturan hem aerobik hem de fakültatif anaerobik mikroorganizmalardan oluşur. *E. coli* ve *Pseudomonas* gibi fakültatif anaerob ve aerobik bakteriler, farklı metallerin korozyon süreçlerini engelleme veya azaltma yetenekleri açısından araştırılmış ve gözlemlenen sonuçlar umut vermiştir (Jayaraman ve diğ., 1997).

Bu mekanizma, mikroorganizmaların büyüme koşulları, metal yüzeyinde biyofilm oluşturma yetenekleri, ortamda bulunan çözünmüş oksijen ve inorganik besin, sıcaklık ve akış hızı gibi diğer çevresel koşullarla ilgilidir (Lou ve diğ., 2021). Wadood ve diğ. (2015) yaptıkları çalışma ile *Bacillus subtilis* ve *P. aeruginosa*'nın paslanmaz çelik korozyonunu önleyici etkisini araştırmış her iki bakterinin de korozyon engelleme potansiyeli olduğunu ancak *B. subtilis*'in korozyon önleme potansiyelinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuç SEM analiziyle metal yüzeyde çomak bakterilerden koruyucu bir film oluşumu gösterilerek doğrulanmıştır. Bununla birlikte kullanılan iki bakteriyi beraber inkübe ettiklerinde de paslanmaz çelik korozyonunu önleme yeteneğinde olduğu ancak gösterdiği etkinin *B. subtilis*'in korozyon önleme etkisinden düşük, *P. aeruginosa*'nın korozyon önleme etkisinden

ise yüksek olduğu ortaya konmuş ve bu iki bakteri arasında antagonistik bir reaksiyon olduğu sonucuna varılmıştır (Wadood ve diğ., 2015).

Kuşkusuz, mikroorganizmaların metallerin yüzeyinde biyofilm oluşturması, malzemelerin korozyonunu başlatmanın ve hızlandırmanın önemli yolları arasındadır. Ancak bazı mikroorganizmalar korozif olmaksızın da malzeme yüzeyinde biyofilm oluşturabilmektedir. Bu bağlamda, oluşturdukları ekzopolimerik madde, metal yüzeyinde korozif mikroorganizmalara karşı koruyucu bir tabaka görevi görür (Go ve diğ., 2020; Lou ve diğ., 2021). Denizden izole edilen *Vibrio* türlerinin korozyon önleme kapasitesi Go ve diğ. (2020) tarafından doğrulanmış, bu sürecin mekanizmasının çelik yüzeyde biyofilm oluşturma yetenekleriyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Yapılan EPS analizi sonucunda, çelik yüzeyinde oluşan biyofilmin, malzemeyi korozyondan korumada önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Go ve diğ., 2020). Başka bir çalışmada, *Streptococcus mutans*'tan ekstrakte edilen EPS'nin, X70 çeliği üzerindeki korozyon davranışı araştırılmış ve EPS'nin düşük oranda da olsa korozyonu önleyici bir etki gösterdiği ortaya konmuştur (Chen ve diğ., 2023).

Mikroorganizmalar, mineral biriktirme süreçleri yoluyla MİK inhibisyonuna neden olabilir. Bu mekanizma mikroorganizmaların türü, mikrobiyal metabolik özellikler ve ortamın doğası ile ilgilidir. Mikroorganizmalar, kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) ve vivianit ($Fe_3(PO_4)_2.8H_2O$) üretimi gibi mineral üretimini tetikler (Volkland ve diğ., 2000; Lou ve diğ., 2021). Minerallerin metal yüzeyinde birikmesi, metal üzerinde koruyucu bir rol oynayan tabaka oluşturur. Ayrıca, bu mineral tabakasının korozyona uğramış metalin geri kazanılmasına yardımcı olduğu bildirilmektedir (Comensoli ve diğ., 2020). Öte yandan, mikroorganizmalar arasındaki rekabet, metallerin mikrobiyal kaynaklı korozyonunu engelleyebilir. Bazı mikroorganizmalar, metabolik büyüme sistemleri aracılığıyla diğer korozif mikroorganizmalarla rekabet edebilir. Aynı elektron alıcısını kullanabilir ve korozif mikroorganizmaların çoğalmasını azaltabilirler (Hubert ve Voordouw, 2007). Bu rekabetin yanı sıra, avcı mikroorganizmalar korozif mikroorganizmaları çoğalmak için konak olarak kullanabilir ve metal yüzeye tutunmalarını engelleyebilir (biyofilm oluşturma inhibisyonu) (Lou ve diğ., 2021). Bdellovibrio ve Benzeri Organizmalar (BALO) gibi mikorganizmalar için durum böyledir.

2.4. *BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS*

2.4.1. Özellikleri ve Yaşam Döngüsü

Bdellovibrio bacteriovorus ilk kez 1963 yılında Stolp ve Stars tarafından bir bitki patojeni olan *Pseudomonas phaseolicola*'ya karşı bir bakteriyofaj izole etmeye çalışırken elde edilmiştir. Bunu ektoparazitik ve bakteriyolitik bir mikroorganizma olarak tanımlamışlardır (Stolp ve Stars, 1963). BALO terimi, fenotipik ve işlevsel durumları bakımından benzer olan ancak filogenetik özellikleri bakımından çeşitlilik gösteren bu bakterileri kapsamak üzere seçilmiştir (Davidov ve diğ., 2006a; Ezzedine ve diğ., 2022). Bu mikroorganizmalar δ-proteobacteria ve α-proteobacteria olarak iki sınıf altında sıralanırken, 16s rRNA küçük alt birimi ve ropB RNA polimeraz alt biriminin analizine dayanan mevcut yeni filogenetik sınıflandırmada, δ-proteobacteria sınıfına ait BALO'ların *Bdellovibrionales, Bacteriovoracales* ve *Oligoflexiales* olmak üzere üç takımdan oluşan *Oligoflexia* sınıfına aktarıldığı görülmüştür (Ezzedine ve diğ., 2022).

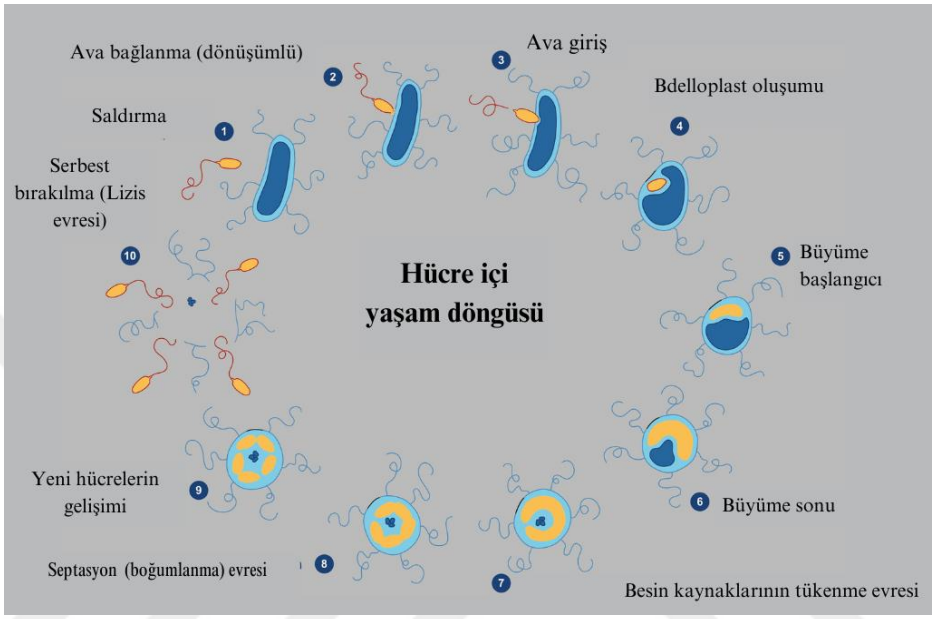
BALO, hem Gram (-) hem de Gram (+) bakterilere farklı yollarla saldırabilen predatör bakterilerdir. Bu Gram-negatif avcıların *S. aureus, E. coli* ve diğer insan patojeni bakterileri ortadan kaldırdığı çalışmalarla ortaya konmuştur (Cavallo ve diğ., 2021; Tajabadi ve diğ., 2023).

Bdellovibrio hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde oluşan biyofilmden de izole edilmektedir (Medina ve Kadouri, 2009; Lambert ve Sockett, 2013). Bu durum biyofilmde hayatta kalmaları ile ilgilidir. Biyofilmdeki yüksek av hücresinin varlığı, avcı hücrelerinin çoğalması için yüksek besin kullanılabilirliğini oluşturmakta ve avcı hücrelerinin düşük sıcaklık, su türbülansı ve dış akışa maruz kalmaya karşı korunması, *Bdellovibrio*'nun çoğalması için rahat bir mikro ortam sağlamaktadır (Kadouri ve O'Toole, 2005; Medina ve Kadouri, 2009). Öte yandan, *Bdellovibro*'nun PVC gibi abiyotik yüzeylerde kendi kendine biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olduğu da gözlemlenmiştir (Medina ve Kadouri, 2009; Lambert ve Sockett, 2013). Halen bu oluşumun mekanizması üzerinde çalışılmaktadır. Bununla birlikte, konaktan bağımsız veya av fakültatif (konak olmasa da yaşayabilen) *B. bacteriovorus* tarafından oluşturulan biyofilmin baskılanması için kullanılan kimyasallara dirençli olduğu, ancak proteazlar ve DNazlar uygulanarak uzaklaştırılabildiği gözlemlenmiştir. Bu gözlem, *B. bacteriovorus* biyofilminin

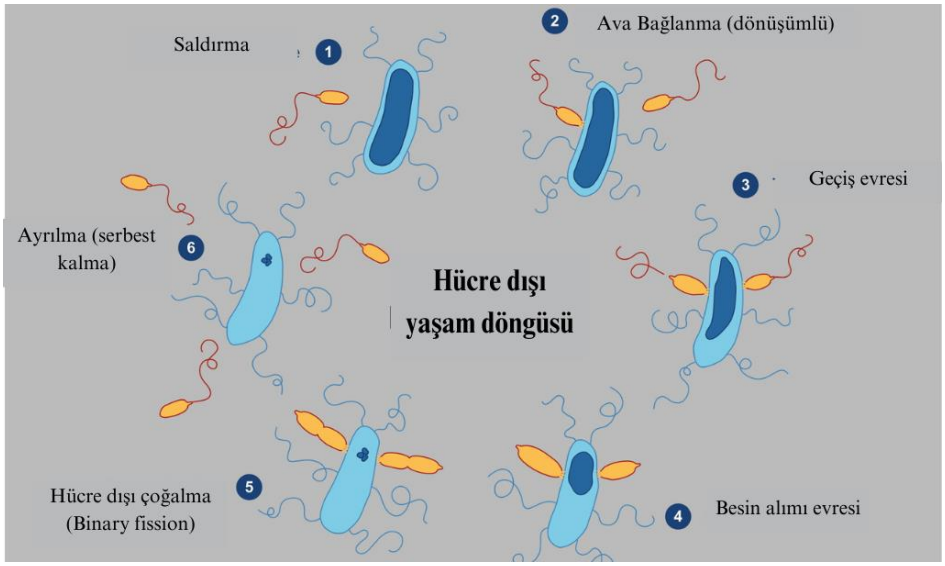
proteinler, peptitler ve eDNA içeren ana bileşimine sahip olduğunu göstermektedir (Medina ve Kadouri, 2009). Benzer şekilde, Lambert ve Sockett (2013) tarafından yürütülen çalışmada, endonükleazların baskılanması ile predasyon aktivitesinin arttığı ve *Bdellovibrio* biyofilm oluşumunun etkili bir şekilde azaldığı kaydedilmiştir. Araştırmacılar, *Bdellovibrio*'nun biyofilm oluşturma kabiliyetindeki bu azalmanın, biyofilmdeki eDNA bolluğundan kaynaklandığını ve bunun da biyofilm üzerine diğer hücrelerin eklenmesini engellediğini öne sürmüştür. Ayrıca, avcının büyüme aşamasında endonükleazlara atfedilen rolün, av biyofilmleri üzerindeki avlanma için gerekli olmadığını da öne sürmüşlerdir (Lambert ve Sockett, 2013).

Avcılar, avlarına ve çevreye bağlı olarak farklı yaşam döngülerine sahiptirler. Genel olarak, enfeksiyon mekanizmasına göre, Ezzedine ve diğ. (2022) BALO'ların yaşam döngüsünü epibiyotik ve periplazmik yaşam döngüleri olarak iki tipte sınıflandırmıştır. Periplazmik döngü sırasında, *B. bacteriovorus HD100* gibi avcı hücre konak hücrenin sitoplazmasına girer, büyür ve çoğalır (Prehna ve diğ., 2014; Said ve diğ., 2019). Predatör, ekosisteminde bir konak hücre bulduğunda, avın dış sitoplazmik membranına geri dönüşümlü olarak bağlanır. Avı tanıdıktan sonra, avcı hücre kamçısını kaybeder, av hücresinin zarını parçalamak için enzimler salgılar ve hücresinin büyüme formunu (bdelloplast) oluşturan konakçı hücrenin içine girer. Bu yaşam döngüsünde BALO'ların başlangıç büyüme evresinde sitoplazmik bileşenin tüketimi için bdelloplast tarafından enzimlerin salgılanması ile karakterizedir. Büyümenin son aşamasında, bdelloplast boyut olarak artar ve flagellumunu oluşturur. Predatör hücre büyümesinin maksimum noktası, konakçı sitoplazmik bileşeninin tükenmesi, septasyon ve hücre bölünmesinden sonra birkaç yeni nesil oluşturup ardından serbest kalmasıdır. Serbest kalan olgun hücreler saldırı fazındadır ve yeni avları arar (Şekil 2.5). Enfekte olmuş av hücresi parçalanır ve epifloresan mikroskobu (faz kontrastı) altında şeffaf ve deforme olmuş bir hücre olarak gözlemlenir. Öte yandan, *Candidatus Bdellovibrio qaytius* gibi konak hücre zarlarına nüfuz edemeyen avcı hücrelerde ise epibiyotik (hücre dışı) yaşam döngüsü kaydedilmiştir (Deeg ve diğ., 2020). Bu döngüde, periplazmik olanın aksine, genellikle birlikte ve/veya çoklu enfeksiyon gözlenir. İlk olarak, hareketli avcı hücre, kendi yaşam ekosistemindeki bir konakçı hücreye rastgele bağlanır. Bu bağlanma, uygun avın tanınmasına kadar tersine çevrilebilir. Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz bağlanma arasındaki aşama geçiş aşaması olarak tanımlanır. Bu aşamadan sonra avcı, av bileşenlerinin kullanılmasıyla belirginleşen büyüme fazına girer.

Bu bileşenler tamamen tüketildiğinde, ana hücre iki hücre verecek şekilde ikiye bölünür ve bu da büyümenin son aşamasını işaret eder. Ölü av hücresinden ayrılmadan önce, her bir yeni nesil hücre flagellum oluşumuyla olgunlaşır ve yeni bir döngüye girmeye hazır hale gelir (Şekil 2.6) (Ezzadine ve diğ., 2022).



Şekil 2.5: Bdellovibrio ve Benzeri Bakterilerin Hücre İçi Yaşam Döngüsü (Ezzedine ve diğ., 2022).



Şekil 2.6: Bdellovibrio ve Benzeri Bakterilerin Hücre Dışı Yaşam Döngüsü (Ezzedine ve diğ., 2022).

2.4.2. *Bdellovibrio bacteriovorus*'un Enzimatik Profili

Predatörün konak hücrelere bağlanması, sitoplazmik içeriğinden beslenmesi ve av hücrelerinin parçalanması, *B. bacteriovorus* ve BALO'ların enzimatik profili hakkında daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir. Araştırmacılar çeşitli çalışmalar ile avcı yaşam döngüsünün farklı aşamalarında farklı enzimlerin ekspresyonunu, moleküler düzeyde incelemiştir. Predatörlerin proteazlar, peptidazlar, DNazlar, lipazlar, glukanazlar ve RNAzlara sahip olduğu; ayrıca, hidrolitik enzimleri ve organik bileşikleri metabolize eden enzimleri kodlayan çeşitli genlerin ifadesinin bu predatör bakterilerde gerçekleştiği belirlenmiştir (Rendulic ve diğ., 2004).

Yates (2021), *B. bacteriovorus* HD100'de peptidaz_S8 fonksiyonel bölgeyi içeren toplam 16 enzim tanımlamıştır. Bazı S8 fonksiyonel bölgelerinin ekzopeptidaz olduğu, ancak çoğunun hücre içi peptidazlar olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, araştırmacı aynı çalışmada *B. bacteriovorus* HD100 genomunun S_13 peptidazlarının Bd0816, Bd3244 ve Bd3459 fonksiyonel bölgelerini içeren 3 enzimi kodlayan gen içerdiğini bulmuştur. Bu çalışma, *B. bacteriovorus* HD100'ün proteaz kodlayan genlerini vurgulamıştır (Yates, 2021). Bd3670, Bd3524, Bd1711, Bd3586 ve Bd2451 enzimlerini içeren *B. bacteriovorus* HD100 ve *B. exovorus* JSS gibi *Bdellovibrio* türlerinde de endonükleaz, ekzonükleaz ve fosfataz fonksiyonel bölgelerini içeren enzimleri kodlayan genler tespit edilmiştir. Bu genlerin moleküler çalışması yapıldığında, predatör yaşam döngüsüne (büyüme fazı, saldırı fazı ve konaktan bağımsız faz) bağlı olarak ifadelerinde bir değişiklik olmamıştır.

Bununla birlikte, bu genlerin artan ifadesi şu şekilde gözlenmiştir: Bd1711 enzimini kodlayan genin ifadesi saldırı fazında artarken, Bd 2451 enzimini kodlayan gen hem saldırı hem de büyüme fazlarında sessizdir ve Bd3586, Bd3524 ve Bd3670'i kodlayan genlerin ifadesi ise av hücresi içindeki işlevlerini gösteren büyüme fazında sitoplazmik içerikten beslenirken artmaktadır (Yates, 2021). *B. bacteriovrus* türünün HD100 suşunda da Bd0934 enzimini kodlayan geni içeren endonükleaz 1 adlı nükleazları kodlayan bir başka fonksiyonel bölgesinin büyüme fazında, Bd1244 ve Bd3507 enzimlerinin enzimlerinin ifadesinin ise hem büyüme hem de saldırı fazlarında arttığı gözlemlenmiştir (Lmbert ve diğ., 2010; Karunker ve diğ., 2013; Yates, 2021). Ayrıca, aynı türde stafilokok benzeri nükleaz (SNase) alanını oluşturan gen tarafından kodlanan Bd1934 ve Bd1431 gibi başka nükleazlar da tespit edilmiştir (Yates, 2021).

Bukowska-Faniband ve diğ. (2020) çalışmalarında *B. bacteriovorus*'tan salgılanan iki DNaz Bd0934 ve Bd3507'yi moleküler ve genetik düzeyde karakterize etmişlerdir. Bu enzimlerin predatörün predatozomunun bir parçası olduğunu, ancak konaktan bağımsız büyümesi, biyofilm oluşumu, avlanma ve av biyofilminin bozulması için gerekli olmadığını belirlemişlerdir.

D-ala-D-ala karboksipeptidaz, varsayılan peptidoglikan bağlayıcı protein ve bir polisakkarit de-asetilaz içeren peptidoglikan modifiye edici enzimler, *B. bacteriovorus* tarafından yaşam döngülerinin tutunma veya erken büyüme aşamasında salgılanır (Lambert ve diğ. 2010; Lerner ve diğ., 2012; Waso ve diğ., 2021). Bu enzimlere, bdelloplast hücrelerinin oluşumu sırasında konak hücrenin peptidoglikanını modifiye etme rolü atfedilir. Bu modifikasyon, avcının çoğalması ve yeni *Bdellovibrio* neslinin olgunlaşması tamamlandığında av hücresinin parçalanmasını kolaylaştırır (Labert ve diğ., 2010; Lerner ve diğ., 2012). Buna ek olarak, *B. bacteriovorus* HD100 sekretomunda tanımlanan D, D- endopeptidazlar ve lizozim (DslA) dahil benzersiz enzimlerin avcının büyüme aşamasında etkili olduğu bildirilmiştir. Bu enzimlerin biyomedikal ve biyoteknoloji endüstrilerine hizmet eden alternatif veya yeni litik proteinler olduğu düşünülmektedir (Lerner ve diğ., 2012; Harding ve diğ., 2020; Waso ve diğ., 2021).

S. aureus'a karşı anti-biyofilm deneyi sırasında konakçıdan bağımsız *B. bacteriovorus* kültürünün süpernatantında bulunan DNazlar ve proteazların, bazı patojenik bakterilerin virülansını azalttığı varsayılmaktadır. Bu nedenle, saflaştırılmış enzimler veya predatör, potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabilir (Monnappa ve diğ., 2014). Öte yandan, Bratanis ve diğ. (2020) immünoglobin G ve immünoglobin A'nın sırasıyla *Bdellovibrio* serin proteaz K (BspK) ve *Bdellovibrio* elastaz benzeri serin proteaz (BspE) tarafından hidroliz edildiğini gözlemlemiştir. Bu sonuçlar, *Bdellovibrio* tarafından üretilen hidrolitik enzimlerin ilaç endüstrisinde antikor modüle edici bir araç olarak potansiyel kullanımını göstermiştir (Bratanis ve diğ. 2020). Özetle, 293 potansiyel litik enzimin *B. bacteriovorus* HD100 genomu tarafından kodlandığı tahmin edilmektedir. Genomun biyoinformatik analizine dayanan bu tahmin, 150 proteaz ve peptidaz, 15 lipaz, 20 DNaz, 10 glikanaz ve 9 Rnase'ın tanımlanmasına izin vermiştir (Rendulic ve diğ., 2004; Waso ve diğ., 2021).

2.4.3. *Bdellovibrio bacteriovorus*'un Predasyon Yeteneğini Etkileyen Faktörler

BALO'ların çeşitli çevresel koşullara uyum sağlama yetenekleri, toprak ve deniz ortamları da dahil olmak üzere farklı ekosistemlerde bol miktarda bulunmalarını sağlar. Avcı olan bu bakterilerin yaşam döngüsü, birbirini tamamlayan avlanma ve avlanma dışı aşamaları içerir. Bununla birlikte hem abiyotik hem de biyotik faktörlerin bu bakterilerin yaşam döngüsünü etkilediği bilinmektedir. Oksijen, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerin BALO'nun gelişimi, predasyonu, canlılığı ve dağılımı üzerinde etkisi olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Piñeiro ve diğ., 2007; Patini ve diğ., 2019; Im ve diğ., 2020). *B. bacteriovorus* ve BALO'lar katı aerobik bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle oksijen, bu predatörlerin temel yaşam aktivitesi olan avlanma faaliyetlerinde önemli bir faktör oluşturmaktadır (Im ve diğ., 2020). Patini ve diğ. (2019), *B. bacteriovorus*'un avlanma potansiyelinin anaerobik koşullar tarafından güçlü bir şekilde engellendiğini göstermiştir. Bu çalışmada, aerobik patojenler av olarak kullanılırken, predatör anaerobik olanları elimine edememiştir. Bununla birlikte, anaerobik koşullar altında predasyon aktivitesi azalsa bile, *B. bacteriovorus* türlerinin bu koşullarda hayatta kaldığı gösterilmiştir (Im ve diğ., 2020). Ayrıca, sınırlı oksijen altında, bu predatörün biyofilm üzerindeki avlanmasının planktonik hücrelere göre daha etkili olduğu bildirilmektedir (Varon ve Shilo, 1968).

Tuzluluk, *B. bacteriovorus* türlerinin yaşam döngüsünü ve avlanma aktivitesini etkileyen bir diğer önemli faktördür. Bu faaliyetler için gereken toplam tuzluluk miktarı predatör türüne, bu da izolasyon ortamına bağlı olduğu, bu bakterilerin bazılarının halofilik, bazılarının halotolerans, bazılarının ise aşırı halofilik olduğu bildirilmiştir (Marbach ve diğ., 1976; Piñeiro ve diğ., 2007; Williams ve Chen, 2020). Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda olsa bile bazı spesifik katyonların predatör hücrelerin büyümesi ve avlanma faaliyetleri için gerekli elementler olduğu gözlemlenmektedir. Örneğin, potasyum iyonlarının varlığı, predatör hareketliliğinde bir artışa neden olduğu, öte yandan, Mg^{+2} iyonlarının bdelloplastın oluşumu ve stabilizasyonunda, bakterinin av hücresine bağlanması ve penetrasyonunun arttırılmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Kalsiyum iyonu eksikliğinin avcı hücrelerin büyüme döngülerindeki sürekliliği engellediği, yavru hücrelerin yeni enfeksiyon hücreleri başlatamaması ile gösterilmiştir (Williams ve Chen, 2020).

Asidik bir ortamın *B. bacteriovorus*'un hayatta kalması için ideal olmadığı gösterilmiştir. Bu predatör türün optimum büyüme ve avlanmasının 6-8 pH aralığında olduğu belirlenmiştir (Varon ve Shilo,1968; Im ve diğ., 2020). *B. bacteriovorus*'un predasyon faaliyetlerini etkileyebilecek bir diğer çevresel faktör de sıcaklıktır. Laboratuvar çalışmalarında, bu bakteri mezofilik koşullar altında 28-30 °C'de kültürlenir. Varon ve Shilo 1968'de av hücrelerine tutunan *B. bacteriovorus* sayısının sıcaklığın 4 °C'den 25 °C'ye yükselmesiyle arttığını göstermiş ve optimum büyümenin 35° C'de olduğunu kaydetmiştir. Benzer şekilde, Pieralisi ve diğ. (2023) farklı sıcaklıklarda süt örneklerinde *B. bacteriovorus*'un *E. coli* üzerindeki avlanma kapasitesini incelemiş, predatörün *E. Coli*'yi 30 °C'de 4 °C'ye göre daha hızlı elimine ettiğini gözlemlemişlerdir (Pieralisi ve diğ., 2023). Bazı BALO'lar termofilik çevresel koşullardan (50 °C'nin üzerinde) izole edilmiştir. Bununla birlikte, bu organizmaların av hücrelerinin dış hücre zarına nüfuz etmelerinin sınırlı olduğu gözlemlenmiştir. Sadece av ile yan yana bağlanırlar ve epibiyotik avcılar olarak hareket ederler (Sangwan ve diğ., 2015).

Diğer bakterilerin sitoplazmik materyallerinden beslenen zorunlu predatörler için bu avlar onların metabolik ve predasyon aktivitelerinin incelenmesinde göz ardı edilemeyecek kadar önemli bir ortam oluşturmaktadır. Bu av bakterileri, avcıların avlanma faaliyetlerini çeşitli yollarla etkilemektedir. Mikro çevredeki avın metabolik faaliyetlerinin avcının avlanma kapasitesi üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Dashiff ve diğ., 2011; Duncan ve diğ., 2018). Ayrıca, mikroorganizmalar ortam koşullarına bağlı olarak indol ve antibiyotik gibi bazı ikincil metabolitler üretebilir. Bu metabolitler pH'ı düşürerek veya artırarak bulunduğu çevreyi etkiler, ardından *B. bacteriovorus*'un predasyon faaliyetlerini ve harcadığı enerjiyi önemli ölçüde değiştirebilir (Varon ve Shilo, 1968; Dwidar ve diğ., 2015; Mun ve diğ., 2017). Ayrıca, avın türü ve ortamdaki konsantrasyonları da *B. bacteriovorus*'un avlanma faaliyetleri ve hayatta kalması ile birlikte çalışılan önemli noktalardan bazılarıdır. Örneğin, Ducan ve diğ. (2018) tarafından yürütülen çalışmada, yüksek hareketli *Vibrio cholerae*'nin *B. bacteriovorus*'a tutunmaya çalıştığında onu strese soktuğu gösterilmiştir. Avlanma başarılı olsa da hareketsiz *V. cholerae* mutant suşunun predatör tarafından yüksek hareketli *V. cholerae* bakterisine göre daha kolay avlandığı belirlenmiştir (Ducan ve diğ., 2018).

2.4.4. *B. bacteriovorus*'un Önemi

B. bacteriovorus ve BALO'ların patojen bakterilerin kontrolünde yüksek öneme sahip olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir. El-Shanshoury ve diğ. (2016) tarafından yürütülen çalışmada, sudan izole edilen *Bdellovibrio* sp., *Salmonella* sp.'nin dört antibiyotiğe dirençli izolatı üzerinde litik aktivite göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkan araştırmacılar, predatör bakterilerin kanalizasyon atık sularının arıtılmasında antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmektedir. Başka bir çalışmada, *B. bacteriovorus*'un fitopatojenik *Pantoea* sp. ve *Xanthomonas campestris* suşlarına karşı antimikrobiyal etkileri olduğu ortaya konmuştur (Odooli ve diğ., 2021). Öte yandan, yapılan deneyler, *B. bacteriovorus*'un, havuç, marul vb. ürünlerin hasatları sonrasında içerebileceği *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojenlerin yok edilmesine yardımcı olabileceğini göstermiştir (Olanya ve diğ., 2020).

İlaç direncinin çoğaldığı günümüzde, alternatif antibiyotikler önerilmektedir. Patojenik özelliği olmayan doğal bir avcı olan ve farklı ekosistemlerde (sular, toprak ve insan) yaşayabilen *B. bacteriovorus*'un başarılı bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. *Bdellovibrio* türleri hem planktonik hücreler hem de biyofilmler üzerinde etki göstermiştir. Biyofilm yapılarındaki mikroorganizmalara saldırının planktonik hücrelere saldırıdan daha yüksek çaba gerektirdiği bildirilmektedir (Kadouri ve O'Toole, 2005). Bununla birlikte, farklı patojenler tarafından oluşturulan biyofilm üzerindeki biyokütlenin azalması önceki çalışmalarda gözlemlenmiştir. Kadouri ve O'Toole (2005), *B. bacteriovorus*'un *E. coli* ve *P. fluorescens* biyofilmleri üzerindeki ilk anti-biyofilm etkisini bildirmiştir (Kadouri ve O'Toole, 2005). Buna ek olarak, *B. bacteriovorus* hem saf hem de çoklu kültürlerin mikrobiyal biyokütlesini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu avcı bakterinin biyofilm oluşumunun engellenmesi üzerindeki etki şekli esas olarak av bakterisine bağlıdır. *S. aureus* biyofilminin *B. bacteriovorus* tarafından inhibe edilmesinin**,** predatör tarafından salgılanan hücre dışı proteazların etkisiyle olduğu gösterilmiştir (Pantanella ve diğ., 2018).

Yanık yarası gibi yaralarda gelişen bakteriyel biyofilmin, onarım veya yeniden şekillenme aşamaları olmaksızın enflamatuar fazda kalan kronik yaraların gelişiminin ana nedeni olduğu bildirilmektedir (Jahromi ve diğ., 2018; Trøstrup ve diğ., 2020). Bu bağlamda, Tajabadi ve diğ. (2023), *P. aeruginosa* patojeninin neden olduğu yanık yarası enfeksiyonuna karşı *B. bacteriovorus* HD100 kullanımının etkinliğini incelemiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, bu

avcı bakterinin uygulanmasının yaranın iyileşme hızını artırdığını, enflamatuar faz süresini azalttığını ve iyileşen yaranın hücre yenilenme sürecini desteklediğini gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak, enfekte farelere *B. bacteriovorus* tedavisi uygulandığında *vegf, tgf-β1* ve *col1* genlerinin yüksek ekspresyonu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, biyofilm oluşturan patojenin uygulanan predatör bakteriler tarafından zayıflatıldığını ortaya koymuştur (Tajabadi ve diğ., 2023).

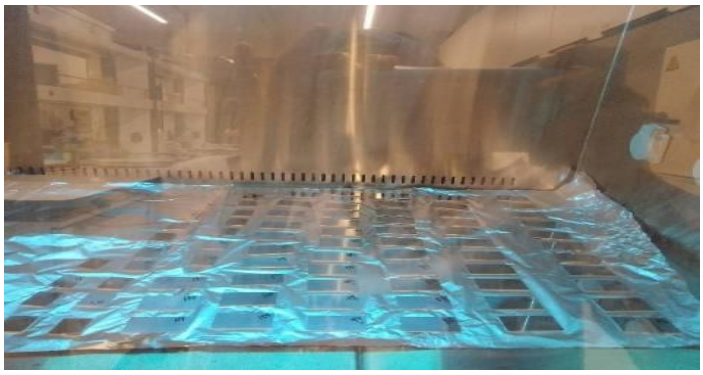
B. bacteriovorus ve BLO'nun doğal antimikrobiyal ajanlar olarak etkinliğini inceleyen önceki çalışmaların çoğu tıbbi öneme, bitki patojenlerinin biyokontrolüne ve atık su arıtımına odaklanmıştır. Bu tarihe kadar, sadece bir çalışmada *B. bacteriovorus*'un SRB'nin neden olduğu mikrobiyal etkili korozyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, X70 çeliğinin korozyon oranının 2 ay sonra 19,17'den 3,75 mg/dm^2/gün'e düştüğünü göstermektedir (Qiu ve diğ., 2016). Bu sonuçlar, farklı sektörlerde önemli ekonomik maliyetlere neden olan endüstriyel hasarlardan kaçmak için bu avcı bakterinin potansiyel kullanımlarının önemini ortaya koymaktadır. Öte yandan, MİK ile ilişkili bakteriler daha önce de gösterildiği gibi farklı etki biçimlerine sahiptir. Bazıları doğrudan metal yüzeyine bağlanır (biyofilm), bazıları ise metalin korozyonunu arttıran enzimler veya diğer kimyasal maddeler salgılar. Bu avcı bakteri hem planktonik hücrelere hem de biyofilm yapısındaki hücrelere saldırabildiğinden, MİK üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, çevresel koşulların *B. bacteriovorus* üzerindeki etkilerini araştıran önceki çalışmalar, bu bakterinin yüksek pH aralığı ve sıcaklık direncine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bu bakteri üzerinde farklı oksijen seviyelerinin herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Williams ve Chen, 2020). Bu veriler, *B. bacteriovorus*'un metal üzerinde oluşan MİK ve biyofilme karşı iyi bir doğal biyokontrol ajanı olduğu fikrini güçlendirmektedir. Bununla birlikte, bu bakterinin sahada uygulanmadan önce farklı metal yüzeyler ve farklı mikroorganizmalar üzerindeki etkileri gibi daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. 316L PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARIN HAZIRLANMASI

Bu çalışma için su soğutma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan 316L paslanmaz çelik seçilmiştir. Çelikler elektrokimyasal çalışma için 50*25*1mm^3 ve 25*25*1mm^3 boyutlarında kesilmiştir. Her bir çelik kuponun yüzeyi, Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi ALUTEAM laboratuvarında bulunan zımparalama/parlatma cihazı ile 600, 800, ve 1200'lük grit silisyum karbür zımparalar kullanarak zımparalanmıştır. Bu işlemden sonra, kuponlar distile su ile yıkanmış, saf etanol ile temizlenmiş, kurutulmuş ve kullanılana kadar anaerobik koşullar altında desikatörde saklanmıştır. Deney hazırlıkları esnasında desikatörden alınan kuponlar bir gece pastör fırınında 70 °C'de kurutulmuştur. Daha sonra, her bir kupon numaralandırılarak ağırlıkları hassas terazi (ondalık kısmı dört haneli) ile tartılmıştır (üç tekrarlı). Kuponlar, deneylerde kullanılmadan önce etanol (%70) ile, ardından her yüzey 30 dakika boyunca UV ışığına maruz bırakılarak steril edilmiştir (Şekil 3.1).

Hazırlanan kuponlardan bir tanesine 316L paslanmaz çelik alaşımının kompozisyonunu belirlemek amacıyla optik emisyon spektrometresiyle kimyasal analiz testi uygulanmıştır.



Şekil 3.1: Kullanma Hazır Olan Kuponlar: Laminar flow kabininde UV Altında Sterilizasyon İşlemi Sırasında.

3.2. DENEY DÜZENEĞİ

3.2.1. Su Soğutma Sistemlerinin Simülasyonu ve Sistemlerin Hazırlanması

Bu çalışmada P ve D olarak adlandırdığımız su sirkülasyonunun gerçekleştiği iki sistem su soğutma sistemi model alınarak dizayn edilmiştir (41,25*34,5*35,5 cm^3

(uzunluk*genişlik*derinlik)). Sistemler, ağzı yarı kapalı cam bir hazne ve su sirkulasyonu yapan devridaim pompasından (EHEIM, 2213) oluşmaktadır.

Sistemlerin oluşan ekipmanlarıyla birlikte sterilizasyonu aşağıdaki gibi yapılmıştır:

a) Tüm ekipmanlar ve sistemler deterjanlı su ile temizlenip ardından durulanmıştır.

b) Sistemler, son konsantrasyonu %10 sodyum hipoklorit çözeltisi ile doldurulmuş ve 12 saat çalıştırılmıştır.

c) Sodyum hipoklorit sistemden arındırılıncaya kadar sıcak steril distile su ile (sirkülasyon yoluyla) durulanmıştır.

3.2.2. Kupon Taşıycıları

Kupon taşıycıları, deterjanla temizlenmiş ve durulanmış, ardından %70'lik etanol ile dezenfekte edilmiştir. Ardından her yüzeyi bir saat boyunca UV ışığına maruz bırakılarak steril edilmiştir. Aeptik koşullar altında tip 2 güvenlik kabini içinde numaralandırılmış kuponlar kupon taşıyıcılara yerleştirilmiş ve deney sistemlerine yerleştirilene kadar steril alüminyum folyo sarılı vaziyette oda sıcaklığında (25 °C) saklanmıştır.

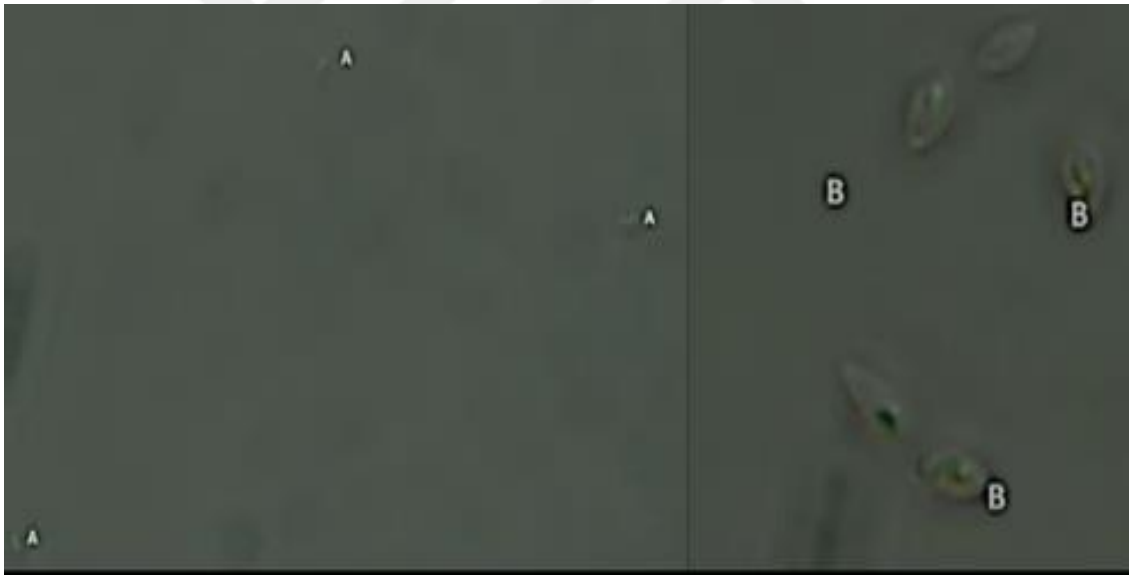
3.2.3. *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 Kültürünün Hazırlanması

Stok olarak %80'lik gliserin içinde -86 °C'de saklanan *B. bacteriovorus* HD100 ve 24 saatlik *E. coli* (ATCC 25922) kültürü ile hazırlanan süspansiyondan dilüye nutrient brot (DNB) besiyerine aktarılmış ve 30 °C'de 120 rpm'de inkübe edilmiştir. *B. bacteriovorus* tarafından oluşturulan *E. coli* lizisi Faz kontrast mikroskop (Nikon Eclipse 80*i* Japan) altında günlük olarak kontrol edilmiş, bir hafta sonunda kültür, steril 0,45 µm membran filtreden (Çözelti A) geçirilmiştir. 1600 ml çeşme suyu 121 °C ve 1.5 atm basınç altında 30 dakika steril edilmiştir. Steril edilen suyun her 400 ml'sine son konsantrasyonları sırasıyla 0,3 mM ve 0,25 mM olacak şekilde $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ eklenmiştir (Çözelti B). *E. coli* süspansiyonu, 24 saatlik *E. coli* kültürünün santrifüj edilmesinden sonra turbidimetrik olarak $1,2*10^9$ kob/ml olacak şekilde B çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır (Çözelti C). Her bir B çözeltisine 1 ml A çözeltisi ve 4 ml C çözeltisi eklenerek D çözeltisi oluşturulmuştur. D çözeltisi 30 °C ve 120 rpm'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. D çözeltisindeki predatörün predasyon aktivitesini kontrol etmek için, *E. coli* 24 saatlik kültürü içeren 50 ml DNB besiyerine filtrelenmiş D çözeltisi inoküle

edilip 30 °C ve 120 rpm'de inkübe edilmiştir. 72 saat sonra epifloresan mikroskop (Nikon Eclipse 80 *i*) altında, Faz-kontrast objektiv ile enfekte *E.coli* hücreleri gözlenmiştir (Şekil 3.2). D çözeltisi, deney sistemine eklenmeden önce steril 0,45 µm membran filtre kullanılarak iki kere süzülmüştür. Bu işlem her ay tekrarlanmıştır. A, B, C, D ve E çözelti içerikleri Tablo (3.1)'de detaylandırılmıştır.

Tablo 3.1: Sistemlerde Kullanılan Karışımlar.

Çözelti	İçerik
A	0,45 µm injektör ucu filtre ile süzülmüş Avcı + av bakteri kültürü
B	Steril 0,3 mM $MgCl_2$ + 0,25 mM $CaCl_2$
C	B çözeltisi ile hazırlanmış $1,2*10^9$ kob/ml *E.coli* süspansiyonu
D	395 ml B + 1 ml A + 4 ml C
E	Steril çeşme suyu +steril 0,3 mM $MgCl_2$ + 0,25 mM $CaCl_2$

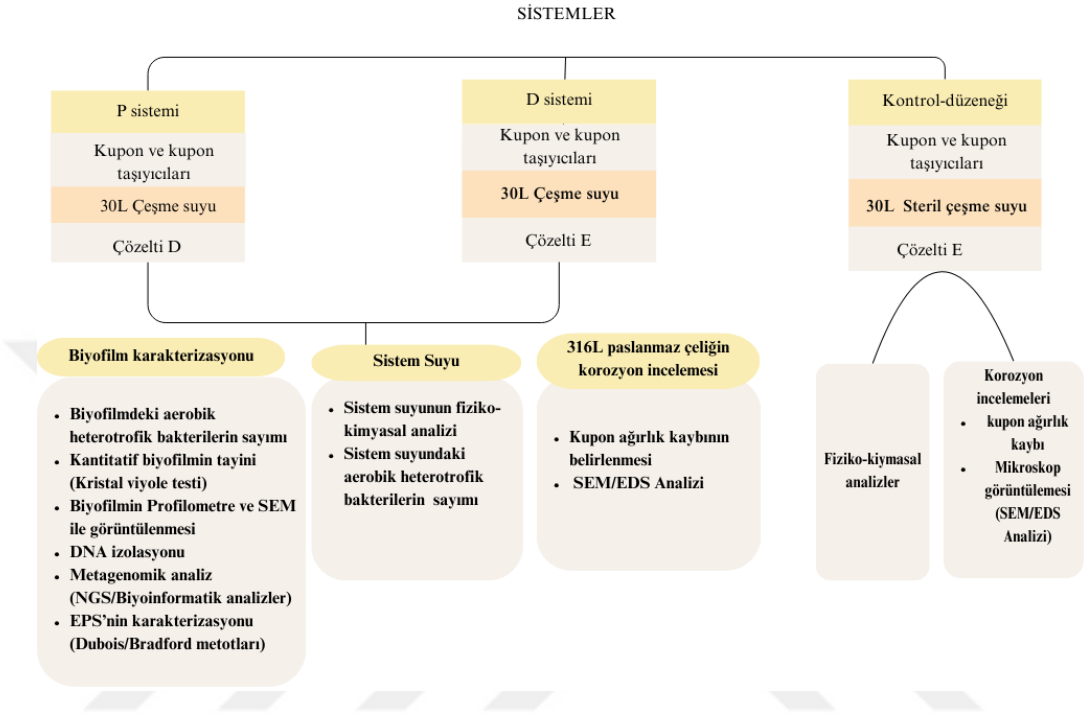


Şekil 3.2: Epifloresan Mikroskop Altında Gözlemlenen *Bdellovibri bacteriovorus* HD100'nin Görüntüsü: A, Serbest Formu (Vibrio Şeklinde); B, *E. coli* İçinde Bulunan Av Bakteri (Bdelloplast Formu).

3.2.4. Deney Sistemlerin Kurulması ve Deneyin Başlatılması

3.2.1'de hazırlanmış sistemlere 3.2.2'de hazırlanan kuponlar aseptik olarak yerleştirilmiştir. Her iki sisteme 30 litre çeşme suyu eklenmiştir. 15 gün sonra, P sistemine 1600 ml filtrelenmiş D çözeltisi eklenmiştir. D sistemine ise 1600ml E çözeltisi eklenmiştir. Düzenli olarak her hafta

sistemlerin içindeki su 30 litreye çeşme suyu ilave edilerek tamamlanmıştır. Ayrıca, her ay sistemdeki suyun %80'i boşaltılıp çeşme suyu ile 30 litreye tamamlanmıştır. Ardından yukarıda da belirtildiği gibi P sistemine D çözeltisi, D sistemine de E çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Deney ve Kontrol Sistemlerin Özeti

3.3. FİZİKSEL VE KİMYASAL ANALİZ

Su sistemlerinin sıcaklık, toplam çözünmüş madde miktarı (TÇM) ve pH değerleri deney başlamadan önce ve deney sürecinde her ay ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Sıcaklık sistemdeki kalıcı termometre ile, pH ve TÇM ise çok fonksiyonlu su kalitesi ölçer cihazı (pen style meter) kullanılarak ölçülmüştür.

3.4. MİKROBİYOLOJİK ANALİZ

Sistemler kurulduktan ve çalıştırıldıktan sonra her ay (30 gün) her sistemden 1000'er ml su steril şişelere alınmış ve 5'er kupon çıkartılmıştır. Sistem suyu sudaki heterotrofik bakteri sayısını belirlemek için kullanılmıştır. Kupon üzerinde oluşan biyofilm ise biyofilmdeki bakteri biyoçeşitliliğinin belirlenmesi, biyofilmin kantitatif tayini, heterotrofik bakteri sayısının belirlenmesi ve EPS ekstraksiyonu için kullanılmıştır.

3.4.1. Sistem Sularındaki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Sistemler kurulur kurulmaz ve sonrasında her ay hem D hem de P sisteminden steril beherler kullanılarak su örnekleri alınmıştır. 47 mm çaplı ve 0,2 µm por çaplı steril naylon filtre kullanarak süzülmüştür. Ardından filtre 10 ml steril çeşme suyu içeren steril örnekleme poşetine aktarılmış ve pedallı homojenizatör (IUL Instruments, Masicator) yardımıyla filtre üzerine tutunmuş olan hücrelerin suya aktarılması sağlanmıştır (Şekil 3.4). Bu konsantre edilen örneklerden dilüsyon serisi(10^{-1}-10^{-7}) hazırlanmış ve her dilüsyondan 100µl R2A besiyerine üç tekrarlı olarak ekilmiştir. Ardından Petri kutuları 7 gün boyunca 30 °C'de inkübe edilmiş, inkübasyon süresinin ardından 30-300 koloni içeren Petri kutuları dikkate alınarak bakteri kolonileri sayılmıştır.



Şekil 3.4: Bakteri Hücrelerinin Yoğunlaştırılması için 'Manifold-Su Pompası' Sistem ile Sistem Suların Filtrelenmesi.

3.4.2. Kupon Üzerinde Oluşan Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Her ay, heterotrofik bakteri sayılarının belirlenmesi ve metagenomik analiz için her sistemden 2 paslanmaz çelik kupon çıkarılmıştır. Biyofilme tutunmamış hücreleri uzaklaştırabilmek için kuponlar beher içindeki steril çeşme suyuna yavaşça daldırılıp çıkartılmıştır. Biyofilm steril eküvyonlar kullanılarak kuponlardan toplanmış ve 10 ml steril çeşme suyuna aktarılmıştır. Ardından seri dilüsyon serisi (10^{-1}-10^{-7}) hazırlanmış ve her bir dilüsyondan 100 µl R2A besiyerine (üç tekrarlı) ekilmiş ve 7 gün boyunca 30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından 30-300 koloni içeren Petri kutuları sayılmıştır.

3.4.3. Paslanmaz Çelik Kuponlarda Oluşan Biyofilmin Kristal Viyole Boyama Yöntemi ile Kantitatif Tayini

Her ay kuponlar üzerinde oluşan biyofilm miktarını kantitatif olarak değerlendirmek için her sistemden 2'şer paslanmaz çelik kupon alınmıştır. İlk olarak, biyofilme tutunmamış hücreleri biyofilmden ayırmak için kuponlar steril çeşme suyuna nazikçe daldırılıp çıkartılmıştır. Daha sonra, kuponların tamamı 5 dakika boyunca metanol içinde bekletilmiş ardından üç kez steril su ile yıkanmış ve havada kurutulmuştur. Böylece biyofilm metanol kullanılarak kuponlar üzerine sabitlenmiştir. Kurutma işleminden sonra, kuponlar 15 dakika boyunca %0,1 kristal viyole ile boyanmış ardından hücre dışındaki boyaların uzaklaştırılması için steril çeşme suyu ile nazikçe yıkanmış ve havada kurutulmuştur. Daha sonra kuponlar 15 dakika boyunca aseton:etanol (80:20; v/v) çözeltisinde bekletilmiş ve renkli çözeltilerin absorbansı 595nm'de spektrofotometre cihazı (ThermoFisher SCIENTIFIC) kullanılarak ölçülmüştür (Arslan-Aydoğdu ve Kimiran, 2018).

3.4.4. Biyofilmin DNA İzolasyonu, Metagenomik Analizi ve Biyoinformatik

Kuponlar üzerinde oluşan biyofilmin bakteriyel taksonomik profilini belirlemek için biyofilmin toplam DNA'sı izole edilmiş ve metagenomik analizi yapılmıştır.

3.4.4.1.DNA İzolasyonu

DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen) kiti kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği prosedüre göre 3.4.1'de toplanan biyofilmlerin DNA'ları izole edilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinin kalite ve konsantrasyon ölçümü NanoDrop spektrofotometre cihazında ölçülmüştür (konsantrasyon, 260/280 ve 260/230 nm absorbans oranları kaydedilmiştir). Aynı zamanda %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek parçalanma durumu kontrol edilmiştir. DNA örnekleri çalışma anına kadar -86 °C'de saklanmıştır.

3.4.4.2.16S Amplikon Dizileme ve Biyoinformatik Analizler

İzole edilmiş DNA örneklerinden bakteriyel 16S rRNA geni V3-V4 bölgesini hedefleyen universal 341F ve 805R primerleri kullanılarak amplikon dizileme kütüphaneleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kütüphaneler saflaştırılıp, miktar ölçümü yapılmış ve normalize edilerek MiSeq (Illumina) cihazında 300bp PE kimyası ile dizilenmiştir.

Elde edilen dizileme verisinden adaptör dizileri kesilerek çıkarılmış, sonrasında CASAVA (Illumina, USA) yazılımı kullanılarak okumalar barkod dizilerine göre ayrılacak analize hazır hale getirilmiştir. Devamında PCR primer dizileri QIIME2 v2021.2 (Bolyen ve diğ., 2019) programı içerisindeki Cutadapt (Martin, 2011) eklentisi ile okumalardan çıkarılmıştır. Primer dizilerinde %100 eşleşme olmaması durumunda ilgili okuma analizden çıkarılmıştır. Tüm amplikon dizileme akışı QIIME2 programı ile gerçekleştirilmiştir. Çift yönlü okumalar birleştirilmiş (vsearch join-pairs), kalite filtrelemesi gerçekleştirilmiş (quality-filter q-score-joined), devamında denoising işlemi Deblur (deblur denoise-16S) programı ile gerçekleştirilmiştir (Amir ve diğ., 2017). Elde edilen amplikon dizi varyantlarının (ASV) taksonomik sınıflandırması 'feature-classifier classify-sklearn' eklentisi ile SILVA v138 veritabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Son ASV tablosu her ASV'nin örneklerdeki okunma miktarlarını içerecek şekilde her taksonomik seviyede birleştirilmiş olarak hazırlanarak örneklerin yüzdece içerikleri tespit edilmiştir. Örnek-içi alfa ve gruplar-arası beta çeşitlilik metrikleri ASV tablosu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Eşit olmayan dizileme derinliğinin neden olduğu önyargılardan kaçınmak için, ASV tablosu en düşük dizi sayısına sahip örneğin dizi sayısına göre seyreltilmiştir (rarefaction). Seyreltmeden sonra, aşağıdaki alfa çeşitlilik ölçümleri hesaplanmıştır: observed-features, Shannon ve Faith filogenetik çeşitliliği (Faith's PD). Örnek grupları arasındaki göreceli bolluktaki farklılıkları bulmak için MaAsLin2 (Microbiome Multivariable Association with Linear Models) (Mallick ve diğ., 2021) programı varsayılan parametreler ile kullanılmıştır. İstatistiksel olarak, anlamlı test sonuçları 0,05'lik bir p-değeri eşiği ve 0,25'lik bir q-değeri eşiği kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin mikrobiyal profillerinin benzerliklerini incelemek amacıyla beta-çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir. Beta-çeşitlilik analizleri için Weighted-Unifrac ve Unweighted-Unifrac uzaklık metrikleri hesaplanmış, gruplar arasındaki farklar PERMANOVA (Anderson, 2001) yöntemi ile test edilmiştir.

3.5.EPS ANALİZİ

Oluşan biyofilmin ekzopolimerik maddesini incelemek için her ay her sistemden 2 kupon alınmıştır. Alınan kuponlar, biyofilmin ekzopolimerik bileşiminin belirlenmesine yönelik işlemlere tabi tutulmuştur.

3.5.1. EPS Eldesi

EPS elde etmek için, her iki sistemden çıkarılan kuponlar biyofilme tutunmamış hücreleri uzaklaştırmak amacıyla üç kez steril distile suya nazikçe batırılıp çıkarılmıştır. Steril eküvyonları kullanılarak, kuponlar üzerindeki biyofilm tabakası santrifüj tüplerinde 25 ml distile steril su içine alınıp süspanse edilmiştir. Ardından süspansiyon 4 °C'de 6000 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant başka bir steril santrifüj tüpüne aktarılmış ve pellet üzerine %8,5 NaCl ve %0,22 formaldehit içeren 25 ml solüsyon eklenmiştir. Karışım 1 dakika boyunca vortekslenmiş ve ardından daha önce elde edilen süpernatant ile karıştırılmıştır. Bu son karışım vortekslenmiş ve 4 °C'de 30 dakika boyunca 11.227 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra, süpernatant 0,22 µm gözenekli steril enjektör filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Elde edilen steril çözelti EPS'yi oluşturmaktadır. EPS'ler analiz edilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

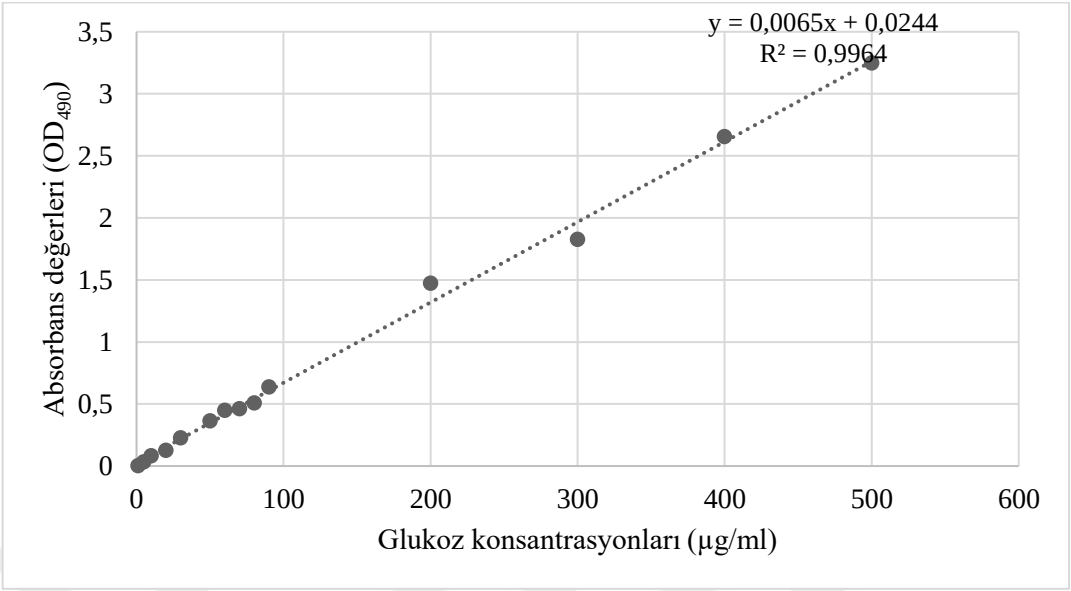
3.5.1. EPS İçeriğindeki Total Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

3.5.1.1.Dubois'in Fenol Sülfirik Asit Yöntemi

EPS içeriğindeki toplam karbonhidratı belirlemek için tüpe 50 µl EPS çözeltisi konmuş üzerine de 150 µl konsantre sülfürik asit ve 30 µl %5 fenol çözeltisi eklenmiş ve vortekslenmiştir. Ardından tüpler Benmari cihazında 90 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında 5 dakika soğumaya bırakılmış süre sonunda tekrar 90 °C'de 5 dakika ısıtılmıştır. Bu işlemlerin ardından soğuyan tüpler spektrofotometre ile (ThermoFisher SCIENTIFIC) 490 nm'de okunarak örneklerin absorbans değerleri kaydedilmiştir (Dubois ve diğ., 1956). Daha sonra elde edilen absorbanslar Şekil 3.5'te bulunan denklem kullanılarak EPS örneklerindeki total karbonhidrat miktarları belirlenmiştir.

3.5.1.2.Kalibrasyon Eğrisi

Standart glukoz çözeltisi 100mg/100ml konsantrasyonda Mili-Q su içinde hazırlanmıştır. Stok çözelti kullanılarak seri glukoz konsantrasyonları (1, 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/ml) hazırlanmış ve daha sonra bu konsantrasyonlara fenol sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen absorbanslar standart eğrinin oluşturulmasında kullanılmıştır (Şekil 3.5).

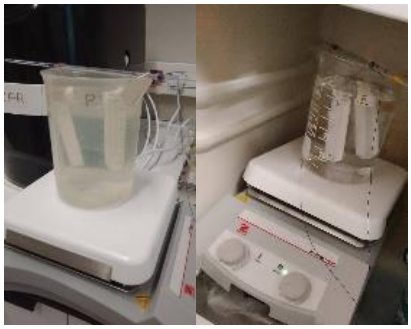


Şekil 3.5: Karbonhidrat Kalibrasyon Eğirisi.

3.5.2. EPS İçeriğindeki Total Protein Miktarının Belirlenmesi

3.5.2.1.EPS'nin Diyalizi:

EPS'deki toplam protein miktarını belirlemeden önce, EPS elde ederken kullanılan tuzların uzaklaştırılması için diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde diyaliz tüpleri ve fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanılmıştır. İlk olarak, diyaliz tüpleri yaklaşık 20 mm kesilmiş, 15 dakika boyunca saf suda ardından 5 dakika boyunca da PBS'de bekletilmiştir. Tüpün uçları klipslerle kapatılmış ve tüpler 20 ml EPS ile doldurulmuştur. Manyetik karıştırıcı üzerine PBS (1000 ml) içeren beher, beherin içine de EPS içeren klipsli tüpten oluşan sistem yerleştirilmiş ve ön diyaliz işlemi oda sıcaklığında 3 saatte tamamlanmıştır. Süre sonunda beherdeki PBS alınmış ve 1000 ml yeni PBS eklenmiş, bir gece boyunca 4 °C'de karıştırılmıştır (Şekil 3.6). Diyaliz edilen lizat steril bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve Bradford Protein testi için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.6: EPS'nin Protein Diyalizi İçin Kullanılan Sistemler.

3.5.2.2.Bradford Eğrisinin Kalibrasyonu ve Analizi:

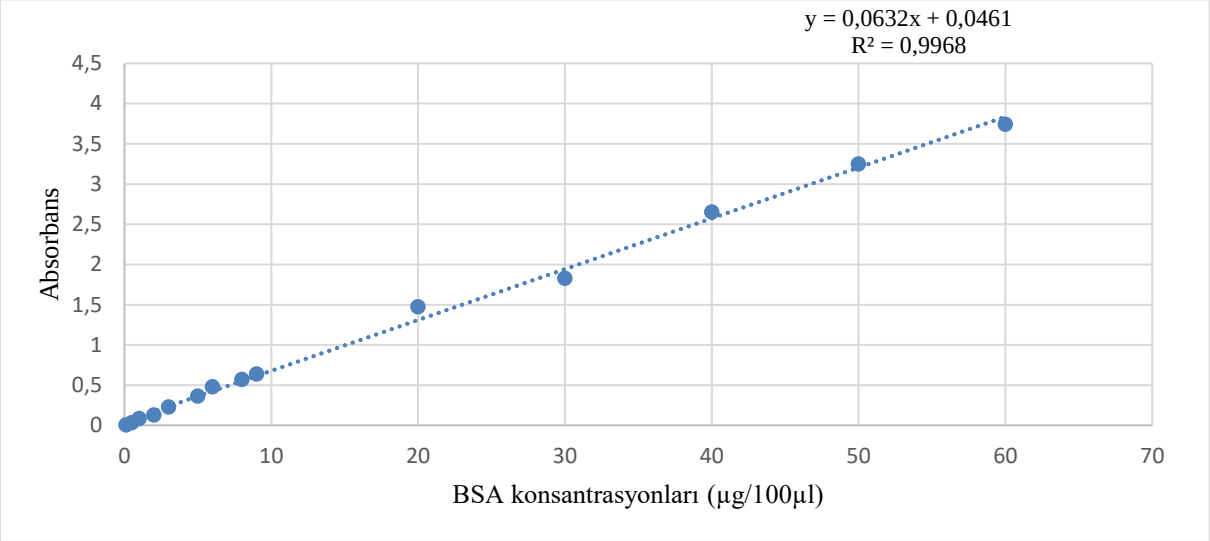
Standart bovin serum albumin (BSA) çözeltisi, Mili-Q su içerisinde 1 mg/ml bovin serum çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır; ve bu çözeltiden 5 µg/100µl – 50 µg/100µl değerleri arasında farklı BSA konsantrasyonları hazırlanmıştır. Plastik küvetler kullanılarak her konsantrasyon üç tekrarlı olarak spektrofotometre cihazında 595nm'de okunmuştur. Kaydedilen absorbanslar standart kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılmıştır (Şekil 3.7). Hazırlanmış örnekler de üç tekrarlı olarak spektrofotometrede (595nm) okunmuştur (He, 2011). Kaydedilen absorbanslar Şekil 3.7'deki denklem kullanılarak örneklerdeki protein miktarları belirlenmiştir.

Ölçüm için hazırlanan Blank ve örneklerin içerikleri:

Blank: 100 µl su + 2500 µl Bradford reaktifi

Örnekler: 100 µl örnek ya da BSA + 2500 µl Bradford reaktifi.

Örnekler ya da BSA (595 nm) okunmadan önce spektrofotometre distile su ile kalibre edilmiştir.



Şekil 3.7: Protein Miktarının Standart Eğrisi.

3.6.DİJİTAL MİKROSKOP, TARAMALI ELEKTRON MİKROSOP (SEM) VE ENERJİ DAĞILIM SPEKTROFOTOMETRE (EDS) ANALİZLERİ

Kuponlar üzerinde oluşan biyofilm tabakasının incelenmesi için, her iki sistemden 8. ayda çıkarılan kuponlar taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelenmiştir. Ayrıca, yüksek korozyon oranına sahip kuponlar üzerinde SEM ve 3D- optik profilometre (Zeiss-Smartzoom5) analizleri kullanılarak korozyon etkileri/hasarları tespit edilmiştir. Analiz öncesi kuponlar önce %2,5'lik glutaraldehit içinde 4 °C'de 1 saat bekletilerek biyofilmin fiksasyonu sağlanmıştır. Ardından kuponlar üç kez steril bidistile suya batırılmıştır ve sonra sırasıyla %30, %50, %80 ve %95 etanol seri konsantrasyonlarında 10'ar dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kuponlar incelenene kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ayrıca, yüksek korozyon oranına sahip kuponlardaki korozyon ürünlerini incelemek için enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) analizi kullanılmıştır.

3.7.316L PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARIN KOROZYON ANALİZİ

İki sistemin 316L paslanmaz çeliğinin korozyonları incelenmesi için her ay 6 kupon her iki sistemden çıkarılıp ağırlık kayıpları belirlenmiştir.

3.7.1. Kuponların Ağırlık Kaybının Belirlenmesi

Sistemden çıkarılan kuponlarda oluşan biyofilm steril eküvyonlar kullanılarak kupon üzerinden toplanmıştır. Ardından korozyon ürünlerinin temizlenmesi için, kuponlar ultrasonik cihazda 10 dakika HNO_3 çözeltisine daldırılmış, distile su ile yıkanmış, asetona batırılmış ve bir gece boyunca 70 °C'de kurutulmuştur. Her bir kuponun ağırlığı kaydedilmiş ve ağırlık kaybı, deneyden önce kaydedilen ilk ağırlıklar ile bu son kaydedilen ağırlıklar arasındaki fark ile belirlenmiştir.

3.8.KONTROL DÜZENEĞİ

Kontrol sistemi olarak kullanılan düzenek deney model sistemleri ile aynı özelliklere sahiptir. Kontrol sistemi steril düzenek olduğu için ek olarak üzerini kapatacak bir cam kapak, UV sterilizatör (EHEIM UV REFLEX 7W) ve su sirkülasyonu yapan devridaim pompasından (EHEIM, 2213) oluşmaktadır. UV sterilizatör sistem suyu içinden geçerken UV ışığı ile suya geçebilecek mikroorganizmaları öldürerek sistemin steril kalmasını sağlamıştır. Ayrıca kontrol sistem deney sürecinde güvenlik kabininde UV ışığı altında bırakılmıştır. Bu sistemde kullanılan kuponlar ve kupon taşıycıları daha önce 3.1 ve 3.2.2'de belirtildiği gibi hazırlanmış ve aseptik koşullar altında kontrol düzeneğine yerleştirilmiştir. Kontrol sistemi steril çeşme suyu ile doldurulmuştur. Kontrol sistemden ayda 1 kez düzenli olarak su desarj edilmiş ve sistem steril çeşme suyu ile 30 litreye tamamlanmıştır. Sistem suyundan her hafta R2A besiyerine ekim gerçekleştirilmiş ve sistemde kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir. Daha önce deneysel sistemler için kaydedilen fizikokimyasal parametreler, su sisteminin sıcaklık, TÇM ve pH değeri 8 ay boyunca, her ay kontrol sistemi suyundan da kaydedilmiştir. Ayrıca, korozyon analizi için her ay sistemden ağırlık kaybı analizi için 3 kupon alınmıştır. Kuponlara uygulanan ağırlık kaybı ve korozyon analizi deney sistemlerinde uygulanan analizler ile aynı olarak gerçekleştirmiştir.

3.9.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada incelenen biyotik ve abiyotik faktörler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek ve elde edilen sonuçları üç sistem arasında karşılaştırmak için Pearson Korelasyon Testi, varyans analizleri için ise One-Way ve Two-Way ANOVA testleri, Welch Two samples t-test ve Tukey HSD testi RStudio uygulamasında kullanılmıştır. Korelasyon şekilleri de RStudio kullanılarak oluşturulmuştur.

3.10. BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.10.1. Reasoner 2 Agar (R2A) Besiyeri

Tablo 3.2: Heterotrofik Bakterilerin Sayımı İçin Kullanılan R2A Besiyerinin Bileşimi.

Kimyasallar	Miktar
Kazein hidrolizatı	0,5g
Nişasta	0,5g
Pirüvik asit	0,3g
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$)	0,05g
Pepton	0,5g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	0,3g
Maya özütü	0,5g
Agar	12g
Distile su	1000ml

R2A besiyeri agar içerdiği için önce Benmari cihazında 100 °C'de tutularak besiyeri homojen hale getirilmiştir. Ardından 121 °C'de, 1,5 atm basınç altında 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Petri kutularına aseptik koşullarda dökülmüş ve 28 °C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapılmıştır.

3.10.2. Seyretilmiş Nutrient Besiyeri (DNB)

Tablo 3.3: *B. bacteriovorus* HD 100 Çoğaltmak İçin Kullanılan Besiyeri.

Kimyasallar	Miktar
Nutrient broth	2,4g
Maya özütü	1,5g
$MgCl_2.\ 3H_2O$	3mM
$CaCl_2.\ 2H_2O$	2mM
Agar (gerekirse)	15g
Distile su	1000ml

Oda sıcaklığında agar eklenmeden önce pH metre ile pH 7.8'e ayarlanmıştır. 121 °C'de, 1,5 atm altında 15 dk otoklav cihazında steril edilmiştir. Petri kutularına aseptik koşullarda dökülmüş ve 28 °C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapılmıştır.

3.10.2. 25mM $CaCl_2$. $2H_2O$ Çözeltisi

$CaCl_2$. $2H_2O$	25g
Distile su	1000ml

3.10.3. 30mM $MgCl_2$. $3H_2O$ Çözeltisi

$MgCl_2$. $3H_2O$	6,099g
Distile su	1000ml

3.10.4. 10X Fosfat Tamponu (PBS)

Na_2HPO_4	17,8g
KH_2PO_4	2,4g
NaCl	80g
KCl	2g
pH	7,2
Distile su	1000ml

3.10.5. Bradford Reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250)

Coomassie Brilliant Blue G-250	100mg
%95 Etil alkol	50ml
%85 Fosforik asit	100ml
Distile su	1000ml'ye tamamlanmıştır.

Comassie Brilliant Blue G-250 manyetik karıştırıcıda tamamen çözülene kadar karıştırılmıştır. Çözelti gece boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra Whatman filtre kağıdından süzülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Reaktifin hazırlanması ve saklanması karanlık koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

3.10.6. Nitrik Asit Çözeltisi

%67 HNO_3	1 hacim
Distile su	3 hacim

3.10.7. %0,1'lik Kristal Viyole Boyası

Kristal viyole	0,1g
%96,5 Etil alkol	100ml

3.10.8. Aseton: Etanol Çözeltisi

Aseton	4 hacim
Etil alkol	2 hacim

3.10.9. 1mg/1ml Ayarlanmış Stok Bovin Serum Albumin (BSA) Çözeltisi

BSA	0,005g
Bidistile su	5ml

3.10.10. 100mg/100ml Ayarlanmış Stok Glukoz Çözeltisi

Glukoz	0,1g
Bidistile su	100ml

4. BULGULAR

4.1. 316L PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARIN KARAKTERİZASYONU

Demir (Fe), kullanılan 316L paslanmaz çeliğin ana alaşım elementidir. Diğer baskın elementler krom ve nikel olarak belirlenmiştir. Ayrıca, bileşim oranı %2'den az olan diğer elementler manganez ve molibdentır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Kullanılan 316L Kuponların kimyasal bileşimi (% ağ.)

Element	C	Si	Mn	Cr	Ni	Mo	Fe
%	0,031	0,396	1,52	16,98	10,37	1,88	kalan

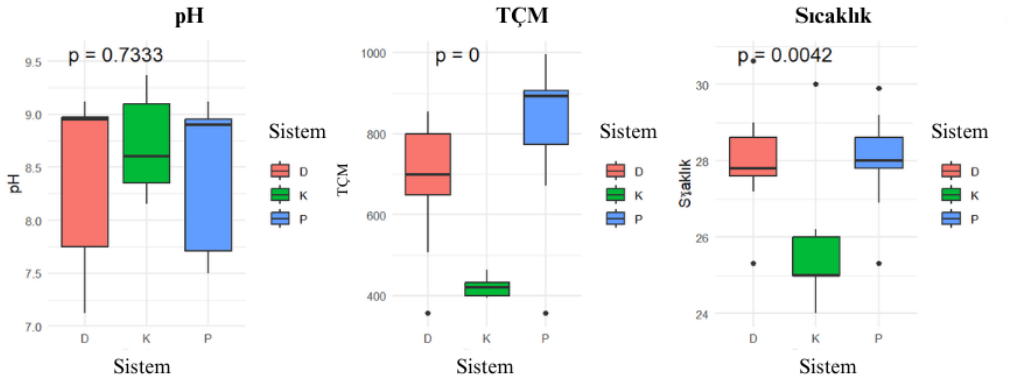
4.1. Sistem Sularının Fiziko-Kimyasal Parametreleri

Deney sistemlerinin (avcı bakteri içeren sistem (P) ve avcı bakteri içermeyen sistem (D)) beslendiği şebeke suyu sıcaklığı 25,3°C, pH değeri 8,95 ve toplam çözünmüş madde miktarı 356 ppm olarak kaydedilmiştir. Sistemlerde su sıcaklığını 30 °C'de tutan bir ısıtıcı bulunmasına rağmen, iki sistemin sıcaklığı 8 ay boyunca 27-30 °C arasında değişmiştir (Tablo 4.2). D sistem suyu pH değerleri 7,12 - 9,12 arasında değişirken, P sistem suyunun pH değerleri 7,61-9,12 arasında değişmiştir. En düşük pH değeri her iki sistem için de 4. ayda, en yüksek pH değeri ise her iki sistem için de 8. ayda gözlenmiştir. D, Ayrıca P ve K (steril) sistem sularının 8 aylık deney sürecinde kaydedilen sıcaklık, pH ve TÇM değerleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

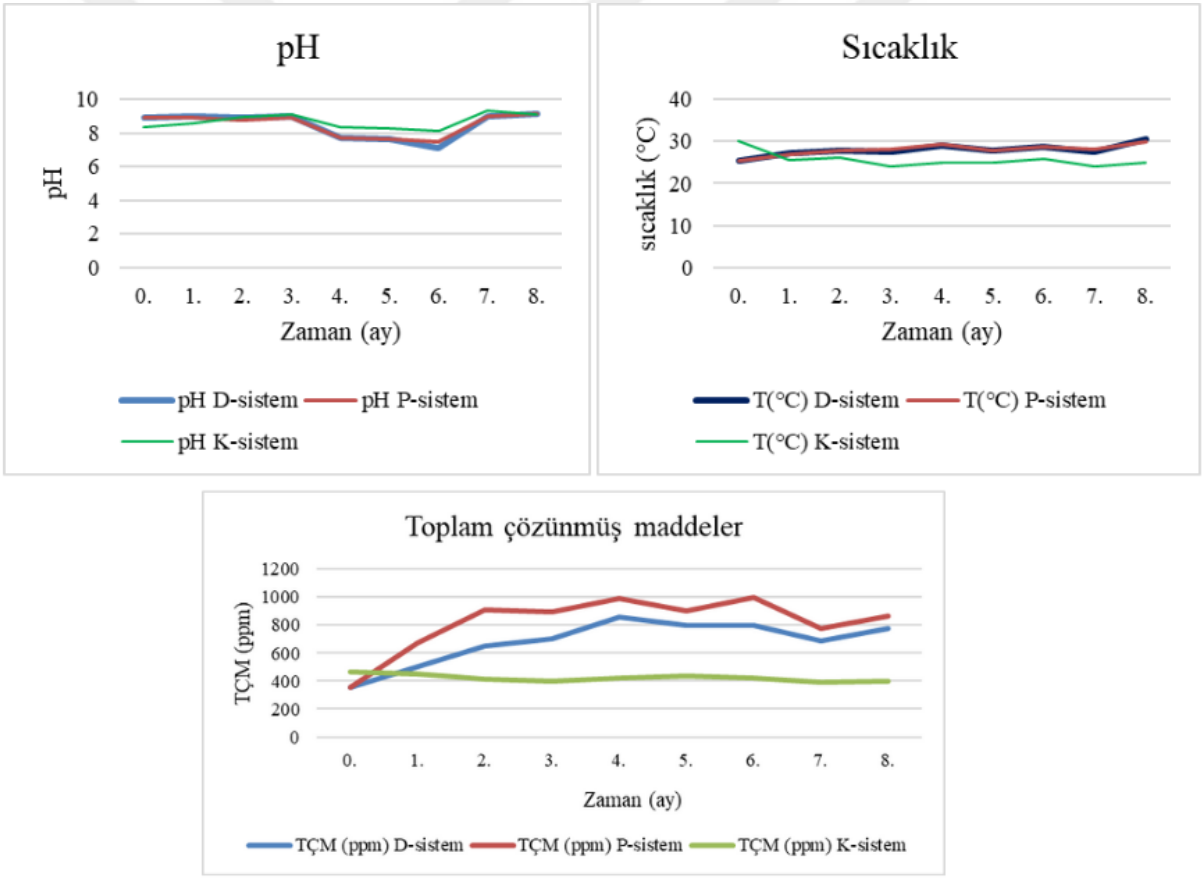
Tablo 4.2: Sistemlerin Sıcaklık, pH, ve TÇM Değerleri.

	T(°C)			pH			TÇM (ppm)		
Ay	D	P	K	D	P	K	D	P	K
0.	25, 3	25, 3	30, 0	8, 95	8, 95	8, 35	356	356	463
1.	27, 2	26, 9	25, 5	8, 97	8, 94	8, 6	506	672	450
2.	27, 9	27, 9	26, 2	8, 9	8, 78	8, 98	649	907	415
3.	27, 6	28, 0	24, 0	8, 97	8, 9	9, 12	699	893	400
4.	29, 0	29, 2	25, 0	7, 75	7, 71	8, 35	855	990	420
5.	27, 8	27, 8	25, 0	7, 6	7, 61	8, 3	800	900	433
6.	28, 6	28, 6	26, 0	7, 12	7, 5	8, 15	800	997	423
7.	27, 6	28, 2	24, 0	9, 0	9, 0	9, 37	685	773	395
8.	30, 6	29, 9	25, 0	9, 12	9, 12	9, 1	774	863	400

Kontrol (K) sistemi sıcaklığı 25 °C-30 °C arasında, pH değerleri 8,95-9,12 arasında değişen, deneysel sistemlere göre daha stabil; TÇM değerleri ise şebeke suyunun TÇM değerine yakın (395 ppm-450 ppm) olarak kaydedilmiştir (Tablo 4.2). Ayrıca, abiyotik faktörlerin (pH, TÇM ve sıcaklık) her biri için üç sistem arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığını belirlemek için One-Way ANOVA testi uygulanmış ve sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Sıcaklık ve toplam çözünmüş madde değerlerinin her biri için üç sistem arasında da anlamlı ($p<0,01$) bir fark olduğu, ancak pH için anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).



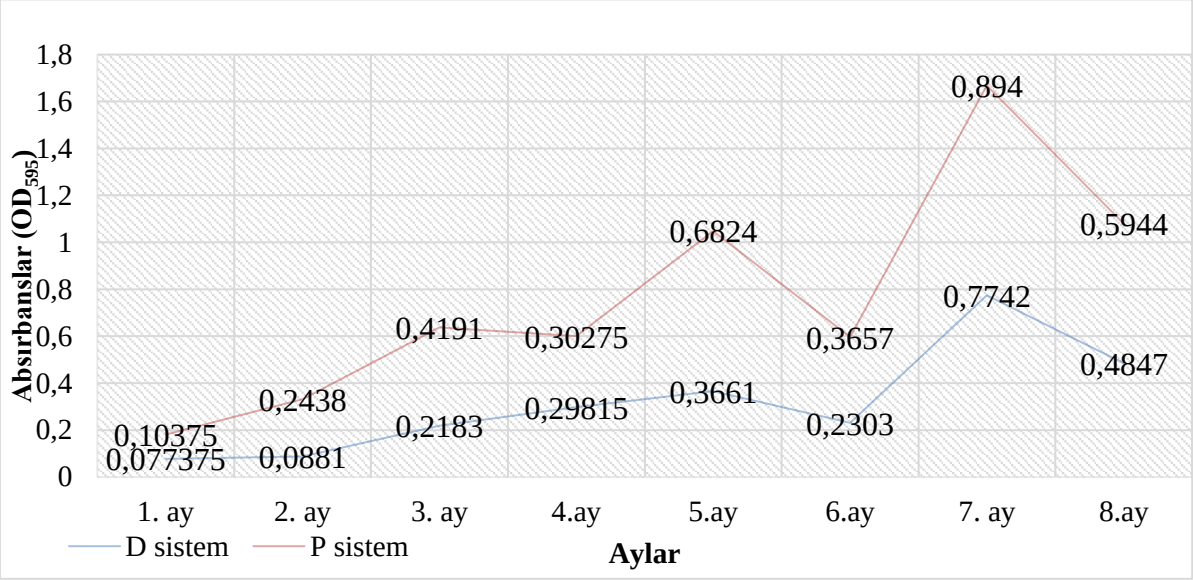
Şekil 4.1: Üç Sistem Arasında pH, TÇM ve Sıcaklık Değerlerinin Farklıklarını Gösteren ANOVA Testi (*:p<0,01).



Şekil 4.2: Sistemlerin Zamanla Gözlemlenen pH, Sıcaklık, ve TÇM Değerleri.

4.2.KANTİTATİF BİYOFİLM TAYİNİ

Kuponlar üzerinde oluşan biyofilm miktarını belirlemek için kristal viyole testi kullanılmıştır. Deney süresince P sisteminde bulunan kuponlar üzerinde oluşan biyofilmin D sisteminde bulunan kuponlar üzerinde oluşan biyofilmden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). İki sistem arasındaki biyofilm miktarlarını karşılaştırmak için, kaydedilen OD_{595} değerlerine t.testi uygulanmıştır. Sonuç, iki sistemdeki biyofilm miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). En yüksek biyofilm miktarı her iki sistemde de 7. ay alınan kuponlarda gözlenmiştir. Buna ek olarak, her iki sistemdeki biyofilm miktarlarının 6. ve 8. aylarda önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

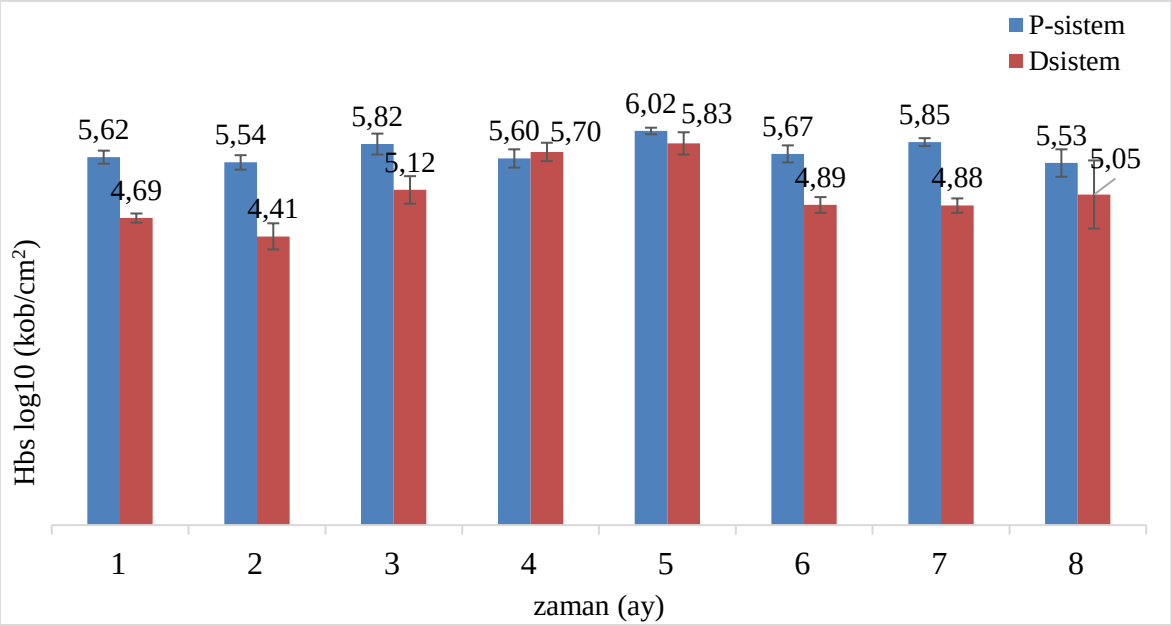


Şekil 4.3: Aylara Göre Gözlemlenen Biyofilm Miktarının Kantitaif Analizi.

4.3.BİYOFİLMDEKİ AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİ SAYISI

Oluşan biyofilmdeki aerobik heterotrofik bakteriler 8 ay boyunca her ay koloni sayma yöntemi ile sayılmıştır. Genel olarak, P sisteminde bulunan kuponlardaki kültüre edilebilen bakteri sayısı, D sistemindeki kuponlarda kaydedilen sayılardan daha yüksek bulunmuştur. Her iki sistemde de 316L paslanmaz çelik yüzeyde oluşan biyofilmdeki maksimum aerobik heterotrofik bakteri sayısı 5. ayda P sisteminde 6,02 kob/cm^2 ve D sisteminde 5,83 kob/cm^2 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4.). Ayrıca, iki sistemden elde edilen bu sayılar Welch İki Örnek t-testi uygulanarak karşılaştırıldığında, iki sistem arasında anlamlı ($p<0,01$) bir farka sahip olduğu bulunmuştur. Bununla beraber P-sistemi için 5,70625, D sistemi için 5,07125 olarak

belirlenen ortalama değerler olarak kaydedilmesi nedeniyle en yüksek hücre sayısının predatör bakteri içeren sistemde (P sistemi) bulunduğu belirlenmiştir.



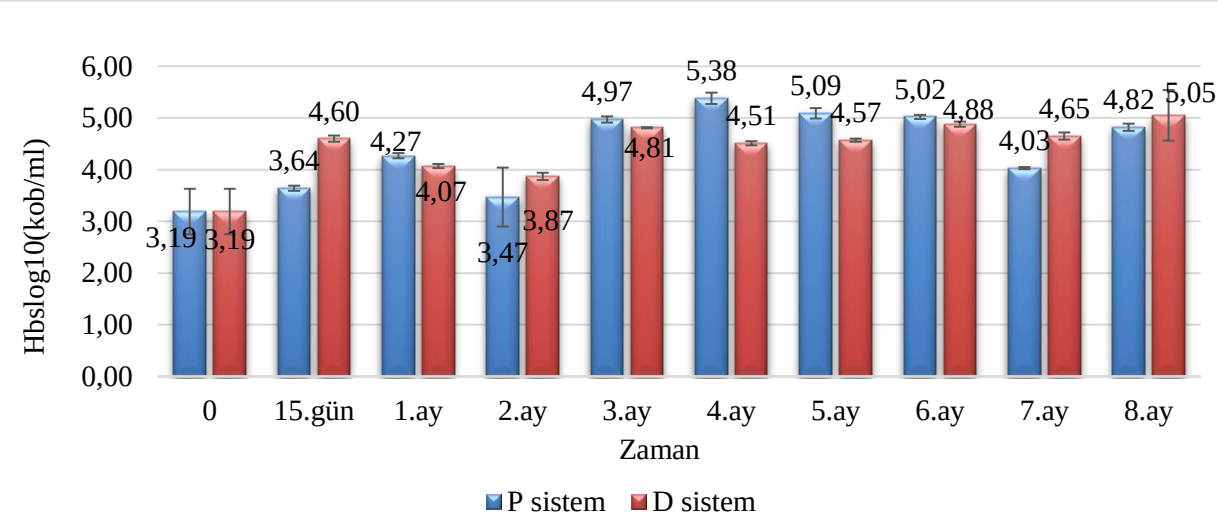
Şekil 4.4: Aylara Göre Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı.

Biyofilmdeki aerobik heterotrofik bakteri sayısının oluşmuş biyofilm miktarıyla ilişkili olup olmadığını belirlemek için Pearson korelasyon testi yapılmıştır. Bu iki parametre iki sistem için pozitif yönde düşük bir korelasyon göstermektedir. Sonuç olarak, biyofilmin aerobik heterotrofik bakteri sayısı ile oluşmuş biyofilm miktarı arasında anlamlı bir ilişki istatistiksel olarak tespit edilememiştir ($p>0,05$).

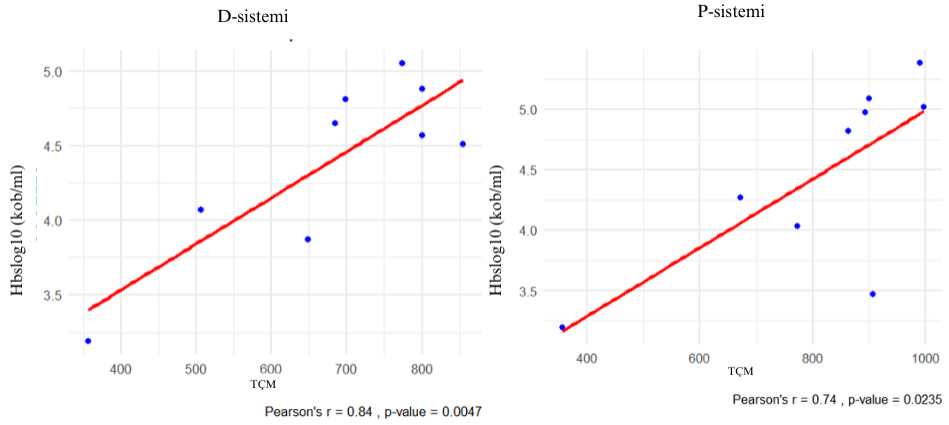
4.4.DENEY SİSTEM SULARINDAKİ AEROBİK HETEROTROFİK BAKTERİ SAYISI

B. bacteriovorus HD100'ün P-sistemine eklenmesinden 15 gün sonra, D sistemindeki bakteri sayısının P-sistemindekinden daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). İki sistem suyunda bulunan bakteri sayısı arasında t-testi uygulandıktan sonra belirlenen sonuçlar, iki sistem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). pH, sıcaklık ve TÇM'nin her bir sistemdeki aerobik ve heterotrofik bakteri sayısı üzerindeki etkisini değerlendirmek için, 8 ay boyunca kaydedilen sudaki aerobik heterotrofik bakteri sayısı ve abiyotik parametreler arasında Pearson korelasyon testi yapılmıştır. D sisteminde, TÇM ile

suların bakteri sayısı arasında pozitif yönde yüksek bir ilişki ($p<0,01$) gözlenmiştir. Aynı şekilde, P sisteminde TÇM ile suların hücre sayısı arasında pozitif yönde bir ilişki ($p<0,05$) olduğu görülmüştür. Diğer abiyotik faktörler ile iki sistemdeki sularının aerobik heterotrofik bakteri sayısı arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. İstatiksel olarak gözlemlenen anlamlı korelasyon grafikleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Aylara Göre P ve D Sistem Sularındaki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı.



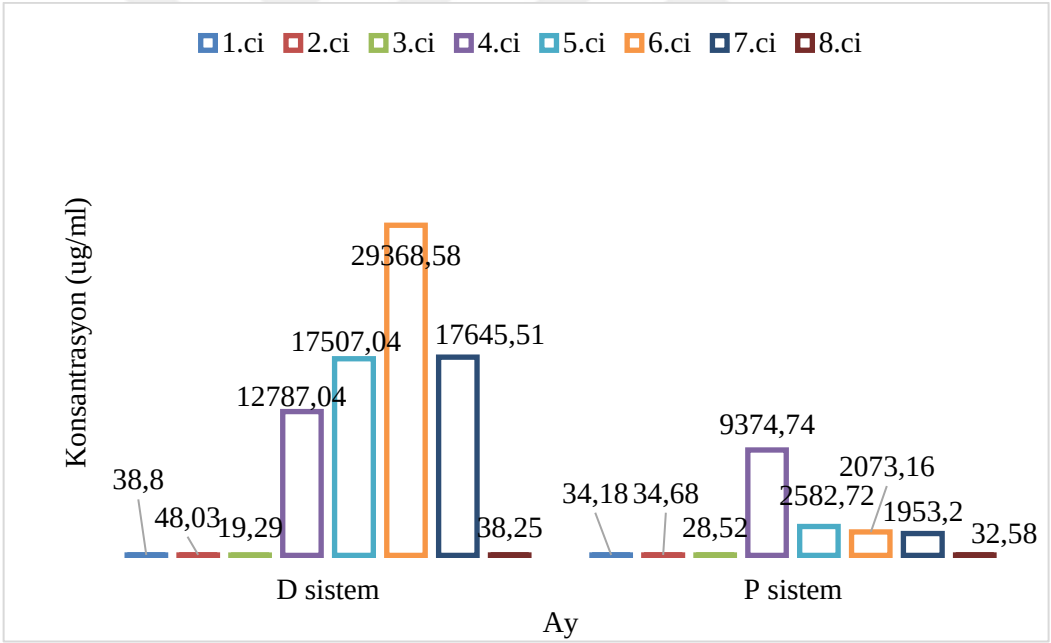
Şekil 4.6: TÇM ve Sistem Sularındaki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı ilişkiyi gösteren Pearson Korelasyon Analizi.

Biyofilmlerdeki aerobik heterotrofik bakteri sayısının, sistem sularındaki aerobik heterotrofik bakteri sayısıyla ilişkili olup olmadığını belirlemek için Pearson korelasyon testi yapılmıştır. Sonuçlara göre biyofilmdeki aerobik heterotrofik bakteri sayısı ile sistem suyundaki aerobik heterotrofik bakteri sayısı arasında her iki sistemde de istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

4.5.EPS'NİN KARAKTERİZASYONU

4.5.1. EPS İçeriğindeki Toplam Karbonhidrat Miktarı

Oluşan biyofilmlerin ekzopolimerik maddesi toplam karbonhidrat miktarı yönünden analiz edildiğinde, D sistemindeki kuponlardan izole edilen EPS içeriğindeki toplam karbonhidrat miktarının, P sisteminden izole edilen toplam karbonhidrat miktarına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek toplam karbonhidrat miktarı D sisteminde 6. ayda, P sisteminde ise 4. ayda kaydedilmiştir (Şekil 4.7). İstatiksel olarak iki sistem arasındaki farklılığı değerlendirmek için t-testi uygulanmıştır. Bu testin sonuçları iki sistemin ortalamaları arasında büyük bir fark olduğunu göstermektedir (D sistemi için 9681,57'ye karşılık P sistemi için 959,60). Bu sonuçlara bakıldığında, ortalamalar arasındaki fark çok büyük olsa bile, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılabilir ($p>0,05$).

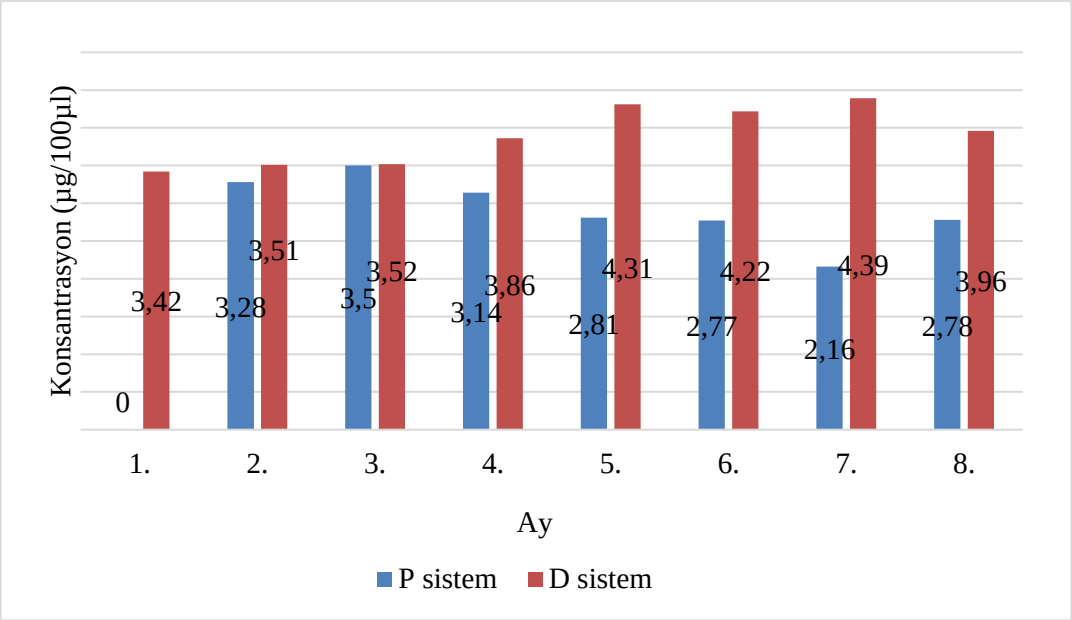


Şekil 4.7: D ve P sistem Biyofilmlerinin EPS İçerikleriğindeki Total Karbonhidrat Miktarı.

4.5.2. EPS İçeriğindeki Toplam Protein Miktarı

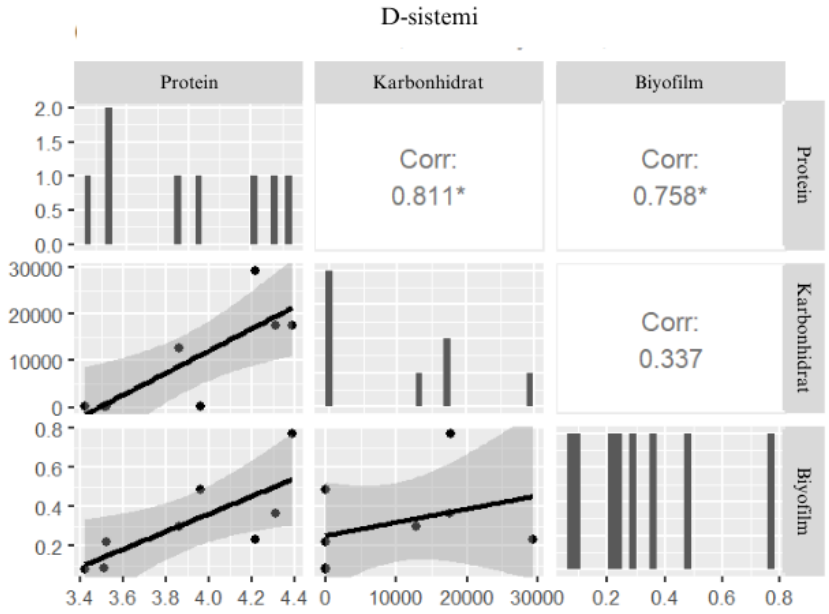
EPS içeriğindeki toplam protein miktarı standart eğri (Şekil 3.7) kullanılarak 8 aylık süre boyunca her ay belirlenmiştir. Sonuçlar, Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu toplam protein miktarına dayalı olarak iki sistemi karşılaştırmak için yapılan t-testi analizi iki sistem arasında

analmlı bir fark olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). En yüksek protein miktarı D sisteminden izole edilen EPS'de ölçülmüştür.

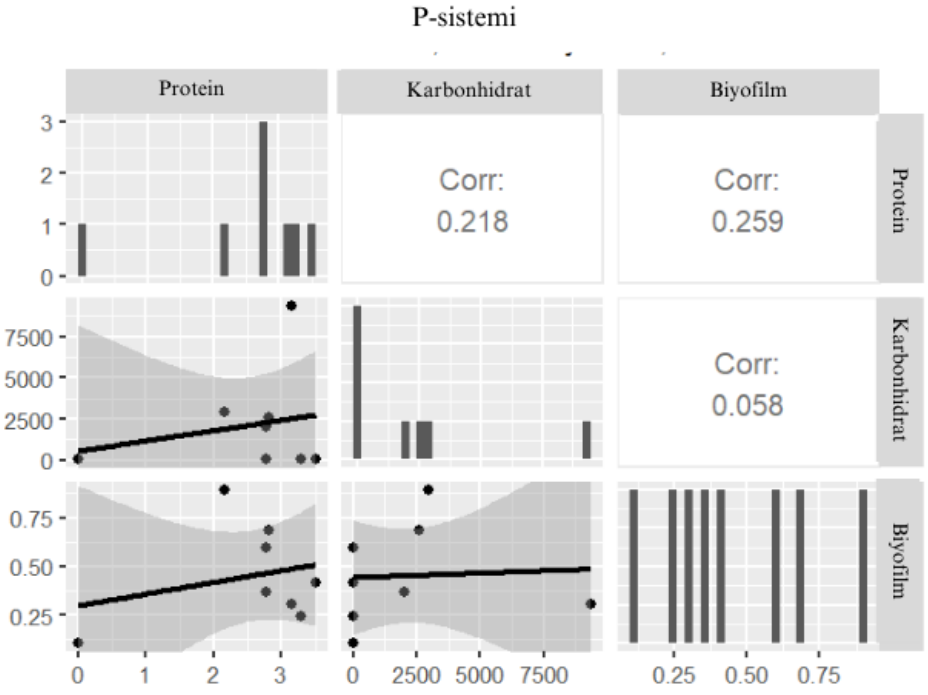


Şekil 4.8: Aylara göre P ve D Sistem Biyofilmlerinin EPS İçerikleriğindeki Total Protein Miktarları.

İki sistemde toplam protein ve karbonhidrat miktarı ile oluşan biyofilm arasındaki ilişkiyi analiz etmek için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. P sistemi için, toplam protein ve karbonhidrat miktarlarının biyofilm kantitatif miktarı ile arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ($p>0,05$). Öte yandan, D sisteminde, toplam karbonhidrat miktarı ve biyofilm kantitatif miktarının, toplam protein miktarıyla arasında pozitif bir ilişki ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Korelasyon grafikleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmektedir. Bununla beraber, karbonhidrat miktarı ile biyofilm kantitatif miktarı arasında anlamlı bir korelasyon belirlenmemiştir.



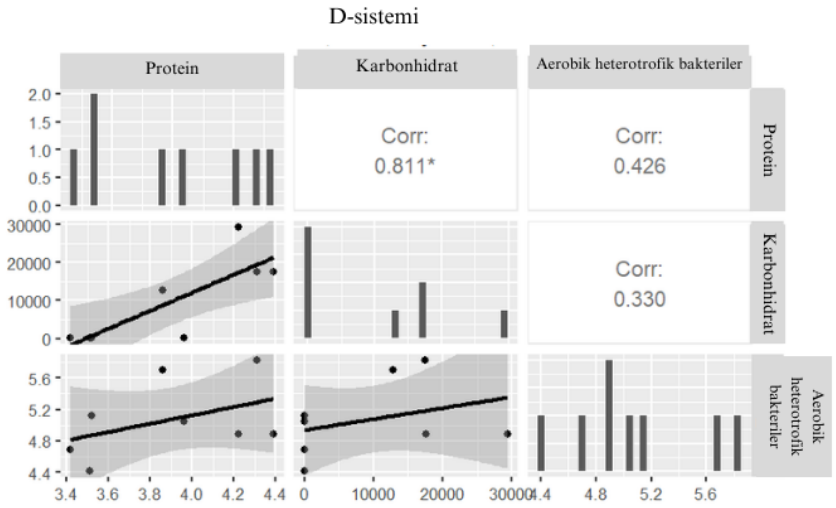
Şekil 4.9: D Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Kantitatif Biyofilm Miktarı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001).



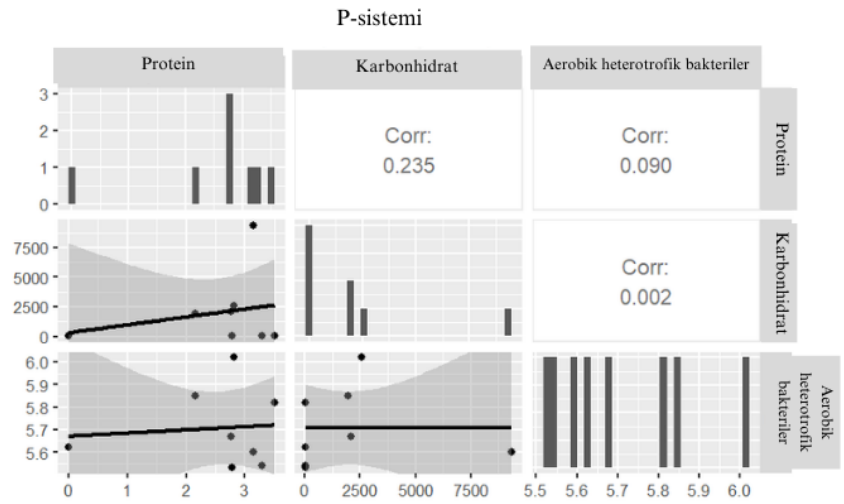
Şekil 4.10: P Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Kantitatif Biyofilm Miktarı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001).

4.5.3. EPS İçeriğindeki Total Karbonhidrat Miktarı, Protein Miktarı ve Biofilmin Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı Arasındaki Korelasyon Analizleri

İki sistemde toplam protein ve karbonhidrat miktarı ile biofilmin aerobik heterotrofik bakteri sayısı arasında var olan korelasyonu analiz etmek için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. D sisteminin sonuçlarına göre, karbonhidrat miktarı ile protein miktarı arasında pozitif yönde analmlı bir ilişkiyi ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. Ancak P sisteminde, bahsedilen üç abiyotik parametre arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir ($p>0,05$). Pearson korelasyon analiz sonuçları Şekil 4.11 ve 4.12'de sunulmuştur.



Şekil 4.11: D Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001).



Şekil 4.12: P Sisteminde Gözlemlenen EPS İçeriğindeki Protein ve Karbonhidrat Yoğunlukları ile Biyofilmdeki Aerobik Heterotrofik Bakteri Sayısı Arasındaki İlişkiyi Gösteren Pearson Korelasyon Analizi (*:p<0,05; **:p<0,001).

4.6.BİYOFİLMİN BAKTERİ ÇEŞİTLİLİĞİ

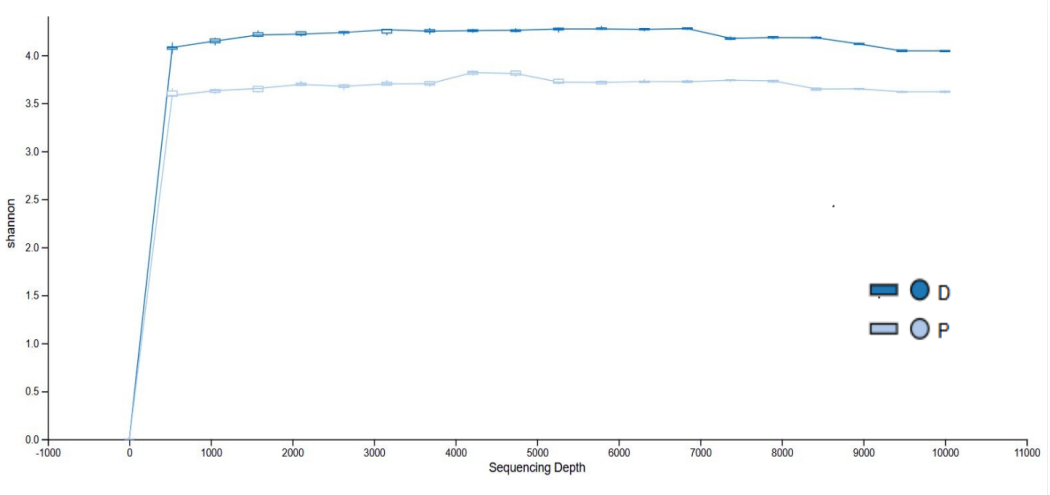
4.6.1. Alfa Çeşitliliği

Her ay toplanan biyofilmin bakteri biyokütlesi ve çeşitliliği değerlendirmek için Alpha çeşitlilik indeksleri kullanılmış ve sonuçlar Tablo 4.3'de gösterilmiştir. İki sistem karşılaştırıldığında, D

sisteminden toplanan biyofilm, 8 ay boyunca kaydedilen Shannon_entropi (Şekil 4.13) ve pielou_evenness değerlerine göre en yüksek çeşitliliği göstermiştir. Her iki sistemde de gözlemlenen en yüksek çeşitlilik, Shannon_entropi ve pielou_evenness indeksleri de baz alındığında 8. ayda gözlemlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: D ve P sistemlerinde bulunan 316L paslanmaz çelik kuponlardan toplanan biyofilmin alfa çeşitliliği.

	Pielou_evenness		Faith_pd		Observed_features		Shannon_entropy	
Ay	D	P	D	P	D	P	D	P
1	0,548	0,426	13,658	10,754	146	127	3,941	2,980
2	0,590	0,492	14,064	11,696	153	136	4,285	3,491
3	0,569	0,544	14,273	10,655	152	93	4,129	3,561
4	0,444	0,501	11,572	12,122	131	141	3,128	3,577
5	0,473	0,512	13,523	13,760	155	157	3,442	3,739
6	0,609	0,577	14,005	13,935	154	150	4,432	4,172
7	0,592	0,611	15,035	13,655	176	162	4,414	4,492
8	0,651	0,641	13,553	14,528	193	169	4,943	4,744

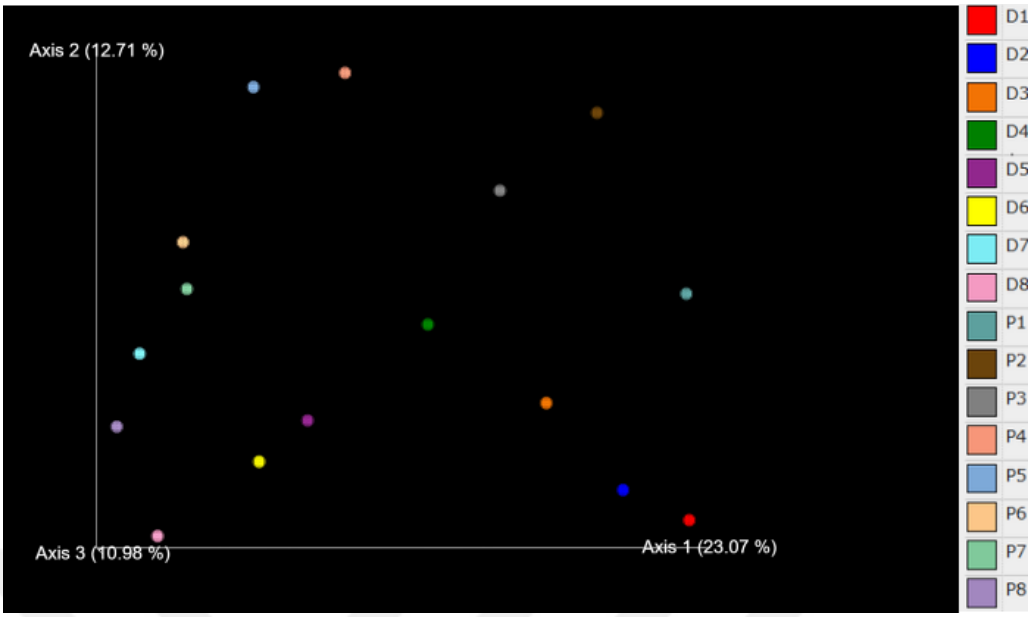


Şekil 4.13: İki Sistemin Shannon_Endeksi (D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem).

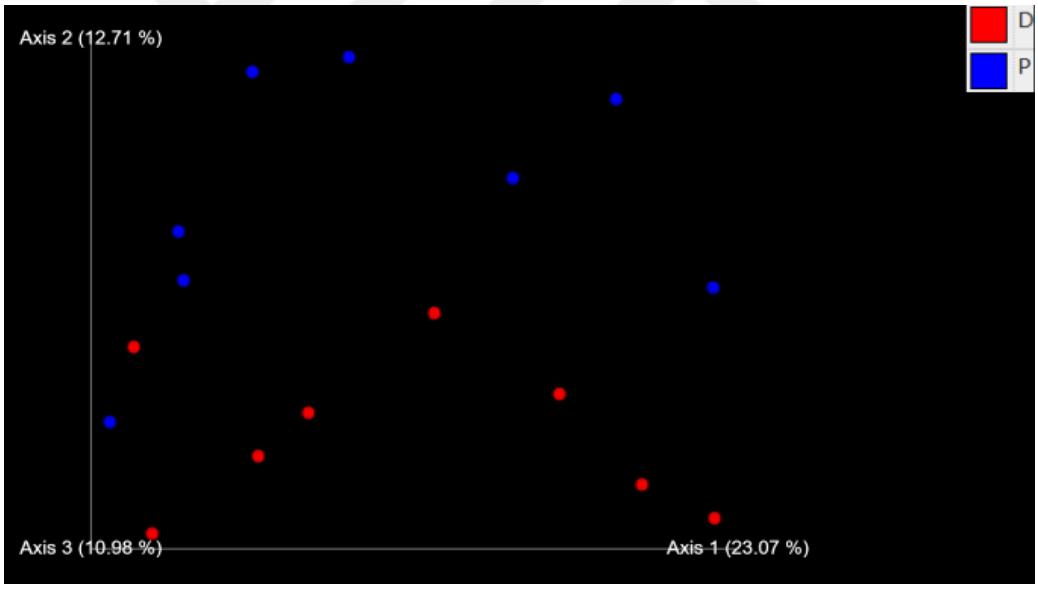
4.6.2. Beta Çeşitliliği

İki sistemden alınan örnekler arasındaki biyoçeşitlilikte gözlemlenen farklılığı belirlemek için ağırlıklandırılmamış UniFrac testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Emperror araçları kullanılarak Principal Coordinate Analysis (PCoA) olarak gösterilmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Bu sonuçlar, predatör bakteri içermeyen sistemde (D-sistemi) gözlemlenen çeşitliliğin

diğer sistemde (P-sistemi) gözlemlenenden daha düşük değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.15). P sisteminde gözlemlenen biyolojik çeşitlilik, bu sistemin neredeyse dağınık bir bakteri çeşitliliğine ve bolluğuna sahip olduğunu ve farklı aylarda düşük bir homojenlik gözlemlendiğini göstermiştir. D sisteminde ise daha yoğunlaşmış bir dağılım gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Ayrıca, P ve D sistemlerindeki kupon örnekleri arasında belirgin bir ayrışma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, iki sistem arasında bakteriyel biyoçeşitlilik ve bolluk oranı açısından önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, her ay gözlemlenen sonuçlar analiz edildiğinde, aynı veya farklı sistemler içindeki örneklerin farklı bakteri çeşitliliği içerdiği görülebilir (Şekil 4.14). Ayrıca, "Weighted-Unifrac" ve "Unweighted-Unifrac" uzaklık metrikleri üzerinde gruplar arasındaki farkları belirlemek için kullanılan PERMANOVA testi, *B. bacteriovorus*'tan yoksun sistemde (D) gözlenen en yüksek çeşitlilik ile iki sistem arasında gözlenen anlamlı farkın ($p<0,05$) sağlandığını göstermiştir.



Şekil 4.14: "Unweighted-Unifrac" PCoA (D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem; Rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir.



Şekil 4.15: "Unweighted-Unifrac" PCoA (D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem.

4.6.3. Biyofilmlerin Bakteriyel Taksonomisi

Toplanan biyofilmlerden izole edilen DNA'ların 16S rRNA gen bölgeleri dizilendiğinde, tüm biyofilmlerde Proteobacteria filumuna ait bakterilerin baskın olduğu belirlenmiştir (D-sisteminden toplanan biyofilmler için %50-73 ve P-sisteminden toplananlar için %58-%82). İkinci baskın filum Planctomycetota olarak bulunmuştur (D sistemine ait biyofilmler için %23-%41 ve P sistemine ait olanlar için %11-32). Diğer bakterilerin ise Actinobacteria,

Acidobacteria, Firmicutes ve Bacteroideta gibi başka 12 filuma ait olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, dizilenen bazı bakteriyel 16s rRNA genleri, kullanılan veri tabanında (SILVA v138) herhangi bir filuma tanımlanmamıştır. Ancak, Alfa ve Beta çeşitlilik indekslerinde gösterildiği gibi, kuponlardaki biyofilmlerin taksonomisi dönem açısından değişkendir.

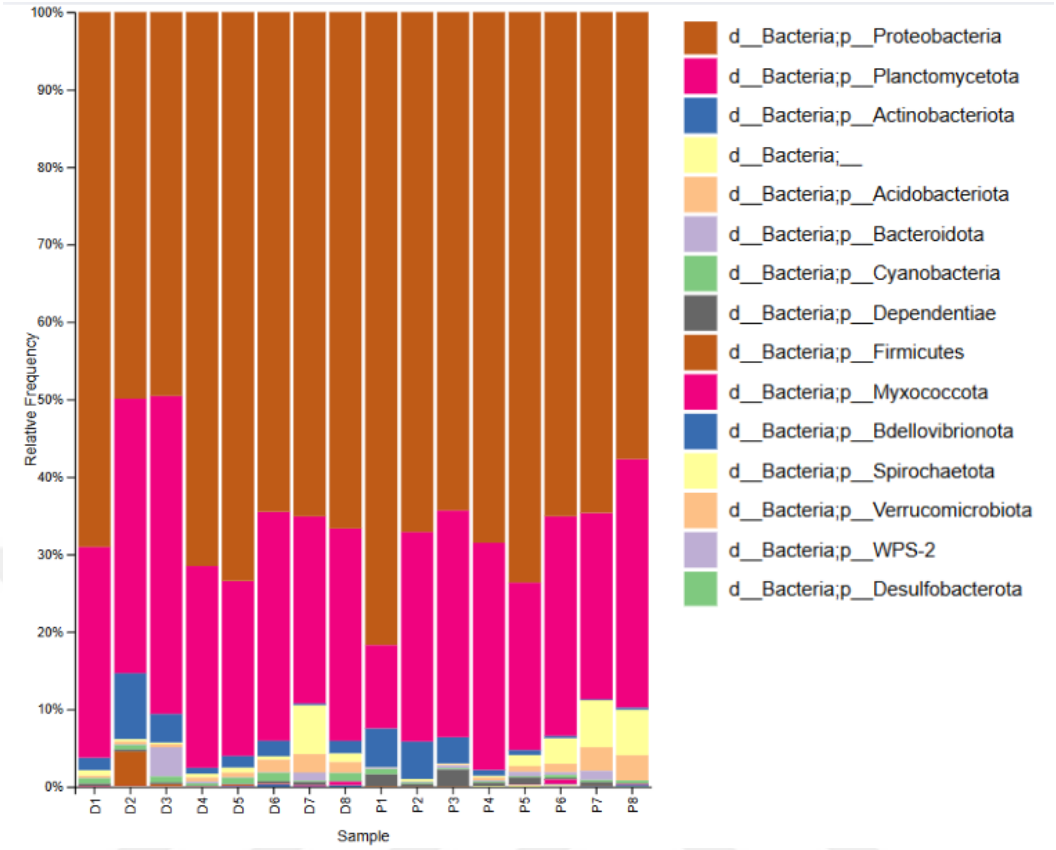
Baskın filumlar olan Proteobacteria, Planctomycetota, Firmicutes, Dependentiae, Actinobacteria, Bacteroidota ve Cyanobacteria bazında) iki sistemi karşılaştırmak için ANOVA testi uygulanmıştır. Planctomycetota ve Proteobacteria filumları, iki sistem arasında önemli bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Cyanobacteria ve Dependentiae ($p<0,05$) ise iki sistem arasında anlamlı farklılıklar göstermiştir. P sistemi, D sistemine göre daha düşük oranda Cyanobacteria barındırmaktadır. Dependentiae ailesine ait bakteriler P sisteminde D sistemine göre daha bol oranda bulunmaktadır. Baskın filum yoğunluk oranları Şekil 4.16'da bar-histogram olarak gösterilmiştir.

Sınıf düzeyinde en baskın olan bakterilerin (hem D hem de P sistemlerinde) Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria ve Planctomycetes'e ait olduğu bulunmuştur. ANOVA testi, Alphaproteobacteria ve Planctomycetes'in iki sistem arasında önemli bir farklılık göstermediklerini ortaya koymuştur ($p>0,05$). Bununla birlikte, Gammaproteobacteria sınıfı iki sistem arasında anlamlı ($p<0,05$) farklılık göstermiş olup, en yüksek bolluk oranı P sisteminde gözlenmiştir. Baskın sınıfların yoğunluk oranları Şekil 4.17'de bar-histogram olarak gösterilmiştir.

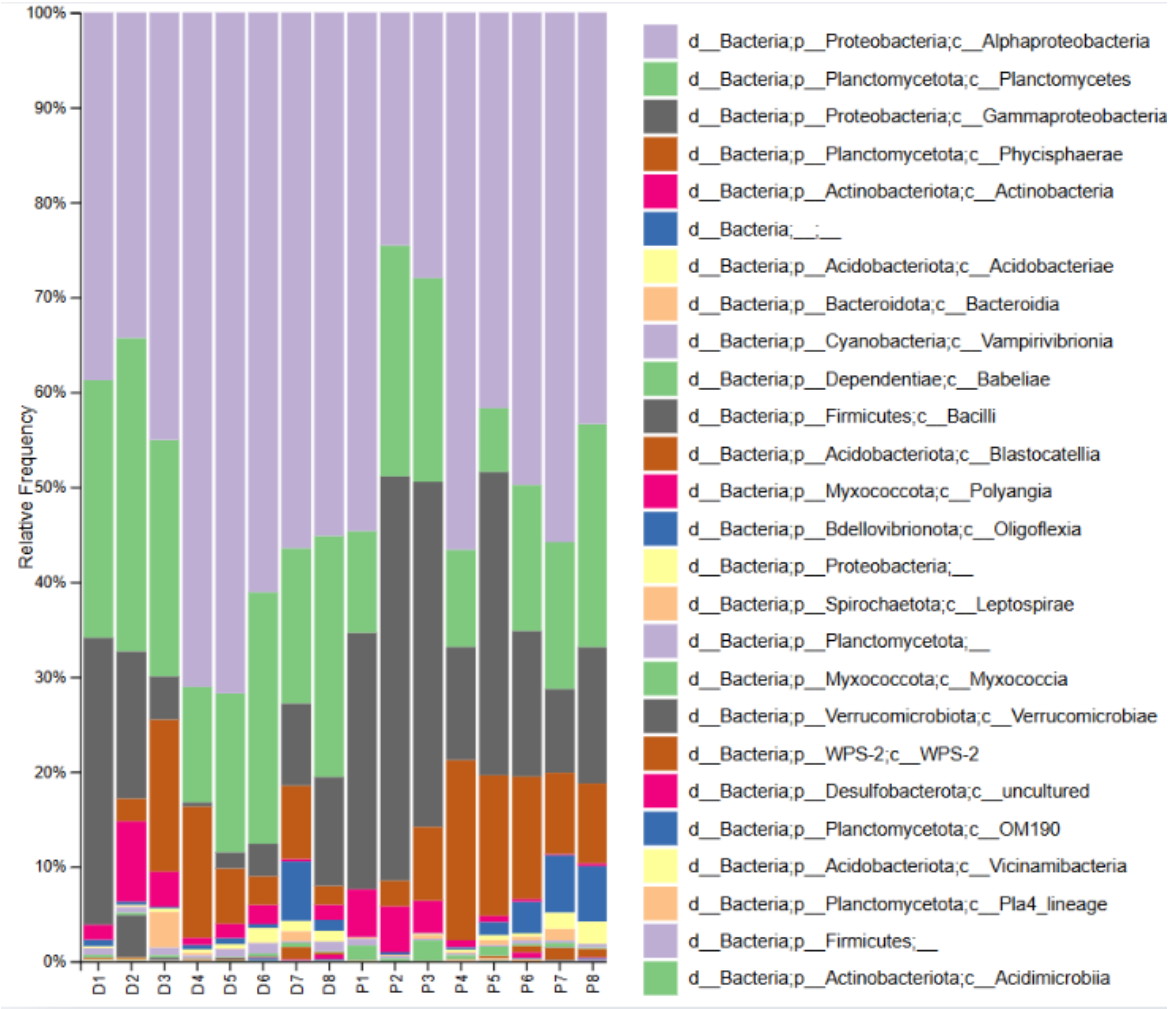
Familya düzeyinde, Planctomycetota'ya ait Isosphaeraceae'nin bolluğu sistem türünden etkilenmemiştir ($p>0,05$). Alphaproteobacteria sınıfına ait Acetobacteraceae ve Parvularculaceae familyaları hem D hem de P sistemlerinde en yoğun bulunan familyalardan olup iki sistemdeki yoğunluk oranları arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Alphaproteobacteria sınıfına ait bir diğer baskın familya Caulobacteraceae'dır ve iki sistem arasındaki yoğunluk oranı anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Öte yandan, Gammaproteobacteria familyasından olan Methylophilaceae'ye ait bakteriler iki sistem arasında anlamlı ($p<0,05$) bir fark göstermiş olup en yüksek bolluk oranı P sisteminde gözlenmiştir. Baskın familya bar-histogramı Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

ANOVA testi uygulandığında iki sistemdeki *Fimbriiglobus*, *Caulobacter*, *Amphiplicatus*, *Bosea*, *Bradyrhizobium*, *Sphingobium* ve *Methyloversatilis* cinslerine ait bakteri grupları

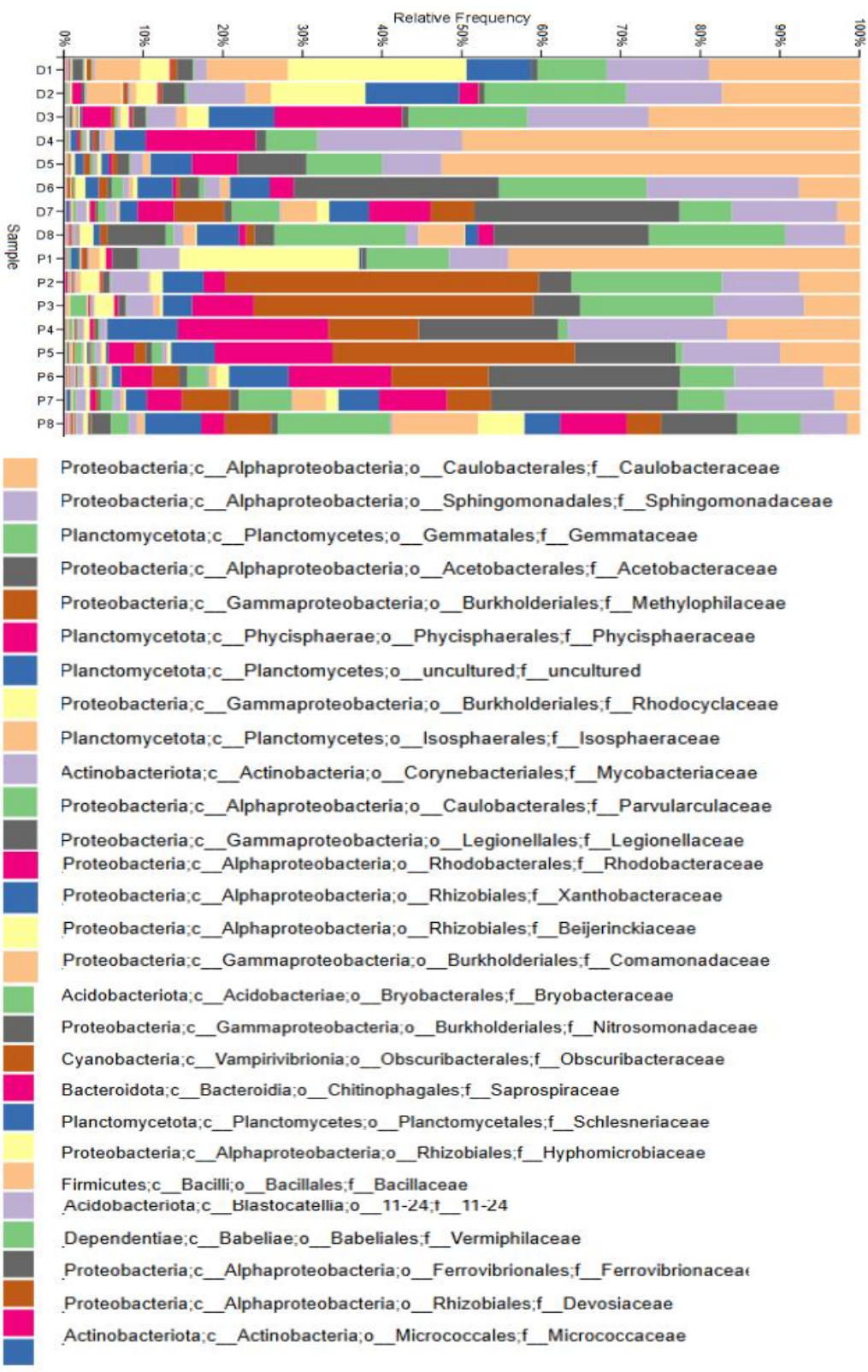
arasında önemli bir farklık belirlenmemiştir ($p>0,05$). Öte yandan, *Gemmata* ve *Tundrisphaera* cinslerinin bolluk oranında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir farklılık gözlenmiştir. *Gemmata* türleri P sistemide azalırken, *Tundrisphaera* türleri aynı sistemde artış göstermiştir. D sisteminde *Tundrisphaera* türlerinin düşük oranda, *Gemmata* türlerinin ise yüksek oranda bulunduğu görülmüştür.



Şekil 4.16: Gözlemlenen Baskın Filumlar; (D *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem; Rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir).



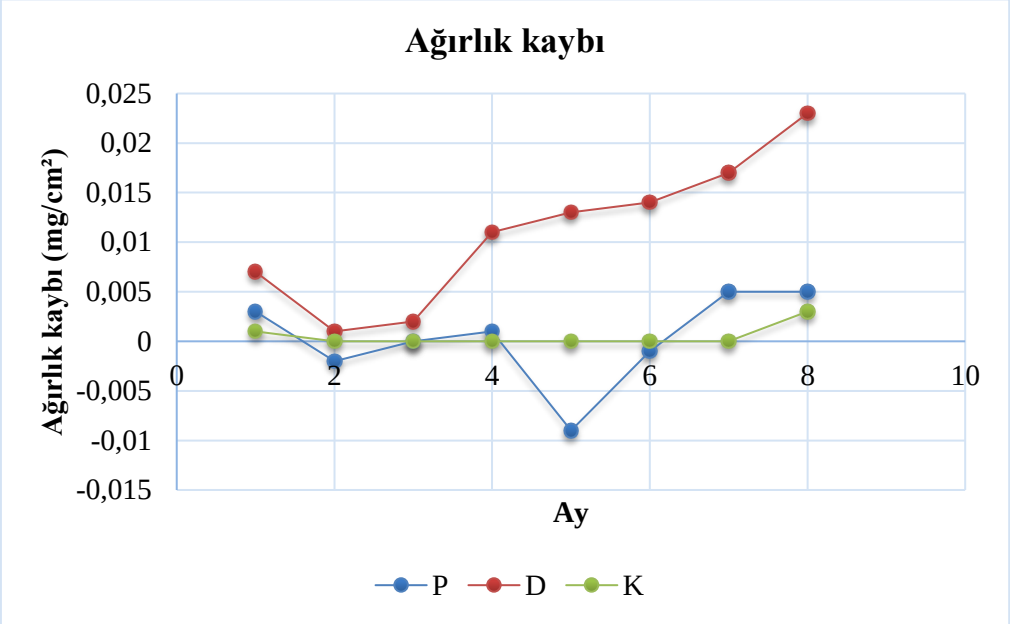
Şekil 4.17: Belirlenen Baskın Sınıflar; (D *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Sistem; Rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir).



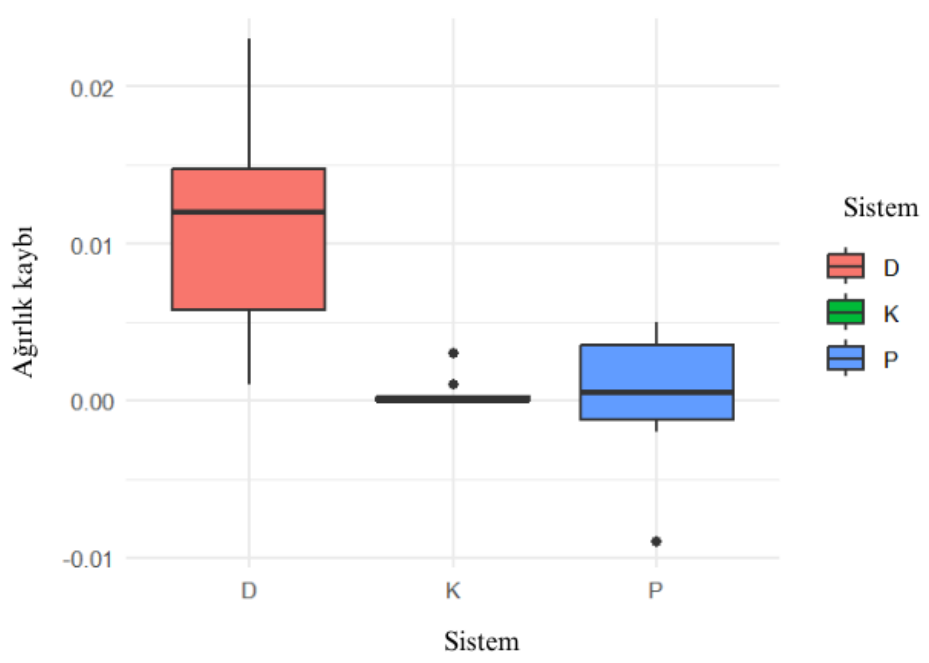
Şekil 4.18: Belirlenen Baskın Familyalar; (D *B. bacteriovorus* HD100 içermeyen sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 içeren sistem; rakamlar deneysel dönemleri göstermektedir).

4.7.KOROZYON ANALİZLERİ

Predatör bakterinin 316L paslanmaz çeliğin mikrobiyal korozyon hızı üzerindeki etkisini değerlendirmek için her bir sistemden alınan kuponların ağırlık kaybı hesaplanmıştır. Sonuçlar steril sistemden (K) alınan çeliklerin 7 ay sonrasına kadar ağırlık kaybı göstermediğini ortaya koymuştur. Predatör içeren sisteme (P) daldırılan kuponlar için ilk aydan sonra hafif bir kayıp gözlenmiştir. 7 ve 8. aylardan sonra da sabit bir ağırlık kaybı gözlenmiştir. D sisteminde ise ilk aydan itibaren ağırlık kaybı gözlenmiştir. İki ve üçüncü aydan sonra ağırlık kaybı gözlenmese de deneyin son 5 ayında artan bir ağırlık kaybı belirlenmiştir. Her bir sistem için ağırlık kaybı grafiği Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Üç sistem arasındaki ağırlık kaybında gözlenen farklılıkları değerlendirmek için ANOVA testi ve Tukey HSD testi yapılmıştır. ANOVA testinden elde edilen sonuçlar, üç sisteme daldırılan kuponlarda gözlemlenen ağırlık kaybı arasında oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark olduğunu göstermiştir. Tukey HSD testi sonuçları, bu farklılıkların D ve K sistemleri arasında ve P ve D sistemleri arasında olduğunu göstermiştir. Predatör bakteri içeren sistem (P) ve steril sistemin (K) içerdiği paslanmaz çelik kuponların ağırlık kaypları arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). Üç sistem için ağırlık kaypları farkları Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19: Kontrol (K), *B. bacteriovorus* HD100 içermeyen (D), ve *B. bacteriovorus* HD100 İçeren (P) Sistem Kuponlarının Ağırlık Kayıpları. En yüksek ağırlık kaybı D sisteminde gözlenmiş, ardından P sistemi ve K sistemi gelmiştir.



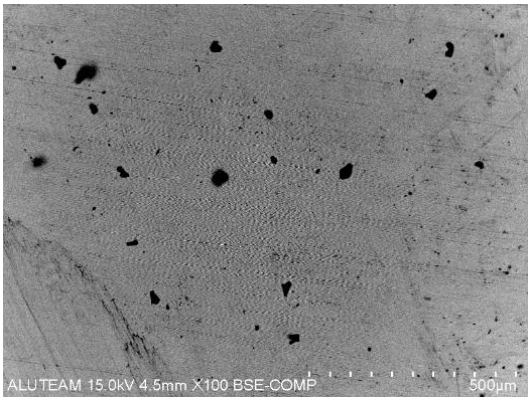
Şekil 4.20: Sistemler Arasında Ağırlık Kaybı ANOVA test ile Karşılaştırması (*:p<0,05; **:p<0,001). K: Steril Sistem; D: *B. bacteriovorus* HD100 İçermeyen Non Steril Sistem; P: *B. bacteriovorus* HD100 İçeren Steril Sistem

4.9. DİJİTAL VE ELEKTRON MİKROSKOPLA GÖRÜNTÜLEME VE ANALİZ

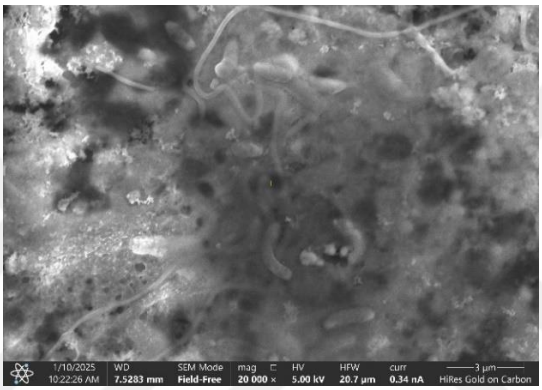
4.9.1. SEM-EDS Analizi

Sistemlerde 8 ay boyunca bekleyen çelik kuponlarda oluşan biyofilm ve biyofilm matriksi (EPS) SEM ile görüntülenmiş ve görüntüler Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.25, ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Paslanmaz çelikte meydana gelen çukur korozyonunu araştırmak için, 8 ay boyunca P ve D sistemlerine daldırılan kuponlardaki korozyon ürünleri ve biyofilm kalıntıları nitrik asit kullanılarak temizlenmiş ve damıtılmış su ile durulanmıştır. Kuponlar havada kurutulduktan sonra SEM ile görselleştirilmiştir. D sisteminden alınan kuponlarda P sisteminden alınanlara göre daha yoğun bir korozyon hasarı gözlemlenmiştir. Şekil 4.21 ve Şekil 4.24 korozyon hasarını bölgesel olarak gerçekleştirdiğini göstermektedir.

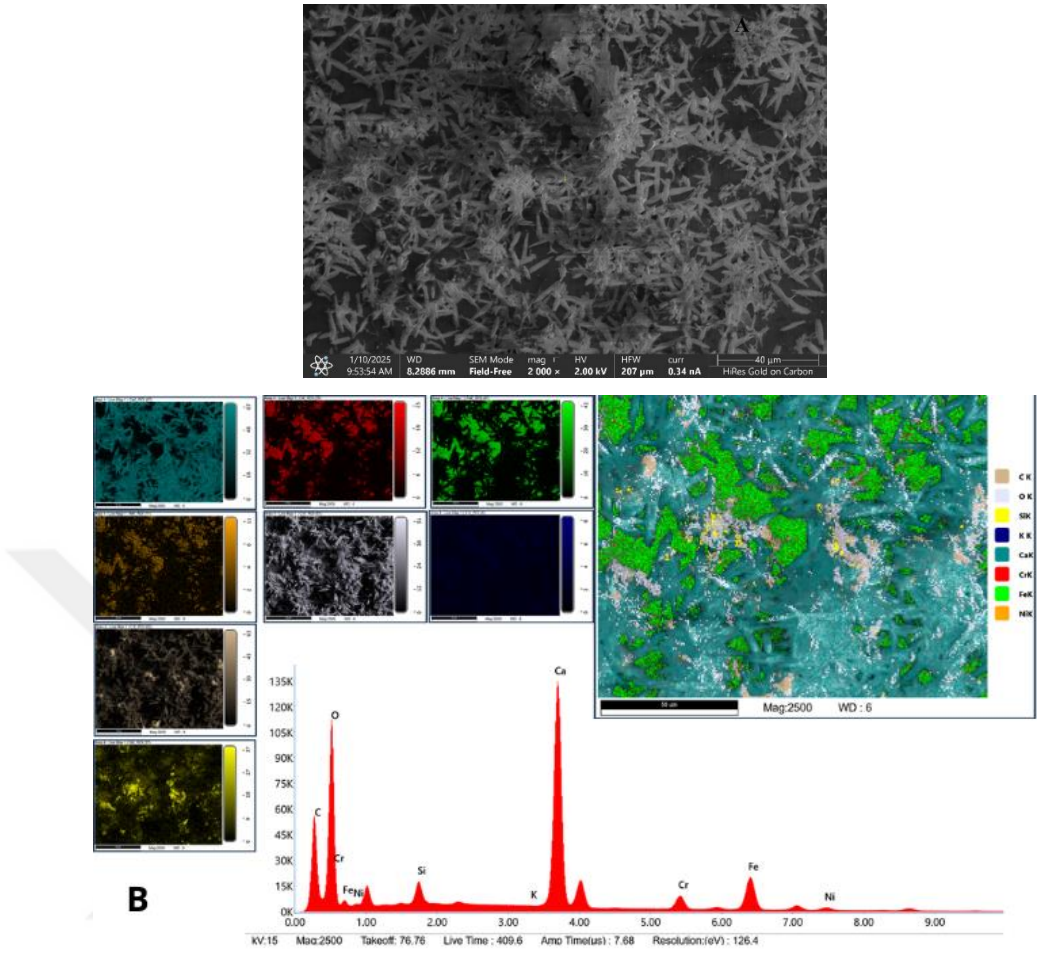
Predatör bakteri içeren sistemden (P sistemi) 8 ay sonra alınan kuponların EDS analizi sonucunda yüksek miktarda C, Fe, O ve Cr tespit edilmiştir. Bu yüzeyde tespit edilen diğer elementler Mo, Si, Ni ve Na'dır (Şekil 4.26). D sistem kuponlarının EDS analiz sonucu ise yüksek Ca, O, C, Fe, Cr, Ni miktarı belirlenmiştir. Bu kuponlarda tespit edilen diğer elementler Si ve K'dır (Şekil 4.23).



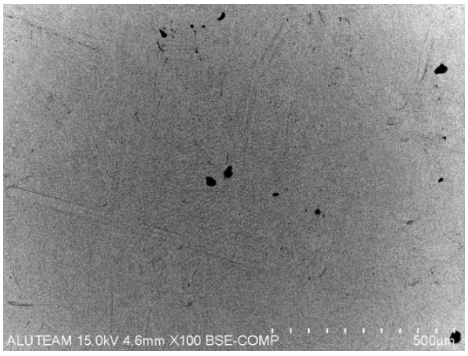
Şekil 4.21: D sistemin 8. ay Kuponundaki Korozyon Hasarlarının SEM Görüntüsü.



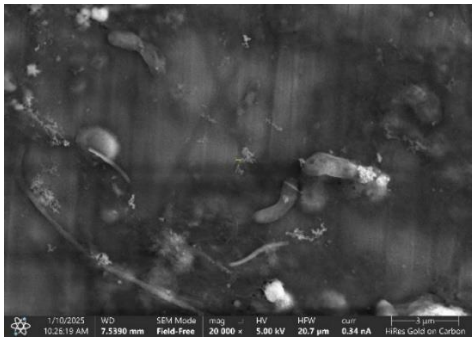
Şekil 4.22: D Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş Biyofilm.



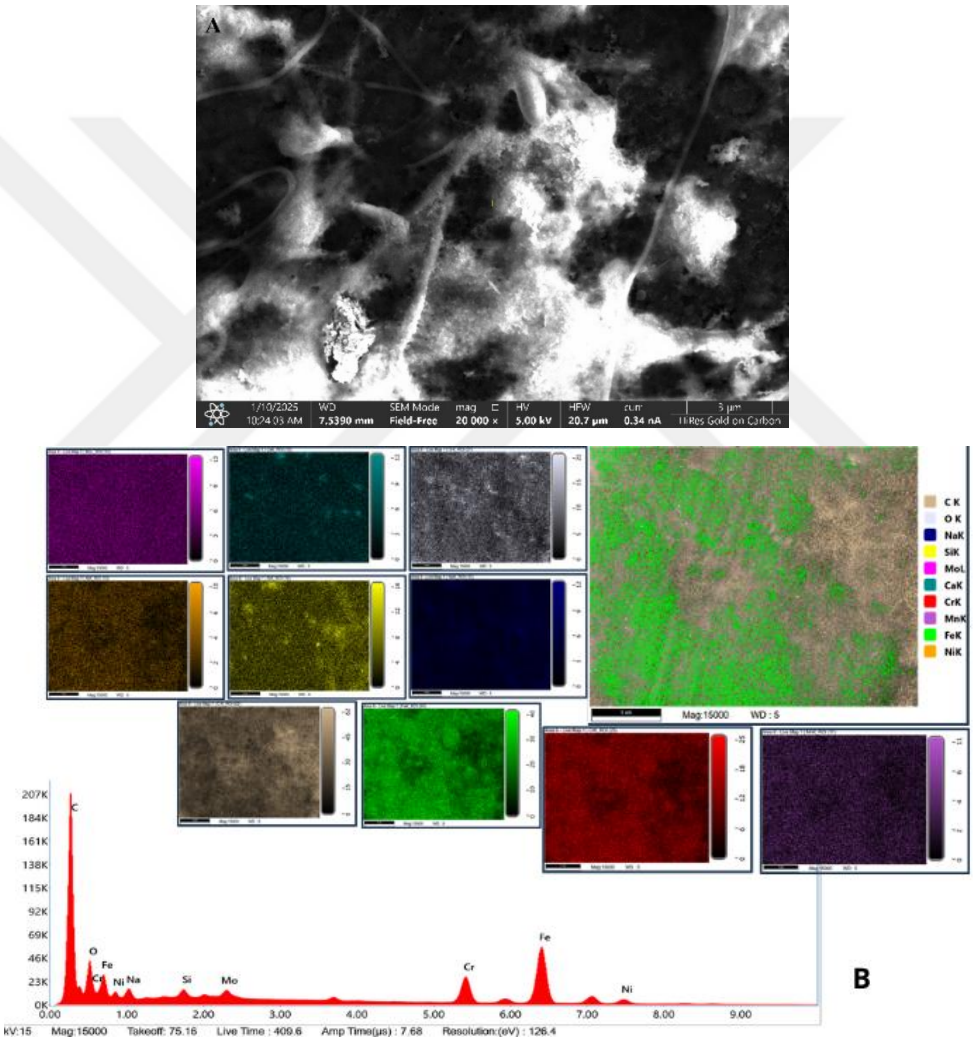
Şekil 4.23: D Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş EPS (A) ve EDS Analizi (B).



Şekil 4.24: P sistemin 8. ay Kuponundaki Korozyon Hasarlarının SEM Görüntüsü.



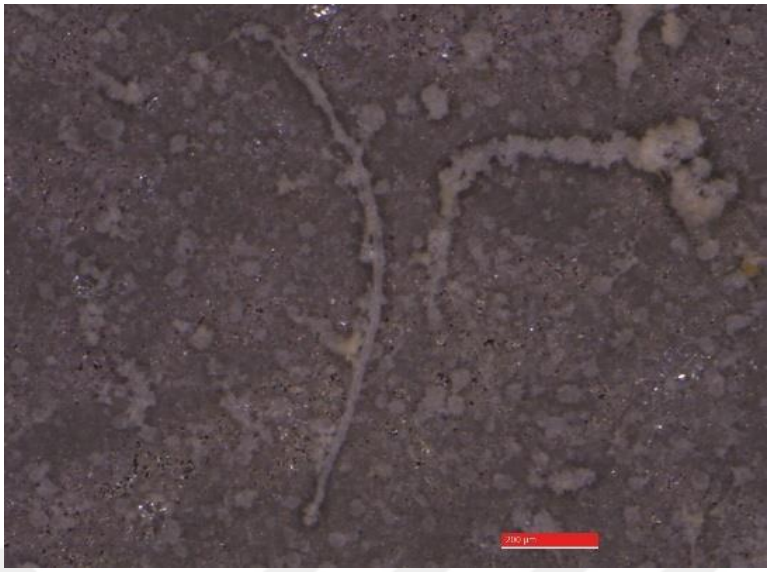
Şekil 4.25: P Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş Biyofilm.



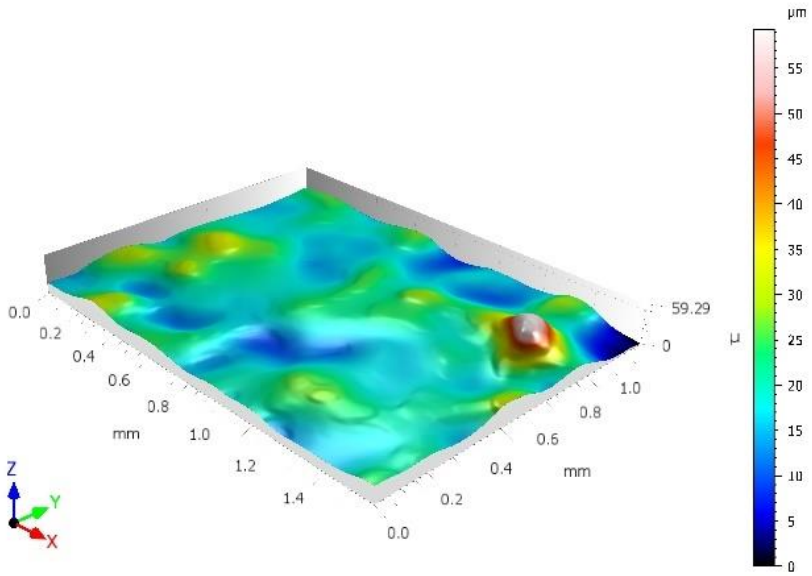
Şekil 4.26: P Sistemi 8.Ay Kuponunun Üzerinde Oluşmuş EPS (A) ve EDS Analizi (B).

4.9.2. 3D-Optik Profilometre ile Biyofilm Analizi

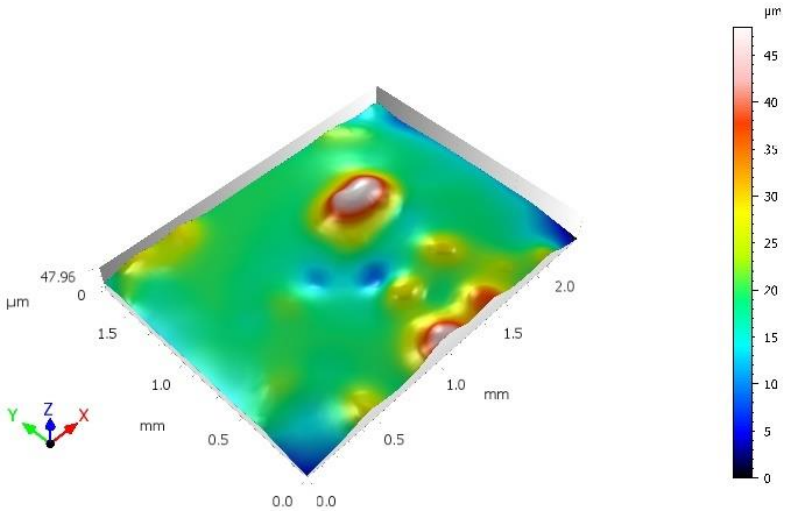
P ve D sistemlerinde sekiz ay boyunca bekleyen kuponlar, ALUTEAM laboratuvarında, 3 boyutlu profilometre kullanılarak biyofilmin yapısı ve dağılımı değerlendirilmiştir. Gözlemlenen alanlar 3 boyutlu görüntü olarak verilmiştir. 3D görüntüleri, biyofilmin P sistemine daldırılan kuponlarda D sistemine daldırılanlara göre daha homojen bir şekle sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.29 ve 4.30). Bu bağlamda, D sistemindeki kuponlarda daha kalın ve bölgesel (kırmızı ve beyaz renkte) bir biyofilm oluşumu gözlenmiş (Şekil 4.27 ve 4.28) ve bu korozyonu bölgesel olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Buna ek olarak, en düşük biyofilm oluşum alanlarını gösterebilecek en yüksek kalınlığın da aynı sistemin kuponlarında gözlemlendiği dikkate alınmalıdır.



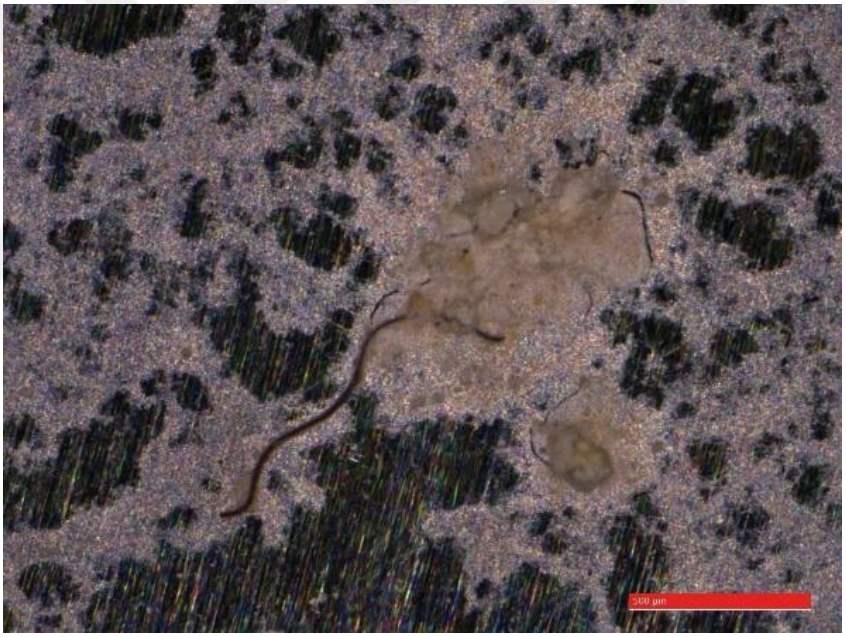
Şekil 4.27: D Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin Optik Profilometre Görüntüsü.



Şekil 4.28: D Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin 3 Boyutlu Optik Profilometre Görüntüsü Şekli.



Şekil 4.29: P Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin 3 Boyutlu Optik Profilometre Görüntüsü.



Şekil 4.30: P Sistemindeki Paslanmaz Çelik Kupon Üzerindeki Biyofilmin Optik Profilometre ile Görüntüsü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrobiyolojik etkili korozyon, endüstriyel malzemelerin tahribat süreci olarak bilinmektedir. Mikroorganizmaların neden olduğu bu olay, ana eylemi biyofilm oluşumu olan farklı mikroorganizmaların bir dizi mekanizmasını içerir. Mikroorganizmalar kendilerini yüksek basınç, avcılar, antimikrobiyal ajanlar vb. çevresel sert koşullara karşı korumak için yüzeye tutunurlar. Kimyasallar aracılığıyla birbirlerine bağlanırlar ve iletişim süreci quorum sensing olarak tanımlanır (Singh ve diğ, 2021). Koruyucu bir yapıda olan mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneği, dünya çapında önemli bir sorun olan çoklu ilaç direncini de arttırmaktadır (Yin ve diğ., 2023). Öte yandan, metaller gibi yüzeylerin bu mikroorganizmalar tarafından tahrip edilmesi, endüstrileri büyük ekonomik kayıplara uğratmaktadır. Bu nedenle, endüstriyel malzemelerin yüzeylerinde biyofilm oluşumunu engellemek için biyosit gibi kimyasallar sentezlenmektedir (Towers, 2016). Ancak oluşan çoklu ilaç direnci, çevre dostu ve düşük maliyetli yeni antibiyofilm ve antikorozyon ajanlarının araştırılmasına neden olmaktadır. Bu hedef çerçevesinde predatör bakterilerin bu MİK'e karşı potansiyel ajanlar olabileceği düşünülmektedir. *B. bacteriovorus*, toprak ve su ekosistemlerinde yaşayan insan, hayvan ve bitki hücreleri için patojenik olmayan predatör bir bakteridir (Stolp ve Stars, 1963). Her yerde bulunan, patojenik olmayan ve avcı bir bakteri olan *B. bacteriovorus*'un, zararlı bakterileri ortadan kaldırarak mikrobiyolojik olarak etkilenen korozyon inhibisyonunda (MİKİ) önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamız, *B. bacteriovorus* HD100'ün açık soğutma kulesi model sisteminde bulunan 316L paslanmaz çeliklerin mikrobiyolojik olarak indüklenen korozyonunun önlenmesindeki rolünü incelemeyi amaçlamıştır. Bildiğimiz kadarıyla, *B. bacteriovorus*'un MİKİ'deki rolü hakkında sadece bir araştırma makalesi bulunmaktadır. Bu çalışma, X70 paslanmaz çelik kullanılarak SRB ve bu avcı bakterinin etkileşimini laboratuvar koşullarında araştırmak için yapılmıştır (Qiu ve diğ., 2016). Bu çalışmanın sonuçları, bu avcı bakterisinin endüstriyel ekipmanların biyokorozyonuna karşı kullanımı için umut vericidir (Qiu ve diğ., 2016).

Çalışmamızda, *B. bacteriovorus*'un varlığında 316L çelikte biyofilm oluşumu araştırılmıştır. Sonuçlar predatör bakteri içeren sisteme daldırılan çelik kuponlar üzerindeki kantitatif biyofilm miktarının, yokluğunda gözlenen kantitatif biyofilm miktarınından istatistiksel olarak farklı olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte, 3D-optik profilometre, P ve D sisteminde

bulunan paslanmaz çelik kuponlar üzerinde oluşan biyofilm farklılıklarını ortaya koymuştur. Oluşan biyofilm miktarını veren kristal viyole analizinin aksine, bu profilometre analizi bize iki sistemin kuponları üzerindeki biyofilm oluşumunun yüzey üzerindeki dağılımını, kalınlığını, yoğunluğunu,ve farklı alanlardaki değişmlerini göstermektedir. Bu sonuçlar, oluşan biyofilm miktarının tek başına, biyofilm oluşum dinamiği için yeterli sonuçlar sağlayamayacağını göstermektedir. Bu predatör bakterinin, biyofilm oluşumunu engelleme potansiyelleri farklı çalışmalarda araştırılmıştır. Ancak bu çalışmalar tek bakteri türü ile oluşturulan biyofilmler üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmaların sonuçları, predatör bakterinin birçok Gram-negatif ve bazı Gram-pozitif bakteriler için biyofilm oluşumunu engelleme yeteneğini göstermiştir. Iebba ve diğ. (2023) ve Tajabadi ve diğ. (2023) tarafından yürütülen çalışmalarda *P. aeruginosa, K. pneumoniae, S. aureus* gibi bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmin *B. Bacteriovorus* tarafından inhibe edildiği bulunmuştur. Ancak ilginç bir şekilde, Kahraman Vatansever ve diğ. (2023) *B. bacteriovorus* uygulamasının farklı *P. aeruginosa* suşları tarafından oluşturulan biyofilmleri baskılamadığını bulmuştur; bu da bu bakterinin predasyon mekanizmasının özgüllüğünü açıklamaktadır.

Paslanmaz çeliklerin yüzeylerindeki kantitatif biyofilm miktarı her iki sistemde de incelendiğinde, biyofilm miktarının maksimum tepe noktası 7. ayda görülmüştür. Ayrıca, her iki sistem için de en düşük kantitatif biyofilm miktarı 6. ve 8. aylarda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, 316L paslanmaz çeliklerle yapılan soğutma kulesi sistemlerinin yüzeyinde biyofilm oluşumunun dinamiğini açıklayabilir. Bu dinamiğin anlaşılması, bu tür soğutma sistemlerinde herhangi bir antibiyofilm uygulanması için önemli bir temel unsur oluşturabilmektedir.

Sonuçlarımıza göre avcı bakteri içeren sistem biyofilmindeki aerobik heterotrofik bakteri sayılarının önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, biyofilmin alfa çeşitlilik indeksi aracılığıyla yapılan metagenomik analiz (Tablo 4.3), predatör bakteri içermeyen sisteme daldırılan kuponlar üzerinde oluşan biyofilmin, predatör içeren sistemde oluşanlardan daha yüksek bakteri bolluğu içerdiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, predatör bakterilerin olmadığı sistemde oluşan biyofilmde yüksek sayıda canlı ancak kültürlenemeyen bakterinin varlığına işaret ediyor olabilir. Bakteriyel hücre sayısını belirlemek için kültür yöntemlerinin uygulanmasının tek başına doğru olmadığı bildirilmiştir (Kumar ve Ghosh, 2019; Liu ve diğ., 2023b). Bu durumdaki bakterileri tespit etmek için, VBNC tespitinde 16r RNA gibi bazı housekeeping genlerin hedeflenmesi gibi moleküler yöntemler uygulanmıştır (Chimento

ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2023b). Sonuçlarımız, biyofilm topluluklarını incelemek için kültür yöntemleriyle birlikte bu tür moleküler yöntemlerin kullanılmasının önemini desteklemektedir.

Oluşan biyofilmlerin, EPS içeriği olan toplam protein ve karbonhidrat miktarları analiz edilmiştir. Toplam karbonhidrat miktarı iki sistem arasında önemli bir farklılık göstermemiştir. Ancak toplam protein miktarının Şekil 4.8'de gösterildiği gibi iki sistem arasında anlamlı bir farklılık ($p<0,05$) olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, en yüksek protein miktarı predatör bakteri içermeyen sistemde (D-sistem) gözlenmiştir. Bu sonuç, *B. bacteriovorus* HD100'ün enzimatik aktivitelerini akla getirmektedir. Monnappa ve diğ. (2014) ile Im ve diğ. (2018) tarafından yürütülen çalışmalarda, Gram pozitif bakteri *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmin azaltılmasının, avcı bakterinin transkriptomunun aktivasyonuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. *B. bacteriovorus,* bu Gram-pozitif patojen tarafından oluşturulan biyofilmin yok edilmesinde veya engellenmesinde önemli bir rol oynayan Bd2269 ve Bd2321 gibi serin-proteazlar başta olmak üzere farklı proteazlar üretmiştir (Monnappa ve diğ., 2014; Im ve diğ., 2018). Bu hidrolazlar, patojenlerin biyofilm matrikslerinde salgıladıkları ve yüzeylere yapışmalarını kolaylaştıran adezinleri parçalamaktadır. Kompleks bir biyofilm oluşumunu içeren çalışmamızda, benzer proteazlar predatör tarafından salgılanabilir ve predatör içeren su sistemine daldırılan kuponlarda oluşan biyofilmin içeriği olan EPS'deki proteinlere saldırabilir. Ayrıca, bu önceki iki çalışmaya atıfta bulunularak, biyofilm oluşumunun engellenmesinin patojenler üzerinde predasyon olmadan da gerçekleştiği gösterilmiştir (Monnappa ve diğ., 2014; Im ve diğ., 2018). Bununla birlikte, biyofilmin zayıflatılması veya engellenmesi patojenin virülansını azaltmakta veya değiştirmektedir.

Çalışmamızda, iki sistemde oluşan biyofilmden elde edilen EPS'nin toplam karbonhidrat ve protein miktarları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, predatör içeren sistemin biyofilm matriksinde karbonhidrat ve protein miktarlarının önemli ölçüde ilişkili olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Bunun aksine, diğer sistem (D) bu iki EPS bileşeni arasında pozitif anlamlı bir korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). Bu sonuç, biyofilmlerdeki mikrobiyal topluluğun EPS'nin hidrofobik kısımlarının (protein molekülleri) ve hidrofilik kısımlarının (karbonhidrat molekülleri) üretiminde aynı metabolizmayı göstermesi şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, bu sonuçlar daha önce önerilen *B. bacteriovorus* tarafından üretilen proteazların EPS'deki proteinleri parçaladığı hipotezini vurgulamaktadır ve predatör bakteri içeren sistemde gözlemlenen dalgalanmayı açıklamaktadır.

Çalışmamızda, her iki sistemde de 8. ayda önemli bir düşüş gözlenen karbonhidrat konsantrasyonu, aynı ayda biyofilm miktarında gözlenen önemli düşüşü açıklayabilir. Buna ek olarak, EPS bileşenine ilişkin sonuçlar, EPS'nin toplam protein konsantrasyonuna kıyasla yüksek karbonhidrat konsantrasyonu içerdiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, Wang ve diğ. (2020) tarafından paslanmaz çelik yüzeyde *E.coli*'nin biyofilm oluşumunun incelenmesi sırasında gözlemlenen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. EPS'deki karbonhidrat/protein oranının biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (O'Loughlin ve Chin, 2001). Bu oran biyofilm oluşumu sırasında artıp, olgunlaşma sonrasında azalmaktadır (Wang ve diğ., 2020). Bu durum, sonuçlarımızda görüldüğü gibi bakteriler tarafından karbonhidrat üretiminin kısıtlandığını gösteren olgunlaşmadan sonra biyofilmden kopmaları açıklayabilir.

İki sistemi incelediğimizde, sistem sularındaki aerobik heterotrofik bakteri sayısı ile biyofilmdeki aerobik heterotrofik bakteri sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçlar Doğruöz ve diğ. (2015) ile Almeida ve França (1998) tarafından elde edilen sonuçlardan farklıdır. Bu farklılıklar, Kimiran-Erdem ve diğ. (2008) tarafından önerildiği gibi, çalışmalarda kullanılan farklı yüzey malzemeleri ile açıklanabilir. Ayrıca, materyal ve yöntemler kısımında belirtildiği gibi, her ay sistem sularının deşarjı bu iki parametrenin bağımsızlığını açıklayabilir. Yüzey malzemesine ek olarak, bakterilerin biyofilm oluşumunun ortamdaki mikrobiyal çeşitlilik, düşük veya yüksek besin, oksijen ve su akış hızı gibi farklı ekolojik faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir (Castiblanco ve Sundin, 2016; Rather ve diğ., 2022). Bu nedenle, biyofilmdeki heterotrofik mikroorganizmaların nicelleştirilmesi, çalışmanın amacına bağlı olarak bu farklı yönlere göre araştırılmalıdır.

Biyofilm DNA'larının dizileme sonuçları, biyofilmdeki bakteri topluluğunun predatör içeren sistemde diğer sisteme göre büyük ölçüde değiştiğini ortaya koymuştur. Filogenetik inceleme, predatör içeren sistemde baskın filum Proteobacteria'nın bolluk oranının sırasıyla ilk ve son ayda %82 ve %58 olduğunu ortaya koymuştur. Diğer sistemde ise bu filumun bolluk oranı ilk ve son aylarda sırasıyla %69 ve %67'dir. İkinci baskın filum olan Planctomycetota'nın da predatör içeren sistemde ilk ve son ay karşılaştırıldığında artan bir bolluk oranı gösterdiği bulunmuştur (%11'e karşı %32). Diğer sistemin aksine, bu filumun bolluk oranı en baskın filum gibi daha istikrarlı bir değişim göstermiştir (%27'ye karşı %27). Sınıf düzeyinde, Planctomycetes sınıfına ait bakterilerin ilk ve son ay arasındaki önemli artışı (%11'den %24'e)

da ilgi çekicidir. Bu sonuçlar, Zebra balığının bulunduğu suya *B. bacteriovorus* eklenmesinden sonra Zebra balığının bağırsak bakteri topluluğunda Gammaproteobacteria'ya ait bakteri türlerinin azaldığını ve Planctomycetes'e ait olanların arttığını gösteren Mo ve diğ. (2024) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerdir (Mo ve diğ., 2024).

B. bacteriovorus HD100, çoğunlukla diğer Gram-negatif bakterilerle beslenen ve bazı Gram pozitif bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmin azaltılmasında önemli rol oynayan bir avcı bakteridir (Mookherjee ve Jurkevitch., 2022). Proteobacteria filumuna ait bazı bakterilerin avlanması, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *V. cholerae* suşları gibi bu Gram negatif gruba ait avlarının geniş aralığını açıklamaktadır (Sun ve diğ., 2017). *Legionella* türleri de Gamma-proteobacteria sınıfına ait Gram-negatif bakterilerdir. Bu cinse ait bazı türler, suyla ilişkili patojenler arasında bildirilen fırsatçı patojenlerdir (Cavallaro ve diğ., 2022). Farklı sucul ekosistemlerin yüzeyine yapışabilme ve biyofilm yapısındaki diğer bakteri hücreleriyle işbirliği yapabilme yetenekleriyle bilinirler (Cavallaro ve diğ., 2022; Zhang ve diğ., 2024). Biyofilm oluşturabilen ve protozoonlar gibi diğer hücrelerin içinde yaşayabilen *Legionella* cinsi bu sayede antibiyotiklere ve ozonlama gibi antimikrobiyal tedavilere karşı korunurlar (Zhang ve diğ., 2024). *B. bacteriovorus*'un bu bakteri üzerindeki predasyonu ilk olarak Tomov ve diğ. (1982) tarafından araştırılmıştır. Çalışma sonuçları *B. bacteriovorus'un* çeşitli suşlarının çeşitli *Legionella* türleri ve suşları üzerinde avlanma yeteneğini göstermiştir (Tomov ve diğ., 1982). Ancak, 2010 yılında Markelova, *Legionella* L100'ün *B. bacteriovorus* HD100'e karşı duyarlı olmadığını gözlemlemiştir. Çalışmamızda *Legionella*, hem *B. bacteriovorus* içeren sistemden hem de predatörden yoksun sistemden alınan biyofilm örneklerinde tespit edilmiştir. Bu bakterinin iki sistemdeki dinamiği incelendiğinde, P sistemindeki bolluk oranının 1. ve son ay için sırasıyla %3 ve %1 olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, bu bakterinin D sistemindeki bolluk oranı ilk ve son ayda %2 olarak ortaya çıkmıştır. Bu sonuçların önemli ölçüde farklı olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, bu önceki çalışmalarla birlikte, çalışmamız Tomov ve diğ. (1982)'nin çalışmasıyla ilişkilendirilebilir, ancak *B. bacteriovorus* HD100'ün predasyonu hakkında olumlu bir sonuca varmak için bu *Legionella* suşunun izole edilmesi ve ayrı olarak incelenmesi gibi daha fazla araştırmanın yapılması gerekmektedir. Bizim çalışmamız da dahil olmak üzere tüm bu çalışmalar, *B. bacteriovorus*'un av türleri, suşlar, planktonik hücre veya biyofilm teriminde predasyon özgüllüğünü vurgulamaktadır.

Bauer ve Forchhammer (2021), *B. bacteriovorus*'un bazı siyanobakteri türlerini avlayabilen predatör bakteriler arasında olduğunu bildirmiştir. Burnham ve diğ. (1976) de *Phormidium luridum* Cyanobacteria türünün *B. bacteriovorus* tarafından parçalanmasını incelemişler ve predatör bakteri ile muameleden sonra, alglerin klorofilinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Buna ek olarak, alg hücresinde hücre içi boşluğun genişlemesi, tam hücre lizisi ile sferoplast oluşumu gibi morfolojik değişiklikler gözlenmiştir (Burnham ve diğ., 1976). Çalışmamızdaki iki sistemin biyofilm toplulukları arasında gözlenen önemli farklardan biri de siyanobakteri dinamiğidir. *B. bacteriovorus*'tan yoksun sistemde 8 ay boyunca bolluk oranı sabit (%1) görünürken, predatör bakteriyi içeren sistemdeki alg topluluğu 2. aydan son aya kadar %0 oranında bulunmuştur. İki sistemdeki bolluk oranı düşük olsa da, iki sistem arasında gözlenen dalgalanmadaki fark, *B. bacteriovorus* HD100'ün biyofilmdeki bu topluluğu avlayabileceğini düşündürmektedir. Burnham ve diğ., (1976) tarafından yapılan çalışma da bizim çalışmamız gibi *B. bacteriovorus*'un av yelpazesi ile ilgili çalışmaların genişletilmesinin önemini vurgulamaktadır, zira literatürde Gram-pozitif bakterilerle ilgili çok az araştırma bulunmaktadır ve bu çalışmalar hala Gram-negatif bakterilerle sınırlıdır.

*Tundrisphae*ra, Planctomycetes sınıfına ait Isosphaeraceae familyasının bir cinsidir. Bu cins, *B. bacteriovorus* eklendiğinde, avcı bakterinin olmadığı sisteme göre daha bol miktarda ortaya çıkmıştır. Bu sonuç, Mo ve diğ. (2024) tarafından Zebra balığı bulunan suya *B. bacteriovorus* eklenmesinden sonra gözlemlenen sonuçla benzerlik göstermektedir. Predatörün varlığında bu bakterilerin bolluk oranındaki bu artış henüz anlaşılamamıştır. Ancak *B. bacteriovorus*'un *Tundrisphaera* ile aynı ekosistemde yaşayan bazı rekabetçi bakterileri avlaması, bu mikroorganizmalara uygun bir gelişme ortamı sunabilir. Ayrıca, bu bakterilerin planktonik hücreler olarak yaşamaktansa yüzeylerde kolonileşmeyi tercih ettikleri bilinmektedir (Allgaier vd., 2006). Gram-negatif bir bakteri olan bu cins, *B. bacteriovorus*'un avı olmaktan uzaktır, ancak avcının varlığında çoğalması önemli olabilir. *Tundrisphaera*'nın mikrobiyal kökenli karbonhidrat ve diğer organik maddeleri kullanabildiği bilinmektedir (Dedysh ve Ivanova, 2019) ve bu da çevredeki organik kirleticilerin biyolojik olarak parçalanmasındaki potansiyel rolünü göstermektedir. Çalışma sonuçlarımız *B. bacteriovorus* ve *Tundrisphaera*'nın bir arada olmasının çevredeki zararlı patojenlere ve maddelere karşı biyokontrol etkinliğinin artabileceğini desteklemektedir.

Gemmata toprak, deniz, tatlı su ve içme suyu gibi farklı ekosistemlerden bildirilen bir Planctomycetes'tir (Ivanova ve diğ., 2020; Ivanova ve diğ., 2021; Singh ve diğ., 2022; Lan ve diğ., 2024). Buna ek olarak, çevresel biyofilmde tespit edilmiş (Kaboré ve diğ., 2019; Zhang ve diğ., 2024) ve yüzeylerde kolonize olma kabiliyetini doğrulanmıştır. Bu cinsin bazı türlerinin, antibiyotik dirençleri ve hastalardan izolasyonları nedeniyle fırsatçı patojen olarak düşünülmektedir (Kaboré ve diğ., 2020). Bununla birlikte, hastaların ve sağlıklı bireylerin gastrointestinal sisteminde 16S rDNA analizi ile tanımlanması, insan normal bağırsak florası arasında olduğunu göstermektedir (Cayrou ve diğ., 2013; Kaboré ve diğ., 2020). Bu cinse ait türlerin çoğu metagenomik analiz yoluyla belirlenmiştir ancak spesifik kültür ortamı ve uzun süreli inkübasyon gereksinimi nedeniyle hala kültürlenememektedir (Kaboré ve diğ., 2020). Çalışmamızda, bu cinse ait kültüre edilemeyen bir tür, iki sistemde de en bol bulunan türlerden biri olarak gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, iki sistemdeki bolluğu önemli ölçüde farklılık göstermektedir ($p<0,01$). *B. bacteriovorus* içeren sistemin biyofilmlerindeki bolluk oranı, diğer sistemin biyofilmlerindeki bolluk oranından önemli ölçüde daha düşüktür. *B. bacterivorus*'un bu cinsin üyeleri üzerindeki predasyonu hiç çalışılmamıştır. Bununla birlikte sonuçlarımız bu bakterinin *B. bacteriovorus* HD100 tarafından avlanma potansiyeline sahip olduğuna işaret etmektedir. *Gemmata*'nın izolasyonlarına odaklanan ve kültüre bağlı yöntemlerle daha fazla çalışma yapılması avcı bakteri ile etkileşimleri hakkında çok sayıda kanıt sağlayabilir.

Metallerin mikrobiyal kaynaklı korozyonu, metalin korozyon hızının mikroorganizmalar veya onların metabolitleri tarafından hızlandırılması anlamına gelir (Liu ve diğ., 2021). Metal yüzeylerde biyofilm oluşumu, korozyonun başlamasında veya hızlanmasında çok önemli bir faktördür (Liu ve diğ., 2023a). Özellikle çevrede oluşan biyofilm topluluğunda, hem aerobik hem de anaerobik bakteriler korozyonun tetiklenmesinde etkileşimli roller oynamaktadır. Böyle karmaşık bir biyofilmde, anaerobik bakteriler alt katmanlarda lokalize olabilirken, fakültatif aerobik ve aerobik bakteriler çoğunlukla üst katmanlarda lokalize olur. Biyofilm oluşum mekanizmasının homojen bir dinamiğe sahip olmadığı unutulmamalıdır: yüzeydeki bazı bölgelerde diğerlerinden daha fazla kolonize olur, kolonize olan bakteriler bölgeden bölgeye farklılık gösterir. Bu durum, yüzey yumuşaklığı/pürüzlülüğü, metal bileşimi veya mevcut besin maddesi gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır (Liu ve diğ., 2021). Bu bağlamda, mikrobiyolojik olarak indüklenen korozyon lokalize korozyonun bir türü olarak kabul edilmektedir (Zhang ve diğ., 2015). EPS özellikleri, biyofilm oluşum dinamikleri ve

biyofilmdeki topluluklar dahil olmak üzere biyofilm yapısının incelenmesi, mikrobiyolojik olarak indüklenen korozyon çalışmasının temelini oluşturmaktadır.

316L paslanmaz çelik, metalin pasif tabakasını oluşturmaya katkıda bulunan krom, molibden ve nikel gibi bazı bileşenleri içermesi nedeniyle korozyona karşı yüksek dirençli olmaları ile bilinir (Yu ve diğ., 2023). Sahip olduğu özellikler nedeniyle bu metal, çoğunlukla soğutma sistemleri ve içme suyu dağıtım sistemleri gibi endüstriyel ekipmanlarda ve diş implantları gibi tıbbi ekipmanlarda kullanılır (Liu ve diğ., 2023a; Yu ve diğ., 2023; Eduok ve diğ., 2024). Bununla birlikte, ortamdaki mikroorganizmaların Cr, Ni ve Fe'nin ayrışmasına neden olarak bu metal türünde lokal korozyonu başlattığı veya hızlandırdığı bildirilmektedir (Eduok ve diğ., 2024). Metalin diğer alaşımlarla kaplanması veya soğutma kuleleri gibi metalin kullanıldığı ortamlarda klor, sodyum hipoklorit, klorofenoller ve bisfenol A epoksi reçinesi gibi biyositlerin uygulanması, metallerin mikrobiyal kaynaklı korozyonunu engellemek veya azaltmak için kullanılan anti-korozif yöntemlerden bazılarıdır (Tower, 2016). Bu yöntemler metal yüzeyde oluşan biyofilmi engellemeye veya ortadan kaldırmaya yöneliktir (Tower, 2016). Ancak mikroorganizmaların giderek artan antibiyotik ve kimyasal direnci nedeniyle, çevrenin sürdürülebilirliğine de yanıt veren biyolojik antibiyofilm ajanları veya metal koruyucu filmler iyi birer alternatif olabilmektedir.

Çalışmamızda biyofilm yapısını incelediğimizde, karbonhidrat ve protein açısından EPS karakterizasyonu, deney süresince predatör bakterilerden yoksun sistem diğer sisteme kıyasla yüksek karbonhidrat/protein oranı göstermiştir. EPS bileşiminin MİK'te önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Liu ve diğ. (2023), EPS konsantrasyonu ne kadar yüksek uygulanırsa, lokal korozyonun da o kadar büyük olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda, predatör bakteri içermeyen sisteme daldırılan kuponlardaki yüksek ağırlık kaybı ve bu kuponlarda gözlenen büyük ve çok sayıda çukur, EPS bileşimi ile açıklanabilir. EPS ve nanopartiküllerin yüzey yüküne bağlı olarak, EPS'nin demir oksit gibi nanopartiküllerin adsorpsiyonunu ve etkileşimini etkileyebileceği, bu etkileşimlerin elektrostatik çekimler ve kimyasal bağlar içerdiği bildirilmiştir (Adeleye ve Keller, 2016). Banerjee ve diğ. (2024), havadaki partiküllerin demir nanopartiküllerinin potansiyel kaynağı olarak tanımlanabileceğini göstermiştir. Bu tozların biyofilm üzerinde birikmesi ve etkileşime girmesi, biyofilm matriksinin metal korozyonu için önemli bir faktör olduğu gösterilen metal oksidasyonunu indükleyebilir. Bu bağlamda, *B. bacteriovorus*'un EPS bileşiminin modifikasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülebilir.

EPS bileşenlerinin, özellikle de karbonhidrat ve proteinlerin sentezini azaltan ve böylece matriksin yabancı hava partikülleriyle etkileşimini değiştiren mikroorganizmalar üzerindeki predasyona bağlanabilir.

Üç sistemden çıkarılan kuponların ağırlık kaybını incelediğimizde, tüm kuponların 1. aydan itibaren düşük ağırlık kaybıyla başladığını ve sisteme göre belirlenen ağırlık kayıplarının en düşükten en yükseğe doğru K sistemi=P sistemi<D sistemi olarak gözlemlenmiştir. İkinci ayda alınan kuponların herhangi bir ağırlık kaybı göstermemesi ilginçtir. Ancak, D sistemine daldırılan kuponlarda ağırlık kaybı 3. aydan sonra kademeli olarak artmaya başlarken, P sisteminde 2. aydan 6. aya kadar, K sisteminde ise 2. aydan 7. aya kadar herhangi bir ağırlık kaybı gözlenmemiştir. Üç sistem arasında gözlenen fark, D sistemindeki bakteri topluluklarının bu korozyon sürecini hızlandırdığını göstermektedir. Paslanmaz çeliğin pasif filminin klorür ve bromür gibi iyonlar tarafından bozulabildiği (Dastgerdi ve diğ., 2019; Wakai ve diğ., 2022), daha önce de vurgulandığı gibi mikrobiyal topluluğun bu bozulmayı hızlandırabildiği (Capão ve diğ., 2020), ve bunun da çeliğin korozyonuna kapı açtığı bilinmektedir.

Çalışmamız sırasında yapılan ilginç gözlemlerden biri, deneyin 3. ayından itibaren çeşme suyunda görülen ve çelik kuponlarda beyazımsı bir yapı oluşumuna neden olan çökelmedir. Bu gözlenen oluşum, çeşme suyundaki bazı tuzlardan kaynaklanıyor olabilir. Ancak ilgili nedenin belirlenmesi için daha fazla deney yapılması gerekmektedir. Diğer yandan, her iki sistem aynı çeşme suyuyla aynı anda beslenmesine rağmen, bu beyaz çökeltinin predatör bakteri içermeyen sisteme daldırılan kuponlarda predatör bakteri içeren sisteme daldırılanlara göre daha fazla ve belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, avcı bakterinin suda bulunan avları avlamak için tuzlu sudan faydalandığı da düşünülmektedir. $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ gibi tuzların *B. bacteriovorus*'un enfeksiyonunu artırdığı bilinmektedir (Williams ve Chen, 2020). Bu durum, predatör içeren sisteme daldırılan çeliklerde gözlemlenen düşük beyaz çökelti miktarını açıklayabilir. EDS analizinden elde edilen sonuçlar, P ve D sisteminde bulunan kuponların yüzeyinde farklılıklar olduğunu göstermektedir. İki sistemdeki yüksek C ve O elementlerinin tanımlanması, genellikle yüksek karbonhidrat konsantrasyonu ile karakterize edilen biyofilm matrisi ile açıklanabilir (Yang ve diğ., 2021; Liu ve diğ., 2023a). Ayrıca, P sisteminde çok az tespit edilen Ca elementinin D sisteminde yüksek oranda tespit edilmesinin, daha önce gösterildiği gibi *B. bacteriovorus*'un predasyon mekanizması sırasında bu elementi kullanabilmesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Williams ve Chen, 2020).

Hyphomicrobium, Bradyrhizobium ve *Sphingomonas* nitrat indirgeyen bakterilerdir (NRB) (Zhang ve diğ., 2022; Yu ve diğ., 2023). *Hyphomicrobium, Sphingomonas* ve *Bradyrhizobium* hem D hem de P sistemlerinde tanımlanmıştır ancak bolluk oranları bakımından iki sistem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). Nitrit indirgeyen bakterilerin, bazı koşullarda metallerin korozyonundan sorumlu olabileceğini gösterilmiştir (Yu ve diğ., 2020; Fu ve diğ. 2021; Liu ve diğ., 2022).

Çalışmamızın bulguları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1- 316L paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde oluşan biyofilm, bu metalin çok çeşitli bakterilerin üzerinde barınmasına olanak tanıyan iyi bir metalosfer olduğunu göstermektedir. Bu gözlem, metagenomik analiz ve SEM fotoğrafları ile doğrulanmıştır.

2- Biyofilm yapısında bulunan bakteri toplulukları her ne kadar sağlanan sudan gelse de sistem sularındaki aerobik heterotrofik bakteri hücre sayısı ile biyofilmde bulunan bakteri sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

3- 316L paslanmaz çelik kuponlar üzerindeki kantitatif biyofilm miktarı iki sistem arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, 3D-optik profilometre, P ve D sisteminde bulunan paslanmaz çelik kuponlar üzerinde oluşan biyofilm farklılıklarını ortaya koymuştur. Predatör içeren sisteme daldırılan kuponlar üzerinde oluşan biyofilm kalınlık açısından daha homojen bir yapıya sahipken, diğer sistemdeki kuponların yüzeyinde daha heterojen bir biyofilm kalınlığı göstermiştir.

4- İki sistemde oluşan biyofilmden elde edilen aerobik heterotrofik bakteri sayıları arasında anlamlı bir farklılık ($p<0,01$) belirlenmiş ve en yüksek bakteri hücre sayısı P sisteminde gözlenmiştir.

5- Çalışmamızda incelenen pH, TÇM ve sıcaklık gibi çevresel abiyotik parametreler arasında TÇM, predatör içeren sistem, predatörden yoksun sistem ve steril sistem dahil olmak üzere her üç sistemde de yüksek değişkenlik göstermiştir. Ayrıca, bu değişimin su sistemlerindeki aerobik heterotrofik bakteri hücre sayısı üzerinde yüksek bir etkisi (D sistem için $p<0,01$; P sistem için $p<0,05$) olduğu gözlemlenmiştir. TÇM arttıkça aerobik heterotrofik bakteri sayısı da artmıştır.

6- Bu çalışmada, karbonhidrat ve protein de dahil olmak üzere EPS bileşenlerinin biyofilm miktarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu bileşenlerin *B. bacteriovorus* HD100 içeren sisteme daldırılan kuponlardan belirlenen kantitatif biyofilm miktarı ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Öte yandan, protein miktarı ile predatör içermeyen sistemdeki biyofilm miktarı arasında istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı ($p<0,05$) bir ilişki olduğunu doğrulanmıştır. Ayrıca, aynı sistemden elde edilen EPS içeriği olan karbonhidrat ve protein miktarlarının pozitif yönde ilişkili ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur.

7- Paslanmaz çelik kuponlar üzerinde oluşan biyofilmdeki bakteriyel çeşitlilik, predatör içeren sistemin diğer sisteme göre daha düşük bakteriyel bolluğa ve çeşitliliğe sahip olduğunu göstermiştir. Observed-features, Shannon ve Faith filogenetik çeşitliliği (Faith's PD) içeren alfa çeşitlilik indeksleri bu durumu doğrulamıştır. Buna ek olarak, beta-çeşitliliğin Weighted-Unifrac ve Unweighted-Unifrac indeksleri, toplanan biyofilmde gözlemlenen bakteriyel çeşitliliğin iki sistem arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Unweighted-Unifrac'ın PCoA temsili, predatör bakterileri içeren sistemin örnekleme dönemi içinde yüksek bir bakteri değişkenliğine sahip olduğunu göstermiştir. Öte yandan, predatör bakteri içermeyen sistem örnekleme dönemi içerisinde daha düzenli bir çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca, iki sistem arasındaki bu bakteriyel çeşitliliğin metrikleri anlamlı ($p<0,05$) bir farklılık göstermiştir.

8- Biyofilmlerden izole edilen DNA'nın metagenomik analizi, iki sistemde de en yüksek bolluğa sahip filumların Protebacteria ve Planctomycetota olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bu iki filumun ilk ve son (8.) aylardaki bolluğu incelendiğinde, predatör bakteri içeren sistemde Protebacteria'nın azaldığı, Planctomycetota'nın ise arttığı gözlemlenmiştir. Diğer sistemde ise bu filumların ilk ayda gözlemlenen bolluk oranları son ayda aynı kalmıştır. Bu düzeyde yapılan istatistiksel analizler, Cyanobacteria'nın predatör bakteri içermeyen sistemde predatör içeren sisteme göre istatistiksel olarak daha fazla olduğunu ($p<0,05$) göstermiştir.

9- Her ikisi de Plactomycetota filumuna ait olan *Gemmata* ve *Tundrisphaera,* iki sistemde de anlamlı farklılıklarla ($p<0,05$) gözlenen en bol iki cinstir. *Gemmata* türleri *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 içeren sistemde azalırken, *Tundrisphaera* türleri aynı sistemde artış göstermiştir. Diğer sistemde ise bu dinamizmin tam tersi gözlenmiştir.

10- En yüksek ağırlık kaybı predatör bakteri içermeyen sistem içinde bekletilen kuponlarda gözlenmiştir. En düşük ağırlık kaybı ise kontrol sistemine daldırılan kuponlarda gözlenmiştir.

Ayrıca en yüksek ağırlık kaybı son ayda gözlenmiştir. Ağırlık kaybının varyansını karşılaştırdığımızda üç sistem arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Ancak steril sistemdeki kuponların ağırlık kaybı ile predatör içeren sistemdeki kuponların ağırlık kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı değildir.

11- *B. bacteriovorus*'un eklenmesinin 3D-optik profilometre sonuçlarına göre biyofilm matriksinde (EPS) değişikliğe yol açarak biyofilmin zayıflamasına ve biyofilm dağılımının değişmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *B. bacteriovorus*, mikrobiyal çeşitliliği azaltarak ve kültürlenebilir bakterilerin çoğalmasını destekleyerek biyofilm içindeki mikrobiyal topluluğu değiştirmiştir. Bu sonuçlara göre *B. bacteriovorus*'un kompleks biyofilm yapısına etki ettiği belirlenmiştir.

12- Predatör bakteri içermeyen sistem içine daldırılan kuponlarda büyük boyutlu çukurlara ek olarak en yüksek ağırlık kaybının gözlenmesi ve EDS analiz sonucu doğrultusunda, çalışmamızın *B. bacteriovorus* HD100'ün su soğutma kulelerindeki 316L paslanmaz çeliğin mikrobiyal etkili korozyonunun engellenmesinde önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Adeleye, A. S., and Keller, A. A., 2016, Interactions between algal extracellular polymeric substances and commercial TiO2 nanoparticles in aqueous media. *Environmental science & technology*, 50(22), 12258-12265.

Alav, I., Sutton, J. M., and Rahman, K. M., 2018, Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003-2020.

Allgaier, M., and Grossart, H. P., 2006, Diversity and seasonal dynamics of Actinobacteria populations in four lakes in northeastern Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3489-3497.

Almeida, M. A. N., and De França, F. P., 1998, Biofilm formation on brass coupons exposed to a cooling system of an oil refinery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 39-44.

AlSalhi, M.S., Devanesan, S., Rajasekar, A., and Kokilaramani, S., 2023, Characterization of plants and seaweeds based corrosion inhibitors against microbially influenced corrosion in a cooling tower water environment. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(3), 104513.

Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z., ... and Knight, R., 2017, Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, 2(2), 10-1128.

Anderson, M. J., 2001, A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology*, 26(1), 32-46.

Arslan-Aydoğdu, E. Ö., and Kimiran, A., 2018, An investigation of virulence factors of *Legionella pneumophila* environmental isolates. *Brazilian journal of microbiology*, 49, 189-199.

Banerjee, D., Sarkar, S., Yadav, R., and Singh, M. R., 2024, Chemical and microbial characterization of cyanobacterial extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm extracts from Hathi Khana, An ancient monument in Agra, Taj complex. *Vibrational Spectroscopy*, 131, 103652.

Basera, P., Lavania, M., Lal, B., 2019, Potential of dynamic bacterial communities in the bio-corrosion process: a proof study with surface morphology of metal coupons. *RSC advances*, 9(30), 17040-17050.

Bauer, A., and Forchhammer, K., 2021, Bacterial predation on cyanobacteria. *Microbial Physiology*, 31(2), 99-108.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... and Caporaso, J. G., 2019, Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.

Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H., and Koo, H., 2018, Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends in microbiology*, 26(3), 229-242.

Bratanis, E., Andersson, T., Lood, R., and Bukowska-Faniband, E., 2020, Biotechnological potential of Bdellovibrio and like organisms and their secreted enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 662.

Brouse, L., Brouse, R., and Brouse, D., 2017, Natural pathogen control chemistry to replace toxic treatment of microbes and biofilm in cooling towers. *Pathogens*, 6(2), 14.

Bukowska-Faniband, E., Andersson, T., and Lood, R., 2020, Studies on Bd0934 and Bd3507, two secreted nucleases from *Bdellovibrio bacteriovorus*, reveal sequential release of nucleases during the predatory cycle. *Journal of Bacteriology*, 202(18), 10-1128.

Burnham, J. C., Stetak, T., and Locher, G., 1976, Extracellular Lysis of the Bluegreen Alga *Phormidium Luridum* by *Bdellovibrio Bacteriovorus* 1. *Journal of Phycology*, 12(3), 306-313.

Capão, A., Moreira-Filho, P., Garcia, M., Bitati, S., and Procópio, L., 2020, Marine bacterial community analysis on 316L stainless steel coupons by Illumina MiSeq sequencing. *Biotechnology Letters*, 42(8), 1431-1448.

Castiblanco, L. F., and Sundin, G. W., 2016, New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of integrative plant biology*, 58(4), 362-372.

Cavallaro, A., Rhoads, W. J., Huwiler, S. G., Stachler, E., and Hammes, F., 2022, Potential probiotic approaches to control *Legionella* in engineered aquatic ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(8), fiac071.

Cavallo, F. M., Jordana, L., Friedrich, A. W., Glasner, C., and van Dijl, J. M., 2021, *Bdellovibrio bacteriovorus*: a potential 'living antibiotic' to control bacterial pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(5), 630–646.

Cayrou, C., Sambe, B., Armougom, F., Raoult, D., and Drancourt, M., 2013, Molecular diversity of the Planctomycetes in the human gut microbiota in France and Senegal. *Apmis*, 121(11), 1082-1090.

Chaal, M., Bahootoroody, A., Basnet, S., Banda, O. A. V., and Goerlandt, F., 2022, Towards system-theoretic risk assessment for future ships: A framework for selecting Risk Control Options. *Ocean Engineering*, *259*, 111797.

Chen, S., Wu, T., Zeng, F., Chen, K., Li, L., and Qu, Q., 2023. Streptococcus mutans soluble extracellular polymeric substances and sodium molybdate as mixed corrosion inhibitor for X70 steel. *Journal of Materials Science*, *58*(6), 2915-2934.

Chimento, A., Cacciola, S. O., and Garbelotto, M., 2012, Detection of mRNA by reverse-transcription PCR as an indicator of viability in *Phytophthora ramorum*. *Forest Pathology*, 42(1), 14-21.

Comensoli, L., Albini, M., Kooli, W., Maillard, J., Lombardo, T., Junier, P., & Joseph, E., 2020, Investigation of biogenic passivating layers on corroded iron. *Materials*, 13(5), 1176.

Costa, R. C., Abdo, V. L., Mendes, P. H., Mota-Veloso, I., Bertolini, M., Mathew, M. T., ... and Souza, J. G. S., 2021, Microbial corrosion in titanium-based dental implants: how tiny bacteria can create a big problem?. *Journal of Bio-and Tribo-Corrosion*, 7(4), 136.

Dashiff, A., Keeling, T. G., and Kadouri, D. E., 2011, Inhibition of predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* via host cell metabolic activity in the presence of carbohydrates. *Applied and environmental microbiology*, 77(7), 2224-2231.

Dastgerdi, A. A., Brenna, A., Ormellese, M., Pedeferri, M., and Bolzoni, F., 2019, Experimental design to study the influence of temperature, pH, and chloride concentration on the pitting and crevice corrosion of UNS S30403 stainless steel. *Corrosion Science* 159:108160.

Davidov Y., Friedjung A., and Jurkevitch E., 2006, Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of Bdellovibrio-and-like organisms. *Environmental Microbiology*, 8(9), 1667–1673.

Dedysh, S. N., and Ivanova, A. A., 2019, Planctomycetes in boreal and subarctic wetlands: diversity patterns and potential ecological functions. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(2), fiy227.

Deeg, C. M., Le, T. T., Zimmer, M. M., and Suttle, C. A., 2020, From the inside out: an epibiotic Bdellovibrio predator with an expanded genomic complement. *Journal of Bacteriology*, 202(8), 10-1128.

Di Pippo, F., Di Gregorio, L., Congestri, R., Tandoi, V., and Rossetti, S., 2018, Biofilm growth and control in cooling water industrial systems. *FEMS microbiology ecology*, 94(5), fiy044.

Doğruöz Güngör, N., Çotuk, A., Ilhan-Sungur, E., and Cansever, N., 2015, Effect of mixed-species biofilm on copper surfaces in cooling water system. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 24, 848-858.

Donlan, R. M., 2000, Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO journal*, *46*(6), S47 S52.

Dou, W., Jia, R., Jin, P., Liu, J., Chen, S., and Gu, T., 2018, Investigation of the mechanism and characteristics of copper corrosion by sulfate reducing bacteria. *Corrosion Science*, 144, 237-248.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Duncan, M. C., Forbes, J. C., Nguyen, Y., Shull, L. M., Gillette, R. K., Lazinski, D. W., ... and Camilli, A., 2018, *Vibrio cholerae* motility exerts drag force to impede attack by the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Nat Commun*, 9, 4757.

Dwidar, M., Nam, D., and Mitchell, R. J., 2015, Indole negatively impacts predation by B dellovibrio bacteriovorus and its release from the bdelloplast. *Environmental microbiology*, 17(4), 1009-1022.

Eduok, U., 2024, Microbiologically induced intergranular corrosion of 316L stainless steel dental material in saliva. *Materials Chemistry and Physics*, 313, 128799.

El-Shanshoury, A. E. R. R., Abo-Amer, A. E., and Alzahrani, O. M., 2016, Isolation of *Bdellovibrio* sp. from wastewater and their potential application in control of Salmonella paratyphi in water. Geomicrobiology Journal, 33(10), 886-893.

Ezzedine, J. A., Desdevises, Y., and Jacquet, S., 2022, Bdellovibrio and like organisms: current understanding and knowledge gaps of the smallest cellular hunters of the microbial world. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(4), 428-449.

Fida, T.T., Chen, C., Okpala, G., and Voordouw, G., 2016, Implications of limited thermophilicity of nitrite reduction for control of sulfide production in oil reservoirs. *Applied and environmental microbiology*, 82(14), 4190-4199.

Flemming, H. C., and Wingender, J., 2010, The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.

Flemming, H. C., and Wuertz, S., 2019, Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247-260.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S., 2016, Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.

Fu, Q., Xu, J., Wei, B., Qin, Q., Gao, L., Bai, Y., ... and Sun, C., 2021, The effect of nitrate reducing bacteria on the corrosion behavior of X80 pipeline steel in the soil extract solution of Shenyang. *International Journal of Pressure Vessels and Piping*, 190, 104313.

Go, L. C., Depan, D., Holmes, W. E., Gallo, A., Knierim, K., Bertrand, T., and Hernandez, R., 2020, Kinetic and thermodynamic analyses of the corrosion inhibition of synthetic extracellular polymeric substances. *PeerJ Materials Science*, 2, e4.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P., 2016, Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of microbiology*, 198, 1-15.

Gupta, R., Mukherjee, A., Deb, A., Vasisht, P., and Ranjan, S., 2022, Comprehensive Study on the Types, Performance, and Application of Cooling Tower. 2022 International Conference on Smart and Sustainable Technologies in Energy and Power Sectors (SSTEPS), 07-11 November 2022, Mahendragarh, India, IEEE, 141-144.

Han, Y. N., Wei, M., Han, F., Fang, C., Wang, D., Zhong, Y. J., ... and Li, F. M., 2020, Greater biofilm formation and increased biodegradation of polyethylene film by a microbial consortium of *Arthrobacter* sp. and *Streptomyces* sp. *Microorganisms*, 8(12), 1979.

Harding, C. J., Huwiler, S. G., Somers, H., Lambert, C., Ray, L. J., Till, R., ... and Lovering, A. L., 2020, A lysozyme with altered substrate specificity facilitates prey cell exit by the periplasmic predator *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Nature Communications*, 11(1), 4817.

He, F., 2011, Bradford protein assay. *Bio-protocol*, e45-e45.

Hubert, C., and Voordouw, G., 2007. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Applied and environmental microbiology*, 73(8), 2644-2652.

Iebba, V., Totino, V., Santangelo, F., Gagliardi, A., Ciotoli, L., Virga, A., ... and Schippa, S., 2014, *Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cystic fibrosis isolates. *Frontiers in microbiology*, *5*, 280.

Im, H., Bäcker, L. E., and Mitchell, R. J., 2020. Environmental and biotic factors impacting the activities of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *The Ecology of Predation at the Microscale*, 155-172.

Im, H., Dwidar, M., and Mitchell, R. J., 2018, *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100, a predator of Gram-negative bacteria, benefits energetically from *Staphylococcus aureus* biofilms without predation. *The ISME Journal*, 12(8), 2090-2095.

Iroha, N. B., Oguzie, E. E., Onuoha, G. N., and Onuchukwu, A. I., 2005, Inhibition of mild steel corrosion in acidic solution by derivatives of diphenyl glyoxal. *16th International Corrosion Congress*, Beijing, China, 20051: 26-131.

Ivanova, A. A., Kulichevskaya, I. S., and Dedysh, S. N., 2021, *Gemmata palustris* sp. nov., a Novel Planctomycete from a Fen in Northwestern Russia. *Microbiology*, 90, 598-606.

Ivanova, A.A., Beletsky, A.V., Rakitin, A.L., Kadnikov, V.V., Philippov, D.A., Mardanov, A.V., Ravin, N.V., and Dedysh, S.N., Closely located but totally distinct: highly contrasting prokaryotic diversity patterns in raised bogs and eutrophic fens, *Microorganisms*, 2020, 8(4), 484.

Jahromi, M. A. M., Zangabad, P. S., Basri, S. M. M., Zangabad, K. S., Ghamarypour, A., Aref, A. R., ... and Hamblin, M. R., 2018, Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 123, 33.

Jayaraman, A., Cheng, E. T., Earthman, J. C., and Wood, T. K., 1997, Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion. *Applied microbiology and biotechnology*, 48, 11-17.

Jia, R., Unsal, T., Xu, D., Lekbach, Y., and Gu, T., 2019, Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. *International biodeterioration & biodegradation*, 137, 42-58.

Kaboré, O. D., Godreuil, S., and Drancourt, M., 2020, Planctomycetes as host-associated bacteria: a perspective that holds promise for their future

isolations, by mimicking their native environmental niches in clinical microbiology laboratories. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 519301.

Kaboré, O.D., Godreuil, S., and Drancourt, M. 2019, Improved culture of fastidious *Gemmata* spp. bacteria using marine sponge skeletons. *Scientific Reports*, 9, 11707i

Kadouri, D., and O'Toole, G. A., 2005, Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4044-4051.

Kadouri, D., and O'Toole, G. A., 2005, Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4044-4051.

Kahraman Vatansever, S., Tekintas, Y., Cilli, F. F., and Hosgor-Limoncu, M., 2023, Effect of predator bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus* on clinical pathogens and biofilms. *Indian Journal of Microbiology*, 63(1), 139-145.

Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E., and Sorek, R., 2013, A Global Transcriptional Switch between the Attack and Growth Forms of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoSONE*, 8(4), p.e61850.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., and Thurnheer, T., 2020, Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in microbiology*, 28(8), 668-681.

Kimiran-Erdem, A. K., Sanli-Yürüdü, N. O., Arslan-Aydoğdu, E. Ö., Dogruoz, N., Zeybek, Z., Türetgen, I., and Cotuk, A., 2008, Quantitative microbiological analysis of biofilm communities from the surfaces of different cooling tower materials. *European Journal of Biology*, 67(1), 9-16.

Kokilaramani, S., Al-Ansari, M. M., Rajasekar, A., Al-Khattaf, F. S., Hussain, A., and Govarthanan, M., 2021, Microbial influenced corrosion of processing industry by re-circulating waste water and its control measures-A review. *Chemosphere*, 265, 129075.

Kumar, S. S., and Ghosh, A. R., 2019, Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology*, 165(6), 593-610.

Kuznietsov, P. M., and Biedunkova, O. O., 2023, Technological and environmental problems in the stabilization treatment of the main condenser cooling circuit by sulfuric acid, *Journal of Engineering Science*, 10(2), H1-H8.

Lambert, C., and Sockett, R. E., 2013, Nucleases in *Bdellovibrio bacteriovorus* contribute towards efficient self-biofilm formation and eradication of preformed prey biofilms. *FEMS microbiology letters*, 340(2), 109-116.

Lambert, C., Chang, C. Y., Capeness, M. J., and Sockett, R. E., 2010, The first bite—profiling the predatosome in the bacterial pathogen *Bdellovibrio*. *PloS one*, 5(1), e8599.

Lan, W., Liu, H., Weng, R., Zeng, Y., Lou, J., Xu, H., ... and Jiang, Y., 2024, Microbial community of municipal drinking water in Hangzhou using metagenomic sequencing. *Environmental Pollution*, 342, 123066.

Lerner, T. R., Lovering, A. L., Bui, N. K., Uchida, K., Aizawa, S. I., Vollmer, W., and Sockett, R. E., 2012, Specialized peptidoglycan hydrolases sculpt the intra-bacterial niche of predatory *Bdellovibrio* and increase population fitness. *Plos pathogens*, *8*(2), e1002524.

Li, X., Xia, L., Gurgenci, H., and Guan, Z., 2017, Performance enhancement for the natural draft dry cooling tower under crosswind condition by optimizing the water distribution. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 107, 271-280.

Li, X., Zhang, D., Liu, Z., Li, Z., Du, C., and Dong, C., 2015, Materials science: Share corrosion data. *Nature*, 527(7579), 441-442.

Li, Z., Yuan, X., Sun, M., Li, Z., Zhang, D., Lei, Y., ... and Wang, F., 2022, Rhamnolipid as an eco-friendly corrosion inhibitor for microbiologically influenced corrosion. *Corrosion Science*, 204, 110390.

Little, B. J., and Lee, J. S., 2014, Microbiologically influenced corrosion: an update. *International Materials Reviews*, 59(7), 384-393.

Little, B., Lee, J., and Ray, R., 2007, A review of 'green'strategies to prevent or mitigate microbiologically influenced corrosion. *Biofouling*, 23(2), 87-97.

Liu, H., Chen, W., Tan, Y., Meng, G., Liu, H., Cheng, Y., and Liu, H., 2022, Characterizations of the biomineralization film caused by marine pseudomonas stutzeri and its mechanistic effects on X80 pipeline steel corrosion. *Journal of Materials Science & Technology*, 125, 15-28.

Liu, H., Fu, C., Gu, T., Zhang, G., Lv, Y., Wang, H., and Liu, H., 2015, Corrosion behavior of carbon steel in the presence of sulfate reducing bacteria and iron oxidizing bacteria cultured in oilfield produced water. *Corrosion Science*. 100, 484–495.

Liu, H., He, J., Jin, Z., and Liu, H., 2023a, Pitting corrosion behavior and mechanism of 316L stainless steel induced by marine fungal extracellular polymeric substances. *Corrosion Science*, 224, 111485.

Liu, H., Sharma, M., Wang, J., Cheng, Y. F., and Liu, H., 2018b, Microbiologically influenced corrosion of 316L stainless steel in the presence of *Chlorella vulgaris*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *129*, 209-216.

Liu, J., Jia, R., Zhou, E., Zhao, Y., Dou, W., Xu, D., ... and Gu, T.,2018a, Antimicrobial Cu-bearing 2205 duplex stainless steel against MIC by nitrate reducing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *132*, 132-138.

Liu, J., Yang, L., Kjellerup, B. V., and Xu, Z., 2023b, Viable but nonculturable (VBNC) state, an underestimated and controversial microbial survival strategy. *Trends in Microbiology*, 31(10), 1013-1023.

Liu, Y., Zhang, W., Sileika, T., Warta, R., Cianciotto, N. P., and Packman, A., 2009, Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems. *Biofouling*, 25(3), 241-253.

Liu, Y., Zhang, W., Sileika, T., Warta, R., Cianciotto, N. P., and Packman, A. I., 2011, Disinfection of bacterial biofilms in pilot-scale cooling tower systems. *Biofouling*, 27(4), 393-402.

Lou, Y., Chang, W., Cui, T., Wang, J., Qian, H., Ma, L., ... and Zhang, D., 2021, Microbiologically influenced corrosion inhibition mechanisms in corrosion protection: A review. *Bioelectrochemistry*, 141, 107883.

Ma, H., Si, F., Zhu, K., and Wang, J., 2018, The adoption of windbreak wall partially rotating to improve thermo-flow performance of natural draft dry cooling tower under crosswind. *International Journal of Thermal Sciences*, *134*, 66-88.

Mahamuni-Badiger, P. P., Patil, P. M., Badiger, M. V., Patel, P. R., Thorat-Gadgil, B. S., Pandit, A., and Bohara, R. A., 2020, Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110319.

Mallick, H., Rahnavard, A., McIver, L. J., Ma, S., Zhang, Y., Nguyen, L. H., ... and Huttenhower, C., 2021, Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLoS computational biology*, 17(11), e1009442.

Marbach, A., Varon, M., and Shilo, M.,1976, Properties of marine bdellovibrios. *Microbial Ecology,* 2, 284–295.

Markelova, N. Y., 2010, Predacious bacteria, Bdellovibrio with potential for biocontrol. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(6), 428-431.

Martin, M., 2011, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.

Medina, A. A., and Kadouri, D. E., 2009, Biofilm formation of *Bdellovibrio bacteriovorus* host-independent derivatives. *Research in microbiology*, 160(3), 224-231.

Mo, H., Li, Q., Cao, Q., Zhao, H., Wang, L., and Yang, H., 2024, The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies under Bdellovibrio treatment from larvae to juveniles and adults. *Aquaculture*, 590, 741006.

Monnappa, A. K., Dwidar, M., Seo, J. K., Hur, J.-H., and Mitchell, R. J., 2014, *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. *Science Report,* 4, 3811.

Mookherjee, A., and Jurkevitch, E., 2022, Interactions between Bdellovibrio and like organisms and bacteria in biofilms: beyond predator–prey dynamics. *Environmental Microbiology*, 24(3), 998-1011.

Mun, W., Kwon, H., Im, H., Choi, S. Y., Monnappa, A. K., and Mitchell, R. J., 2017, Cyanide production by *Chromobacterium piscinae* shields it from *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 predation. *MBio*, 8(6), 10-1128.

Negus, D., Moore, C., Baker, M., Raghunathan, D., Tyson, J., and Sockett, R. E., 2017, Predator versus pathogen: how does predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* interface with the challenges of killing Gram-negative pathogens in a host setting?. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 441-457.

Nourani, Z., Naserbegi, A., Tayyebi, S., and Aghaie, M., 2019, Thermodynamic evaluation of hybrid cooling towers based on ambient temperature. *Thermal Science and Engineering Progress*, 14, 100406.

Odooli, S., Roghanian, R., Ghasemi, Y., Mohkam, M., and Emtiazi, G., 2021, Predatory and biocontrol potency of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward phytopathogenic strains of *Pantoea* sp. and *Xanthomonas campestris* in the presence of exo-biopolymers: in vitro and in vivo assessments. *International Microbiology*, 24(3), 399-413.

Olanya, O. M., Niemira, B. A., Cassidy, J. M., Boyd, G., and Uknalis, J., 2020, Pathogen reduction by predatory bacteria and survival of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Escherichia coli* on produce and buffer treated with low-dose gamma radiation. *LWT*, *130*, 109630.

Ottaviani, D., Pieralisi, S., Angelico, G., Mosca, F., Tiscar, P. G., Rocchegiani, E., ... and Haouet, N., 2020, *Bdellovibrio bacteriovorus* to control *Escherichia coli* on meat matrices. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(3), 988-994.

Pal, M. K., and Lavanya, M., 2022, Microbial influenced corrosion: understanding bioadhesion and biofilm formation. *Journal of Bio-and Tribo-Corrosion*, 8(3), 76.

Pantanella, F., Iebba, V., Mura, F., Dini, L., Totino, V., Neroni, B., ... and Schippa, S., 2018, Behaviour of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the presence of Gram-positive *Staphylococcus aureus*. *New Microbiol*, 41(2), 145-152.

Patini, R., Cattani, P., Marchetti, S., Isola, G., Quaranta, G., and Gallenzi, P., 2019, Evaluation of predation capability of periodontopathogens bacteria by *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100. An in vitro study. *Materials*, 12(12), 2008.

Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., and Donelli, G., 2015, Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology*, 64(4), 323-334.

Pieralisi, S., Canonico, C., Di Lullo, S., Angelico, G., Cardinali, G., Rocchegiani, E., ... and Ottaviani, D., 2023, Effectiveness of Bdellovibrio bacteriovorus to contain Escherichia coli on milk and temperature impact on predation dynamics. *Italian Journal of Food Science*, 35(2), 80-87.

Piñeiro, S. A., Stine, O. C., Chauhan, A., Steyert, S. R., Smith, R., and Williams, H. N., 2007, Global survey of diversity among environmental saltwater Bacteriovoracaceae. *Environmental Microbiology*, 9, 2441–2450.

Prehna, G., Ramirez, B. E., and Lovering, A. L., 2014, The lifestyle switch protein Bd0108 of *Bdellovibrio bacteriovorus* is an intrinsically disordered protein. *PLoS One*, *9*(12), e115390.

Procópio, L., 2019, The role of biofilms in the corrosion of steel in marine environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 73.

Qi, H., Shi, Q., Peng, R., Sun, T., Zhang, Z., Li, L., and Xie, X.,2023, Effect of One Sulfate-Reducing Bacterium SRB-Z Isolated from Pearl River on the Corrosion Behavior of Q235 Carbon Steel. *Coatings*, 13(2), 478.

Qian, H. C., Chang, W. W., Liu, W. L., Cui, T. Y., Li, Z., Guo, D. W., ... and Zhang, D. W. 2022, Investigation of microbiologically influenced corrosion inhibition of 304 stainless steel by D-cysteine in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioelectrochemistry*, 143, 107953.

Qiu, L., Mao, Y., Gong, A., Zhang, W., Cao, Y., and Tong, L., 2016, Inhibition effect of Bdellovibrio bacteriovorus on the corrosion of X70 pipeline steel induced by sulfate-reducing bacteria. *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 63(4), 269-274.

Qiu, L., Mao, Y., Gong, A., Zhang, W., Cao, Y., and Tong, L., 2016, Inhibition effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* on the corrosion of X70 pipeline steel induced by sulfate-reducing bacteria. *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 63(4), 269-274.

Qvist, T., Eickhardt, S., Kragh, K. N., Andersen, C. B., Iversen, M., Høiby, N., and Bjarnsholt, T., 2015, Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a biofilm infection. *European Respiratory Journal*, 46(6), 1823-1826.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., and Sintim, H. O., 2015, Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future medicinal chemistry*, *7*(4), 493-512.

Rao, T. S., 2011, Microbial fouling and corrosion: fundamentals and mechanisms. *Operational and environmental consequences of large industrial cooling water systems*, In : Rajagopal, S., Jenner, H., Venugopalan, V. (eds), Springer US, Boston, MA, ISBN: 978-1-4614-1698-2, 95-126.

Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M., 2021, Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-18.

Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., ... and Schuster, S. C., 2004, A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 303(5658), 689-692.

Rumbaugh, K. P., and Sauer, K., 2020, Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586.

Said, N., Chatzinotas, A., and Schmidt, M., 2019, Have an Ion on It: The Life-Cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* Viewed by Helium-Ion Microscopy. *Adv. Biosys.* 3, 1800250.

Sangwan, N., Lambert, C., Sharma, A., Gupta, V., Khurana, P., Khurana, J. P., ... and Lal, R., 2015, Arsenic rich Himalayan hot spring metagenomics reveal genetically novel predator–prey genotypes. *Environmental microbiology reports*, 7(6), 812-823.

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., and Bjarnsholt, T., 2022, The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.

Schroeder, M., Brooks, B. D., and Brooks, A. E., 2017, The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*, 8(1), 39.

Singh, N., Singh, V., Rai, S. N., Vamanu, E., and Singh, M. P., 2022, Metagenomic analysis of garden soil-derived microbial consortia and unveiling their metabolic potential in mitigating toxic hexavalent chromium. *Life*, 12(12), 2094.

Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., and Rajnish, K. N., 2021, Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-19.

Soto, S. M., 2013, Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 4, 223–229.

Stolp H., and Starr M.P., 1963, *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 29, 217–248.

Sudek, L. A., Templeton, A. S., Tebo, B. M., and Staudigel, H., 2009, Microbial ecology of Fe (hydr) oxide mats and basaltic rock from Vailulu'u Seamount, American Samoa. *Geomicrobiology Journal*, 26(8), 581-596.

Sun, Y., Ye, J., Hou, Y., Chen, H., Cao, J., and Zhou, T., 2017, Predation efficacy of *Bdellovibrio bacteriovorus* on multidrug-resistant clinical pathogens and their corresponding biofilms. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 70(5), 485-489.

Sun, Y., Ye, J., Hou, Y., Chen, H., Cao, J., and Zhou, T., 2017, Predation efficacy of *Bdellovibrio bacteriovorus* on multidrug-resistant clinical pathogens and their corresponding biofilms. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 70, 485–489.

Tajabadi, F. H., Karimian, S. M., Mohsenipour, Z., Mohammadi, S., Salehi, M., Sattarzadeh, M., ... and Feizabadi, M. M., 2023, Biocontrol treatment: application of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 against burn wound infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Burns*, 49(5), 1181-1195.

Tomov, A., Kassovsky, V., Chorbadjiiska, L., Tsvetkova, E., Tsanev, N., and Vencheva, Z., 1982, Lytic activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* against bacteria of the family Legionellaceae. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 252(1), 96-100.

Towers, J. C., 2016, *Cooling technology institute*. assets.speakcdn.com [Ziyaret tarihi, 5.01.2025]

Tran, T. T. T., Kannoorpatti, K., Padovan, A., and Thennadil, S., 2021, A study of bacteria adhesion and microbial corrosion on different stainless steels in environment containing *Desulfovibrio vulgaris*. *Royal Society open science*, 8(1), 201577.

Trego, A. C., Mills, S., and Collins, G., 2021, Granular biofilms: function, application, and new trends as model microbial communities. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(15), 1702-1725.

Trøstrup, H., Laulund, A. S. B., and Moser, C., 2020, Insights into host–pathogen interactions in biofilm-infected wounds reveal possibilities for new treatment strategies. *Antibiotics*, 9(7), 396.

Tuson, H. H., and Weibel, D. B., 2013, Bacteria–surface interactions. *Soft matter*, *9*(17), 4368-4380.

Varon, M., ve Shilo, M., 1968, Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 95(3), 744-753.

Videla, H. A., Guiamet, P. S., Gómez de Saravia, S. G., Herrera, L. K., & Gaylarde, C. C. 2004. Environmentally friendly approaches to inhibit biocorrosion. An overview. *International Hx, CORROSION/2004*, March 28–April 1, 2004, New Orleans, Louisiana, Texas: NACE. 04574: 1-11.

Vishwakarma, V., 2020, Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *Journal of basic microbiology*, 60(3), 198-206.

Volkland, H. P., Harms, H., Müller, B., Repphun, G., Wanner, O., and Zehnder, A. J., 2000, Bacterial phosphating of mild (unalloyed) steel. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4389-4395.

Wadood, H. Z., Rajasekar, A., Ting, Y. P., and Sabari, A. N., 2015, Role of Bacillus subtilis and *Pseudomonas aeruginosa* on corrosion behaviour of stainless steel. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40, 1825-1836.

Wakai, S., Eno, N., Mizukami, H., Sunaba, T., Miyanaga, K., and Miyano, Y., 2022, Microbiologically influenced corrosion of stainless steel independent of sulfate-reducing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 982047.

Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., and Uppuluri, P., 2019, Candida albicans biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 52, 1-6.

Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., and Uppuluri, P., 2019, *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 52, 1-6.

Wan, H., Zhang, T., Wang, J., Rao, Z., Zhang, Y., Li, G., ... and Liu, H., 2023, Effect of alloying element content on anaerobic microbiologically influenced corrosion sensitivity of stainless steels in enriched artificial seawater. *Bioelectrochemistry*, 150, 108367.

Wang, J., Li, G., Yin, H., and An, T., 2020, Bacterial response mechanism during biofilm growth on different metal material substrates: EPS characteristics, oxidative stress and molecular regulatory network analysis. *Environmental research*, 185, 109451.

Wang, W., Zhang, H., Liu, P., Li, Z., Lv, J., and Ni, W., 2017, The cooling performance of a natural draft dry cooling tower under crosswind and an enclosure approach to cooling efficiency enhancement. *Applied Energy*, 186, 336-346.

Wang, Y., Wu, J., Zhang, D., Li, E., and Zhu, L., 2021, The inhibition effects of Cu and Ni alloying elements on corrosion of HSLA steel influenced by Halomonas titanicae. *Bioelectrochemistry*, 141, 107884.

Waso, M., Reyneke, B., Havenga, B., Khan, S., and Khan, W., 2021, Insights into *Bdellovibrio* spp. mechanisms of action and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 85.

Wilén, B.-M., Liébana, R., Persson, F., Modin, O., and Hermansson, M., 2018, The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 5005-5020.

Williams, H. N., & Chen, H. (2020). Environmental regulation of the distribution and ecology of Bdellovibrio and like organisms. *Frontiers in microbiology*, *11*, 545070.

Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., ... and Döring, G., 2002, Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of clinical investigation*, 109(3), 317-325.

Wright, G. D., 2005, Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451-1470.

Yang, C., Wang, Q., Ren, Y., Jin, D., Liu, D., Moradi, M., ... and Wang, F., 2021, Corrosion behavior of high nitrogen nickel-free austenitic stainless steel in the presence of artificial saliva and *Streptococcus mutans*. *Bioelectrochemistry*, *142*, 107940.

Yang, Y., Masoumeh, M., Zhou, E., Liu, D., Song, Y., Xu, D., ... and Smith, J. A., 2021, *Streptococcus mutans* biofilms induce metabolite-mediated corrosion of 316L stainless steel in a simulated oral environment. *Corrosion Science*, 182, 109286.

Yates, J., 2021, *Investigating Bdellovibrio predation: novel isolates and bioinformatics studies of predatory enzymes*, Doctoral dissertation, University of Nottingham.

Yin, H., Wang, H., Wang, M., and Shi, B., 2023, The interaction between extracellular polymeric substances and corrosion products in pipes shaped different bacterial communities and the effects of micropollutants. *Water Research*, 247, 120822.

Yu, H., Li, W., Song, X., Zhang, G., and Sun, S., 2023, The divergency of microbiological influenced corrosion for diverse pipe materials in the drinking water distribution system. *Chemical Engineering Journal Advances*, 16, 100559.

Yu, S., Lou, Y., Zhang, D., Zhou, E., Li, Z., Du, C., ... and Gu, T., 2020, Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by nitrate reducing *Bacillus cereus* in simulated Beijing soil solution. *Bioelectrochemistry*, 133, 107477.

Yue, Y., Lv, M., and Du, M., 2019, The corrosion behavior and mechanism of X65 steel induced by iron-oxidizing bacteria in the seawater environment. *Materials and Corrosion*, 70(10), 1852-1861.

Zetsche, E. M., Larsson, A. I., Iversen, M. H., and Ploug, H., 2020, Flow and diffusion around and within diatom aggregates: effects of aggregate composition and shape. *Limnology and Oceanography*, 65, 1818-1833.

Zhang, L., Graham, N., Li, G., Zhu, Y., and Yu, W., 2024, Excessive Ozonation Stress Triggers Severe Membrane Biofilm Accumulation and Fouling. *Environmental Science & Technology*, 58(13), 5899-5910.

Zhang, P., Xu, D., Li, Y., Yang, K., and Gu, T., 2015, Electron mediators accelerate the microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. *Bioelectrochemistry*, 101, 14-21.

Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., and Zhong, N., 2017, Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 7: 36670–36683.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nahdhoit AHAMADA RACHID
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	❒ T.C. ☑ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İskenderiye Üniversitesi (Mısır)
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Mikrobiyoloji/Biyokimya
Mezuniyet Yılı	22.11.2016

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

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

Makale ve Bildiriler

SCI-E, SSCI İndekslerince Taranan Yayınlar

1- Ahamada Rachid, N., & Doğruöz Güngör, N., (2023). Screening of Bioactive Compounds for Biomedical and Industrial Uses from Actinobacteria Isolated from the Parsik Cave (Turkey). Johnson Matthey Technology Revıew , Vol.67, No.2, 159-170.

2- Rachid, N. A., & Gungor, N., (2023). Major Impacts of Caving Activities on Cave Microbial Diversity: Case Study of Morca Cave, Turkey. Internatıonal Microbiology , Vol.26, No.2, 179-190.

3- Elyamine, A. M., Wang, H., Oummu-Kulthum, M. A. H., Raissa, S., Nahdhoit, A. R., Meng, S., ... Tao, P.(2023). Mangroves Leaves Phyllosphere Bacteria Community

and its Ability to Survive Under Pyrene Stress During the Acclimation Process. Marine Environmental Research , Vol.187.

4- Arslan Aydoğdu, E. Ö., Avci, Y., Rachid, N. A., Çolak, B., & Doğruöz Güngör, N., (2023). Screenıng Of Bacterıa In Yarık Sınkhole, Antalya, Turkey For Carbonate Dissolution, Biomıneralization And Biotechnological Potentials Pregled Bakterij V Vrtači Yarık, Antalja, Turčija, V Zvezi Z Raztapljanjem Karbonata, Biomineralizacijo in Biotehnološkim Potenciali. Acta Carsologica , Vol.52, No.1, 147-166.

Kitap Bölümleri

1-Sağlam, N. G., Rachid, N. A., & Güngör, N. D. (2024). Secondary metabolites and biological compounds of actinomycetes and their applications. In Bacterial Secondary Metabolites (pp. 123-145). Elsevier.

2-Doğruöz Güngör, N., Ahamada Rachid, N., & Erdoğan, H. (2024). Microorganisms: Saviors of the Globe Facing the Consequences of Global Warming and Climate Change. Ecological Dynamics in the Face of Climate Change-Exploring Organisms, Habitats, and Behavioral Adaptations (pp.1-23), İstanbul:Nobel Yayınevi.

3- Kimiran A., Battal G., Selim G., Ahamada Rachid N. (2023). Biotechnological Uses Of Marine Microbial Enzymes Mega Allıances With The Mıcro-Worlds The Biotechnological Importance Of Aquatic Microorganisms, Arslan Aydoğdu Elif Özlem, Doğruöz Güngör Nihal, Haspolat Yusuf Kenan, Editör, Orient Publications, Ankara, Ss.123-159.

4-Arslan Aydoğdu, E.Ö., Ahamada Rachid, N., Doğruöz Güngör, N. (2024). Rhizospheric Microbiome: Biodiversity, Significance, and Prospects for Biotechnological Advancements. In: Mathur, P., Roy, S. (eds) Plant Microbiome and Biological Control. Sustainability in Plant and Crop Protection, vol 20. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-75845-4_6

SCI/SCI-E indekleri dışında taranan makaleler

1-Nahdhoit AHAMADA RACHID & Nihal DOĞRUÖZ-GÜNGÖR "Microplastics in Our Planet: Source, Distribution, Effects and Biodegradation." Eskişehir Technical University Journal Of Science And Technology C- Life Sciences And Biotechnology, 2020, 9 (2), Pp.284-303, DOI: 10.18036/Estubtdc.656857

2- Ahamada Rachid N. & Doğruöz Güngör N., Human Activities's Impacts on Cave Microbial Diversity: Perspectives for Cave Microbial Diversity Conservation. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(2): p. 311- 323. DOI: 10.38001/ijlsb.829925

BİLDİRİLER

1-Nahdhoit Ahamada Rachid & Nihal Doğruöz Güngör "Caving İmpacts On Cave Bacterial Diversity: A Case Study Of Camping İn Morca Cave, Turkey''. International

Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (Biotechbiochem 2020) December 16-18, 2020 Www.Biotechbiochem.Org., Pp. 100.

2- Nahdhoit Ahamada Rachid & Nihal Doğruöz Güngör, "Economic Values of Cave Bacteria''. International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (Biotechbiochem 2020) December 16-18, 2020 Www.Biotechbiochem.Org., Pp. 463-468.

3-Nahdhoit Ahamada Rachid & Nihal Doğruöz Güngör, 'Production Potentiality of Bioactive Compounds by Actinobacteria Isolated From Parsik Cave, Turkey' 11th. International Conference on Mathematics, Engineering, Natural And Medical Sciences January 30-31, 2021 Karak, JORDAN, PP. 14. Https://Www.Ejonscongress.Org/

4-Nahdhoit Ahamada Rachid, Elif Özlem Arslan Aydoğdu, Nihal Doğruöz Güngör, 'Polypropylene Degradation Potentials of Cave Bacteria'. 11th. International Conference on Mathematics, Engineering, Natural and Medical Sciences January 30-31, 2021 Karak, JORDAN, PP.15. Https://Www.Ejonscongress.Org/

5- Nahdhoit Ahamada Rachid And Nihal Doğruöz Güngör, "Microplastics In Freshwater Ecosystems: Biodegradation as Potential Solutıon''. III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021, Pp. 179.

6- Nahdhoit Ahamada Rachid, Eda Mulla Özaltun And Nihal Doğruöz Güngör,"How Cave Microbial Diversıty Can Change Under Anthropogenic Impacts?''. III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021, Pp. 180.

7-Nahdhoit Ahamada Rachid And Nihal Doğruöz Güngör, '*Bdellovıbrio Bacteriovorus* in Biofilm and Microbiologically Influenced Corrosıon Inhibitıon'. V. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 18-20 September 2023, Pp. 49-58.

8-Nahdhoit Ahamada Rachid And Nihal Doğruöz Güngör, 'Potential Application of Cannabis and Cannabis Derived Compounds Against Biofilm'. V. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 18-20 September 2023, Pp. 59-65.

9-Nahdhoit Ahamada Rachid & Nihal Doğruöz Güngör, "Microbial Surfactants as Potential Agents of Green and Blue Economy", 3rd Internatıonal Ege Congress On Scıentıfic Research, December 2022, 2024 / İzmir, Türkiye

10-Nahdhoit Ahamada Rachid & Nihal Doğruöz Güngör, "Biotechnological Importance of Predatory Bacteria: Case of *Bdellovibiro Bacteriovorus*", 3rd Internatıonal Ege Congress On Scientific Research, December 20-22, 2024 / İzmir, Türkiye

11- Angar Y., Kebbouche-Gana, S., Khemıli-Talbi, S., Doğruöz Güngör N., Arslan Aydoğdu E. Ö., Ahamada Rachıd. N. Molecular Identification of Biosurfactant

Producing Isolates. Nd International Conference on Bioinformatics (2ICB'24), Bumardas, Cezayir, 13 - 14 Kasım 2024, Ss.1

Yüksek Lisans Tezi

Nahdhoit Ahamada Racahid and Nihal Doğruöz-Güngör "Determination of The Effect of Caving Activities on Cave Microbial Diversity''. MSc. thesis, referans number: 10378587.