

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜREAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ ÜRETEN
LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS U1 BAKTERİSİ İLE
MİKROBİYAL KALSİYUM ÇÖKELİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT CAN AKDEMİR

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2019

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ÜREAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ ÜRETEN
LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS U1 BAKTERİSİ İLE
MİKROBİYAL KALSİYUM ÇÖKELİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT CAN AKDEMİR

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

MURAT CAN AKDEMİR tarafından hazırlanan "ÜREAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ ÜRETEN *LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS* U1 BAKTERİSİ İLE MİKROBİYAL KALSİYUM ÇÖKELİMİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 21.08.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN
Pamukkale Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Gürkan SEMİZ
Pamukkale Üniversitesi

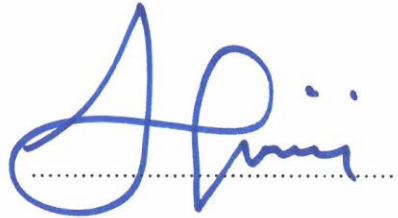
Üye
Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR
Dokuz Eylül Üniversitesi


.....

.....

.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
04/09/2019 tarih ve 35/35... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

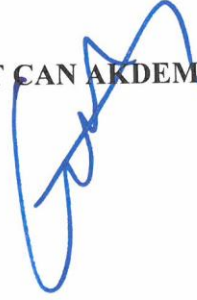

.....

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

MURAT CAN AKDEMİR



ÖZET

ÜREAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ ÜRETEN *LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS* U1 BAKTERİSİ İLE MİKROBİYAL KALSİYUM ÇÖKELİMİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MURAT CAN AKDEMİR
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)
DENİZLİ, AĞUSTOS - 2019

Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen kalsiyum karbonat (CaCO_3) çökeli mi, doğal ortamda ve laboratuvar şartlarında yaygın bir olaydır. Kalsiyum karbonat, çevre dostu bir ürün olup kalsiyum mineralizasyonu için çeşitli sayıda mikroorganizma araştırılmaktadır. Bu yüzden bu araştırmanın amacı, yerel bir izolat olan *Lysinibacillus fusiformis* U1 suşunun kalsiyum karbonat çökeli mi kapasitesini araştırmaktır. Bu amaçla, iki kültür ortamı (standart KMO ve LB-mineralizasyon) kullanılmıştır. Çalışmada her iki besi ortamına %5 oranında yeast ekstrakt da ilave edilmiştir. Ayrıca bakterinin üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri de belirlenmiştir. CaCO_3 'ın morfolojik yapısı ve mineral tipi SEM-EDX ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, KMO besiyerinde CaCO_3 miktarı inkübasyonun 96. saatinde 172.80 mg/L iken, LB mineralizasyon ortamı 24 saatlik inkübasyon sonunda 163.20 mg/L'dir. FTIR and SEM-EDX analizi yle de kalsit kristallerinin varlığı doğrulanmıştır.

ANAHTAR KELİMELE R: Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Çökeli mi, Üreaz, Karbonik Anhidraz, *Bacillus*

ABSTRACT

**MICROBIAL CALCIUM MINERALIZATION FROM UREASE AND
CARBONIC ANHYDRASE PRODUCING *LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS* U1**

MSC THESIS

MURAT CAN AKDEMİR

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, AUGUST 2019

Calcium carbonate precipitation by microorganisms is a common process in natural environment and laboratory conditions. The bacterial calcium carbonate is an environmentally friendly product and numerous microorganisms are being investigated for calcium mineralization. The aim of this research was therefore to investigate the efficiency of calcium carbonate precipitation of local isolate *Lysinibacillus fusiformis* U1. For this reason, two culture media (standard CMP and LB-mineralization) were used in our study. And 5% yeast extract was added in CMP and LB-mineralization. Urease and carbonic anhydrase enzyme activities were also determined. The morphological characterization of CaCO₃ and its mineral type were analysed by Scanning Electron Microscope (SEM-EDX) and Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR). As a result of our study, the amount of CaCO₃ was 172.80 mg/L in KMO medium at 96th hours and 163.20 mg/L at 24 hours in LB mineralization medium. The calcite crystals were verified by FTIR and SEM-EDX analysis.

KEYWORDS: Microbial Calcium Mineralization, Urease, Carbonic Anhydrase, *Bacillus*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	ix
SEMBOL LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
2. TEZ KONUSU VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1 Çalışmanın Amacı	9
3. YÖNTEM	10
3.1 Materyaller	10
3.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	10
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	10
3.1.3 Kullanılan Bakteri	11
3.1.4 Kullanılan Besiyerleri	11
3.2 Metodlar	12
3.2.1 Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi	12
3.2.2 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	13
3.2.3 Kalsiyum Karbonat Miktarının Belirlenmesi	13
3.2.4 Amonyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi	14
3.2.5 Lowry ile Protein Tayini	15
3.2.6 Protein Seviyesinde Eksresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi: Western Blot	15
3.2.7 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizleri.....	17
3.2.8 Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizleri	17
4. BULGULAR	18
4.1 Üreaz Aktivitesi.....	18
4.2 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi.....	19
4.3 Bakteriyal CaCO ₃ Çökeltmesi	19
4.4 Amonyum Konsantrasyonu	21
4.5 Western Blot Sonuçları	22
4.6 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	23
4.7 Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR) İncelemeleri ..	24
5. TARTIŞMA	26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
7. KAYNAKLAR	33
8. ÖZGEÇMİŞ	40

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: Bakteri hücresinde kalsiyum karbonat mineralizasyonu	5
Şekil 2: Protein Konsantrasyonu Formülü	15
Şekil 3: Standart (Amonyum sülfat) kalibrasyon eğrisi	18
Şekil 4: Standart (<i>p</i> -nitrofenol) kalibrasyon eğrisi	19
Şekil 5: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1 bakterisinin yeast extract ilaveli KMO ve LB mineralizasyon ortamlarında ürettiği kalsiyum karbonat halkalar şeklinde erlen cidarlarında görülmektedir.....	20
Şekil 6: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1 bakterisinin Western Blot Jel görüntüsü (ALP görüntüleme metodu ile)	23
Şekil 7: Bakteriyel CaCO ₃ 'ün SEM-EDX analizi.....	24
Şekil 8: Yeast extract ilaveli KMO besiyerinde CaCO ₃ 'ün FTIR analizi (96 saatlik inkübasyon)	25
Şekil 9: LB Mineralizasyon besiyerinde CaCO ₃ 'ün FTIR analizi (24 saatlik inkübasyon).....	25

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Western Blot jel içerikleri	16
Tablo 2: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1'in yeast extract ilaveli KMO besiyerindeki üreaz aktivitesi ölçüm değerleri ($\mu\text{mol/dk/ml}$).....	18
Tablo 3: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1'in LB Mineralizasyon besiyerindeki üreaz aktivitesi ölçüm değerleri ($\mu\text{mol/dk/ml}$).....	18
Tablo 4: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1'in yeast extract ilaveli KMO ve LB Mineralizasyon besiyerindeki karbonik anhidraz ölçüm değerleri (nmol/dk/mg).	19
Tablo 5: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1'in yeast extract ilaveli KMO besiyerinde ürettiği CaCO_3 miktarı (mg/L) ve son pH değerleri.	20
Tablo 6: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1'in LB Mineralizasyon besiyerinde ürettiği CaCO_3 miktarı (mg/L) ve son pH değerleri.	21
Tablo 7: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1'in yeast extract ilaveli KMO besiyerindeki amonyum konsantrasyonu (mg/L).....	22
Tablo 8: <i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1'in LB Mineralizasyon besiyerindeki amonyum konsantrasyonu (mg/L).	22

SEMBOL LİSTESİ

°C	: Celcius derecesi
µm	: Mikrometre
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
CaCO₃	: Kalsiyum karbonat
cm	: Santimetre
cm³	: Santimetre küp
CO(NH₂)₂	: Üre
CO₂	: Karbondioksit
CO₃²⁻	: Karbonat İyonu
dH₂O	: Distile su
dk	: dakika
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
g	: Gram
H⁺	: Hidrojen iyonu
H₂O	: Su
kg	: Kilogram
KMO	: Kalsiyum mineralizasyonu ortamı
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mm³	: milimetreküp
m³	: Metreküp
CaSO₄	: kalsiyum sülfat
Ca₃(PO₄)₂	: kalsiyum fosfat
pH	: Hidrojen potansiyali
NH₃	: Amonyak
NH₄⁺	: Amonyum iyonu
OH⁻	: Hidroksil iyonu
PVC	: Polivinil klorür
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
EDX	: Enerji Yayılımlı X-ışını Analizi
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
MICP	: Mikrobiyal kaynaklı kalsit çökeltme
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
KMO	: Kalsiyum Mineralizasyon Ortamı
LB	: Luria Bertani
NaCl	: Sodyum klorür
ALP	: Alkalen Fosfatez

ÖNSÖZ

2016-2019 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'ın tez danışmanlığı ve Prof. Dr. Şevki ARSLAN'ın eş danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma, yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

İlk olarak yüksek lisans süresi boyunca her türlü destek ve katkılarını hiç esirgemediği, bildiği tüm bilgi ve becerilerini paylaşmaktan çekinmediği, yüksek lisans eğitimi yan sıra bana kattığı onlarca tecrübe ve hayat dersi için danışman hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

Tezime yaptığı desteklerden dolayı eş danışmanım olan Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a

FTIR analizlerimi yapmam için laboratuvarını benimle paylaşan Kimya Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Aykut DEMİRÇALI hocama,

Laboratuvar çalışmalarına başladığım ilk günden beri öğrettiği ve paylaştığı her şey için Tuğba ŞENSOY CANDOĞAN'a

Aynı ortamda çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum ve her durumda desteğini hiç esirgemeyen iyilik dolu yüreğe sahip Kübra Betül SOLMAZ'a

Bu yola başlarken verdiğimiz çabayı dün gibi hatırladığım ve bu yolda bana her zaman destek olan Buket KABALAY ve Yağmur ÖZYILMAZ'a

Her türlü konuda yardım aldığım tüm Bakteriyoloji Laboratuvarı öğrencileri ve Nur BOZBEYOĞLU'na

Beslenme Diyet Birimine' ne ve yardımlarından ötürü Kübra NOYAN'a,

Güzel yürekli ve yardımsever olma unvanına sahip Elif KALE'ye

Bana bir karşılık beklemeden sevmeyi öğreten ve benim ruhumun gizli mimarı o koca yüreğe,

Yüksek lisans sürecimin en başından en sonuna kadar her anımda ve hayatımın 20 yılı boyunca hep destekçim olan Gamze GÜREL ve Gözde GÜREL'e,

En önemlisi bu uzun ve yorucu dönemde her anımda maddi manevi destek olan benim koruyucu meleklerim Özden AKDOĞAN, Özlem GÜLCAN, Senem GEZEN'e ve benim bu dünya üzerinde anlam kazanmama sebep olan Emine AKDEMİR ve İskender AKDEMİR'e son olarak da kalbimde yeri hiç değişmeyecek benim yoldaşım kelim Apple'a varlıklarını hissettirdikleri için şükrediyor ve en içten teşekkürlerimi borç biliyorum.

1. GİRİŞ

Biyomineralizasyon, canlı organizmaların oluşturduğu tüm ya da kısmî mineralleşme demektir. Günümüzde biyomineralizasyon yöntemi canlı organizmalar ile biyolojik onarım, biyoçimentolama, zemin iyileştirme gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar, dünyada gerçekleşen tüm biyojeokimyasal döngülerde önemli rollere sahiptirler. Yaşamsal süreçlerinde çok çeşitli mineralizasyon olaylarında aktif oldukları gibi minerallerin depolanmasına da katılırlar. Doğal yaşamlarında mikroorganizmalar karbon dioksit ile kalsiyum iyonu arasındaki temastan kaynaklanan karbonat minerallerinin biyolojik çökeltilmesine aracılık ederler. Canlılar tarafından minerallerin oluşumu olan biyomineralizasyon hemen hemen yeryüzünde yaşayan tüm canlılarda gerçekleşen doğal bir olay olmakla birlikte her organizma mineral sentezinde farklı mekanizma kullanır. Yer kabuğu, traverten, inci, toprak ve mercanların kabuğuna kadar birçok yerde bulunan kalsiyum karbonat, biyomineralizasyon ile üretilen en yaygın mineraldir (Yıldırım ve diğ. 2016). Birçok çalışma olmakla birlikte, bakterilerin karbonat çökelimindeki rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Biyomineralizasyonda mikroorganizmaların faaliyetlerinin çözümlenmesi ile traverten korunması ve temizlenmesi (Morales ve diğ. 2019), anıtsal kalker taşlarının korunması ve arkeolojik ürünlerin onarımı (Dick ve diğ. 2006), çatlak dolgu materyali (Bachmeier ve diğ. 2002), inşaat ve çevre biyoremediyasyon (Tittelboom ve diğ. 2010) gibi endüstriyel alanlarda kullanılabilecek çok yönlü malzemelerden birinin ekonomik ve ucuz olarak üretilmesi mümkün olacaktır. Mineralizasyon olayı, doğada kendiliğinden meydana gelen biyolojik ve kimyasal olaylardır. Biyomineralizasyon olayı ise mineralleşme olarak belirtilmekte ve bu özellikle prokaryot canlılar tarafından meydana getirilir. Biyomineralizasyon sürecinde kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) ile oluşturulan biyopolimerler özellikle $Ca_3(PO_4)_2$ (kalsiyum fosfat), $CaSO_4$ (kalsiyum sülfat), $CaCO_3$ gibi mineralli bileşiklerdir (Knoll 2003). Mikrobiyal $CaCO_3$ çökelişi, toprak, su ve denizlerde kendiliğinden gerçekleşen yaygın bir prosestir (Canaveras ve diğ. 2001).

$CaCO_3$; çimento, plastik, kırtasiye, mürekkep, floresan markör ve kauçuk gibi (Yoshida ve diğ. 2010) çeşitli uygulamalarda da MICP yöntemi ile elde edilebilir

(Dhami ve diğ. 2013). Mikroorganizmaların onarım konusunda doğada kendi kendine yaptığı iyileştirmenin yanı sıra laboratuvar ortamında da onarım çalışmaları yapılmaktadır. Mikrobiyal mineral çökelme teknolojisi, aslında kum sütunların birleştirilmesinde (Stocks-Fischer ve diğ. 1999), kalker (kireçtaşı) anıtların onarımında (Dick ve diğ. 2006; Rodriguez-Navarro ve diğ. 2003) ve sınırlı olmakla birlikte beton çatlakların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Bang ve diğ. 2001).

Belirlenen farklı besiyeri koşullarında farklı üreme ve biyomineralizasyon sonuçları ortaya çıkmaktadır. Ortamda mevcut olan maddelere göre değişen ve gelişen şartlar oluşmaktadır. Besiyerindeki madde miktarı ve çeşidine göre biyomineralizasyon oranları değişmektedir.

Dünya'nın kendi kendini iyileştirme özelliği vardır. Bu da bünyesinde taşıdığı canlıların metabolik faaliyetleriyle doğal olarak bağlantılıdır. Toprağın oluşumundan insan barsak sisteminin dengeli çalışmasına dek sayılamayacak önemli olaylarda kilit noktalarda mutlaka mikroorganizmalar mevcuttur. Önemli olan bu canlıların en verimli olanının tespit edilerek endüstriyel uygulamalarda insanoğlunun hizmetine sunulmasıdır. Bu amaçla yapılan son yıllardaki güncel çalışmalardan biri de üreolitik bakterilerle kalsiyum karbonat çökelişi olup, zemin iyileştirme, beton güçlendirme, mikrobiyal çatlak dolgusu, kendi kendini temizleyebilme, su geçirmezliği, zararlı atık barındırmama gibi bakteriler kullanılarak endüstride ihtiyaç duyulan kaynakların düşük maliyetlerle üretimidir. Cheng ve Cord-Ruwish (2012), *Bacillus sphaericus* ile zemin iyileştirmeyi amaçlamıştır. Bunun için hazırladıkları saf silika kumundan yapılmış kolonlardan, bakteri kültürü ve saf su içeren sıvıyı geçirmişlerdir. Deney tamamlandığında toplam amonyum nitrojen konsantrasyonu, kalsiyum iyonlarının varlığı, biyokütle konsantrasyonu ve üre aktivitesinin miktarının ölçülmesi gibi parametreler saptanmıştır. Zemin iyileştirmeye olumlu yönde etkisi olduğu rapor edilmiştir. Aynı şekilde, Ferris ve diğ. (1996) da yaptıkları mikrobiyal iyileştirme sonucu permeabilitenin %15 ila %20 oranında azaldığını tespit etmişlerdir. Benzer bir diğer çalışmada ise Whiffin ve diğ. (2007) ise %22-%75 arasında permeabilitede bir azalma gözlemlemişlerdir. Dejong ve diğ. (2006) ise mikrobiyolojik olarak direnci arttırlarken zemin oturmada azalma rapor etmişlerdir. Dejong ve diğ. (2010) zemin iyileştirme deneylerinde permeabiliteyi 10^{-3} ve sıkıştırılabilirliği 10^{-2} oranında azaltırlarken, rijitliği ve kayma direncini 10^2 kat arttırmışlardır. Paassen (2009)'a

göre, 60 kg/m³ kalsiyum karbonat konsantrasyonuna kadar zemin direncinde anlamlı farklılık görülmezken bu değerin üstündeki dirençlerde önemli iyileşmeler olmuştur.

Küçük fabrikalar olarak düşülen mikroorganizmaların gelişme koşulları iyileştirilerek üretilen kalsiyum karbonat miktarı ve üretim zamanı istenilen seviyelere çekilebilir. Günümüzde bu amaçla özellikle üreaz aktivitesine sahip *Bacillus* cinsi bakteriler sıklıkla kullanılmaktadır.

Dünya ve Türkiye’de artan nüfus beraberinde birçok sorunu da ortaya çıkarmaya devam etmekte ve günümüzde nüfus artışının sebep olduğu sorunların başında barınma sorunu gelmektedir. Barınma sorununu ortadan kaldırmak için her yeni günde yeni yapılaşmalar başlamakta ve bu da doğaya ve çevreye zarar veren beton, çimento, demir gibi maddeler ile olmaktadır. Bilindiği gibi, çimento üretimi yapan fabrikaların çevreye olan olumsuz etkisine rağmen fabrikaların çevre koruma bilincine göre aldığı önlemler yetersizdir. Çimento üretiminde sıcaklık, toz, toksik ve alerjik kimyasal maddeler, ağır metaller ve atık gazlar çevreye çok zarar vermektedir (Marlowe ve Mansfield 2002; Al Smadi ve diğ. 2009; Küçük, 2009).

2. TEZ KONUSU VE LİTERATÜR TARAMASI

Bakteriyal kalsiyum karbonat mineralizasyonu konusunda yapılan çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir (Achal ve Mukherjee 2015; Bang ve diğ. 2001; Ghosh ve diğ. 2005; Jonkers ve Loosdrecht 2010; Muynck ve diğ. 2008^{a,b}). Kalsiyum karbonat mineralizasyonu, kimyasal bir süreçtir. Kültür ortamında bakterilerin gerçekleştirdiği reaksiyon sonucunda öncelikle amonyum ve karbonat oluşmaktadır. Sonrasında kültür ortamına belirli miktarda CaCl_2 eklendiğinde ise karbonat ve kalsiyum iyonları arasındaki reaksiyon sonucunda pH seviyesinin yükselmesi ile kalsiyum karbonat çökelişi gerçekleşir (Cheng ve Cord-Ruwisch 2013).

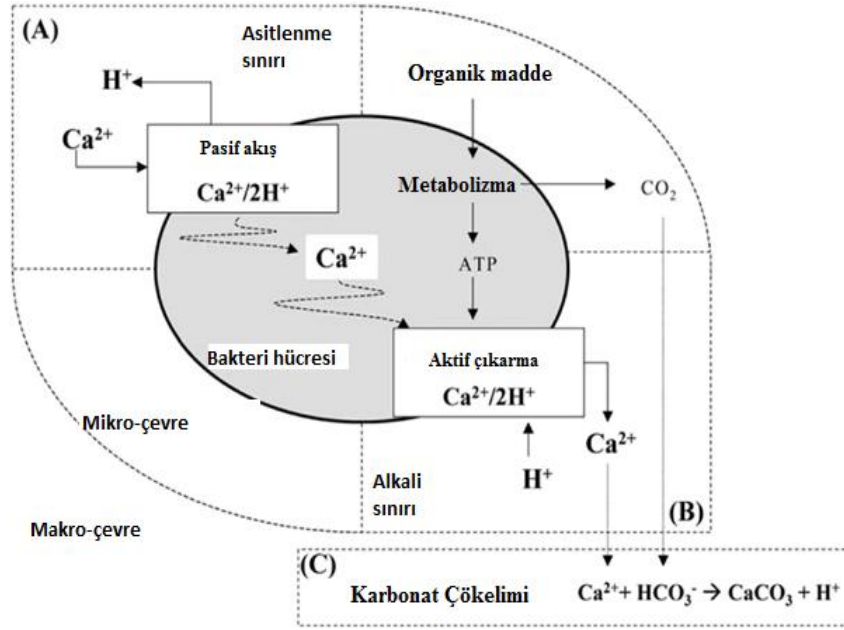
PVC üretiminde ve seramik sektöründe de yapı malzemesi olarak yararlanılabilmektedir. Sağlık alanında kronik böbrek yetersizliğinde besinlerdeki fosforu bağlayarak fosfatlı bileşiklerin dengelenmesinde kullanıldığı da bilinir (Cozzolino ve diğ. 2005). Ayrıca gıda sektöründe ise kalsiyum karbonat E170 adında bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Aguilar ve diğ. 2011).

Bağımsız çevre koşullarına göre kalsiyum karbonat minerali sentezlenir. Kontrollü mineralizasyon örnekleri arasında magnetotaktik bakterinin manyetit oluşturması (Bazylinski ve diğ. 2007); *Coccolithophores* ve diatomların oluşturduğu silisler örnek olarak verilebilir (Barabesi ve diğ. 2007). Tuzluluk ve ortamın kompozisyonu gibi abiotik faktörler kadar bakteri tipi de kalsiyum karbonat mineralizasyonuna önemli boyutlarda katkı sağlamaktadır (Rivadeneira ve diğ. 2004; Muynck ve diğ. 2008^a). Bakteriler tarafından üretilen kalsiyum karbonat indüklenmiş olarak kabul edilmekte ve üretilen kalsiyum karbonat mineralinin tipi büyük ölçüde çevre koşullarına bağlıdır (Rivadeneira ve diğ. 1994).

CaCO_3 mineralizasyonu, yeterli miktarda kalsiyum ve karbonat iyonlarına gereksinim duyar. Karbonat iyon konsantrasyonu, sucul sistemin pH'sı ve çözülmüş inorganik karbon konsantrasyonu ile ilişkilidir. Buna ek olarak, çözülmüş inorganik karbon konsantrasyonu, sıcaklık ve karbon dioksit kısmi basıncı gibi çeşitli çevresel parametrelere de bağlıdır. Kalsiyum karbonat çökelişi, genel olarak dört ana faktör tarafından yönetilen kimyasal bir işlem olup oldukça basittir. Bunlar; 1-kalsiyum

konsantrasyonu, 2-çözülmüş inorganik karbon konsantrasyonu, 3-pH ve 4-çekirdeklenme alanlarının durumu şeklindedir (Hammes ve Verstraete 2002).

Mikrobiyal aktivite ile üretilen kalsiyum karbonat, hem doğal hem de yapay olmak üzere üretilen katılaştırma (çimentolaşma) maddesidir. Önerilen bakteriyel kalsiyum metabolizması şeması ve sonrasındaki oluşan CaCO_3 çökelişi Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: Bakteri hücresinde kalsiyum karbonat mineralizasyonu (Achal ve diğ. 2015)

Mikrobiyal mineral çökeltme teknolojisi, aslında kum sütunların birleştirilmesinde (Stocks-Fischer ve diğ. 1999), kalker (kireçtaşı) anıtların onarımında (Dick ve diğ. 2006; Rodriguez-Navarro ve diğ. 2003), sınırlı olmakla birlikte beton çatlakların iyileştirilmesinde (Bang ve diğ. 2001; Bachmeier ve diğ. 2002), kumlu zeminlerin iyileştirme (Akyol ve diğ. 2017), kendi kendini temizleyebilme (Morales ve diğ. 2019), su geçirmezlik (Wang ve Liapis 2012), antimikrobiyal etki (Khezerlou ve diğ. 2018) ve doğal yollarla onarım sağlama (Tittelboom ve diğ. 2010) gibi bir çok konuda kullanılmaktadır. Bu nedenle üreolitik bakteriler, son zamanlarda arkeoloji, inşaat, jeoloji ve çevre mühendisliğin birçok bölümünde gündemdedir ve bu tür bakterilerle çevre dostu materyallerin üretimi ile ilgili bilimsel çalışmalar yoğun ilgi görmektedir.

Kalsiyum karbonat çökelişini indüklemek üreazın doğadaki başka bir önemli işlevidir. Süreç; üre hidrolizinden üretilen karbonat iyonları ve reaksiyon sırasında

artan pH miktarı sayesinde ortamda bulunan Ca iyonları varlığında CaCO_3 çökmesi meydana gelir. Üreaz doğada birçok öneme sahip olması dışında biyometrik bir şekilde gerçekleşir ve üreaz destekli bir CaCO_3 mineralizasyonu yaparsa hafif mühendislik koşulları altında çevre dostu, iyileştirme amacıyla kullanılan yenilikçi bir uygulama sunmaktadır (Krajewska ve diğ. 2018).

Mikrobiyal mineral çökme; mikroorganizma tipi, iz yol ve ortam çeşitliliğine bağlıdır. Üreolitik bakteriler üreaz enzimi ile kalsiyum karbonatı çöktürmektedirler. Bu enzim, üreyi karbondioksit ve amonyağa katalizleyerek pH'nın ve karbonat konsantrasyonunun artışına neden olmaktadır. Yüksek oranda doygunluğa ulaşıldıktan sonra, bakteriyel hücre duvarlarında heterojen bir çekirdeklenme ile kalsiyum karbonat kristalleri mineralize olmaktadır. Abdul Khalil ve diğ. (2018), dört farklı kum numunesinin kantitatif analizlerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kumun ana bileşeni olan kuvarsın en bol bileşik olduğu tespit edilmiştir. Bakteri tarafından tıkanmış kolonun toplam ağırlığının % 30,2'sinin kalsit olduğu belirlenirken canlı bakteri hücresi olmayan kolonda kalsite rastlanmamıştır. Bununla birlikte, ölü hücrelerin bulunduğu sütunda glenitin çöktüğü, canlı hücrelerde ise kalsitin çöktüğü bulunmuştur. SEM analizinde de sediment numunelerinde ve kalsit kristallerinin ortasında bozulmamış basil olarak fosilleşmiş bakteri hücrelerini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar bakterilerle ilişkili kristal kalsit varlığının bakterilerin mineralizasyon sırasında çekirdeklenme bölgeleri olarak görev yaptığını rapor etmişlerdir (Abdul Khalil ve diğ. 2018).

Dünyada en ucuz ve en bol bulunan minerallerden biri olan kalsiyum karbonat, kalsit, vaterit ve aragonit olmak üzere üç polimorf yapıdan oluşmaktadır. Polimorflarından biri olan kalsit, kâğıt, boya, plastik, kauçuk, ilaç ve tarım endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan bir dolgu maddesidir (Yoshida ve diğ. 2010).

Doğal bir minarel olan kalsiyum karbonat çoğu zaman kayalardan elde edilmektedir. Üretim sürecinde ortaya çıkan ses, hava ve su kirliliği gibi problemler önemli çevresel sorunlar yaratmaktadır. İstenmeyen bu tür çevresel etkiyi azaltmak için mikrobiyal kaynaklı kalsit çökeltme (MICP) doğal ve sürdürülebilir bir yaklaşım için bir alternatif olabilir Hücre konsantrasyonu, sıcaklık, pH, üre ve kalsiyum

konsantrasyonları gibi çeşitli çevresel faktörlere göre bakteriyel mineralizasyonunun kontrol edilebilmesi önemli bir avantajdır (Anbu ve diğ. 2016).

Son on yıldan beri, deniz yosunu yüksek potansiyel biyopolimerlerden biri olarak kabul edilir (Abdul Khalil ve diğ. 2018). Deniz yosunundan biyolojik olarak parçalanabilir CaCO_3 dolgulu bir kompozit film üretmişlerdir. Kompozit materyelin SEM analizi ile mikrobiyal CaCO_3 ve kimyasal CaCO_3 'in oluşturduğu kalsiyum, oksit ve karbon varlığı doğrulanmış ve mikrobiyal CaCO_3 'deki Ca oranının atomik olarak kimyasal CaCO_3 'den daha iyi olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca araştırmacılar FTIR sonuçlarına göre, mikrobiyal CaCO_3 'in kimyasal CaCO_3 'dan daha çok su tutma kapasitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Kalsiyum karbonat presipitasyonu, hücre içi veya hücre dışı inorganik ve organik bileşiklerin katılaşmasını sağladığı için önemli bir biyojenik süreçtir. Bu nedenle mikrobiyal CaCO_3 'a günümüzde "biyoçimento" denilmektedir. Çevre dostu olması açısından yeşil çimento da denilen bu ürün, bilim camiasında dikkat çekmiştir (Rong ve Qian 2012).

Günümüzde üzerinde fazlaca durulan ve mikrobiyoloji mühendisliğinin ortaya çıkmasına neden olan biyoçimento tekniği, bina yapılarında dayanıklılık arttırmak için uzun vadeli onarım aracı olarak son derece umut vericidir (Achal ve Mukherjee 2015; Bang ve diğ. 2001; Ghosh ve diğ. 2005; Jonkers ve diğ. 2010; Muynck ve diğ. 2008^a). MICP ile sağlanan başarı bu sürecin çeşitli alanlardaki keşfine ilk adım olmuştur. Ağır metallerin ve radyonüklitlerin biyoremediyasyonunda (Kang ve diğ. 2016), petrol rezervlerinden petrolün tekrar kazanımının geliştirilmesinde (Stocks-Fischer ve diğ. 1999) ve kum sütunlarının güçlendirilmesinde (Dejong ve diğ. 2006) başarıyla uygulanabildiği kayıt edilmiştir.

Bakteriler metabolik aktiviteleri sonucu, kalsiyum karbonat üretir ve çatlakları onarır iyileştirir. Karbonatın çökmesine neden olabilecek birçok mikrobiyal işlem vardır. Halen, birçok çalışma, üreaz enzimi tarafından üre hidrolizine odaklanmaktadır (Le Metayer-Levrel ve diğ. 1999) Çatlaklar tamamen kalsiyum karbonatla doldurulduktan sonra, bakteri uyku haline geri döner. Gelecekte ise herhangi bir çatlak oluşursa, bakteriler aktif hale gelir ve çatlakları doldurur. Bu

yöntem bize bakteriler uzun süreli iyileştirici bir ajan mekanizması olarak hareket edebildiklerini göstermiştir (De Belie ve diğ. 2016).

Bazı mikroorganizmalar, kalsiyum karbonatı üreaz yoluyla çökeltme kabiliyetine sahiptir. Literatür taramaları bazı bakterilerin mikrobiyal çökeltme yaptıklarını ortaya çıkarmıştır. *Bacillus subtilis* bakterileri, hafif agrega ve grafit nano plateletlerle betonun gücünü artırabilir (Khaliq ve diğ. 2016). *Bacillus aerius* bakterileri pirinç kabuğu külü betonda incelenmiş ve betonun dayanıklılığının arttığı görülmüştür (Siddique ve diğ. 2016). *Bacillus megaterium* bakterileri ise betonda kullanılmış ve sonuçlar %24 basınç dayanımında artış olduğunu göstermiştir (Andalib ve diğ. 2016), diğer yandan da betonda kalsiyum karbonatın *Bacillus sphaericus* tarafından biriktirilmesi, betonun dayanıklılığını artırdığı ortaya çıkmıştır (Wang ve diğ. 2014). Uçucu kül betonunda kullanılan *Sporosarcina pasteurii* bakterileri, uçucu kül betonunun kendi kendini iyileştirici etkisi ile dayanıklılık ve dayanıklılıkta önemli gelişme olduğunu göstermiştir (Chahal ve diğ. 2012). Silika duman betonunda kullanılan *Sporosarcina pasteurii* bakterileri sayesinde silika duman betonunun kendi kendini iyileştirici etkisi ile dayanıklılığında ve sağlamlığında bir iyileşme olduğu tespit edilmiştir (Chahal ve diğ. 2012). *Bacillus sphaericus* bakterileri, yüzey işlemlerini kontrol etmek için betonda kullanılmış ve sonuçlar, bakteriyel karbonat çökeltmesinin beton için alternatif bir yüzey işlemi olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Muynck ve diğ. 2008^b).

Bakteri sporu tozunun betona eklenmesi, sağlanan kalsiyum kaynağına bağlı olarak betonun sertleşme süresini hızlandırır. Bakterilere besleyici maddeler olan kalsiyum laktat, kalsiyum nitrat ve kalsiyum format formunda verilir. Kalsiyum laktat ilavesi, sertleşme süresini geciktirebilir, kalsiyum format ve kalsiyum nitrat, betonun sertleşme süresini hızlandırdığı tespit edilmiştir (Luo ve diğ. 2015; Zhang ve diğ. 2015).

Vijay ve diğ. (2017) çalışmanın önemini, betondaki çatlakların iyileşmesinde *Bacillus subtilis*, *Bacillus pasteurii* türleri gibi üreaz üreten bakteri izolatları kullanılması sayesinde olduğunu söylemektedir. Çalışma, çatlakları iyileştirmede kullanılacak farklı bakteri türlerini gözden geçirmiştir. Aynı zamanda basınç dayanımı için bakterilerin olumlu bir etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. Su penetrasyonunu ve klorür iyonu geçirgenliğini azaltmasından dolayı bakteri

kullanmanın daha avantajlı olduğunu vurgulamıştır. Bu çalışmanın sonuçları, mikrobiyal beton kullanmanın, alternatif ve kaliteli bir beton için sızdırmazlık maddesi olabileceğini öngörmektedir. Uygun maliyetli, çevre dostudur ve sonuç olarak yapı malzemelerinin dayanıklılığında iyileşmeye yol açacağını ortaya koymuştur diye açıklamıştır (Vijay ve diğ. 2017).

2.1 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada üreolitik toprak bakterisi olan *Lysinibacillus fusiformis* U1 suşu ile bakteriyal kalsiyum karbonat çökelimi (CaCO_3) amaçlanmıştır. Bunun için kullanılan U1 suşu yerel bir izolat olup bakterinin CaCO_3 çökelim kapasitesi araştırılmıştır. Çalışmada, bakterinin üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitesi de belirlenmiş, yeast extract ilavesinin hem enzim aktivitesi hem de kalsiyum çökelimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bakteriyal CaCO_3 'ün morfolojisi ve mineral tipi SEM ve FTIR ile karakterize edilmiştir.

3. YÖNTEM

3.1 Materyaller

3.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Amonyum Klorür (VWR,470300-194), Magnezyum Sülfat (Merck, 106067), Amonyum (Merck, 109162), Eriokrom Siyahı T (Sigma, 1787-61-7), Sodyum Klorit (Merck, 106406), Sodyum Bikarbonat (VWR,144-55-8), Kalsiyum Klorür (Sigma, 10043-52-4), Üre (Sigma, 57-13-6), Disodyum Fosfat (Merck, 7558-79-4), Mono Potasyum Fosfat (Scarlab, SO10060250), Glukoz (SigmaAldrich, 50-99-7), Agar (SigmaAldrich, 9002-18-0), Nutrient Agar (Merck, N9405-500G), Nutrient Broth (LabM, LAB068), Fenol Red (Merck, P3532), Bakır (II) Sülfat (Merck, 102790), Sodyum Potasyum (Merck, 108087), Sodyum Karbonat (Merck, 106392), Folin (Sigma), Yeast extract (LabM, MC001), Tripton (Fluka, 70169), Agar (SigmaAldrich, 05039), Meat Extract (Merck, 103979).

Bu çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik derecede ve yüksek saflıkta olacak şekilde ticari kaynaklardan elde edilmiştir.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Santrifüj (Hettich Micro 220 R), Otoklav (Nüve OT 4060V), (Hiclave HVE-50), Dikey Elektroferez Aparatı (Scie-plus), Transfer düzeneği (BİO-RAD Trans Blot), OrbitalShacker (Alfagen OS-200), Vorteks (Dragon Lab MX-F), Spektrofotometre (Lange DR 5000), Terazı (Radwag AS 220/C/2), Mikrodalga Fırın (SHOV M7017-P), Güç Kaynağı (MS, MP-300X), Etüv (Nüve EN120), Çalkalamalı Etüv (ZHİCHENG ZHWY-111B), Kuru Hava Steril Fırını (Nüve FN120), Sonikasyon Cihazı (Bandelin D-12207 UW 2070), Distile Su Cihazı (Human-ZeneerPower I), FTIR (Perkin Elmer- Spectrum Two).

3.1.3 Kullanılan Bakteri

Çalışmada kullanılan üreolitik *Lysinibacillus fusiformis* U1 suşu, Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir.

3.1.4 Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri aşağıda verilmiştir:

Üre Broth-Agar besiyeri (g/L):

Pepton	1
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	0,8
Glukoz	1
Fenol red	0,012

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak distile suda çözülmüş ve pH 7'ye ayarlanmıştır. 115°C'de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra içine Sartorius marka 0,22 µm çaplı filtre ile steril edilen %40'luk üre stoğundan 100 ml besiyerinde 5 ml olacak şekilde üre ilave edilmiştir. Katı besiyeri için de sıvı besiyerine 17 g/L Agar ilave edilmiştir.

LB, LB üre ve LB mineralizasyon besiyeri (g/L)

Tripton	10
NaHCO ₃	2,10
Yeast extract	5
CaCl ₂	2,77
NaCl	10

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak distile suda çözülmüş ve pH 7'ye ayarlanmıştır. 115°C'de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra içine Sartorius marka 0,22 µm çaplı filtre ile steril edilen 2M'lık üre stoğundan 333mM olacak şekilde üre ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine ürenin etkisinin anlaşılması amacıyla LB üre besiyerinden NaHCO₃ ve CaCl₂ çıkarılmıştır.

LB-üre besiyerinde mineralizasyon çalışması sırasında yukarıda belirtilen besiyerine NaHCO₃ (2,10 g/L) ve CaCl₂ (2,77 g/L) ilave edilmiştir.

Kalsiyum Mineralizasyon Besiyeri (KMO) g/L cinsinden Pepton From Meat 1,875; Meat Extract 1,125; NaHCO₃ 2,1003 ve CaCl₂ 2,7748 tartılarak distile suda çözülmüştür. Besiyerinin pH'sı 7'ye ayarlanarak 115°C'de 20 dakika steril edildikten sonra içine filtre ile steril edilen 2M'lık üre stoğundan 333 mM olacak şekilde üre ilave edilmiştir (Ferris ve diğ. 1996; Whiffin ve diğ. 2007).

Her iki besiyerine de %5 yeast extract ilave edilmiştir.

3.2 Metodlar

3.2.1 Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi (Phenol-Hypochloride, Weatherburn 1967-Smith ve diğ. 1993).

Üreaz aktivitesini belirlemek için Weatherburn tarafından verilen laboratuvarımızda optimize ettiğimiz fenol-hipoklorit yöntemi kullanılmıştır (Weatherburn, 1967). Kısaca, fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,0), 50 mM üre çözeltisi ve bakteri süpernatantı karıştırılarak hazırlanan çözelti 25 °C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda çözeltiye öncelikle 500 µl fenol reaktifi eklenmiş ve 500 µl alkali hipoklorit çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır.

Son olarak elde edilen çözelti 50-60 °C'de 5 dakika inkübasyonun ardından soğutularak 630 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Enzim aktivitesi (NH₄)₂SO₄ ile oluşturulan standart eğri yardımıyla belirdi.

Fenol Reaktifin Hazırlanması:, Reaktif A ve reaktif B' nin 1:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilmektedir. Reaktif A; 25 ml distile suda 2,5 gr fenolün çözünmesiyle hazırlanır. Reaktif B ise 25 ml distile suda 0,0125 gr Nanitroprussid'in çözünmesiyle elde edilmektedir.

3.2.2 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz aktivitesi, laboratuvarımızda optimize edilen ve Armstrong ve diğ. (1966) tarafından açıklanan yöntemle göre *p*-nitrofenol miktarının ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Kısaca, 0,9 ml 100 mM fosfat tamponunun pH 7,2 ve 3 mM *p*-nitrofenil asetat karışımına 100 µl enzim eklenmiş ve renk değişimi en az 5 dakika 412 nm'de ölçüldü. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında *p*-nitrofenol standartları kullanılarak oluşturulan standard eğri kullanıldı.

Üreaz ve Karbonik anhidraz enzim aktivitesini belirlemek için; KMO, LB ve LB-mineralizasyon besiyerleri kullanılmıştır. Bu besiyerline; yeast extract ilavesinin enzim aktivitesine etkisini belirlemek için, %5, %7,5 ve %10 oranlarında yeast extract ilave edilmiştir.

3.2.3 Kalsiyum Karbonat Miktarının Belirlenmesi

Enzim aktivitesi ön çalışmalarında besiyerlerine eklenen %5, %7,5, %10 yeast extractın ilave edilmesi sonuçlarına göre; enzim aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmamasından dolayı bakteriyel CaCO₃ çökelişi çalışmalarında %5 yeast extract kullanılmıştır. KMO Yeast ve LB mineralizasyon ortamlarına %5 oranında ekimi yapılan *Lysinibacillus fusiformis* U1, 37° C'de inkübe edilmiştir. İnkübe edilen bakteriler 12 saat, 24 saat, 36 saat, 48 saat, 60 saat, 72 saat, 96 saat, 120 saat, 168 saat ve 240 saat olmak üzere birçok saat aralığında bekletilerek ürettikleri kalsiyum karbonat miktarları EDTA titrimetrik yöntemle göre belirlenmiştir (APHA 1989).

3.2.3.1 Analitik Yöntem

Titrasyon Basamakları: 25 ml numune alınır ve üzerine 1 ml Tampon Çözelti ilave edilerek son pH 10.00'a ayarlanır. Numune içerisine toz halinde bulunan indikatör karışımından spatül yardımı ile çok az miktarda alınır ve eklenir (pembe renk oluşturmaktadır). Standart EDTA Çözeltisi ile titrasyon işlemi başlatılır. Pembe olarak başlayan titrasyon rengi mavi renge dönüşence titrasyon durdurulur. Harcanan EDTA miktarı alınır ve aşağıdaki denklem kullanılarak CaCO₃ miktarı hesaplanır.
$$CaCO_3 = \frac{V1.M.1000}{V2}$$

Tampon Çözelti Hazırlanışı: 1,179 g Na₂EDTA.2H₂O ve 780 mg MgSO₄.7H₂O tartılır, 50 ml distile suda (dH₂O) çözülür. 16,9 g NH₄Cl ve 143 ml yoğun NH₄OH (amonyum) çözeltiye ilave edilerek distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

İndikatör Çözelti: 0,5g Eriochrome Black T ve 100g sodyum klorür (NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır.

Standart EDTA Çözeltisi: 3,723 g EDTA disodyum tuzu dihidrat 1000 ml distile su (dH₂O) ile birlikte çözülür.

3.2.4 Amonyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Süpernatanttaki amonyum konsantrasyonu, Hachmark Nessler Amonyum Tayin Kiti ile spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır. Optimum şartlarda hazırlanan örnekler (50 ml) inkübasyon sürelerinin sonunda santrifüj edilmiştir. 25 ml süpernatant ayrı bir falkona alınarak pH'ı 5N HCl ya da 5N NaOH ile 7,00'a ayarlanmıştır. Örneğe 3 damla mineral stabilizer eklenip bir defa ters-yüz edildikten sonra 3 damla PolyvinylAlcohol eklenip karıştırılmıştır. 1 ml NesslerReagent eklenen örnekler, Hach DR 5000 spektrofotometrede 380N numaralı Ammonia, Ness. programı yardımıyla Amonyum azotu (NH₃-N) miktarı mg/L cinsinden okunmuştur.

3.2.5 Lowry ile Protein Tayini

Protein konsantrasyonu belirlemek için Lowry metodu kullanılmıştır (Lowry ve diğ. 1951). Bu metodda enzim kaynağı 25 kez seyreltilmiştir. Orijinal seyreltmeye ek olarak, test tüpleri içinde 0,05 ml, 0,1 ml ve 0,2 ml alikotlar halinde tekrar seyreltme yapılmıştır. Bunların miktarları daha sonra distile su ile 0,2 ml son hacime tamamlanmıştır. Daha sonra 1 ml alkalın bakır reaktifi (%2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartrat ve 0,1 N NaOH ihtiva eden %20'lik sodyum karbonat 1:1:100 oranında) ile karıştırılmıştır. Bütün tüpler vortekslenmiştir. Alkalın ortamda bakır reaksiyonu gerçekleşmesi için 10 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Bekleme süresince 2 N Folin Fenol Reaktifi (1 ml Folin ve 1ml dH₂O 1:1 oranında) hazırlanmış olup her tüpe eklenmiştir. Vorteks ile tekrar karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Renk değişimi spektrofotometre ile 660 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Kristal sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan standartlar (0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/ml) için de yukarıdaki tüm basamaklar yapılmıştır. Elde edilen değerler sayesinde bir standart eğrisi oluşturulup eğim elde edilmiştir. Protein konsantrasyonu (Şekil 2) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Protein Konsantrasyonu} = \frac{\text{OD}_{660}}{\text{Eğim}} \times \frac{\text{Tüp İçi Seyreltme Faktörü}}{\text{Orijinal Seyreltme Faktörü}}$$

Şekil 2: Protein Konsantrasyonu Formülü

3.2.6 Protein Seviyesinde Eksresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi: Western Blot

Elektroforez, iki fazlı akrilamid jel üzerinde gerçekleştirilmiştir. 1.faz jel %8,5' luk ayrışma jeli ve 2.faz %4'lük yükleme jeli, Tablo 1'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 1: Western Blot jel içerikleri (Mutlu 2015)

Jel içeriği	Ayrıştırma jeli (%8,5)	Yükleme jeli (%4)
Akrilamid/Biaskrilamid	2,85 ml	0,75 ml
Distile su	4,5 ml	2,5 ml
Tris-HCL	pH:8.8	2,5 ml
Tamponu	pH:6.8	1,25 ml
%10 SDS	0,15 ml	0,1 ml
APS	0,05 ml	0,025 ml
TEMED	0,0065 ml	0,005 ml

Cam plakalar, jelin döküleceği standlara yerleştirilip plakalar arasına önce 1. Jel olan ayrıştırma jeli arkasından 2.jel olan yükleme jeli dökülmüştür ve oda sıcaklığında sırasıyla 50 ve 20 dakika olmak üzere donmaya bırakılmıştır. Ardından ilk kuyucuğa molekül ağırlığını bildiğimiz proteinlerden oluşan markır, diğerlerine de protein miktarları Lowry yöntemiyle belirlediğimiz numuneler yüklenerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. 1X elektroforez tamponu eklenen düzenek, numunelerin ayrışma jeline kadar aynı anda toplanabilmesi için ilk olarak 10 mA akıma daha sonra gerçek ayrışmanın olması için 15 mA'e yükseltilerek elektroforez işlemi yapıldı. Elektroforez sonrasında iki cam plaka arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde konulan nitroselüloz membran ile sandviç modeli yapılmıştır. Bu esnada kullanılacak olan nitroselüloz membran, süngerler ve filtre kağıtları 1X transfer tamponu ile önceden ıslatılarak doyuruldu. Sandviç modeli için, katottan anota doğru sırayla sünger, filtre kağıdı, jel, nitroselüloz membran, filtre kağıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üstü üste yerleştirildi ve aparat sıkıca kapatıldı. Hazırlanan sandviçin anot ve katot kutbunun doğru kutuplara takılmasına dikkat edilerek Hoefer Mini VE transfer tankına yerleştirildi. Transfer işlemi 1X tamponu içerisinde +4°C'de 45 V ve 350 mA'de 90 dakika süresince gerçekleşti. Transfer sonucunda sandviç aparatının içinden alınan membran, önce nonspesifik bağlanmaların olmaması amacıyla %5'lik blok solüsyonu ile oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. Daha sonrasında membran *H. pylori* üreaz B (ab127916) primer antikoruna alınarak +4°C'de bir gece bekletildi. Sonrasında işaretleyici enzim-alkali fosfataz (örneğin; anti-rabbit Goat- ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla 60 dakika inkübe edildi. Membran görüntülenmesi sebebi ile, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan Alkalen Fosfataz (ALP) substrat çözeltisi (1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM ZnCl₂, Dietanolamin, NBT (Nitrobluetetrazolium), PMS ve

BCIP (5-bromo-4-kloro-indol-fosfat)) ile inkübe edilmiştir. Görüntü elde edildikten sonra blot kurutularak folyoda saklandı.

3.2.7 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizleri

Bakteriyel kalsiyum karbonatlı oluşumların dokusal ve kimyasal özelliklerini incelemek ve bakterilerin kalsit mineralizasyonu yaptığını doğrulamak amacıyla SEM analizleri de yapılmıştır. Altın malzeme ile kaplanan örnekler, Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLTAM) QUANTA FEG 250 Scanning Elektron Mikroskop kullanılarak incelenmiştir.

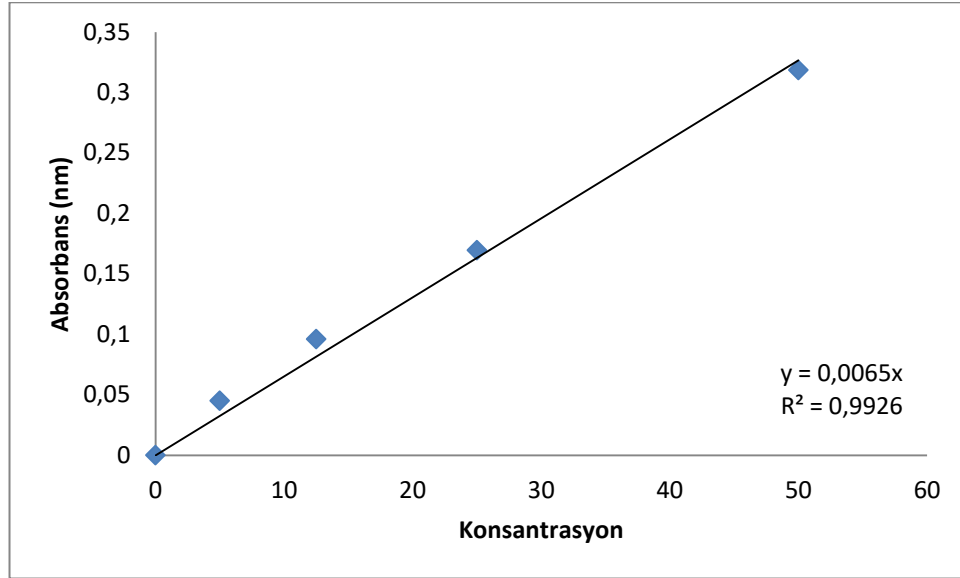
3.2.8 Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizleri

Bakteriyel kalsiyum karbonatlı oluşumların kızılötesi (IR) spektroskopisi sayesinde maddenin oluşmasını sağlayan atomlar arasındaki bağların titreşimleriyle oluşan frekanslara karşılık gelen absorpsiyon piklerini görmek ve kalsiyum varlığını doğrulamak için Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde FTIR (Perkin Elmer- Spectrum Two) analizi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Üreaz Aktivitesi

Bu kısımda *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisinin Phenol-Hypochloride, Weatherburn (1967)-Smith ve diğ. (1993) metoduna göre 360 nM’de yapılan okumalarda yeast extract ilaveli KMO besiyeri için Tablo 2’de ki sonuçlar bulunmuş ve LB Mineralizasyon besiyeri için de Tablo 3’deki sonuçlar bulunmuştur. Standart kalibrasyon eğrisi Şekil 3’te verilmiştir.



Şekil 3: Standart (Amonyum sülfat) kalibrasyon eğrisi

Tablo 2: *Lysinibacillus fusiformis* U1’in yeast extract ilaveli KMO besiyerindeki üreaz aktivitesi ölçüm değerleri ($\mu\text{mol/dk/ml}$).

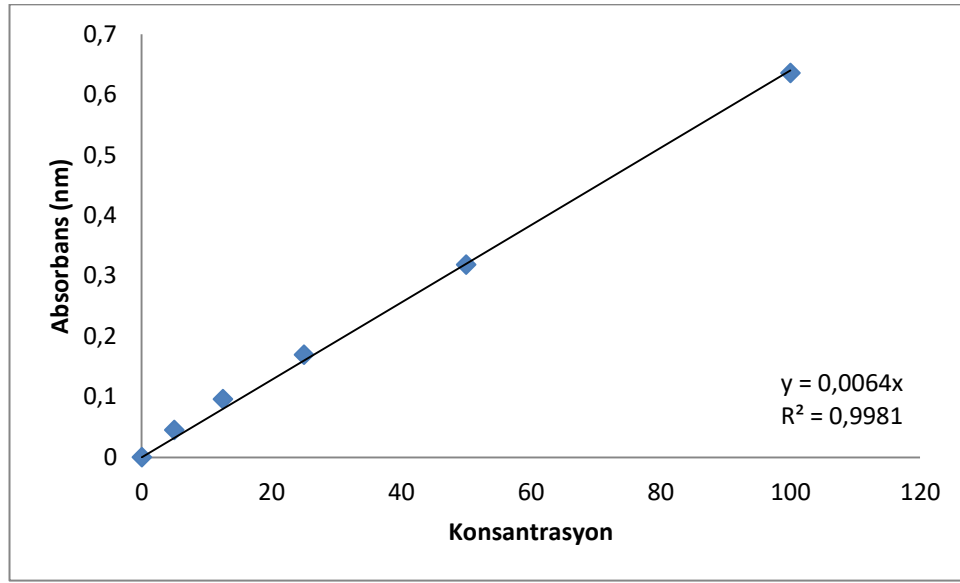
Üreaz Aktivitesi Sonucu ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Ölçüm Değeri (30. dk)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1	20,671

Tablo 3: *Lysinibacillus fusiformis* U1’in LB Mineralizasyon besiyerindeki üreaz aktivitesi ölçüm değerleri ($\mu\text{mol/dk/ml}$)

Üreaz Aktivitesi Sonucu ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Ölçüm Değeri (30. dk)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> U1	4,808

4.2 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi

Karbonik anhidraz aktivitesi, laboratuvarımızda optimize edilen ve Armstrong ve diğ. (1966) tarafından açıklanan yönteme göre *p*-nitrofenol miktarının ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Yeast extract ilaveli KMO besiyerindeki karbonik anhidraz ölçüm değerleri (nmol/dk/mg) ve LB Mineralizasyon besiyerindeki karbonik anhidraz ölçüm değerleri (nmol/dk/mg) Tablo 4' de gösterilmiştir. Standart kalibrasyon eğrisi Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4: Standart (*p*-nitrofenol) kalibrasyon eğrisi

Tablo 4: *Lysinibacillus fusiformis* U1'in yeast extract ilaveli KMO ve LB Mineralizasyon besiyerindeki karbonik anhidraz ölçüm değerleri (nmol/dk/mg).

Karbonik Anhidraz Sonuçları (nmol/dk/mg)	60 sn	120 sn	1' Ölçüm	180 sn	1' Ölçüm	240 sn	1' Ölçüm
Yeast extract KMO	60,91	63,75	31,87	107,66	35,89	131,74	32,94
LB Mineralizasyon	40,92	58,28	29,14	69,44	23,15	102,93	25,73

4.3 Bakteriyal CaCO₃ Çökeltilmesi

Lysinibacillus fusiformis U1, 5 g/L yeast extract ilaveli KMO ve LB mineralizasyon besiyerine inkübasyon oranı %5 olacak şekilde ekilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Bakterinin 12-240 saat inkübasyon sonunda ürettikleri kalsiyum karbonat miktarı EDTA titrimetrik yöntemle hesaplanmıştır (APHA 1989). Genel

olarak yeast extract ilaveli KMO besiyerinde bakterinin 64-172,80 mg/L miktarlarında CaCO_3 ürettiği gözlenirken (pH: 9,12-9,49), bu oran LB mineralizasyon ortamında 70,40-163,80 mg/L (pH: 9,31-9,41) aralığında olmuştur. Yeast extract ilaveli KMO besiyerinde yapılan ölçümler sonucunda inkübasyonun 96. saatinde kalsiyum karbonat miktarı maksimum $172,80 \pm 25,6$ mg/L iken LB mineralizasyon besiyerinde yapılan ölçümlerde maksimum sonuç 24.saat sonunda $163,20 \pm 32$ mg/L olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 5 ve 6'da verilmiştir.



Şekil 5: *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisinin yeast extract ilaveli KMO ve LB mineralizasyon ortamlarında ürettiği kalsiyum karbonat halkalar şeklinde erlen cidarlarında görülmektedir.

Tablo 5: *Lysinibacillus fusiformis* U1'in yeast extract ilaveli KMO besiyerinde ürettiği CaCO_3 miktarı (mg/L) ve son pH değerleri.

İnkübasyon Süresi (saat)	CaCO_3 Miktarı (mg/L)	pH
12	$108,80 \pm 25,6$	9,12
24	$64,00 \pm 12,8$	9,42
36	$69,44 \pm 1,92$	9,38
48	$83,20 \pm 25,6$	9,23
60	$96,00 \pm 25,6$	9,13
72	$99,20 \pm 44,8$	9,5
96	$172,80 \pm 25,6$	9,49
120	$121,60 \pm 25,6$	9,48
168	$124,80 \pm 6,4$	9,4
240	$128,00 \pm 38,4$	9,2

Tablo 6: *Lysinibacillus fusiformis* U1'in LB Mineralizasyon besiyerinde ürettiği CaCO₃ miktarı (mg/L) ve son pH değerleri.

İnkübasyon Süresi (saat)	CaCO ₃ Miktarı (mg/L)	pH
12	153,60±25,6	9,37
24	163,20±32	9,38
36	147,20±51,2	9,34
48	140,80±12,8	9,33
60	99,20±32	9,31
72	99,20±19,2	9,36
96	89,60±25,6	9,35
120	70,40±12,8	9,41
168	96,00±25,6	9,35
240	83,20±25,6	9,35

4.4 Amonyum Konsantrasyonu

Lysinibacillus fusiformis U1, 5 g/L yeast extract ilaveli KMO ve LB mineralizasyon besiyerine inkübasyon oranı %5 olacak şekilde ekilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Optimum şartlarda hazırlanan örnekler (50 ml) inkübasyon sürelerinin sonunda santrifüj edilmiştir. 25 ml süpernatant ayrı bir falkona alınarak pH'ı 5N HCl ya da 5N NaOH ile 7.00'a ayarlanmıştır. Örneğe 3 damla mineral stabilizer eklenip bir defa ters-yüz edildikten sonra 3 damla PolyvinylAlcohol eklenip karıştırılmıştır. 1 ml NesslerReagent eklenen örnekler, Hach DR 5000 spektrofotometrede 380N numaralı Ammonia, Ness. programı yardımıyla Amonyum azotu (NH₃-N) miktarı mg/L cinsinden okunmuştur. Yapılan okumalarda yeast extract ilaveli KMO besiyeri için 168.saat 5,43 mg/L değeri Tablo 7'de gösterilirken, LB Mineralizasyon besiyerinde maksimum değer 96.saat 0,80 mg/L olarak Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7: *Lysinibacillus fusiformis* U1'in yeast extract ilaveli KMO besiyerindeki amonyum konsantrasyonu (mg/L).

İnkübasyon Süresi (saat)	Amonyum Konsantrasyonu
24	5,05
48	5,295
96	5,125
168	5,43
240	5,21

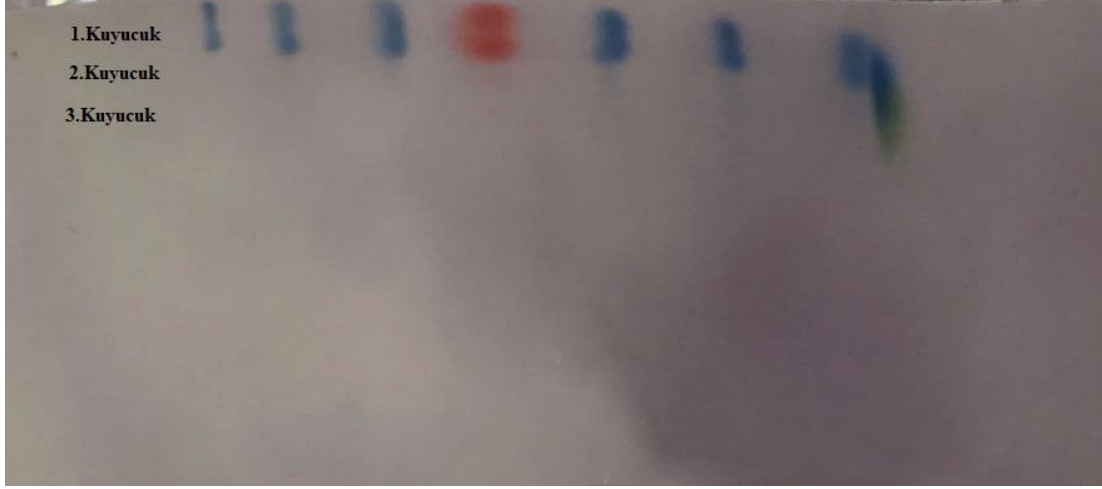
Tablo 8: *Lysinibacillus fusiformis* U1'in LB Mineralizasyon besiyerindeki amonyum konsantrasyonu (mg/L).

İnkübasyon Süresi (saat)	Amonyum Konsantrasyonu
24	0,49
48	0,3
96	0,8
168	0,68
240	0,7

4.5 Western Blot Sonuçları

Elektroforez düzeneği kurulduktan sonra protein eksprese edilip edilmediğine bakılmak üzere ilk kuyucuğa ladder ikinci kuyucuğa yeast extract ilaveli KMO besi ortamında geliştirilip *Lysinibacillus fusiformis* U1 ile hazırlanmış olan örnek, üçüncü kuyucuğa ise LB Mineralizasyon besi ortamında geliştirilen *Lysinibacillus fusiformis* U1 yerleştirilip jel düzeneği başlatılmıştır. Jel düzeneğindeki farklı besi ortamlarına ait (*Lysinibacillus fusiformis* U1) *Helicobacter pylori* üreaz B (ab127916) primer antikorunda +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbitGoat- ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla 1 saat inkübe edilmiştir. Analiz sonunda protein bandına rastlanmıştır (Şekil 6). Western blot analizinde kullanılan antikor, *H. pylori* üreaz enzimine karşı hazırlanmış bir antikor olup enzimin B alt birimine spesifiktir. Dolayısıyla *H. pylori* üreazı ile *Lysinibacillus fusiformis* U1 üreaz alt birimlerinin farklı olması kullanılan antikorun bakterimizin üreaz enzimini tanımasına neden olmuş olabilir. Diğer taraftan

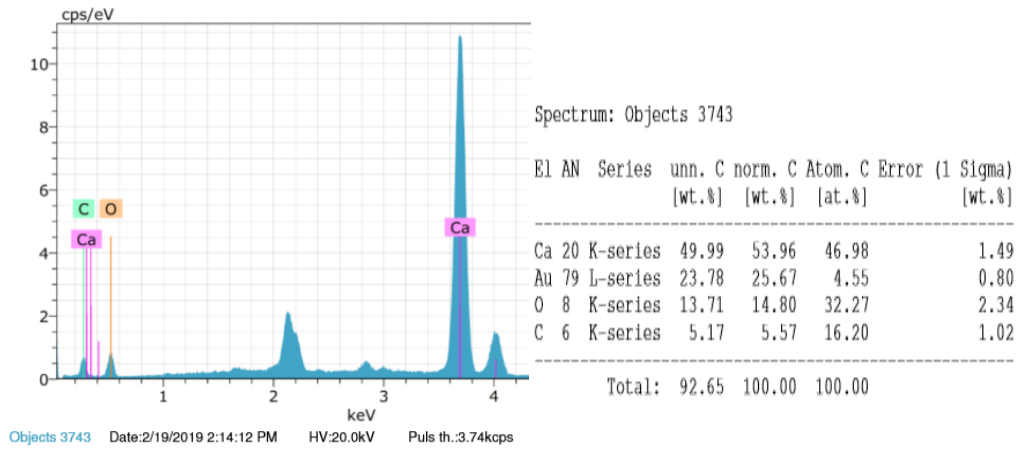
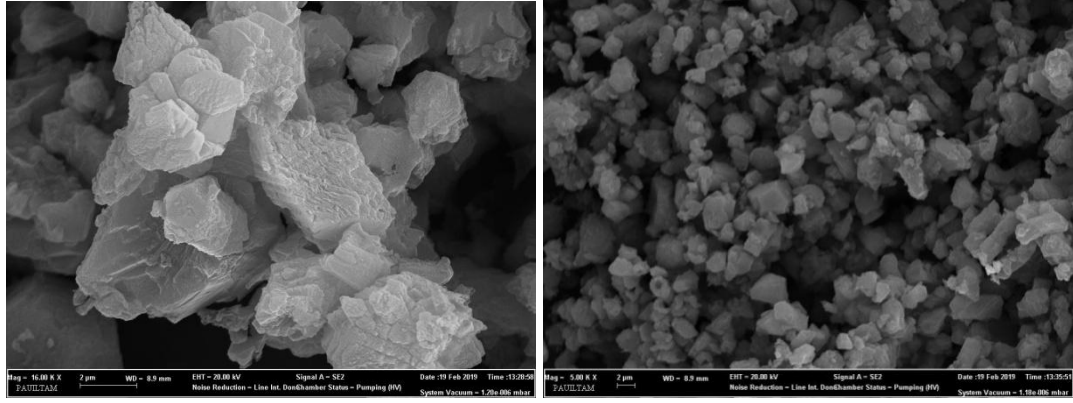
transfer sırasında kullanılan enzimin bozulmuş olması western blot analizinin olumsuz sonuçlanmasının nedeni olabilir.



Şekil 6: *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisinin Western Blot Jel görüntüsü (ALP görüntüleme metodu ile).

4.6 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

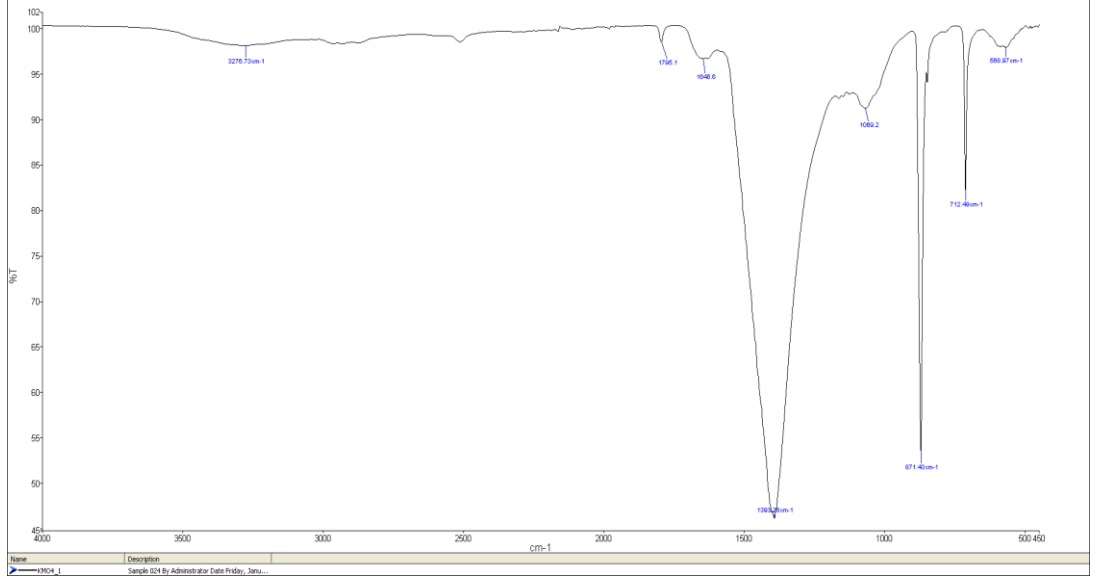
Lysinibacillus fusiformis U1 bakteri örneğindeki mikrobiyal kalsiyum karbonatla oluşmuş kristalin, amorf doğasını ve dokusal özelliklerini incelemek amacıyla SEM analizleri yapılmıştır. Bakteriyel oluşumun küresel, yarı küresel ve hegzagonal kalsit kristal yapısında oldukları görülmektedir. SEM-EDX analiziyle de bakteri tarafından üretilen ürünün yüksek oranda Ca, C ve O elementlerinden oluştuğu ve yapının kalsiyum karbonat olduğu anlaşılmıştır (Şekil 7).



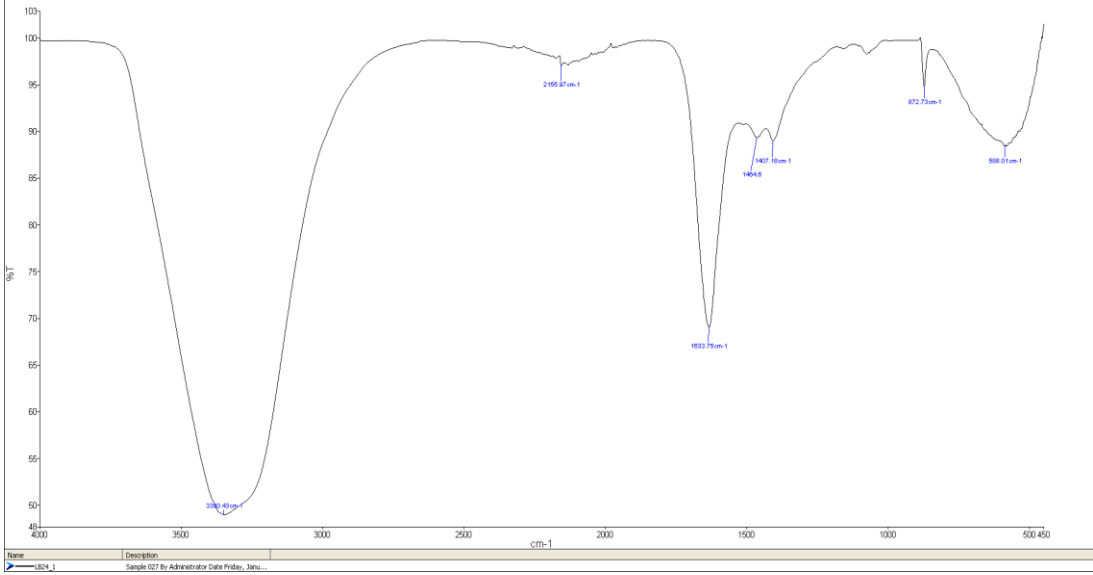
Şekil 7: Bakteriyel CaCO₃'ün SEM-EDX analizi.

4.7 Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR) İncelemeleri

Lysinibacillus fusiformis U1 bakterisinin yeast extract ilaveli KMO ve LB Mineralizasyon ortamlarında geliştirilen kültürlerin kalsiyum karbonat varlığını doğrulamak için Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde FTIR analizi yapılmıştır. FTIR sonuçları Şekil 8 ve 9'da verilmiştir. Yeast extract ilaveli KMO besiyerinde bakterinin ürettiği CaCO₃'ün FTIR analizi sonunda elde edilen 871,4 cm⁻¹ ve 712,49 cm⁻¹ pikler kalsiyum karbonat varlığını göstermektedir (Şekil 8). LB mineralizasyon besi ortamında ise 872,73 cm⁻¹ piki kalsiyum karbonat pikidir (Şekil 9).



Şekil 8: Yeast extract ilaveli KMO besiyerinde CaCO₃'ın FTIR analizi (96 saatlik inkübasyon)



Şekil 9: LB Mineralizasyon besiyerinde CaCO₃'ın FTIR analizi (24 saatlik inkübasyon)

5. TARTIŞMA

Kalsiyum karbonat çökmesi, 1-kalsiyum konsantrasyonu, 2-çözünmüş inorganik karbon konsantrasyonu, 3-pH ve 4-çekirdeklenme alanlarının durumu olmak üzere dört ana faktör tarafından yönetilir (Hammes ve Verstraete 2002). CaCO_3 mineralizasyonunun gerçekleşmesi için yeterli miktarda kalsiyum ve karbonat iyonlarına gereksinim duyulur. Karbonat iyon konsantrasyonu, sucul sistemin pH'sı ve çözünmüş inorganik karbon konsantrasyonu ile ilişkilidir. Buna ek olarak, çözünmüş inorganik karbon konsantrasyonu, sıcaklık ve karbon dioksit kısmi basıncı gibi çeşitli çevresel parametrelere de bağlıdır. Üreaz enzimi bakteriyel kalsiyum karbonat mineralizasyonuna etki eden önemli bir diğer faktördür. Bu nedenle enzim aktivitesinin belirlenmesi, kalsiyum karbonat biyomineralizasyonu ile enzim arasındaki ilişkiyi açıklamada oldukça önemlidir.

Bakteriyel kalsiyum mineralizasyonunda önemli rolü olduğu bilinen üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitelerini etkileyen fiziksel ve kimyasal parametrelerin detaylı olarak araştırılması, bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliiminin anlaşılması için önemlidir. Literatür bilgilerine göre bakteri türüne göre biyomineralizasyon ve mineral tipi değişkenlik göstermektedir.

Birçok farklı bakteri ile CaCO_3 çökeliim çalışması yapılmıştır. Kullanılan her bakteri ve ortama göre CaCO_3 çökeliim miktarları, amonyum değerleri, üreaz aktivitesi değerleri değişim göstermektedir. *S. pasteurii* bakterisinden izole edilmiş bir suş ile CaCO_3 çökeliimine bakmıştır (Canakci ve diğ. 2015). Bir başka çalışmada *B. pasteurii* ATCC 6453 bakterisini Tris-YE besiyerinde kullanarak CaCO_3 çökeliimi araştırılmıştır (Stocks-Fischer 1999). Xu ve diğ. (2015)'de *Sporosarcina pasteurii* bakterisini kullanarak EDTA titrimetrik yöntemiyle CaCO_3 miktarı incelenmiştir (Xu ve diğ. 2015).

Besiyeri içeriği veya besiyeri çeşitliliğinin mineralizasyona olan etkisi, üzerinde durulan bilimsel araştırma konularından biridir. Bu çalışmada, literatürde bakteriyel kalsiyum karbonat mineralizasyonunda standart olarak kullanıldığı bilinen Kalsiyum Mineralizasyon Ortamı (KMO) ile Luria Bertani (LB) besiyerinin mineralizasyona etkisi araştırıldı. Ayrıca her iki besiyerine farklı miktarlarda Yeast

Extract ilave ederek hem enzim aktivitesine hem de CaCO₃ çökelimine etkisi incelendi.

Bu amaçla, *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisinin EDTA titrimetrik ölçüm metodu ile kalsiyum karbonat çökelim miktarı, amonyum konsantrasyonu, üreaz ve karbonik anhidraz aktiviteleri analiz edilmiştir. SEM-EDX ve FTIR analizleri ile kalsiyum karbonatla doğrulanmış ve bakteriyal CaCO₃'in mineral tipi belirlenmiştir.

Lysinibacillus fusiformis U1 bakterisi yeast extract ilaveli KMO besiyerinde inkübasyonun 96.saatinde maksimum 172,80 ± 25,6 mg/L oranında çökelim gerçekleştirmiştir. Bakteri LB mineralizasyon besiyerinde maksimum üretimi ilk 24 saatlik sürede gerçekleştirmiş ve 163,20 ± 32 mg/L oranında CaCO₃ üretmiştir.

KMO besiyerindeki kalsiyum karbonat miktarı 64,00-172,80 mg/l arasındayken, LB besiyerinde 83,20-163,20 mg/l'dir. Tüm inkübasyon saatleri incelendiğinde KMO besiyerinde karbonat çökeliminin LB'ye göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca KMO besiyerinde inkübasyon süresi arttıkça karbonat çökelimi miktarında artış olmuştur. Maksimum karbonat çökeliminin gerçekleştiği 96 saat sonra az da olsa karbonat üretiminde azalma olmuştur.

Canakci ve diğ. (2015) yaptığı mukavemet çalışmasında kalsiyum karbonat çökelimini artırmak için *S. pasteurii* kullanmış ve gelişim ortamına beef extract (1g/L) ilave etmiştir. Beef extract ilaveli üre agar içerisinde gelişmiş olan *S. pasteurii*'nin CaCO₃ üretimi normal besiyerine göre %20 artış göstermiştir (Canakci ve diğ. 2015). Besi ortamına eklenen azot kaynağı farklılığı CaCO₃ miktarında değişime neden olmuştur. Ortamdaki azot kaynağı farklılığında üreaz enzim aktivitesini etkilemektedir. Bu sebeple seçilecek olan besiyeri önem arz etmektedir. Kullanılan besiyerlerindeki CaCO₃ miktarlarındaki farklılık, besiyeri kompozisyonuna bağlı olduğu gibi ortamdaki azot ve enerji kaynağı farklılığından da ileri gelmiştir. Çalışmamızda *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisi, azot ve enerji kaynağı olarak yeast extract kullanıldığında KMO besiyerinde LB besiyerine göre daha iyi CaCO₃ üretmiştir. Yeast extract ilavesi bakteri oluşumunu olumlu yönde etkilemiştir. Hücre sayısındaki artışa bağlı olarak hücreden açığa çıkan üreaz enzim hızında bir yükseliş ve dolayısıyla CaCO₃ çökeliminde artışa neden olmuştur.

Xu ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada CaCO_3 çökeli mi olması için besiyerinde kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum klorür yerine kalsiyum nitrat ve kalsiyum laktat kullanmışlardır. Ortamların CaCO_3 miktarlarını belirlemek için EDTA titrasyon metodu ile ölçüm yapmışlardır. Yapılan ölçümlerde kalsiyum nitratlı ortamda 0,574 k (h-1) bulunmuş ve kalsiyum laktat içeren ortamda da 1,239 k (h-1) bulunmuştur. Yapılan deneyler sonucunda CaCO_3 miktarları laktatlı ortamda nitrat içeren ortama kıyasla daha yüksektir (Xu ve diğ. 2015).

B. pasteurii ATCC 6453 çalışması boyunca Tris-YE besiyeri kullanılmıştır. Besiyerine kalsiyum kaynağı olarak direkt kalsiyum eklemiştir. Kalsiyum oranları 12.6, 25.2 ve 50.4 mM olarak farklı konsantrasyonlarda yapılmıştır. CaCO_3 çökeli m sonuçları kalsiyum konsantrasyonlarına göre sırayla 0.76, 0.77, 0.72 μ (h-1) olarak bulunmuştur (Stocks-Fischer 1999). Besiyeri, bakteri farklılığı ve kullanılan kalsiyum kaynağına bağlı olarak her CaCO_3 çökeli mi farklı sonuçlar göz önüne sermektedir.

Bu çalışmada standart KMO ve LB besiyerleri ile yeast extract ilaveli KMO, LB Mineralizasyon besiyerinde CaCO_3 çökeli mi araştırılmıştır. KMO besiyeri içerisine eklenen yeast extract ve LB besiyerine mineralizasyon özelliği kazandırmak amacıyla eklediğimiz NaHCO_3 ve CaCl_2 , bakterinin CaCO_3 üretimini olumlu yönde arttırmıştır. Bakteriyel CaCO_3 miktarı KMO besiyeri için maksimum 172,80 mg/l iken LB besiyeri için bu miktar 163,20 mg/l olarak tespit edilmiştir. Her iki besiyerin de içeriği ve madde miktarındaki farklılık; bakterinin farklı miktarlarda CaCO_3 üretmesine neden olmuştur.

Üreolitik bakteriler kullanılarak, bakteriyel karbonat mineralizasyonu üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Nitekim bu bakteriler üreaz enzimi üreterek, kalsiyum karbonatı çökeltmektedirler. Bu enzim, üreyi karbondioksit ve amonyağa katalizleyerek pH'ın ve karbonat konsantrasyonunun artışına neden olmaktadır. Yüksek oranda doygunluğa ulaşıldıktan sonra, bakteriyel hücre duvarlarında heterojen bir çekirdeklenme ile kalsiyum karbonat kristalleri mineralize olmaktadır (Stocks-Fischer ve diğ. 1999). Tüm üreazlar ürenin hidrolizi olan bir katalitik fonksiyon gösterir ve aynı katalitik mekanizmayı takip eder. Barbara Krajewska'nin yaptığı çalışmada deney ortamının pH'sı 9,2'ye kadar ulaşmış ve bu ortamının pH'sındaki artış, üreazların etkisinin bir sonucu olarak

arttığını göstermiştir. (Krajewska 2018). Bu sonuçlara ek olarak bizim laboratuvar ortamında çalıştığımız iki farklı besiyeri üzerinde de pH ölçümleri yapılmıştır ve Yeast extract ilaveli KMO ve LB Mineralizasyonu ortamlarında yapılan çalışmalarda pH artışını görülmüştür. Yeast extract ilaveli KMO'da maksimum CaCO_3 miktarını elde ettiğimiz 96. saatte ki pH 9,49 olarak görülürken tüm saatler içinde maksimum pH 72. saatte 9,5 olmuştur. Diğer besiyerimiz olan LB Mineralizasyon ortamında ise maksimum CaCO_3 miktarını elde ettiğimiz 24. saatte ortamın pH'sı 9,38 iken tüm saatler içinde maksimum pH 120. saatte 9,41 olarak kaydedilmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından bakterilerin kalsit çökeltmesi için pH değerlerinde ideal aralığın 8.3 ile 9.3 arasında olduğu bildirilmiştir (Stocks-Fisher ve diğ. 1999; Dejong ve diğ. 2010). Bu değerler bize ortam pH'sının CaCO_3 miktarındaki artışa bağlı olarak yükseldiğini desteklemiş fakat CaCO_3 miktarının en yüksek olduğu saatte pH'ında maksimum değerde olması gerekmediğini göstermiştir.

Üre, alkalofilik mikroorganizma tarafından üretilen üreaz enzimi ile birlikte biyokimyasal reaksiyona girerek 1 mol NH_3 ve 1 mol NH_2 COOH (karbamik asit) oluşturmakta ve bu maddeler ise kendiliğinden 1 mol NH_4^+ ve 1 mol H_2CO_3 (karbonik asite) dönüşmektedir (Hall-stoodley ve diğ. 2004; Patro ve diğ. 2015; Yıldırım ve diğ. 2016) Ortamda kalsiyum karbonat üretiliyorsa bu ortamda amonyum bulunması beklenir. Bulunan değerler kalsiyum karbonat biyomineralizasyonunu desteklemektedir. Sonuç olarak yeast extract ilaveli KMO besi yerinde maksimum değer 168. saatte 5,43 mg/L olarak bulunmuş ve LB Mineralizasyon besi yerinde ki maksimum değeri ise 96. saatte 0,80 mg/L olarak belirlenmiştir. LB ortamda amonyum miktarının düşüklüğü bakteri türü ve besiyeri kaynaklı olarak düşük belirlenmiştir. Çünkü amonyum değeri 0,80 $\mu\text{mol/dk/ml}$ iken CaCO_3 miktarı ise 83,20-163,20 $\mu\text{mol/dk/ml}$ 'dir. Amonyum değerlerini besiyerine eklediği laktat ve nitratlı ortamlarda tarayan Xu ve diğ. (2015) nitrat içeren ortamda amonyum değerini 0,137 $\text{k (h}^{-1})$ olarak bulurken laktat içeren ortamda ise 0,174 $\text{k (h}^{-1})$ bulmuştur (Xu ve diğ. 2015). Xu ve diğ. (2015)'nin yaptığı çalışma ve bizim çalışmamızdaki veriler gösteriyor ki besiyerinde kullanılan farklı maddeler amonyum miktarlarında değişmeye neden olmaktadır. Bu nedenle de LB ortamında CaCO_3 değerleri yüksek bulunurken amonyum değeri düşük bulunabilmektedir. Bilindiği gibi amonyak toksik özelliğinden dolayı insan sağlığına zarar vermektedir. Özellikle inşaat sektöründe amonyum kirliliği istenmeyen bir özelliktir. Bakterinin CaCO_3 çökelişi sırasında

ortama verdiği amonyum azotunun miktarının düşük olması ilerde *Lysinibacillus fusiformis* U1 suşumuzun inşaat sektöründe kullanılmak üzere geliştirilebileceğini düşündürmüştür.

Yapılan üreaz aktivitesi taramalarında ise yeast extract ilaveli KMO besi yeri için bulunan absorbans değeri 20,671 iken LB Mineralizasyonbesi yeri için absorbans değeri 4,808 olarak tespit edilmiştir. Üreaz aktivitesi kalsiyum karbonat biyomineralizasyonu ile enzim arasındaki ilişkiyi açıklayan en temel aşamadır. Elde edilen değerler biyomineralizasyonu destekler niteliktedir.

Karbonik anhidraz tarafından katalize edilen çökeltme 0,2-2,0 U/mL aralığındaki enzim konsantrasyonlarına olumlu sonuçlar verirken enzim konsantrasyonu 8.0 U/mL olduğu zaman belirli bir seviyeye kadar inhibe olmuş ve bir süre sonra değer yükseldikçe CaCO₃ için elverişli olmamıştır (Li ve diğ. 2013). *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisi için yapılan karbonik anhidraz ölçümü değerleri dakika bazında olup yeast extract ilaveli KMO besiyeri için 2. dakikada 31,87 (nmol/dk/mg), 3. dakikada 35,89 (nmol/dk/mg) ve 4. dakikada 32,94 (nmol/dk/mg) olarak bulunmuş ve LB Mineralizasyon besiyeri içinse bu değerler 2. dakikada 29,14 (nmol/dk/mg), 3. dakikada 23,15 (nmol/dk/mg) ve 4. dakikada 25,73 (nmol/dk/mg) olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi sonuçları, *Lysinibacillus fusiformis* U1 suşunun yeast ilaveli KMO besiyerinde çok daha iyi CaCO₃ üretimi gerçekleştirmesini açıklar niteliktedir.

CaCO₃ çökeli mi sonucunda kalsiyum karbonatın polimorfu olan kalsit veya vatarite rastlanır (Xu ve diđ. 2015). FTIR analizi verilerine göre 712 cm⁻¹ ve 875 cm⁻¹ değer aralığındaki pikler, kalsit varlığını gösteren pikler olduğunu göstermektedir (Bosch ve diđ. 2002). FTIR analizinde 708 cm⁻¹ ile 883 cm⁻¹ pik değerleri aralığı CaCO₃ varlığını gösteren değer aralığıdır. (Plavšić ve diđ. 1999). Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde yapılan FTIR analizleri verilerine göre yeast extract ilaveli KMO besi yerinin 96 saatlik inkübasyonunda 871,4 cm⁻¹ ve 712,49 cm⁻¹ pikler tespit edilmiş ve LB Mineralizasyon besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında 872,73 cm⁻¹ pik bulunmuştur. Elde edilen verilere göre 96 ve 24. saatlerde kalsiyum karbonatın varlığı kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar bakterinin kalsiyum karbonatı doğal yollarla ürettiğini gözler önüne sermektedir.

Tirkolaei ve Bilsel (2015) yaptığı FTIR analizi sonunda deneylerde kalsiyum karbonat polimorflarının çökmesini göstermiştir. Küresel bir vaterit ve çubuk şeklindeki kristallerin varlığına rastlanmıştır. Vaterit varlığı CaCO_3 çökmesini desteklemiştir (Tirkolaei ve Bilsel 2015). Vahabi ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada CaCO_3 çökmesini bulmuşlardır. SEM ve FTIR analizlerinde kalsiyum polimorfu olan kalsit mineraline rastlamışlardır (Vahabi ve diğ. 2015). Tirkolaei ve Bilsel (2015) çalışmasında CaCO_3 çökeli sonucunda vaterit bulurken, Vahabi ve diğ. (2015) çalışmalarını sonunda kalsit bulmuştur. Biz ise yaptığımız çalışmalar sonunda kalsiyum karbonat polimorfu olan kalsit mineralini bulduk.

CaCO_3 çökeli sonrasında yapılan SEM analizlerinde laktat ve nitrat varlığı tespit edilmiştir. Kalsiyum nitrattan olan çökeltilerde küresel ve partikül şeklinde yapılara rastlanmıştır. Kalsiyum laktattan oluşan çökeltinin görüntüsünde ise nispeten kalsiyum nitrata göre daha büyük partiküller ve kristal yapılar görülmüştür (Xu ve diğ. 2015). Abdul Khalil ve diğ. (2018) de mikrobiyal CaCO_3 ve kimyasal CaCO_3 'ın SEM analizlerinde kalsiyum (Ca), oksit (O) ve karbon (C) varlığı tespit etmiş ve görüntülemiştir. Mikrobiyal yolla üretilen CaCO_3 'ın atomik oranı kimyasal CaCO_3 dan daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. (Abdul Khalil ve diğ. 2018). Mikrobiyal yolla ürettiğimiz CaCO_3 için yapılan SEM-EDX analizi, CaCO_3 varlığını göstermiş olup bu CaCO_3 'ın *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisi tarafından üretildiğini kanıtlamıştır. *Lysinibacillus fusiformis* U1 bakterisinin EDX analiz sonucunda ortamda %53,96 Ca, %14,80 O ve % 5,57 C bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde iyi bir kalsiyum karbonat çökelişi yapan mikroorganizma ya da çökeliş şartlarının tam olarak belirlenmesi amacıyla optimizasyon araştırılmaktadır. Genellikle üreolitik toprak bakterilerinin üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitelerinin yüksek olması bakteriyel kalsiyum karbonat mineralizasyonu için bu bakterileri önemli kılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmada kalsiyum karbonat çökelişi yaptığı bilinen bir üreolitik toprak bakterisi olan *Bacillus* cinsi yerel izolatın CaCO_3 çökelişine besiyeri etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan *Lysinibacillus fusiformis* U1 suşu bu alanda ilk kez çalışılmış olup CaCO_3 üzerindeki etkisi ortaya konmuştur. Bir tarama niteliği taşıyan bu çalışmada genel olarak KMO ve LB besi yerlerine yapılan yeast extract ilavesiyle CaCO_3 miktarlarında bir artış olduğu görülmüştür. Çalışılan modifiye besi yerlerindeki pH ölçümleri CaCO_3 miktarına bağlı olarak ortamın pH'sının arttığını da desteklemiştir. Üreaz aktivitesi, karbonik anhidraz aktivitesi ve ölçülen amonyum miktarları ortamda kalsiyum karbonat biyomineralizasyonu olduğunu göstermektedir. Bakteriyel ürünün FTIR ve SEM-EDX analizleri CaCO_3 mineral tipinin kalsit olduğunu doğrulamıştır. İlerde daha detaylı çalışmalarla optimizasyon yapılarak en iyi şartların elde edilmesine karar verilmiştir.

Bu çalışma sonucunda Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarında stoklarında bulunan *Lysinibacillus fusiformis* U1'in çeşitli alanlarda (beton ve zemin iyileştirme, kum sütunlarının birleştirilmesinde, kalker anıtlarının onarımında vb.) kullanılma potansiyeli olmakla beraber daha ileri teknikler ile bunun test edilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

Abdul Khalil, H. P. S., Chong, E. W. N., Owolabi, F. A. T., Asniza, M., Tye, Y. Y., Tajarudin, H. A., Paridah M. T. and Rizal, S., “Microbial-induced CaCO₃ filled seaweed-based film for green plasticulture application”, *J. Clean. Prod.*, 199, 150-163, (2018).

Achal, V. and Mukherjee, A., “A review of microbial precipitation for sustainable construction”, *Constr. Build. Mater.*, 93, 1224-1235, (2015).

Aguilar, F., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., Grilli, S., Gürtler, R., König, J., Lambré, C., Larsen, J-C., Leblanc, J-C., Mortensen, A., Parent-Massin, D., Pratt, I., Rietjens, I. M. C. M., Stankovic, I., Tobback, P., Verguieva, T. and Woutersen, R. A., “Scientific opinion on re-evaluation of calcium carbonate (E 170) as a food additive”, *EFSA Journal*, 9 (7), 231854, (2011).

Akyol, E., Bozkaya, Ö. and Dogan, N. M., “Strengthening sandy soils by microbial methods”, *Arab. J. Geosci.*, 10 (327), 1-8, (2017).

Al Smadi, B. M., Al-Zboon K. K. and Shatnawi K. M., “Assessment of Air Pollutants Emissions from a Cement Plant: A Case Study in Jordan”, *JJCE*, 3 (3), (2009).

American Public Health Association (APHA), “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, *17th ed. Am. J. Public Health*, Washington DC, (1989).

Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J. and So, J. S., “Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications”, *Springer Plus*, 5 (1), 593, (2016).

Andalib, R., Majid, M. Z. A., Hussin, M. W., Ponraj, M., Keyvanfar, A., and Lee, H. S., “Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete”, *Constr. Build. Mater.*, 118, 180-193, (2016).

- Armstrong, J. M., Myers, D. V., Verpoorte, J. A. and Edsall, J. T., “Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases”, *J. Biol. Chem.*, 241 (21), 5137-5149, (1966).
- Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R. and Bang, S. S., “Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation”, *J. Biotechnol.*, 93 (2), 171-181, (2002).
- Bang, S. S., Galinat, J. K. and Ramakrishnan, V., “Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Sporosarcina pasteurii*”, *Enzym. Microb. Technol.*, 28, 404–409, (2001).
- Barabesi, C., Galizzi, A., Mastromei, G., Rossi, M., Tamburini, E. and Perito, B., “*Bacillus subtilis* gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization”, *J. Bacteriol. Mycol.*, 189, 228-235, (2007).
- Bazylinski, D. A. and Schübbe, S., “Controlled Biomineralization by and Applications of Magnetotactic Bacteria”, *Adv. Appl. Microbiol.*, 62, 21-62, (2007).
- Bosch, F., Reig, J. V., Adelantado, G. and Moya Moreno, M. C. M., “FTIR quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. Application to geological samples”, *Talanta*, 58, 811-821, (2002).
- Canakci, H., Sidik, W. and Kilic, I. H., “Bacterial Calcium Carbonate Precipitation in Peat”, *Arab. J. Sci. Eng.*, 40 (8), 2251-2260, (2015).
- Canaveras, J. C., Sanz-Rubio, E., Sanchez-Moral, S., Calvo, J. P. and Rouchy, J. M., “Calcitization of Mg–Ca carbonate and Ca sulphate deposits in a continental Tertiary basin (Calatayud Basin, NE Spain)”, *Sediment Geol.*, 140 (1-2), 123-142, (2001).
- Chahal, N., Siddique, R. and Rajor A., “Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of concrete incorporating silica fume”, *Constr. Build. Mater.*, 37, 645-651, (2012).
- Cheng, L. and Cord-Ruwisch, R., “*In situ* soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation”, *Ecol. Eng.*, 42, 64-72, (2012).

- Cheng, L., Cord-Ruwisch, R. and Shahin, M. A., “Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation”, *Can. Geotech. J.*, 50 (1), 81-90, (2013).
- Cozzolino, M., Brancaccio, D., Gallieni, M. and Slatopolsky, E., “Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease”, *Kidney Int.*, 68 (2), 429-436, (2005).
- De Belie, N., Gruyaert, E., Van Tittelboom, K., Sucaet, J., Anrijs, J., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., De Geest, B. G. and Remon, J. P., “Capsules with evolving brittleness to resist the preparation of self-healing concrete”, *Mater. Construcc.*, 66 (323), e092, (2016).
- Dejong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C. and Nelson, D. C., “Bio-mediated soil improvement”, *Ecol. Eng.*, 36, 197–210, (2010).
- Dejong, J. T., Fritzges, M. B. and Nüsslein, K., “Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear”, *IJEE*, 132 (11), 1381-1392, (2006).
- Dhami, N. K., Reddy, M. S. and Mukherjee, A., “Biomining of calcium carbonates and their engineered applications”, *Frontiers Microbiol.*, 4, 314, (2013).
- Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N. and Verstraete, W., “Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species”, *Biodegradation*, 17(4), 357-367, (2006).
- Ey, P. L. and Ashman, L. K., “The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures”, *Methods Enzymol.*, 121, 497-509, (1986).
- Ferris, F. G., Stehmeier, L. G., Kantzas, A. and Mourits, F. M., “Bacteriogenic mineral plugging”, *J. Can. Pet. Technol.*, 35 (8), 56–61, (1996).
- Ghosh, W., Bagchi, A., Mandal, S., Dam, B. and Roy, P., “*Tetrathlobacter kashmirensis* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing, facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India”, *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.*, 55, 1779–1787, (2005).

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P., “Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 (2), 95-108, (2004).
- Hammes, F. and Verstraete, W., “Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation”, *Rev. Environ. Sci. Bio.*, 1, 3-7, (2002).
- Jonkers, H. M. and Loosdrecht, M. C. M. V., “Bio. Geo. Civil Engineering”, *Ecol. Eng.*, 36 (2), 97-98, (2010).
- Kang, C., Kwon, Y. and Yani, J., “Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures”, *Ecol. Eng.*, 89, 64-69, (2016).
- Khaliq, W. and Ehsan, M. E., “Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques”, *Constr. Build. Mater.*, 102 (1), 349-357, (2016).
- Khezerlou A., Alizadeh Sani, M., Azizi-lalabadi, M. and Ehsani, A., “Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses”, *Microb. Pathog.*, 123 (C), 505-526, (2018).
- Knoll, A. H., “Biomineralization and Evolutionary History”, *Rev. Mineral. Geochem.*, 54 (1), 329-356, (2003).
- Krajewska, B., “Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review”, *J. Adv. Res.*, 13, 59-67, (2018).
- Küçük, A., “ÇED Rehberi – Çimento Fabrikaları”, *Çevresel Etki Değerlendirmesi Sektörel Rehberleri*, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, (2009).
- Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubière, J. F. and Perthuisot, J. P., “Application of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestone in buildings and historic patrimony”, *Sediment Geol.*, 126, 25–34, (1999).
- Li, W., Chen, W. S., Yu, L. and Zhou, P., “Influence of enzyme concentration on bio-sequestration of CO₂ in carbonate form using bacterial carbonic anhydrase”, *Chem. Eng. J.*, 232, 149-156, (2013).

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193 (1), 265-275, (1951).
- Luo, M., Qian, C. and Li, R., "Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete", *Constr. Build. Mater.*, 87, 1-7, (2015).
- Marlowe, L. and Mansfield, D., "Toward a sustainable cement industry, environment, health and safety performance improvement", *WBCSD*, Substudy 10, (2002).
- Morales, L., Garzón, E., Romero, E. and Sánchez-Soto, P. J., "Microbiological induced carbonate (CaCO₃) precipitation using clay phyllites to replace chemical stabilizers (cement or lime)", *Appl. Clay. Sci.*, 174, 15-28, (2019).
- Mutlu, D., "CYP1A1'in Doğal Polifenoller Tarafından İnhibisyonunun *in Vitro* ve Moleküler Modelleme Çalışmaları ile İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, (2015).
- Muynck, W. D., Cox, K., Belie, N. D. and Verstraete, W., "Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete", *Constr. Build. Mater.*, 22, 875-885, (2008^a).
- Muynck, W. D., Debrouwer, D., Belie, N. D. and Verstraete, W., "Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials", *Cement Concrete Res.*, 38, 1005-1014, (2008^b).
- Paassen, V. L. A., "Biogrout, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation", Ph.D. Thesis, Dept. Civil Eng, Delft University of Technology, Delft, (2009).
- Patro, S. K., Chandra, K. S., Sugandha, S., Chand, S., Sahu, S.K. and Manimara, S., "Effect of bacteria on the properties of concrete using Portland slag cement", *Proceedings of the National Conference on Recent Advances and Future Prospects in Civil Engineering*, 89-98, (2015).
- Plavšić, B., Kobe, S. and Orel, B., "Identification of crystallization forms of CaCO₃ with FTIR spectroscopy", *Kovine Zlitine Tehnol.*, 33, 6, 517, (1999).

- Rivadeneira M. A., Delgado, R., Moral, A., Ferrer, M. R. and Ramos-Cormenzana, A., “Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* spp. from an inland saltern”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 13 (3), 197-204, (1994).
- Rivadeneira, M. A., Párraga, J., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A. and Delgado, G., “Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48(1), 39-46, (2004).
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K. B. and Gonzalez-Muñoz, M.T., “Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbona biomineralization”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (4), 2182–93, (2003).
- Rong, H. and Qian, C. X., “Development of microbe cementitious material in China”, *J. Shanghai Jiaotong Univ. (Sci.)*, 17, 350–355, (2012).
- Siddique, R., Kuna, L., Singh, K., Singh, M., Corinaldesi, V. and Rajor, A., “Properties of bacterial rice husk ash concrete”, *Constr. Build. Mater.*, 121, 112-119, (2016).
- Smith, P. T., King, A. D. and Goodman, N., “Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*”, *J. Gen. Microbiol.*, 139: 957-962, (1993).
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K. and Bang, S. S., “Microbiological precipitation of CaCO_3 ” *Soil Biol. Biochem.*, 31, 1563-1571, (1999).
- Tirkolaei, H. K. and Bilsel, H., “Statistical modeling of environmental factors on microbial urea hydrolysis process for biocement production”, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, (2015).
- Tittelboom, K. M., Belie, N. D., Muynck, W. D. and Verstraete, W., “Use of bacteria to repair cracks in concrete”, *Cement Concrete Res.*, 40 (1), 157-166, (2010).
- Vahabi A., Akbar, Ramezaniapour, A. A., Sharafi, H., Zahiri, H. S., Vali, H. and Noghabi, K. A., “Calcium carbonate precipitation by strain *Bacillus licheniformis* AK01, newly isolated from loamy soil: a promising alternative for sealing cement-based materials”, *J. Basic Microbiol.*, 55 (1), 105-115, (2015)
- Vijay, K., Murmu, M. and Deo, S., “Bacteria based self healing concrete – A review”, *Constr. Build. Mater.*, 152, 1008-1014, (2017).

Wang, J., Dewanckele, J., Cnudde, V., Van, S. V., Verstraete, W. and Belie, N. D., “X-ray computed tomography proof of bacterial-based self-healing in concrete”, *Cement Concrete Comp.*, 53, 289-304, (2014).

Wang, J. C. and Liapis, A. I., “Water–water and water–macromolecule interactions in food dehydration and the effects of the pore structures of food on the energetics of the interactions”, *J. Food Eng.*, 110 (4), 541-524, (2012).

Weatherburn, M. V., “Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia”, *Anal. Chem.*, 39 (8), 971-974, (1967).

Whiffin, V. S., Paassen, L. A. V. and Harkes, M. P., “Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique”, *Geomicrobiol J.*, 24, 417-423, (2007).

Xu, J., Du, Y., Jiang, Y. and She, A., “Effects of Calcium Source on Biochemical Properties of Microbial CaCO₃ Precipitation”, *Front. Microbiol.*, 6, 1366, (2015).

Yıldırım, N., Gürtug, Y. ve Sesalı, C., “Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Oluşum Mekanizmaları ve Uygulama Alanları”, *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 2, 70-80, (2016).

Yoshida, N., Higashimura, E. and Saeki, Y., “Catalytic biomineralization of fluorescent calcite by the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoglucosidasius*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 7322–7327, (2010).

Zhang, Y., Guo, H. X. and Cheng, X. H., “Role of calcium sources in the strength and microstructure of microbial mortar”, *Constr. Build. Mater.*, 77, 160-167, (2015).

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Murat Can AKDEMİR

Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri / 01.01.1992

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : muratcanakdemir91@hotmail.com

İletişim Adresi : Feslegen Mah. 992. Sokak No:2 Daire:3
Pamukkale/DENİZLİ

ESERLER

A. Uluslararası konferanslarda yayımlanan eserler:

Akdemir, M., Sensoy, T., Komur, K., Ozcanak, M., Mercan Doğan, N., ‘Calcium carbonate precipitation induced by ureolytic *Bacillus* licheniformis B22 under some environmental conditions’, International Conference On Engineering and Natural Sciences, p:120, 15-19 May 2015, Skopje, MACEDONIA.

Akdemir, M., Bilmez, F., Bozbeyoglu, N.N., Kabalay, B., Arslan, S., Mercan Dogan, N., ‘Determination of urease and carbonic anhydrase activities in thermophilic *Bacillus* licheniformis B37’, the 4th International Symposium on Euroasian Biodiversity, SEAB 2018, Kiev, UKRAINE.

Akdemir, M., Aydın, D., Bozbeyoglu, N.N., Kabalay, B., Arslan, S., Mercan Dogan, N., ‘Role of urease and carbonic anhydrase in thermal *Bacillus* sp.B33 for calcium carbonate mineralization’, the 4th International Symposium on Euroasian Biodiversity, SEAB 2018, Kiev, UKRAINE.