

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

**ÜREOLİTİK BAKTERİ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*
U17 İLE KALSİYUM KARBONAT ÇÖKELİMİ VE BETONUN
FİZİKSEL ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

MERVE TEPE

DENİZLİ, EYLÜL - 2021

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



ÜREOLİTİK BAKTERİ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*
U17 İLE KALSİYUM KARBONAT ÇÖKELİMİ VE BETONUN
FİZİKSEL ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

MERVE TEPE

DENİZLİ, EYLÜL - 2021

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017FEBE016 nolu proje ile desteklenmiştir.

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.

MERVE TEPE

ÖZET

ÜREOLİTİK BAKTERİ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* U17 İLE KALSİYUM KARBONAT ÇÖKELİMİ VE BETONUN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

MERVE TEPE

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, EYLÜL - 2021

Bu çalışmada kalsiyumca zengin topraklardan (İsrafil Deresi, Denizli) izole edilen *Bacillus amyloliquefaciens* U17 suşunun kalsiyum karbonat çökeli ile üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitesi araştırılmıştır. *B. amyloliquefaciens* U17, % 10 inokulasyon oranında inkübasyonun 5. gününde 25 mM üre, 25 mM CaCl₂ ve 25 mM NaHCO₃ içeren ortamda 2248 ± 74 mg/L CaCO₃ çökeli yapmıştır. En iyi çökeli yaptığı sıcaklık 37°C ve başlangıç pH'sı da 6.50'dir. KMO besiyerinde üreaz enzim aktivitesi 0,615±0,092 µmol/dk/mg ve karbonik anhidraz aktivitesi 1,315±0,021 nmol/dk/mg iken, LB-üre besiyerinde üreaz aktivitesi 36,03±5.48 µmol/dk/mg ve karbonik anhidraz aktivitesi 28,82±3,31 nmol/dk/mg'dir. Üreaz B protein ekspresyon seviyesi western blot ile ilk kez bu çalışmada gösterildi. Mineralojik analizlerle doğrulanan bakteriyel CaCO₃'ün vaterit ve kalsit kristal varlığı XRD, SEM, CRS ve EPMA ile gösterildi. Çalışmamızda farklı kalsiyum kaynaklarının (Ca-klorür, C-laktat, Ca-nitrat ve Ca-asetat) çökeli etkisi de test edildi ve en etkili kalsiyum kaynağının Ca-nitrat (25 mM Ca-nitrat, 3282±10,0 mg/L CaCO₃) olduğu bulundu. Şahit beton örnekleri ve 5 günlük hücre kültürünün eklenmesi ile hazırlanan beton örnekleri 28, 60 ve 90. günlerde basınç dayanımı ve 28. günde kılcal su emme testlerine tabi tutuldu. İnce kesiti alınan beton örneklerinin mineralojik analizleri SEM, CRS ve EPMA aracılığıyla gerçekleştirildi. U17'nin beton basınç dayanımı ve kılcal su emme kapasitesine herhangi bir etkisi bulunmamasıyla birlikte bakteriyel beton örneklerinde biyojenik vaterit ve kalsit kristallerinin varlığı gösterildi. Yerel izolatımızın CaCO₃ çökeli potansiyelinin iyileştirilmeye değer olduğuna karar verildi.

ANAHTAR KELİMELEER: *Bacillus amyloliquefaciens*, üreaz, karbonik anhidraz, kalsiyum karbonat çökeli, beton.

ABSTRACT

CALCIUM CARBONATE PRECIPITATION BY UREOLYTIC BACTERIA *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* U17 AND ITS EFFECT ON THE PHYSICAL PROPERTIES OF THE CONCRETE

PH.D THESIS
MERVE TEPE

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. NAZIME MERCAN DOGAN)

DENİZLİ, SEPTEMBER 2021

In this research, calcium carbonate precipitation with urease and carbonic anhydrase enzyme activity of *Bacillus amyloliquefaciens* U17 isolated from calcium-rich soil (İsrafil Stream, Denizli) were investigated. *B. amyloliquefaciens* U17 precipitated 2248 ± 74 mg/L CaCO_3 on the 5th day of the incubation at the rate of 10% inoculation in a medium comprising 25 mM urea, 25 mM CaCl_2 and 25 mM NaHCO_3 . Topnotch precipitation temperature is 37°C and initial pH is 6.50. As urease enzyme activity is $0,615 \pm 0,092$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ and carbonic anhydrase activity is $1,315 \pm 0,021$ $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ in CPM medium, urease enzyme activity is $36,03 \pm 5.48$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ and carbonic anhydrase activity is $28,82 \pm 3,31$ $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ in LB-urea medium. Urease B protein expression level was shown with western blot for the first time in this research. Existences of vaterite and calcite crystals of the bacterial CaCO_3 verified by mineralogical analyses were shown by XRD, SEM, CRS and EPMA. Effects of different calcium sources (Ca-chloride, C-lactate, Ca-nitrate, and Ca-acetate) on precipitation were also tested in this research and the most effective calcium source was found as Ca-nitrate (25 mM Ca-nitrate, $3282 \pm 10,0$ mg/L CaCO_3). Reference concrete samples and the concrete samples prepared by the addition of 5-days cell culture were subjected to compressive strength tests at 28th, 60th and 90th days and capillary water absorption test at 28th day. Mineralogical analyzes of thin-sectioned concrete samples were carried out by SEM, CRS and EPMA. While there is no effect of U17 on compressive strength and capillary absorption of the concrete, presence of biogenic vaterite and calcite in bacterial concrete samples were shown. It was decided that the CaCO_3 precipitation potential of our local isolate was worth to be improved.

KEYWORDS: *Bacillus amyloliquefaciens*, urease, carbonic anhydrase, calcium carbonate precipitation, concrete.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	xii
ÖNSÖZ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEZİN KONUSU VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1 Tezin Konusu	4
2.1.1 Mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat (CaCO ₃) çökelimi.....	4
2.1.2 Mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat (CaCO ₃) çökelimini etkileyen faktörler	5
2.1.2.1 Bakteri Türü	6
2.1.2.2 Hücre Konsantrasyonu	7
2.1.2.3 pH.....	8
2.1.2.4 Sıcaklık.....	9
2.1.2.5 Üre ve Ca ⁺² Konsantrasyonu	10
2.1.3 Üreolitik Bakteriler ile Gerçekleştirilen Beton Çalışmaları	12
2.2 Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Özellikleri	14
3. MATERYAL VE METOD	16
3.1 Materyal	16
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	16
3.2 Metod.....	17
3.2.1 Kalsiyum Karbonat Çökelim Şartlarının Belirlenmesi	17
3.2.2 Kalsiyum Karbonat Miktarının Belirlenmesi.....	18
3.2.3 EDTA Titrimetrik Hesaplamaları.....	18
3.2.4 Bakteriyel Kalsiyum Karbonatın Kurutulması ve Saklanması	18
3.2.5 Amonyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi	19
3.3 Mineralojik Analizler.....	19
3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri	19
3.3.2 Elektron Prob Mikro Analizör (EPMA) Analizleri.....	19
3.3.3 Konfokal RAMAN Spektrofotometresi.....	20
3.3.4 X-Işınları Kırınımı.....	20
3.4 Enzim Analizleri.....	20
3.4.1 Üreaz ve karbonik anhidraz aktivitesinin izlenmesi	20
3.4.2 Analitik Metotlar	21
3.4.2.1 Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	21
3.4.2.2 Üreaz Enzim Aktivitesi	22
3.4.2.3 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi	22
3.4.2.4 Üreaz Protein Seviyesinin Belirlenmesi	22
3.5 Beton Çalışmaları ve Analizleri	24
3.5.1 Bakteriyel Kalsiyum Karbonatın Beton Dayanımına Etkisinin Belirlenmesi.....	24
3.5.1.1 Beton Numunelerinin Mineralojik Analizi	27

3.5.1.2	Beton Numunelerinin Analizi.....	27
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1	Yerel İzolatın Teşhis ve Tanımlanması	29
4.2	Kalsiyum Karbonat Çökelimini Etkileyen Faktörler.....	30
4.2.1	Bakteri Türünün Etkisi ve Yerel İzolatın Önemi	30
4.2.2	pH'nın etkisi.....	33
4.2.3	Sıcaklık Etkisi:	35
4.2.4	Ürenin Etkisi	38
4.2.5	Kalsiyum Kaynakları Olarak Kalsiyum Klorür, Kalsiyum Laktat, Kalsiyum Nitrat ve Kalsiyum Asetatın Etkisi	40
4.2.6	Hücre İnokulasyon Oranının Etkisi.....	43
4.2.7	Ajitasyonun etkisi.....	45
4.2.8	Amonyum Konsantrasyonu	46
4.3	Enzim Analizleri (Analitik Metotlar)	48
4.3.1	Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi.....	48
4.3.2	Üreaz ve Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi	50
4.3.3	Üreaz Protein Seviyesinin Belirlenmesi	55
4.4	Mineralojik Analizler.....	57
4.5	Beton Analizleri.....	74
4.5.1	Beton Örnekleri CRS Analizleri	74
4.5.2	Beton Örnekleri EPMA Analizleri.....	85
4.5.3	Beton Örnekleri FESEM Analizleri	97
4.5.4	Basınç Dayanımı ve Kılcal Su Emme Analizleri.....	98
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	104
6.	KAYNAKLAR	105
7.	EKLER	125
	EK A-Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	125
	EK B-Çalışmada Kullanılan Reaktif ve Kimyasallar.....	126
	EK C-Enzim Deneylerinde Kullanılan Standart Kalibrasyon Eğrileri.....	128
	EK D-EPMA Nokta ve Alan Analizleri	130

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Üreolitik CaCO ₃ çökelişi (De Muynck ve diğ. 2010).....	6
Şekil 3.1: Taze betona eklenmek için hazırlanan bakteri kültürleri.....	25
Şekil 3.2: Reçeteye göre bakteri kültürü eklenen taze beton karışımının fiziksel özelliklerinin kontrolü.....	26
Şekil 3.3: TS EN 206'ya uygun hazırlanan karışımların TS EN 12350-1 standardına uygun olarak kalıplara dökülmesi.....	26
Şekil 3.4: 1 gün süre ile kalıpta bekletilen ve kuruduktan sonra kül havuzuna yerleştirilecek olan numuneler.....	27
Şekil 3.5: Basınç Dayanımı Testi.....	28
Şekil 4.1: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin 16S rDNA baz dizilimi.....	30
Şekil 4.2: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 Üreaz Testi.....	32
Şekil 4.3: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 Karbonik Anhidraz Testi.....	33
Şekil 4.4: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin toplam protein miktarları.....	49
Şekil 4.5: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı oranlarda maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin total protein miktarları.....	50
Şekil 4.6: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri.....	52
Şekil 4.7: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri.....	53
Şekil 4.8: Üreaz B protein bantları. Western blot ile analiz edilmiştir. A) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 KMO ve LB-üre ortamında geliştirilmiştir. Hatlar: 1, Protein marker, 2, LB-üre besiyerinde U17 üreaz B proteini, 3, KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 4, protein marker. B) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinde üreaz protein seviyesi. Hatlar: 1 Kalsiyum asetat KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 2 Kalsiyum nitrat KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 3 Kalsiyum laktat KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 4 Kalsiyum klorid KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 5) Moleküler kütle standardı.....	56
Şekil 4.9: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin XRD profili (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	59

Şekil 4.10: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin CRS analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	60
Şekil 4.11: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin SEM analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	60
Şekil 4.12: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	61
Şekil 4.13: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	62
Şekil 4.14: 25 mM kalsiyum laktat içeren besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve kalsit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	65
Şekil 4.15: 25 mM kalsiyum laktat içeren besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	66
Şekil 4.16: 25 mM kalsiyum nitrat içeren besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve kalsit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	67
Şekil 4.17: 25 mM kalsiyum nitrat içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	68
Şekil 4.18: 25 mM kalsiyum asetat içeren besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	69
Şekil 4.19: 25 mM kalsiyum asetat içeren besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	70
Şekil 4.20: 25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	71
Şekil 4.21: 25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin 1 nolu nokta EPMA analizi.....	71
Şekil 4.22: 25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	72
Şekil 4.23: 25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin 1 nolu nokta EPMA analizi.....	72
Şekil 4.24: 25 mM kalsiyum asetat KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50).....	73

Şekil 4.25: 25 mM kalsiyum asetat KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin 1 nolu nokta EPMA analizi.....	73
Şekil 4.26: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen dolomit pikleri (B).....	76
Şekil 4.27: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B).....	77
Şekil 4.28: Şahit beton örneğinin 28. gün CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik fayalit pikleri (B).....	78
Şekil 4.29: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B).....	79
Şekil 4.30: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B).....	80
Şekil 4.31: 60. gün şahit beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik siderit pikleri (B).....	81
Şekil 4.32: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen CaCO ₃ pikleri (B).....	82
Şekil 4.33: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B).....	83
Şekil 4.34: 90. gün şahit beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen kalsit pikleri.....	84
Şekil 4.35: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA analizi.....	86
Şekil 4.36: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA 1 nolu nokta analizi.....	86
Şekil 4.37: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA analizi.....	87
Şekil 4.38: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi.....	87
Şekil 4.39: 28. gün şahit beton örneği EPMA analizi.....	88
Şekil 4.40: 28. gün şahit beton örneği 1 nolu alan EPMA analizi.....	89
Şekil 4.41: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA analizi.....	90
Şekil 4.42: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi.....	90
Şekil 4.43: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA analizi.....	91
Şekil 4.44: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi.....	92
Şekil 4.45: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA analizi.....	93
Şekil 4.46: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi.....	93
Şekil 4.47: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA analizi.....	94

Şekil 4.48: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi.....	95
Şekil 4.49: 90. gün şahit beton örneği EPMA analizi.....	95
Şekil 4.50: 90. gün şahit beton örneği 1 nolu alan EPMA analizi.....	96
Şekil 4.51: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği FESEM görüntüsü (A) ve EDS analizi (D); <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği FESEM görüntüsü (B) ve EDS analizi (E); 28. gün şahit beton örneği FESEM görüntüsü (C) ve EDS analizi (F).....	97
Şekil 4.52: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 ilaveli beton örneğinin 90.gün sonunda SEM analizi.....	102

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Kalsiyum karbonat çökeliminde kullanılan deneysel parametreler....	17
Tablo 3.2: Katkısız C8 Taze Beton Karışımı İçeriği (1000 L; 2331 kg/m ³ için reçete).....	25
Tablo 4.1: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine başlangıç pH'sının etkisi (CaCO ₃ mg/L; 333 mM Üre, 25 mM CaCl ₂ , 25 mM NaHCO ₃ , t=37°C).....	35
Tablo 4.2: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine asıcılığın etkisi (mg/L) (333 mM Üre, 25 mM CaCl ₂ , 25 mM NaHCO ₃ , pH: 6.5).....	37
Tablo 4.3: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine üre konsantrasyonunun etkisi (mg/L) (pH:6.5, 25 mM CaCl ₂ , 25 mM NaHCO ₃ , t=37°C).....	39
Tablo 4.4: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine CaCl ₂ konsantrasyonunun etkisi (mg/L) (pH:6.5, 333 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , t=37°C).....	41
Tablo 4.5: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine kalsiyum kaynaklarının etkisi (mg/L) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , t=37°C, pH: 6.50) ve son pH dereceleri.....	43
Tablo 4.6: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine hücre inokulasyon oranının etkisi (mg/L) (pH:6.5, 25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , t=37°C).....	44
Tablo 4.7: Çalkalamalı inkübasyonun <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine etkisi (mg/L) (pH:6.5, 25 mM Üre, 25 mM NaHCO ₃ , 25 mM CaCl ₂ , t=37°C) ve son pH.....	45
Tablo 4.8: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından yapılan çökelim şartlarında amonyum azotu (NH ₃ -N) analiz sonuçları (mg /L).....	46
Tablo 4.9: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'in çökelim parametrelerinde kalsiyum karbonat miktarı (25 mM üre, 25 mM CaCl ₂ , 25 mM NaHCO ₃ , %10 inokulasyon oranı, sıcaklık: 37°C, pH _{başlangıç} : 6,5).....	47
Tablo 4.10: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin toplam protein miktarları.....	49
Tablo 4.11: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı oranlarda maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin total protein miktarları.....	49
Tablo 4.12: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri.....	52

Tablo 4.13: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri.....	53
Tablo 4.14: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA kantitatif analizi.....	61
Tablo 4.15: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA kantitatif analizi.....	62
Tablo 4.16: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından farklı kalsiyum kaynakları ile hazırlanmış besiyerinde çökeli mi gerçekleştirilen CaCO ₃ miktarı (mg/L) ve türü.....	63
Tablo 4.17: 25 mM kalsiyum laktat içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA kantitatif analizi.....	71
Tablo 4.18: 25 mM kalsiyum nitrat içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA kantitatif analizi.....	72
Tablo 4.19: 25 mM kalsiyum asetat içeren KMO besiyerinde <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 tarafından üretilen CaCO ₃ kristallerinin EPMA kantitatif analizi.....	73
Tablo 4.20: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	86
Tablo 4.21: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	88
Tablo 4.22: 28. gün şahit beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	89
Tablo 4.23: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	91
Tablo 4.24: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	92
Tablo 4.24 (devamı): <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	92
Tablo 4.25: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	94
Tablo 4.25 (devamı): <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	94
Tablo 4.26: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	95
Tablo 4.27: 90. gün şahit beton örneği EPMA kantitatif analizi.....	96
Tablo 4.28: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 ile hazırlanan bakteriyel betonun basınç dayanımı.....	99
Tablo 4.29: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> U17 ile hazırlanan bakteriyel betonun su emme analizi.....	99

Tablo 4.30: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 ile hazırlanan bakteriyel betonun basınç dayanımı.....	100
Tablo 4.31: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 ile hazırlanan bakteriyel betonun su emme analizi.....	100

SEMBOL LİSTESİ

L	:	Litre
mL	:	Mililitre
g	:	Gram
mg	:	Miligram
µg	:	Mikrogram
mM	:	Milimolar
µmol	:	Mikromol
nmol	:	Nanomol
mm	:	Milimetre
CaCO₃	:	Kalsiyum karbonat
KMO	:	Kalsiyum mineralizasyon ortamı
LB	:	Lauria-Bertani
MPa	:	Megapascal
KOB	:	Koloni oluşturan birim
ALP	:	Alkalin fosfataz
°C	:	Celcius derecesi
OD	:	Optik dansite
dH₂O	:	Distile su
XRD	:	X-Işınları Kırınımı
XRF	:	X-Işını Floresansı
CRS	:	Konfokal RAMAN Spektrofotometresi
EPMA	:	Elektron Prob Mikro Analizör
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
FESEM	:	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
EDS	:	Elektron Demet Sistemi

ÖNSÖZ

Engin bilgisi ve anne şefkati ile beni her zaman sarmalayan, en zor zamanlarda bile benden bir an olsun vazgeçmeyen, değerli danışmanım Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a

Enzim çalışmalarının her aşamasında, bizi her zaman destekleyen Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a

Bizim için oldukça yabancı olan beton konusunda bize en iyi şekilde destek veren ve yönlendiren Prof. Dr. Ali Haydar KAYHAN'a,

Mineral analizlerini anlamamızda ve yorumlamamızda bize sonsuz destek sunan Prof. Dr. Tamer KORALAY'a,

Laboratuvarlarında gerçekleştirdiğimiz analizler süresince her an yanımızda olup yönlendirmelerini esirgemeyen Prof. Dr. Yusuf Kağan KADIOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Kıymet DENİZ'e,

Bilimsel ve manevi desteğini her daim hissettiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Erdal UĞUZDOĞAN'a,

Laboratuvar arkadaşlarım Öğr. Gör. Naime Nur BOZBEYOĞLU KART, Ferid NESİRLİ, Doğukan MUTLU, Buket KABALAY YILDIRIM ve Tuğba Hilal DENİZLİ'ye,

Denizli'yi benim için yaşanır kılan sevgili dostum Burak TOP'a ve sevgili annesi Nurgül TURHAN'a,

Her zaman yanımda olan, canımdan çok sevdiğim sevgili annem Mehtap TEPE'ye ve sevgili babam Ahmet TEPE'ye,

En kıymetlim, dünyalar güzeli kardeşim Buse ÖZÇELİK'e ve çok sevgili eşi Özden ÖZÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Organizmaların çeşitli sebeplerle, buldukları ortamda yahut bünyelerinde inorganik bileşenler biriktirmeleri süreci biyomineralizasyon olarak tanımlanır. Diğer bir deyişle, canlı organizmaların regülasyonu altında organik ve inorganik maddenin birbiriyle birleştiği bir süreçtir. Alg ve diatomlarca üretilen silikatlar, omurgasızlarca üretilen karbonatlar, omurgalı canlıların çeşitli vücut yapılarında gözlemlenen fosfat ve karbonat yapıları gibi birçok oluşum biyomineralizasyon sonucunda gerçekleşir (Dhami ve diğ. 2013). Prokaryotlar tarafından mineral oluşumu “biyolojik olarak kontrol edilen” ve “biyolojik olarak indüklenen mineralizasyon” şeklinde genel iki sınıfa ayrılır. Belirli bir konumda ve koşulda, hücre içinde ya da dışında gerçekleşen mineral sentezi “Biyolojik Olarak Kontrol Edilen Mineralizasyon” olarak değerlendirilirken, organizmaların metabolik aktiviteleri doğrultusunda hücre dışında mineral oluşturmaları dolayısıyla ortamı regüle etmeleri ise “Biyolojik Olarak İndüklenmiş Mineralizasyon” olarak tanımlanır (Lowenstam 1981; Lowenstam ve Weiner 1989). Biyominerallerin hücre dışı oluşumu, prokaryotların çeşitli alanlarda kullanım potansiyelini gündeme getirmiştir. Bu nedenle günümüzde çok sayıda bilim insanı tarafından bakteriyel biyomineralizasyon (bakteriyel çökeltim-presipitasyon) konusu yoğun olarak araştırılır.

Üreolitik bakteriler aracılığıyla gerçekleştirilen mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat (CaCO_3) çökeltiminin mühendislik, materyal bilimi ve çevre alanındaki uygulamaları oldukça çeşitlilik arz eder. Kendi kendini onarabilen dental kompozitlerin üretimi (Seifan ve diğ. 2016), diş, kemik gibi vücut yapılarının onarımında kullanım potansiyelinin ortaya çıkarılması amacıyla üreolitik kalsifikasyon ile üretilen polimer hidrojelilerin üretimi (Rauner ve diğ. 2014) gibi tıbbi materyal araştırmalarının yanı sıra ağır metallerin uzaklaştırılması (Warren ve diğ. 2001), radyonüklidlerin ortadan kaldırılması (Fujita ve diğ. 2004), sularda kalsiyum miktarının azaltılması (Hammes ve diğ. 2003), atık sulardaki kirleticilerin biyoayrıştırılması (Chaturvedi ve diğ. 2006), karbondioksitin kalsiyum karbonata çökeltimi araştırmaları (Herzog ve Drake 1996; Shaffer 2010; Bhattacharya 2010) gibi çevre araştırmaları, kalkerli taş malzemelerin restorasyonu (Tiano 1995;

Castanier ve diğ. 2000; Stocks-Fisher ve diğ. 1999; Rodriguez-Navarro ve diğ. 2003), arkeolojik kalıntıların bakteriyel CaCO₃ çökelişi ile konsolidasyonu (Jroundi ve diğ. 2014) gibi restorasyon çalışmaları, kumlu zeminlerin iyileştirilmesi (Akyol ve diğ. 2017; Riveros ve Sadrekarimi 2020; Liang ve diğ. 2019), beton iyileştirilmesi (Pacheco-Torgal ve Labrincha 2013; Raut ve diğ. 2014; Maheswaran ve diğ. 2014; Al-Ansari ve diğ. 2017; Charpe ve diğ. 2017) ve beton onarımına (Dhami ve diğ. 2013; Qiu ve diğ. 2014; Lors ve diğ. 2017; Gupta ve diğ. 2018; Wang ve diğ. 2018) ilişkin çok sayıda mühendislik alanı araştırmaları mevcuttur.

İnşaat endüstrisinin küresel sera gazı emisyonunun yaklaşık %7'sine sebep olduğu bilinir (Hendricks ve diğ. 2004). Bu endüstride kullanılan materyallerin ve ham maddelerin yenilenebilir özellikte olmamaları nedeniyle sürdürülebilir yapı elemanları aracılığıyla çevresel etkilerin azaltılması amaçlandığından, bu alandaki araştırmalar günden güne artış gösterir. Geleneksel beton iyileştirme, sağlamlaştırma, onarma ve koruma yöntemlerinin maliyet ve çevresel etkilerinin ortadan kaldırılmaya çalışılması, üreolitik toprak bakterilerinin beton ile ilgili çalışmalara dahil edilmelerine sebep olur. Günümüzde, bu çalışmalardan elde edilen verilerin yenilikçi inşaat teknolojilerinde kullanılabilecek alternatif yöntemler olabilecekleri kabul edilir ve biyojenik sıva ile beton onarımı (Sierra-Beltran ve diğ. 2014; Amidi ve Wang 2015; Choi ve diğ. 2017; Gupta ve diğ. 2018; Xu ve Wang 2018; Jongvivatsakul ve diğ. 2019; Chen ve diğ. 2020), kendi kendini iyileştirebilen beton uygulamaları (Wang ve diğ. 2014; Khushnood ve diğ. 2020) ve doğrudan ya da immobilize edilmiş üreolitik bakteriler eklenerek hazırlanan betonun fiziksel özelliklerindeki değişimlerin araştırıldığı çalışmalara (Tepe ve diğ. 2019; Chahal ve diğ. 2012; Bang ve diğ. 2001; Shaheen ve diğ. 2019) ağırlık verilir.

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan, kalsiyum karbonat çökelişi yapabildiği bilinen üreolitik yerel izolat *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelişi yeteneği incelendi, üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri ile mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlandı. X-Işınları Kırınımı Analizi (XRD), X-Işınları Floresans Analizi (XRF), Confocal RAMAN Spektrofotometresi, Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi (SEM) ve Elektron Prob Analizör (SEM-EPMA) aracılığıyla

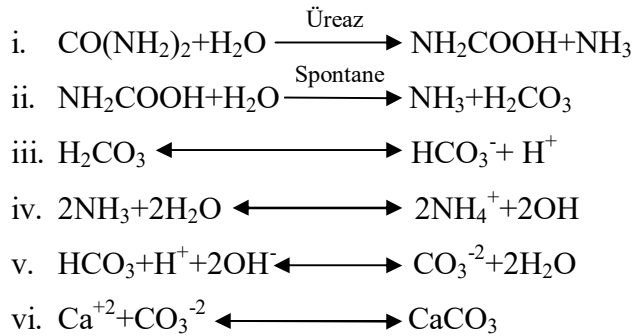
bakterilerin kalsiyum karbonat profilleri kıyaslandı. Ayrıca yerel izolatımızın inşaat sektöründe kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, bakterinin ürettiği CaCO₃'ın betonun kılcal su emme ve basınç dayanımı özellikleri üzerine etkisi de çalışıldı. Beton çalışmalarında *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 kontrol olarak kullanıldı.

2. TEZİN KONUSU VE LİTERATÜR TARAMASI

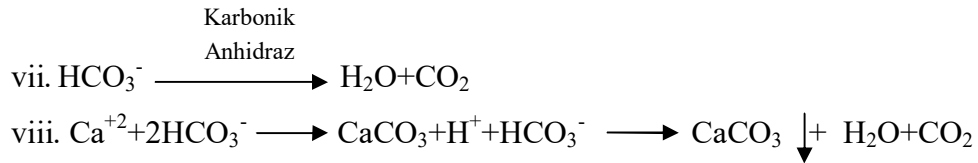
2.1 Tezin Konusu

2.1.1 Mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat (CaCO₃) çökelişi

Mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat (CaCO₃) çökelişi bakterilerin fotosentez (Thompson ve Ferris 1990; McConnaughey ve Whelan 1997), nitrat ya da sülfat indirgenmesi (Warthmann ve diğ. 2000), üre hidrolizi (Stocks-Fischer ve diğ. 1999; De Muynck ve diğ. 2010; Dhami ve diğ. 2013), biyofilm ve ekstrasellüler polisakkarit (EPS) oluşumu (Kawaguchi ve Decho 2020; Arias ve Femandes 2008) ve benzeri metabolik aktiviteleri doğrultusunda gerçekleşir ve bu aktiviteler sonucunda CaCO₃ çökelişi meydana gelir (Banzerara ve diğ. 2011). Genel olarak çökeliş, üreolitik toprak bakterilerinin enzim aktivitesi ile ortamın kimyasal koşullarının değişmesi sonucunda gerçekleşir (Hammes ve Verstraete 2002). Diğer bir deyişle, bakteri hücrelerinin biyokimyasal aktivitelerine bağlı olarak aşırı doygun ortamlarda kalsiyum karbonat oluşturmaları şeklinde açıklanabilir ve bu aktiviteler esnasında organizmalar ortamdaki Ca⁺² iyonu ile reaksiyona girebilen bir ya da daha fazla metabolik ürün (CO₃⁻²) üretebilirler. Bu aktiviteler üreaz ve karbonik anhidraz enzimleri tarafından gerçekleştirilir ve çökelişi meydana getiren süreçler karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar ile şekillenir (Achal ve diğ. 2014). Bu reaksiyonlar:



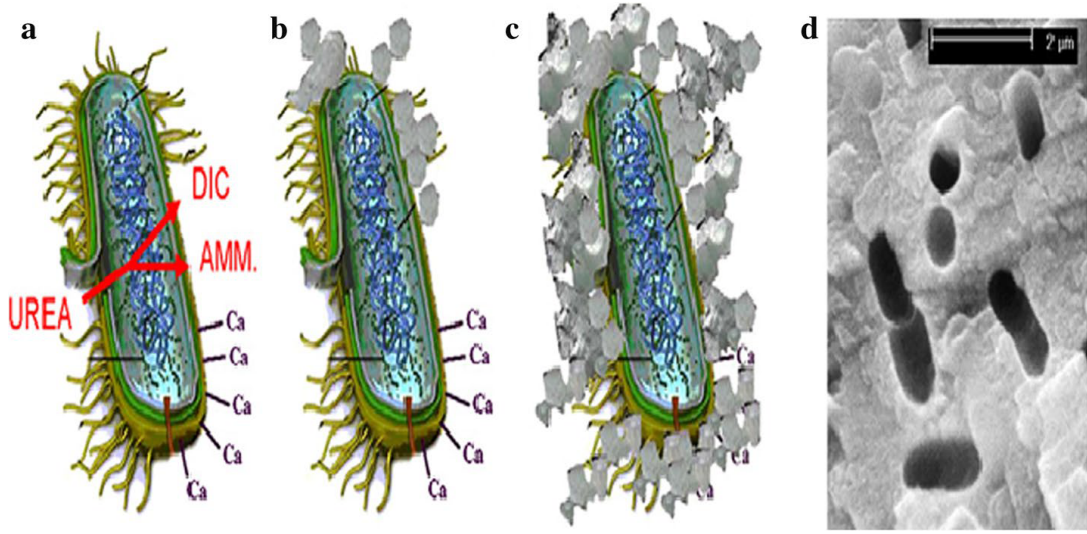
şeklinde olup ilk aşamada üre, bakteriyel üreaz varlığında karbamik asit ve amonyuma indirgenir (i). Ardından karbamik asit kendiliğinden amonyum ve karbonik asite dönüşür (ii) (Stocks-Fischer ve diğ. 1999; Burne ve Chen 2000) ve bunun sonucunda bikarbonata ayrışır (iii). Çözeltide bulunan hidroksit (OH⁻) ve amonyum iyonlarının (NH₄) ortam pH'ını yükseltmesi (iv ve v) karbonat (HCO₃⁻) oluşumuna sebep olur (Ferris ve diğ. 1996; Mitchell ve Ferris 2005). Ortamda yeterli kalsiyum (Ca⁺²) iyon doygunluğu bulunması durumunda (vi), bu yüksek saturasyon koşulları CaCO₃ çökelinin oluşumunu sağlar (Qian ve diğ. 2010; Phillips ve diğ. 2013). Ortamda çözülmüş inorganik karbon kaynağı olarak bikarbonat (HCO₃⁻) bulunması durumunda, bikarbonat karbonik anhidraz enzimi aktivitesi sonucunda (vii ve viii) CaCO₃ mineraline dönüştürülür (Li ve diğ. 2010). Üreaz enziminin ortamın pH'ının alkalinitesini koruyarak biyomineralizasyonu hızlandırdığı, karbonik anhidraz enziminin ise karbondioksitin bikarbonata hidrasyonu görevini üstlendiği belirtilir (Dhami ve diğ. 2014).



2.1.2 Mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat (CaCO₃) çökelimini etkileyen faktörler

Mikrobiyal CaCO₃ çökeli, kısa zaman diliminde yüksek miktarda CaCO₃ mineralinin üretilbildiği, kolaylıkla kontrol edilebilen bir süreçtir (Dhami ve diğ. 2013). Üreaz aktivitesi ve çökelen CaCO₃ miktarı bakteri türü, bakteriyel hücre konsantrasyonu, pH, sıcaklık, üre ve çözülmüş Ca⁺² konsantrasyonuna bağlıdır (Mortensen ve diğ. 2011; Qabany ve diğ. 2012). Üreaz enzimi, biyomineral oluşumu ile ilişkili kimyasal süreci pH, çözülmüş inorganik karbon, kalsiyum ve karbonat iyon konsantrasyonları aracılığıyla düzenlerken, bakteri konsantrasyonu yani nükleasyon alanlarının varlığı ise devamlı CaCO₃ çökelimini sağlar (Phillips ve diğ. 2013; Anbu ve diğ. 2016).

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi süresince bakteri hücrelerinin nükleasyon alanı oluşturarak ortaya çıkan CaCO_3 miktarına ve türüne etki ettikleri bilinir (Douglas ve Beveridge 1998; Rodriguez-Navarro ve diğ. 2012). Negatif yüklü bakteriyel hücre yüzeyleri ortamdaki katyonları (Ca^{+2} , Mg^{+2} vb.) yakalayarak (Şekil 2.1) nötral bir ortam yaratmaları dolayısıyla CaCO_3 birikimi için uygun nükleasyon zonları oluşturur (Ferris ve diğ. 1996; Ramachandran ve diğ. 2001; DeMuynek ve diğ. 2010; Anbu ve diğ. 2016).



Şekil 2.1: Üreolitik CaCO_3 çökelişi (De Muynek ve diğ. 2010).

2.1.2.1 Bakteri Türü

Son yıllarda başta üreolitik bakteriler olmak üzere birçok mikroorganizmada bulunan üreaz enziminin kalsiyum karbonat çökelişini indüklemeye kabiliyeti çok sayıda araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. Bu çalışmalar üreolitik organizmaların tanımlanması, izole edilmesi ve ürettikleri CaCO_3 'ün niteliği, türü ve kullanım potansiyellerinin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Örneğin, *Bacillus aerius*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Synechococcus leopoliensis*, *Kocuria flava*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus stabekisii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Diaphorobacter nitroreducens*, *Bacillus megaterium*, *Desulfocella halophilia*, *Halmona seurihalina*, *Helicobacter pylori*, *Methylocystis parvum*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas denitrificans*, *Spolactobacillus sp.*, *Sporosarcina ginsengisoli*, *Sporosarcina pasteurii*, *Aerobacter aerogenes*, *Myxococcus xanthus*, *Shewanella sp.*, *Staphylococcus aureus*,

Pararhodobacter sp. ve bazı fungus türleri ile halotolerant bakteriler üreaz kapasitesine sahip olup kalsiyum karbonat çökmesi yapabilen türlerdir (Mudgil ve diğ. 2018; Tepe ve diğ. 2019; Bai ve diğ. 2017; Omoregie ve diğ. 2017; Erşan ve diğ. 2015; Ganendra ve diğ. 2014; Achal ve Pan 2014; Dhami ve diğ. 2013; Gorospe ve diğ. 2013; Li ve diğ. 2013; Achal ve diğ. 2011; Chen ve diğ. 2009; Chekroun ve diğ. 2004; Hammes ve diğ. 2003; Stocks-Fischer ve diğ. 1999).

Farklı bakteri türlerinin farklı miktarlarda üreaz enzim aktivitelerine ve kalsiyum karbonat çöküm oranlarına sahip oldukları, mikroorganizma tür ve suş çeşitliliğinin kristal fazı, boyutu, yapısı ve morfolojisi gibi özellikler üzerinde etkili olduğu bilinir (Hammes ve diğ. 2003). Türler/suşlar ve ürettikleri kalsiyum karbonat kristallerinin özellikleri arasındaki ilişkinin anlaşılması büyük önem taşır. Bu özelliklerin bakteri hücre yüzeyinde depolanan, farklı biyokimyasal yapıları sonucu farklı özelliklerde kristaller oluşmasında etkili olan EPS yapıları ile ilişkili olduğu düşünülür (Ercole ve diğ. 2007).

Diğer bakterilere kıyasla daha yüksek çevre adaptasyonu, daha spesifik hücre yüzeyi özellikleri, hücreler arasında daha düşük kümelenme ve yüksek üre hidrolizi oranına sahip olmaları sebebiyle *Bacillus* ve *Sporosarcina* cinsi bakteriler daha yüksek üreolitik aktivite ve kalsiyum karbonat çöküm oranına sahiptirler (DeJong ve diğ. 2010; Jiang ve diğ. 2016). Bu bakteri türleri, üre hidrolizi sürecinin yanı sıra, solunum esnasında üreyi enerji ve azot kaynağı olarak kullanmak suretiyle karbondioksit elde ederek karbonata dönüştürürler ve metabolizasyon sonucu kalsiyum karbonat depolarlar (De Muynck ve diğ. 2010; DeJong ve diğ. 2006; Qian ve diğ. 2015).

2.1.2.2 Hücre Konsantrasyonu

Yüksek hücre konsantrasyonunun (10^6 - 10^8 hücre/mL) artan üreaz konsantrasyonu ve üre hidrolizi aracılığıyla üretilen kalsiyum karbonat miktarını arttırdığı bilinir (Okwadha ve Li 2010; Zhao ve diğ. 2019). Çeşitli araştırmacılar üre hidrolizi ile bakteriyel hücre sayısı arasında doğrudan bir korelasyon olduğunu ve bakterilerin nükleasyon alanı teşkil etmeleri sebebiyle hücre yoğunluğunun kalsiyum karbonat çökümü açısından büyük önem arz ettiğini ifade etmektedirler (Stocks-

Fischer ve diğ. 1999; Ng ve diğ. 2012). Örneğin, Andalib ve diğ. (2016), 5 farklı hücre konsantrasyonunda (10×10^5 - 50×10^5 cfu/mL) betona uyguladıkları *Bacillus megaterium* bakterisi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında bakteri konsantrasyonu ve çökeltim arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ve en yüksek hücre konsantrasyonu ile hazırlanan betonun basınç dayanımında %24, en düşük konsantrasyonla hazırlanan betonun basınç dayanımında ise %12.8 oranında artış gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus sphaericus* ile gerçekleştirilen mineral optimizasyonu çalışmalarında hücre konsantrasyonu artışı ile birlikte, çökeltim kalsiyum karbonat miktarının da lineer olarak arttığı gösterildi (Seifan ve diğ. 2016). Farklı konsantrasyonlarda *Pararhodobacter* sp. kültürünün kum kolonlarına tatbik edildiği bir çalışmada ise hücre konsantrasyonundaki artışa paralel olarak kum kolonlarında solidifikasyon ve basınç dayanımı artışı gözlemlendi (Amarakoon ve diğ. 2017).

2.1.2.3 pH

Kalsiyum karbonat çökeltimi pH ile doğrudan ilişkilidir; çünkü üreaz enziminin sadece belli pH aralığında üre hidrolizi yapabildiği bilinir. Kalsiyum karbonat çökeltimi ve üre hidrolizi için besiyerinin optimum başlangıç pH değeri her suş için farklıdır (Omorie ve diğ. 2017). Birçok araştırmacıya göre üreaz enzim aktivitesi için optimum pH 8.0 olup, bunun üstündeki değerlerde enzim aktivitesi azalmaktadır (Stocks-Fischer ve diğ. 1999; Gorospe ve diğ. 2013). pH amonyum üretimi ve üre hidrolizi için belirleyicidir ve amonyum üretimi ile yükselen pH ortamında aerobik bakterilerin hücre solunumu ile karbondioksit salınımı artar (Ng ve diğ. 2012). Karbondioksit salınımı ile birlikte karbonat oluşur ve dolayısıyla da kalsiyum karbonat çökeltir. Ancak bu tersinebilir bir reaksiyondur ve düşük pH ortamında kalsiyum karbonat çözünür (Marvasi ve diğ. 2010). Mobley ve diğ. (1995), çökeltimin optimum pH'sının yaklaşık olarak 7.0 olduğunu belirtirken, bazı araştırmacılara göre kalsiyum karbonat oluşumunun büyük çoğunluğu pH 8.7- 9.5 arasındaki alkali koşullarda gerçekleşir (Stocks-Fischer ve diğ. 1999; Ferris ve diğ. 2003; Lee ve diğ. 2003; Dupraz ve diğ. 2009). *Bacillus megaterium* ve *Bacillus cereus*, *Sporosarcina pasteurii* gibi bazı izolatlar 6.5-11.5 aralığındaki pH değerlerinde çökeltim yapabilirken, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* ve

Lysinibacillus fusiformis izolatları için bu aralık 6.0-10'dur (Dhami ve diğ. 2013; Vahabi ve diğ. 2015). Halofilik ve alkalifilik üreolitik bakteriler pH 8.5 ve üzerinde yüksek konsantrasyonlarda çökeltim yapabilirken (Stabnikov ve diğ. 2013), *Sporosarcina pasteurii*'nin pH 11.0'e kadar geniş bir pH aralığında çökeltim yapabildiği bilinir (Henze ve Randall 2018). Nitekim *Sporosarcina pasteurii* izolatları üzerine yapılan bir çalışmada, optimum pH NB33 için 6,5; LPB21 için 7,5 ve NB30 ile NB28 suşları için ise 8,0 olarak rapor edilmiştir (Omoriege ve diğ. 2017).

Doğal ortamda kalsiyum bağlanma alanları (EPS) yanı sıra pH, Ca^{+2} ve CO_3^- ve bunların zamana bağlı değişimi kalsiyum karbonat çökeltiminde anahtar öneme sahiptir (Dupraz ve Visscher 2005; Dupraz ve diğ. 2009). Ancak kalsiyum karbonat çökeltim ortamının hücre dışı kalsiyum oranının hücre içi proton konsantrasyonlarına kıyasla çok yüksek olması (alkali pH sonucu) bakteri için stres koşullarına sebep olur. Bakteri, konsantrasyon gradientini dengelemeye çalıştığı esnada yüksek ATP harcayarak CO_2 açığa çıkarır ve ortamdaki aşırı kalsiyumu $CaCO_3$ şeklinde çökeltirerek ortam pH'sını düşürmeye çalışır (Hammes ve Verstraete 2002).

2.1.2.4 Sıcaklık

Ürenin katalizi, sıcaklığa bağlı enzimatik bir reaksiyondur ve birçok bakteri için üreazın optimal sıcaklık aralığı 20-37°C arasındadır. Ancak enzimatik reaksiyonun optimum aralığı, çevresel koşullar, bakteri türü ve sistemde bulunan reaktant konsantrasyonu gibi faktörlerden doğrudan etkilenir (Okwadha ve Li 2010; De Muynck ve diğ. 2013). Örneğin, sıcaklığın 5°C (15-20°C) ve 10°C (10-20°C) arttırıldığı ortamlarda üreaz aktivitesi sırasıyla 5 ve 10 kat artmaktadır (Mitchell ve Ferris (2005). Bir diğer araştırmada, taban suyundan izole edilen *Bacillus pasteurii*'nin $CaCO_3$ çökeltiminde üreazın optimal aktivitesinin 10-20°C aralığında olduğu tespit edildi (Ferris ve diğ. 2003). Diğer taraftan *Bacillus megaterium* üreaz aktivitesi 35°C'de stabil iken sıcaklık 55°C'ye yükseldiğinde enzim aktivitesinin yaklaşık %47 azaldığı bildirilmiştir (Dhami ve diğ. 2014). Sıcaklık, hem oluşan kristal miktarını hem de biyojenik kristallerin morfolojilerini etkiler (De Muynck ve diğ. 2013; Zamarreno ve diğ. 2009). *Sporosarcina pasteurii*'nin üreaz aktivitesinin sıcaklık ile değişiminin belirlenmesi amacıyla farklı reaksiyon sıcaklıklarında (5, 10,

20, 30, 35, 40, 45 ve 50°C) kum kolonlarında CaCO₃ çökeli mi ile birlikte salınan ortalama amonyum miktarı 2016 yılında geliştirilen amonyum fiksasyonu yöntemi ile (Yu ve diğ. 2016) hesaplandı ve *Sporosarcina pasteurii* için optimal amonyum fiksasyon oranının (%67.97) 40°C’de gerçekleştiği tespit edildi (Yu ve diğ. 2019).

2.1.2.5 Üre ve Ca⁺² Konsantrasyonu

Üre, mikrobiyal üreaz varlığında çözülmüş amonyum, inorganik karbon ve karbondioksit e çözünerek ortam pH’sını artırır ve dolayısıyla kalsiyumca zengin ortamda kalsiyum karbonat çökeli mine sebep olur (Fujita ve diğ. 2008). Ayrıca ortamdaki üre, üreolitik bakteriler tarafından azot ve enerji kaynağı olarak kullanıldığından bakteriyel aktivite için de önemlidir (Moble y ve Hausinger 1989). Artan üre konsantrasyonu, sadece çökelen kalsiyum karbonat miktarında artışa neden olmaz, aynı zamanda ürenin ilave edildiği besiyerinin bakteri hücre yüzeyinin nükleasyon için daha sağlıklı bir ortam haline dönüşmesine ve dolayısıyla yüksek kalsiyum iyonu bağlama kapasitesine sahip daha fazla negatif hücre yüzey alanı oluşmasına da katkı sağlar (Ma ve diğ. 2020). Bu nedenle çok sayıda bilimsel araştırmada kalsiyum karbonat çökeli mi için en uygun başlangıç üre konsantrasyonu araştırılır (De Muynck ve diğ. 2010; Okwadha ve Li 2010; Ducasse-Lapeyrusse ve diğ. 2017). Örneğin alkalofilik *Sporosarcina pasteurii* BNCC 337394 ile gerçekleştirilen bir çalışmada, artan üre konsantrasyonuna bağlı olarak üreaz aktivitesi ve kalsiyum karbonat çökeli minde artış olurken (Ma ve diğ. 2020), *Bacillus sphaericus* LMG 22557’nin kalsiyum karbonat çökeli mi için optimum üre konsantrasyonu 0.5 M olarak rapor edildi (De Muynck ve diğ. 2010). Diğer taraftan yüksek üre konsantrasyonun *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 suşunun kalsit çökeli minin olumsuz etkilediği bildirilen bir çalışmada 0,05-0,25 M gibi düşük üre konsantrasyonlarında çökeli m miktarının daha yüksek olduğu ve çökeli min ortamdaki üre miktarından ziyade kalsiyum iyonu konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirildi (Okwadha ve Li 2010). Aslında Silver ve arkadaşları 1975 yılında kalsiyum iyonunun metabolik süreçlerde kullanılmadığını ve hücre dışında yer alarak kalsiyum karbonat şeklinde çökeldiğini iddia ettiler (Silver ve diğ. 1975). Bu görüşün aksine, ortamda kalsiyum iyonu varlığının üreaz aktivitesini yaklaşık 10 kat arttırdığı

Hammes ve arkadaşları tarafından 2003 yılında kanıtlanmıştır (Hammes ve diğ. 2003).

Son zamanlarda farklı kalsiyum kaynaklarının kalsiyum karbonat çökeli mi ve mineral morfolojisine etkisini araştıran çalışmalara da ağırlık verilmiştir. Biyomineralizasyon sürecinde CaCO_3 'ün, Ca^{+2} iyonlarının hücre dışında belli koşullarda indüklendiği belirtildi (Seifan ve diğ. 2016). Araştırmacılar, Ca^{+2} iyonlarının *Bacillus licheniformis* ATCC 9789, *Lysinibacillus sphaericus* ATCC 4525, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus sphaericus* NZRM 4381 suşlarının biyomineralizasyonları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda farklı kalsiyum kaynaklarını (kalsiyum klorür, kalsiyum laktat, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat) kullanmışlardır. Çalışmada, yüksek Ca^{+2} konsantrasyonunun bakteri aktivitesini inhibe ettiği, düşük konsantrasyonda ise ortamda az miktarda elektron reseptörü bulunması sebebiyle çökeli minin sınırlı kaldığı, tüm suşlarda en yüksek CaCO_3 çökeli minin kalsiyum klorid ile hazırlanan besiyeri ortamında gözlemlendiği bildirildi (Seifan ve diğ. 2016). Buna ilaveten, farklı kalsiyum kaynaklarının CaCO_3 mineral kompozisyonlarında da farklılıklara sebep olduğu bilinir. Örneğin, kalsiyum klorür, kalsiyum laktat, kalsiyum asetat ve kalsiyum glukonatın *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558 tarafından indüklenen CaCO_3 mineral morfolojisinin araştırıldığı bir çalışmada, tüm ortamlarda kalsit ve vaterit kristalleri tespit edilmiş ancak en yüksek kalsit oranının kalsiyum klorür ortamında meydana geldiği belirtilmiştir (Gorospe ve diğ. 2013). *Bacillus sp.* CR2 ile gerçekleştirilen bir diğ er çalışmada ise en yüksek çökeli m miktarına kalsiyum klorür içeren besi ortamında ve en düşük çökeli m miktarına ise kalsiyum oksit içeren besi ortamında ulaşıldı. Ayrıca, kalsiyum nitrat ortamında kalsiyum asetat ortamına göre bir miktar daha fazla çökeli m olduğu ve kalsiyum asetatlı ortamda sadece kalsit mineralleri bulunurken, kalsiyum klorür, kalsiyum nitrat ve kalsiyum oksit ortamında kalsit, vaterit ve aragonit kristallerinin bulunduğu bildirildi (Achal ve Pan 2014). Hiç kuşkusuz kalsiyum karbonat kristal tipinin fiziksel dayanıma nasıl katkı sağladığı da araştırılması gereken önemli konulardan biridir. Örneğin, *Bacillus cereus* ile gerçekleştirilen kum iyileştirme çalışmalarında, kalsiyum asetat ve kalsiyum klorür ortamında vaterit mineral tipi (sırasıyla 2,5 ve 2,4 g/L) daha yoğunken, kalsit kristalinin rastlandığı kalsiyum nitrat ortamında (2,1 g/L kalsit) kum kolonundan daha iyi bir iyileşme sağlanması dikkat çekicidir (Pan ve diğ. 2019).

Üre hidrolozi sonucunda bakteriyel CaCO_3 çökeliminin yanı sıra amonyum da oluşur. Ancak yüksek miktarda amonyum konsantrasyonu toksik özellik gösterir ve istenen bir özellik değildir (Harkes ve diğ. 2010, Chaparro-Acuña ve diğ. 2018). Birçok araştırmada üreolitik aktivitenin hesaplanması amacıyla amonyum konsantrasyonu belirlenmesine rağmen (Cheng ve diğ. 2014; Okyay ve Rodrigues 2014; Khamehchiyan ve diğ. 2015; Gat ve diğ. 2017; Algaifi ve diğ. 2018; Hsu ve diğ. 2018; Phang ve diğ. 2018; Tredici ve diğ. 2018) amonyum konsantrasyonunun minimize edilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışma mevcut değildir.

2.1.3 Üreolitik Bakteriler ile Gerçekleştirilen Beton Çalışmaları

Son yıllarda endüstri, sanayi ve inşaat sektöründeki hızlı gelişmeler, beton kullanımının artması ve bununla birlikte maliyet ve çevresel etki gibi birçok sorunu beraberinde getirdi. Beton ürünlerinde dayanıklılık, kendi kendini iyileştirme, su geçirmezliği, zararlı atık barındırmama ve düşük maliyetli üretim/bakım ve doğal yöntemlerle bu özelliklerin elde edilebilmesi sıklıkla aranan özellikler haline geldi. Üreolitik bakterilerin yapı materyallerinde bağlayıcı/güçlendirici olarak kullanım potansiyeline ilişkin araştırmalar günden güne yaygınlaştı. Beton elemanlarına ilişkin üreolitik bakteriler ile yapılan çalışmalar genellikle beton çatlaklarının onarımı (Shaheen ve diğ. 2019; Nguyen ve diğ. 2019; Karimi ve Mostofinejad 2020), gözenek tıkama yoluyla porozite azaltılması (Noeiaghahi ve diğ. 2017), beton elemanlarının yüzey bakımı (De Muynck ve diğ. 2008; Amidi ve Wang 2015; Bernardi ve diğ. 2014), ve tuğla üretimi için biyolojik çimento üretimi (Bernardi ve diğ. 2014) konularında yoğunlaştı. Bakteri ilave edilen çimento karışımlarında kum partikülleri ve bağlayıcı materyallerin de etkisiyle dayanım artışının sağlanması (Ng ve diğ. 2012), yaşlanma ve donma-çözünme süreçleri sebebiyle betonda oluşan çatlakların bakteriyel biyomineralizasyon ile onarımı (Ramachandran ve diğ. 2001; Achal ve diğ. 2013) ve klorür iyonları gibi zararlı maddelerin girişini engellemesi sebebiyle bakteri kullanarak betonun korunması (De Muynck ve diğ. 2008) ile ilgili çalışmalar üreolitik bakterilerin varlığını önemli kılmaktadır.

Beton ortamında besin tuzu erişiminin bakteriler için oldukça güç olması sebebiyle bu ortamın bakteriler için ekstrem güçlükler barındırdığı, bu koşulların beton üretim sürecinin içerdiği yüksek pH ve yüksek sıcaklık koşulları ile birlikte

bakteriler için koşulları daha da zorlu kıldığı bilinir (Jonkers ve diğ. 2010). Ancak bakteriler sporulasyon özellikleri sayesinde beton içerisinde oluşabilecek açlık, çevresel stres, uzamış dormansi gibi olumsuz koşulları tolere edebildikleri (Lee ve Park 2018), bu koşullarda hayatta kaldıkları ve betonun kendi-kendine iyileşmesine olanak sağladıkları bilinir (Jonkers ve diğ. 2010; Wiktor ve Jonkers 2011).

Bakterilerin betona doğrudan eklenmesinden ziyade önce kil içerisine fikse edilerek yahut pelet halinde spor formunda eklenmelerinin bakterinin dayanıklılığını arttırarak betonun iyileşmesinde olumlu katkı sunacağı bildirilirken (Jonkers ve diğ. 2010; Wiktor ve diğ. 2011), bakterinin beton harcına doğrudan konulması ile bakterinin betonun ekstrem koşulları içerisinde dayanıklılığını arttıracak bir materyal ile immobilize edilerek konulması arasında betonun fiziksel özellikleri açısından farklar olduğu ve pirinç kabuğu külü, silika tozu, duman külü, krom cürufu, cam boncuk gibi materyallerin bu amaçla kullanılabileceği de ifade edilmiştir (Zhang ve diğ. 2019; Achal ve diğ. 2011; Shanmuga-Priya ve diğ. 2019; Siddique ve diğ. 2016). Örneğin, *Bacillus halodurans* DSM 497 bakterisinin yaban tip ve mutant suşlarınının, uçucu kül ile immobilize ederek beton karışımlarına eklendiği çalışmada, 28. günün sonunda kontrol betonuna (34.4 MPa) göre %19 (yaban tip, 41.1 MPa) ve %26 (mutant, 43.3 MPa) daha yüksek basınç dayanımına ulaşıırken (Zhang ve diğ. 2019), yine uçucu kül ile betona uygulanan *Bacillus megaterium* ile hazırlanan beton örneğinin kontrol beton örneğine göre 28. günün sonunda %19 daha yüksek basınç dayanımı gösterdiği bildirildi (Achal ve diğ. 2011). Silika tozu ile immobilize edilen *Bacillus sphaericus* bakterisi ile hazırlanan beton karışımının basınç dayanımının ise kontrol betona göre 7. günde %10.90, 28. günde %13.32 daha fazla olduğu kaydedildi (Priya ve diğ. 2019). Benzer şekilde %10 pirinç kabuğu külü ile immobilize edilen *Bacillus aerius* (10^5 hücre/mL) ile hazırlanan betonun basınç dayanımının 28. günün sonunda 40 MPa olduğu ve kontrol betonuna (36.1 MPa) göre yaklaşık %10 daha yüksek basınç dayanımına ulaştığı tespit edildi (Siddique ve diğ. 2016). Diğer taraftan besiyerinin doğrudan çimento harcına eklenmesinin hidrasyon sürecini ve sertleşmeyi geciktirerek erken fazda düşük basınç dayanımına sebebiyet verebileceğini (Bundur ve diğ. 2015) veya çimento karışımına organik biyomineral bileşenleri ve bakteri eklenmesinin %10 oranında dayanım kaybına yol açabileceğini (Jonkers ve diğ. 2010) bildiren bilimsel raporların aksine, Chahal ve diğ. (2012) tarafından 10^5 hücre/mL oranında betona eklenen

Sporosarcina pasteurii'nin betonun basınç dayanımını (24 MPa'dan 28 MPa'ya) %22 oranında arttırdığı rapor edildi.

Üreaz aktivitesi, karbonasyon süreçleri, biyokalsifikasyon zamanlaması ve türe özgü özellikler biyoçementasyonda etkili olabilir. Yerel bir izolat olan *Sporosarcina sp.* ile üretilen biyoçementonun indikatör bir suş olan *Sporosarcina pasteurii* DSMZ 33 ile üretilen biyoçementoya kıyasla %461 daha yüksek basınç dayanımı göstermesi ve %120 daha fazla kalsiyum karbonat içeriği dikkat çekici (Marin ve diğ. 2020) olup, yerel tür ve suşların araştırılması gerekliliğinin kanıtını sunar niteliktedir.

Çatlak onarımı, porozitenin ve geçirgenliğin azaltılması ve kendi kendine iyileşme özelliklerinin yanı sıra bakterilerin betonun mekanik özelliklerine etkilerinin birçok yönden ele alındığı çalışmalar mevcuttur. Bakteriyel betonun mekanik özellikleri basınç dayanımı (Algaifi ve diğ. 2021; Priyom ve diğ. 2021; Vashisth ve Shukla 2020; Shahid ve diğ. 2020; Chen ve diğ. 2020; Suliman ve Sarsam 2018), eğilme dayanımı (Andalib ve diğ. 2016), yarmada çekme dayanımı (Pachaivannan ve diğ. 2020; Khushnood ve diğ. 2020; Nain ve diğ. 2019, Shaheen ve diğ. 2019), ezilme dayanımı (Chen ve diğ. 2019) ve aşınma dayanımı (Prasad ve Lakshmi 2018) testleri aracılığıyla ortaya konulur. Çalışmamızda ise yerel izolatın betonun mekanik özelliklerine etkisinin ilk defa araştırılması ve çalışma bütçesinin kısıtlılığı gibi sebepler göz önünde bulundurularak, yerel izolatımız ve kontrol bakterisi ile hazırlanan betonların mekanik özelliklerinin test edilmesinde literatürde yaygın olarak kullanılan basınç dayanımı testi tercih edilmiştir.

2.2 Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Özellikleri

Bacillus amyloliquefaciens U17 ile gerçekleştirilen çalışmamızda *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 beton çalışmalarında kontrol organizması olarak kullanılmıştır.

Bacillus amyloliquefaciens; bakteriler alemi, Firmicutes şubesi, Bacillales takımı, Bacillaceae ailesi ve *Bacillus* cinsinde yer alan, zorunlu aerob ve heterotrof bir bakteridir. İlk olarak Fukumoto tarafından 1943 yılında tanımlanmıştır. Gram

pozitif ve çubuk şekilli bir bakteridir. Çalışmamızda yer alan *Bacillus amyloliquefaciens* U17, Denizli ili, Pamukkale ilçesi, İsrail Deresi'nden izole edilerek 16s rDNA analizi ile tanımlanmıştır. Optimum üreme sıcaklığı 37°C olu, 24-48 saat içerisinde ürer.

Sporosarcina pasteurii; bakteriler alemi, Firmicutes şubesi, Bacillales takımı, Planococcaceae ailesi ve *Sporosarcina* cinsinde yer alan, zorunlu aerob ve heterotrof bir bakteridir. Önceden *Bacillus* cinsine ait olduğu düşünülürken (Priest ve diğ. 1993), Garrity (2005) tarafından *Sporosarcina* cinsi altında *Sporosarcina pasteurii* olarak adlandırılmıştır. Gram pozitifdir. Doğada çubuk şeklindedir ve endospor oluşturabilir. Alkalifil bir bakteridir ve pH: 11,2'ye kadar canlılığını koruyabilir.

Sporosarcina pasteurii ATCC 6453, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonuna kayıtlı mutant bir suştur. Gram pozitif ve çubuk şekillidir. Mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsit çökelimi çalışmalarında model organizma olarak kullanılır (Mahanty ve diğ. 2013; Al-Salloum ve diğ. 2017; Arpajirakul ve diğ. 2021;) . Optimum üreme sıcaklığı 30°C olup 48-72 saat içerisinde ürer.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Eriokrom Siyahı T (Sigma, 1787-61-7), Pepton from meat (Sigma), D (+) Glikoz (SigmaAldrich, 50-99-7), Sodyum Klorür (Merck, 106406), Potasyum Dihidrojen Fosfat (Scharlau), Fenol Red (Merck, P3532), Bakır (II) Sülfat (Merck, 102790), Agar-Agar (SigmaAldrich, 05039), Tripton (Fluka, 70169), Soya Peptonu (Sigma), Nutrient Broth (LabM, LAB068), Kalsiyum Klorür (Sigma, 10043-52-4), Sodyum Bikarbonat (VWR, 144-55-8), Maya Ekstratı (LabM, MC001), Üre (Sigma, 57-13-6), Hidroklorik Asit (Sigma), Sodyum Hidroksit (Merck), Etilendiamin Tetraasetik Asit Disodyum Tuzu Dihidrat (Sigma), Paranitrofenilasetat (Sigma), Asetonitril (Merck), Potasyum Sodyum Tartarat Tehtahidrat (Merck, 108087), Sodyum Karbonat (Merck, 106392), Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Sigma), Fenilmetilsülfonilflorid (Sigma), Aminokaproik Asit (Sigma), Glisin (Sigma), Trisma Base (Sigma), Nessler Amonyum Tayin Kiti (Hach, DOC316.53.01078), Potasyum Fosfat (Scarlab, SO10060250), Amonyum Sülfat (Merck), Fenol Hipoklorür (Sigma), Fenol Nitropürissid (Sigma), Alkali Sodyum Hipoklorür (Sigma), Sığır Serum Albümini (Sigma), Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma), Akrilamid (Sigma), Metilen bisakrilamid (Sigma), Amonyum Sülfat (Sigma), Tetrametiletildiamin (Sigma), Tween-20 (Sigma), Skim Milk (Fluka), Ethidium Bromide (Sigma).

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Nüve OT 4060V, Hiclave HVE-50), Orbital Shaker (Alfagen OS-200), Santrifüj (Hettich Micro 220 R), Dikey Elektroferez (Scie-plus), Transfer

düzenegi (BIO-RAD Trans Blot), Vorteks (Dragon Lab MX-F), Terazi (Radwag AS 220/C/2), Spektrofotometre (Lange DR 5000), Güç Kaynağı (MS, MP-300X), Etüv (Nüve EN120), Çalkalamalı Etüv (ZHICHENG ZHWY-111B), Kuru Hava Steril Fırını (Nüve FN120), Sonikasyon Cihazı (Bandelin D-12207 UW 2070), Distile Su Cihazı (Human- ZeneerPower I), InelEquinox 1000 XRD Cihazı, ThermoDXR Confocal Raman Spektrofotometresi, ZeissSupra 40 VP Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu, JEOL FE-EPMA JXA-8530FPlus HyperProbe Elektron Mikroskobu

3.2 Metod

3.2.1 Kalsiyum Karbonat Çökelim Şartlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan ve kalsiyum karbonat çökelim yeteneği bilinen *Bacillus amyloliquefaciens* U17 izolatı (İsrafil Deresi, Denizli, Türkiye) kullanıldı. Bakterinin kalsiyum karbonat çökelimi şartlarının belirlenmesi amaçlandı. Çökelim çalışmalarında Ferris ve arkadaşları tarafından 1996 yılında geliştirilen standart kalsiyum mineralizasyon ortamı (KMO, EK A) kullanıldı. Deneyler Tablo 3.1’de verilen tüm parametreler için üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: Kalsiyum karbonat çökeliminde kullanılan deneysel parametreler

Parametre Adı	Koşullar
pH	6.0, 6.50, 7.00, 7.50, 8.00, 9.00, 10.00
Üre Konsantrasyonu (mM)	25, 50, 100, 200, 250, 333, 350
Sıcaklık (°C)	20, 25, 30, 37, 42
CaCl ₂ Konsantrasyonu (mM)	50, 100, 250, 500, 750, 1000
İnkübasyon Süresi (gün)	12. saat, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 ve 14. gün
Hücre İnokulasyon Oranı (%)	10, 15, 20
Çalkalama Hızı (rpm)	100, 150
Kalsiyum Kaynakları (25 mM)	Kalsiyum nitrat, Kalsiyum asetat, Kalsiyum laktat

3.2.2 Kalsiyum Karbonat Miktarının Belirlenmesi

Kalsiyum karbonat miktarının belirlenmesi amacıyla EDTA titrimetrik yöntemi kullanıldı (APHA, 1989). 25 mL örneğin pH'sı 1 ml tampon çözeltisi ile 10.00'a ayarlandıktan sonra örneğe pembe rengini vermek için az miktarda indikatör ilave edildi. Sonrasında örnek rengi pembeden maviye dönüncüye kadar standart EDTA çözeltisi ile titrasyon yapıldı ve kullanılan EDTA miktarına göre toplam CaCO₃ miktarı hesaplandı.

3.2.3 EDTA Titrimetrik Hesaplamaları

CaCO₃ (mg/L): $(V_1 \cdot M \cdot 1000) / V_2$

V1: Titrasyon süresince kullanılan EDTA (mL)

M: 1 mL EDTA = 0.96 mg CaCO₃

V2: Titre edilen numunenin miktarı (mL)

1000: Mililitre cinsinden çalışılan değerleri litre cinsine dönüştüren katsayı

Tampon Çözeltisi: 1,179 g Na₂EDTA.2H₂O (Sigma) ve 780 mg MgSO₄.7H₂O (Merck) tartılarak 50 ml dH₂O'da çözüldü. 16,9 g NH₄Cl ve 143 ml NH₄OH hazırlanan bu çözeltiliye ilave edilmiş ve toplam hacim dH₂O ile 250 ml'ye tamamlandı.

İndikatör Çözeltisi: Mordant Black 11 Triturate (VWR Chemicals)

Standart EDTA Çözeltisi: 3,723 g EtilendiaminTetraasetik Asit (EDTA) disodyum tuzu dihidrat (Sigma) 1000 ml dH₂O içerisinde çözüldü.

3.2.4 Bakteriyel Kalsiyum Karbonatın Kurutulması ve Saklanması

Bakteriler tarafından üretilen kalsiyum karbonat çökeltisi, soğutmalı santrifüj (10000 rpm/10 dk) ile toplandı ve pastör fırınında 40°C'de kurutularak analizlerde kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

3.2.5 Amonyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Süpernatanttaki Amonyum Azotu (NH₃-N) miktarı Hach marka Nessler Amonyum Tayin Kiti ile amonyum konsantrasyonu olarak mg/L cinsinden spektrofotometrik olarak hesaplandı. Optimum şartlarda hazırlanan örnekler (50 mL), inkübasyon sürelerinin sonunda santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant (25 mL) temiz bir falkon tüpe alındı ve pH'ı 5N HCl ve 5N NaOH ile 7.00'a ayarlandı. Örneğe 3 damla mineral sabitleyici eklenip karıştırıldı (1 defa up-down). Ardından 3 damla polivinil alkol eklenen örneklere 1 ml Nessler Ayıracı ilave edilip karıştırıldıktan sonra Hach DR 5000 spektrofotometrede kayıtlı programlardan 380N numaralı Ammonia, Ness. programı ile okuma yapıldı. Cihazın kalibrasyonu için kör olarak 25 ml dH₂O kullanılmış olup, örnekler için yapılan işlemler kör için de uygulandı.

3.3 Mineralojik Analizler

3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile bakteriyel kalsiyum karbonatın morfolojik özellikleri incelendi. SEM analizleri Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

3.3.2 Elektron Prob Mikro Analizör (EPMA) Analizleri

Elektron Prob Mikro Analizör (EPMA) taramalı elektron mikroskobuna eklenen özel bir ataçman olup, görüntü üzerinde seçilen nokta ya da alandaki örneğin içeriğini detaylı bir şekilde analiz etmektedir. EPMA analizleri Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Yer Bilimleri Araştırma Merkezi'nde (YEBİM) JEOL FE-EPMA JXA-8530F Plus HyperProbe marka elektron mikroskobu ile gerçekleştirildi. Elektron prob analizör (SEM-EPMA) nokta analizleri aracılığıyla, elde edilen kalsiyum karbonat kristallerinin yapıları analiz edildi.

3.3.3 Konfokal RAMAN Spektrofotometresi

Raman saçılması kristal halindeki bir yapının karakterizasyonu için kullanılabilir. Raman spektrometrelerinde dalga boyu ayırıcıları olarak prizmalar kullanılır. Prizmadan geçen ışın demetleri bir fotoğraf filmi üzerine düşürülür. Bu teknik ile prensip olarak sulu çözeltiler, tek kristaller ve polimerler incelenir. Konfokal RAMAN Spektrofotometresi analizleri Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Yer Bilimleri Araştırma Merkezi'nde (YEBİM) Thermo DXR marka cihaz ve 785 nm lazer ile gerçekleştirildi.

3.3.4 X-Işınları Kırınımı

Bir kristalin atomik ve moleküler yapısının incelenmesi için kullanılan ve kristalleşmiş atomların bir X-ışını demetindeki ışınların kristale özgü kırınımı prensibine dayanan bu yöntemle kristaldeki atomların kimyasal bağları, kristal yapıdaki düzensizlikler ve bazı başka bilgilerle birlikte ortalama konumları tespit edilebilir. XRD analizleri için Inel Equinox 1000 difraktometre ve XRF analizleri için de Spectro XLAB2000 spektrometre kullanıldı. Analizler Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Yer Bilimleri Araştırma Merkezi'nde (YEBİM) yapıldı.

3.4 Enzim Analizleri

3.4.1 Üreaz ve karbonik anhidraz aktivitesinin izlenmesi

Bacillus amyloliquefaciens U17'nin üreolitik aktivitesi için Christensen (1946) tarafından geliştirilen üre agar besiyeri (EK A) kullanıldı. Bakteri ekimi yapılan plakalar 24-48 saat 37°C'de inkübe edildi. Besiyerinde turuncudan pembeye doğru renk değişimi üreolitik aktivitenin varlığını göstermektedir. *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin karbonik anhidraz enzim aktivitesi ise Raman ve arkadaşları tarafından geliştirilen metotla tespit edildi (Raman ve diğ. 2009). Triptik soy agara (Ek A) bakteriler ekildi (24-48 saat 37°C). Kolonilerin

gözenmesinin ardından üzerlerine 10 mM p-nitrofenil asetat (p-NPA, EK B) çözeltisi spreylendi. p-NPA'nın p-nitrofenol ve asetata ayrışması ve dolayısıyla karbonik anhidraz enzim aktivitesinin varlığı, şeffaf p-NPA'nın sarı renge dönmesi ile gözlemlendi.

3.4.2 Analitik Metotlar

Toplam protein miktarının tespit edilmesi amacıyla KMO besiyeri, çökelinin gerçekleşmediği ortamda toplam protein miktarını tespit etmek için 25 mM steril üre içeren Lauria-Bertani (LB; Ek A) kullanıldı. Kültürler çalkalamalı ortamda (48 saat 37°C) inkübe edildikten sonra santrifüj (6000 rpm, 20 dk) ile çöktüldü ve pelletler 2 mL liziz tamponu (EK B) içinde sonike edildi (120 saniye-5 tekrar). Pellet içeriğindeki tüm bakteri hücrelerinin ürettiği ham enzim karışımı ependorf içerisinde -80°C'de analizler için saklandı.

3.4.2.1 Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Enzim ekstraktının toplam protein konsantrasyonu Lowry metodu ile tespit edildi (Lowry ve diğ. 1951). Sığır Serum Albümini (BSA) standart protein olarak kullanıldı. Bu metotta alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu^{+1} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein aminoasitleri Folin-Ciocalteu fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu çalışmada 2,5 kat yarılanmış Lowry metodu (25 kat orijinal seyreltme faktörü, 1, 2 ve 4 kat tüp içi seyreltme) uygulandı. BSA'nın kalibrasyon aralığı 0,02-0,20 mg/L olarak belirlendi. 0.2 ml protein örneklerine 1 ml bazik bakır (EK B) ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 0.1 ml Lowry reaktifi (EK B2) eklenerek 10 dk 50°C'de inkübe edildi. Toplam protein miktarı 660 nm'de spektrofotometrede ölçülerek BSA standart kalibrasyon eğrisi (EK C) yardımı ile hesaplandı.

3.4.2.2 Üreaz Enzim Aktivitesi

Üreaz enzim aktivitesi Weatherburn metodu modifiye edilerek hesaplandı (Weatherburn 1967). Bu metotta, üreaz ile parçalanma sonunda oluşan amonyum miktarı hesaplandı. Buna göre, 1/5 seyreltilmiş 100 µl ham enzim, 500 µl reaksiyon tamponu (50 mM üre içeren 100 mM potasyum fosfat tamponu, pH 8.0) ile karıştırılarak 37°C'de 30 dk süre ile inkübe edildi. Bu karışımın 50 µl'si, 500 µl fenol-nitropürissid ve 500 µl alkali sodyum hipoklorür ile karıştırılarak renk değişiminin gerçekleşmesi için 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda örnekler 630 nm'de spektrofotometrede okundu. Kalibrasyon eğrisi 5-50 mM aralığında amonyum sülfat ile hazırlandı (EK C).

3.4.2.3 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi

Karbonik anhidraz aktivitesi, Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen metoduna göre belirlendi (Armstrong ve diğ. 1966). 1/5 seyreltilmiş 100 µl ham enzim, 900 µl 100 mM fosfat tampon (pH:7.2) ve 100 µl 3 mM p-nitrofenil asetat ile karıştırıldı. Renk değişimi en az 5 dk süre takip edildi ve 412 nm'de spektrofotometrede okundu. Karbonik anhidraz enzim aktivitesinin hesaplanması için 5-100 mM aralığında p-nitrofenol standart kalibrasyon eğrisi kullanıldı (EK C).

3.4.2.4 Üreaz Protein Seviyesinin Belirlenmesi

Üreaz protein seviyesi, SDS-PAGE ve western blot ile Arınç ve diğ. (2007) tarafından geliştirilen metoda göre belirlendi. 75 µg sonike bakteriyel protein, kesintili tampon sistemi ile %8 poliakrilamid jel elektroforezinde ayrıştırıldı (10 mA, 100 V). Elektroforez jel içeriği aşağıdaki şekildedir.

Jel içeriği

-Ayrırma Jeli (%8.5, Toplam Hacim 10 ml)

dH₂O (4.5 ml)

Akrilamid jel çözeltilisi (2.85 ml)

Ayrıştırma tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 2.5 ml)

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (150 µl)

Amonyum persülfat (%0.1 w/v, 50 µl)

Tetrametiletildiamin (6.5 µl)

-Yığma Jeli (%4, Toplam Hacim 5 ml)

dH₂O (2.5 ml)

Akrilamid jel çözeltilisi (750 µl)

Ayrıştırma tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.25 ml)

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (100 µl)

Amonyum persülfat (%0.1 w/v, 20 µl)

Tetrametiletildiamin (5 µl)

Jelde ayrıştırılan proteinler pH 8.3 metanollü soğutulmuş (4°C) Tris-Glisin tamponu içeren trans-blotelektroforetik hücre sistemi (Bio-Rad) aracılığıyla, nitroselüloz membrana transfer edildi (350 mA, 45 V, 120 dk). Nitroselüloz membrana geçen proteinler immünokimyasal olarak boyandı. Bunun için, membran Tris-buffered salin (TBST, EK B) ile 1/1000 seyreltilerek hazırlanan primer antikorda (Abcam anti-*Helicobacter pylori* urease B- ab127916) 1 gece (4°C'de) bekletildi. Süre sonunda Tris Buffer Saline Tween 20 (TBST) çözeltilisinde 3 kez yıkandı. Daha sonra konjüğe alkalın fosfataz goat-anti rabbit IgG (TBST ile 1/5000 seyreltilmiş) sekonder antikorda 1 saat süre (4°C'de) bekletildi. İki antikor arasında ve Alkalın fosfataz (ALP) aktivitesinin belirlenmesinden önce 3'er defa 15 dk boyunca TBST ile yıkama işlemleri yapıldı.

Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan metot ile ALP gerçekleştirildi. ALP çözeltilisi (EK B), karanlık ortamda nitroselüloz membran üzerine tatbik edildi. Protein bantları belirgin hale geldikten sonra kağıt membranın üzerindeki çözelti döküldü ve membran kurumaya bırakıldı. Membranda gözlenen protein bantları Scion Image Version Beta 4.0.2 yazılımı ile analiz edildi.

3.5 Beton Çalışmaları ve Analizleri

3.5.1 Bakteriyel Kalsiyum Karbonatın Beton Dayanımına Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmamızın bu aşamasında *Bacillus amyloliquefaciens* U17 ve pozitif kontrol için *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 suşunun taze betonda basınç dayanımı ve kılcal su emme üzerine etkisi araştırıldı. Beton numuneleri, Akça Beton A.Ş. Hacıyüplü (Denizli) beton santralinde TS EN 206 ve TS EN 12350-1 standartlarına uygun olarak hazırlandı.

Basınç dayanımı ve kılcal su emme testleri, T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı Merkez Yapı Denetim Komisyonu Başkanlığı 02.06.2017 tarih ve 576 sayılı izni ile akredite edilmiş FEBLAB Yapı Test ve Kalibrasyon Laboratuvarları San. ve Tic. Ltd. Şti. Laboratuvarlarında TS EN 12350-1, TS EN 12390-2 ve TS EN 12390-3 standartları uyarınca hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

Çalışma öncesinde bakteriler KMO besiyerinde optimum şartlarda geliştirildi. U17 (5 günlük) ve ATCC 6453 (7 günlük) kültürü, 200 kg/m³ taze beton içerisine karıştırıldı (Şekil 3.1-3.4). Şahit numune olarak su ile hazırlanan taze beton içeriği Tablo 3.2’de görülmektedir.

Bakteri kültürünün hazırlanması: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 suşu, 25 mM Üre, 25 mM Kalsiyum Klorür, 25 mM Sodyum Bikarbonat ve 3g/L Nutrient Broth içeren 500 mL KMO besiyerine %10 oranında inoküle edildi ve 37°C’de 5 gün inkübe edildi. *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 suşu ise, 333 mM Üre, 25 mM Kalsiyum Klorür, 25 mM Sodyum Bikarbonat ve 3 g/L Nutrient Broth içeren 500 ml KMO besiyerine %10 oranında inoküle edildi ve 30°C’de 7 gün inkübe edildi.

Tablo 3.2: Katkısız C8 Taze Beton Karışımı İçeriği (1000 L; 2331 kg/m³ için reçete)

Ham madde	Özellikleri	Kuru Özgül Ağırlık (kg/m ³)	Hacim (lt)	Miktar(kg/m ³)	
1	Çimento	Denizli Çimento CEM I 42,5 R	3,1	64,52	200
2	Su*	Su	1	200,00	200
3	Mineral Katkı	Soma Tip II	2,1	0,00	0
4	Kimyasal Katkı	-	1,1	0,00	0
5	Hava İçeriği	-	-	17	-
Ham madde	Özellikleri	Kuru Özgül Ağırlık (kg/m ³)	Ağırlık (kg)	Miktar (kg/m ³)	
6	0-3 mm agrega	Serinhisar Kırma (Kireçtaşı)	2,68	408,96	1096
7	0-4 mm agrega	Serinhisar Kırma (Kireçtaşı)	2,68	0	0
8	4-12,5 mm agrega	Serinhisar Kırma (Kireçtaşı)	2,68	122,68	330
9	11,2-22,4 mm agrega	Serinhisar Kırma (Kireçtaşı)	2,7	187,04	505
Taze Beton Birim Özellikleri			1000,2 lt	2331 kg/m³	

*Su yalnızca şahit beton numunelerine eklendi. Deney gruplarında aynı ölçekte bakteri kültürleri kullanıldı.



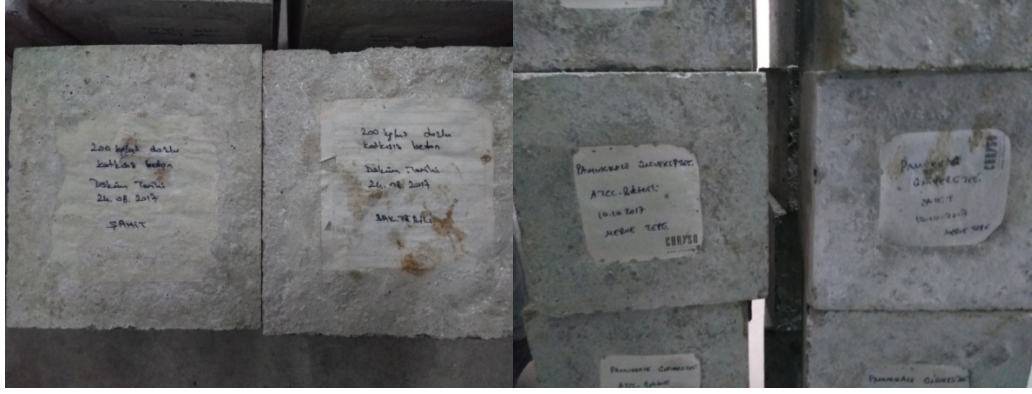
Şekil 3.1: Taze betona eklenmek için hazırlanan bakteri kültürleri



Şekil 3. 2: Reçeteye göre bakteri kültürü eklenen taze beton karışımının fiziksel özelliklerinin kontrolü



Şekil 3.3: TS EN 206'ya uygun hazırlanan karışımların TS EN 12350-1 standardına uygun olarak kalıplara dökülmesi



Şekil 3.4: 1 gün süre ile kalıpta bekletilen ve kuruduktan sonra kül havuzuna yerleştirilecek olan numuneler

3.5.1.1 Beton Numunelerinin Mineralojik Analizi

İnce kesit haline getirilerek hazırlanan beton numuneleri mineralojik yönden CRS, EPMA ve FESEM ile incelendi. CRS analizi 780 nm lazerli Thermo DXR marka cihaz ve EPMA analizi JEOL FE-EPMA JXA-8530 FPlusHyperProbe marka elektron mikroskobu ile yapıldı. Örneklerin EPMA ve CRS analizleri, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Yer Bilimleri Araştırma Merkezi (YEBİM)'nde ve FESEM analizi ise Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (İLTAM) Zeiss Supra 40 VP marka cihaz ile yapıldı.

3.5.1.2 Beton Numunelerinin Analizi

Beton numunelerinin basınç dayanımı analizleri FEBLAB Yapı Test ve Kalibrasyon Laboratuvarlarında UTest UTC 4730 cihazı ile yapıldı (Şekil 3.5). Kılcal su emme analizleri ise yine aynı laboratuvar personelleri tarafından ilgili standartlar doğrultusunda 28. Gün sonundaki ağırlık değişiminin ölçülmesi ile hesaplandı.



Şekil 3.5: Basınç Dayanımı Testi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Yerel İzolatın Teşhis ve Tanımlanması

Çalışmamızda kullanılan *Bacillus* sp. U17 suşunun tür tayini Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından yapılarak *Bacillus amyloliquefaciens* (%100) olarak kaydedildi. Ayrıca bakteri suşumuz NCBI (GenBank ulaşım numarası: MK878414) 'ya kaydedildi. Refik Saydam Ulusal Kültür Koleksiyonları (Kod numarası, RSKK 19001, RSKK, Ankara, Türkiye) merkezinde stoklanan (Tepe ve diğ. 2019) suşumuzun sekans analizi aşağıda verilmiştir.

```
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGA
TTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAG
AACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCC
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCT
GGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTC
CTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT
TCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGC
ACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTAC
AGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTAC
CGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAA
TGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGC
GAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCG
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCCG
CCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAAC
CTTCATCACTCACGCGGGTGTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTC
CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGA
TCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAA
```

CTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATG
TCTGAACCATGCGGTTTCAGACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTT
ATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACA
TCAGGGAGCAAGCTCCCA

Şekil 4.1: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin 16S rDNA baz dizilimi

4.2 Kalsiyum Karbonat Çökelimini Etkileyen Faktörler

Bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliminin bakteri türü, bakteriyel hücre konsantrasyonu, pH, sıcaklık, üre ve çözünmüş Ca^{+2} konsantrasyonu gibi çok çeşitli parametrelerden etkilendiği bilinir (Mortensen ve diğ. 2011; Ng ve diğ. 2012; Al-Qabany ve diğ. 2012). *Bacillus amyloliquefaciens* U17 suşumuzun üreaz enzim aktivitesi ve kalsiyum karbonat üretim yeteneğinin tespit edilerek yerel izolatımızın bu alanda kullanım potansiyelinin ortaya çıkarılması amaçlandı. Çalışmanın ilk aşamasında *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin $CaCO_3$ çökelim şartlarının belirlenmesi amacıyla pH, üre konsantrasyonu (mM), sıcaklık ($^{\circ}C$), inkübasyon süresi (gün), hücre inokulasyon oranı (%), ajitasyon (rpm) ve organik kalsiyum kaynaklarının etkisi inkübasyon süresine bağlı olarak araştırıldı.

4.2.1 Bakteri Türünün Etkisi ve Yerel İzolatın Önemi

Dünyada bizimle birlikte yaşayan ve izole edilmemiş ya da tanımlanmamış milyarlarca çeşitlilikte mikroorganizma türü olduğu düşünülür. Her organizmanın bulunduğu ortamdaki hem canlı-canlı hem de canlı-çevre etkileşimi eşsiz mükemmellikte olup, bir düzen çerçevesinde görev ve sorumluklarını yerine getirirler. Bu nedenle yeni türlerin veya izolatların teşhisi ve tanımlanmasının önemi tarif edilemeyecek değerdedir. Mikroorganizma aracılığıyla verimli kalsiyum karbonat çökelimi için üreaz enzim aktivitesi yüksek olan yeni bakteri türlerinin ya da izolatların seçilmesi bu tür çalışmaların da temelini oluşturur. Dolayısıyla birçok araştırmacı üreolitik mikroorganizmaları çeşitli kaynaklardan izole eder ve yerel izolatların kalsiyum karbonat çökelim kapasitelerini ve mineral tiplerini araştırırlar. Farklı mikroorganizma türleri araştırılmakla birlikte *Bacillus* cinsine ait türler,

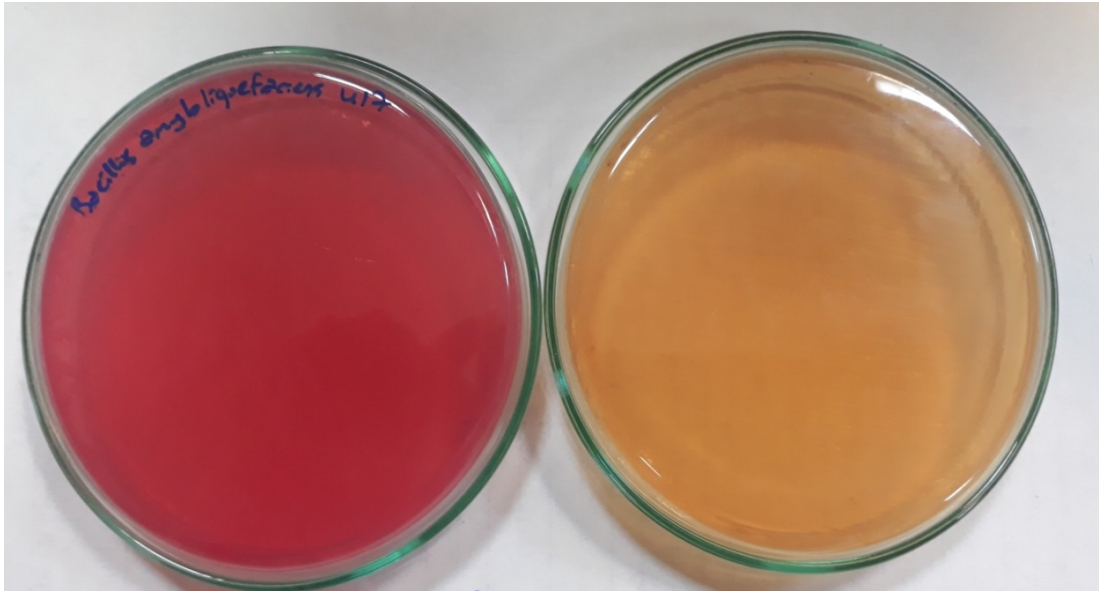
kalsiyum karbonat çökeliminde en yaygın kullanılan bakterilerdir. Örneğin, *Sporosarcina pasteurii*, ağır metallerin giderimi, kirlenme, beton ıslahı ve toprağın iyileştirilmesi için sıklıkla kullanılan bir bakteri türüdür (Li ve diğ. 2013; Phillips ve diğ. 2013, Whiffin ve diğ. 2007). Benzer şekilde beton sertliğinin ve inşaat malzemelerinin dayanıklılığının artırılmasına yönelik *Bacillus megaterium* ile yapılmış deneysel çalışmalar mevcuttur (Dhami ve diğ. 2013; Soon ve diğ. 2013).

Bizim de çalışma bakterisi türümüz olan *Bacillus amyloliquefaciens*'in kalsiyum karbonat çökelim özelliği Lee ve arkadaşları tarafından 2003 yılında rapor ilk kez rapor edildi. Çalışmada, mezofilik ve alkalifilik bir tür olan *B. amyloliquefaciens*'in optimal kalsit çökelimini pH 8, sıcaklık 30°C, ve % 0,4 maya ekstrakt, %0,5 glukoz ve %1,5 kalsiyum asetat içeren B4 besi ortamında gerçekleştirdiği ve SEM mikrograflarına göre de, bakteri tarafından üretilen kalsit kristallerinin tipik rombohedral polikristalin yapıda olduğu tespit edildi (Lee ve diğ. 2003). Yerel izolatlar üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise Malezya Sarawak'taki limestone mağaralarından yüksek üreaz aktivitesine sahip bakteri suşları izole edilerek izolatların kalsiyum karbonat çökelimi ile ilgili şartlar optimize edildi (Omeregje ve diğ. 2017). Diğer bir çalışmada ise Hindistan'ın kireçli topraklarından üreaz pozitif *Bacillus* cinsine ait çok sayıda tür (*B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. Subtilis* ve *L. fusiformis*) izole edilerek kayıt altına alındı (Dhami ve diğ. 2013). Benzer şekilde Hindistan'da lale bitkisinin bulunduğu toprakların rizosfer bölgelerinden ve alkali topraklardan izole edilen bakterilerin kalsiyum karbonat çökelimleri incelenerek XRD ve EDX analizleri ile kalsit minerallerinin varlığı doğrulandı (Chahal ve diğ. 2012). Termotolerant *B. licheniformis* S-86'nın kalsiyum karbonat çökelimi ve mineral tipi Arjantin'den bildirilirken (Tourney ve Ngwenya 2009), Çin'deki maden ocakları toprağından (Achal ve Pan 2014) ve Tsinghua Üniversitesi kreş bahçesi topraklarından kalsiyum karbonat çökelimi yapabilen *Sporosarcina* suşları izole edilerek literatüre kazandırıldı (Li ve diğ. 2013). Benzer şekilde *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350 İran'ın rüzgar erozyonundan etkilenen bölgelerinden alınan kum örnekleri ile laboratuvar ölçekli rüzgar tünellerinde gerçekleştirilen toz tutma çalışmalarında bakteri uygulanan toprak zeminin stabilize olduğu, rüzgar erozyonu kaybının kontrol örneklerine (2,7575 g/cm² ve 2,9375 g/cm²) kıyasla bakterili örneklerde (0,0250 g/cm² ve 0,6825 g/cm²)

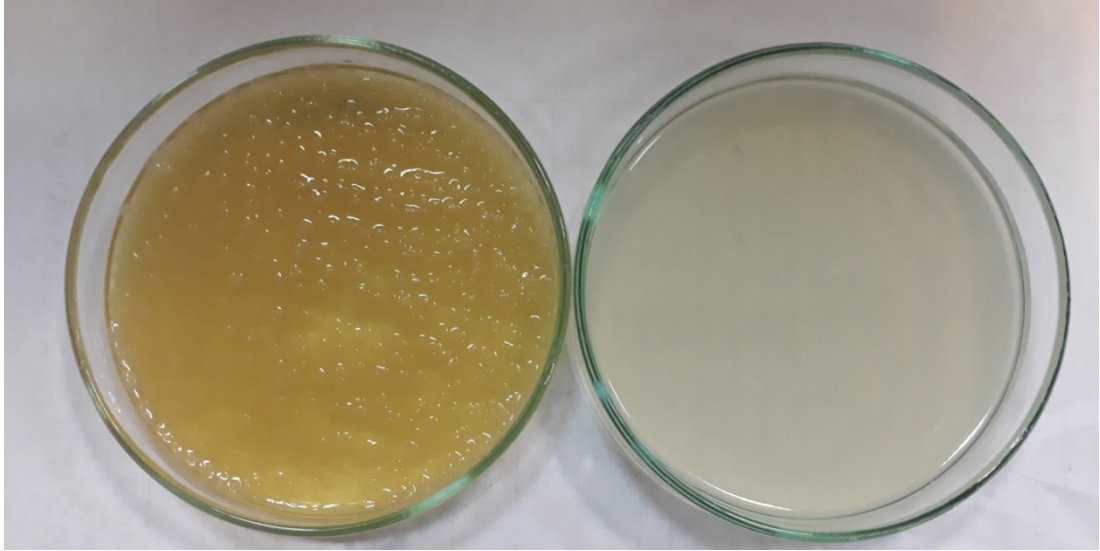
belirgin ölçüde azaldığı gösterildi ve SEM analizlerinde bakteriyel kalsit kristalleri tespit edildi (Mohebbi ve diğ. 2019).

Yukarıda verilen bu bilgiler ışığında, yerel suşlarımızın da enzim aktiviteleri ve kalsiyum karbonat çökeltim yeteneklerinin tespit edilerek bakterilerimizin bu alanda kullanım potansiyellerinin ortaya dökülmesi ve ilerde dışa bağımlılığın azaltılması açısından önemli olacaktır. Bu amaçla kalsiyumca zengin topraklardan (İsrafil deresi, Denizli) izole edilen üreaz aktivitesine sahip yerel bir bakteri suşunun (*Bacillus amyloliquefaciens* U17) kalsiyum karbonat çökeltimi araştırılmıştır.

İlk olarak izolatımızın (*Bacillus amyloliquefaciens* U17) üreolitik aktivitesinin varlığını doğrulamak için Christensen (1946) tarafından geliştirilen üre agar besiyeri kullanıldı. Bakteri ekimi yapılan plakalar 24-48 saat 37°C’de inkübe edildi. Besiyerinde turuncudan pembeye doğru renk değişimi üreolitik aktivitenin varlığını gösterdi (Şekil 4.2). *Bacillus amyloliquefaciens* U17’nin karbonik anhidraz enzim aktivitesinin tespiti ise Ramanan ve diğ. (2009) tarafından geliştirilen metotla gerçekleştirildi. Triptik soy agara bakteriler ekildi (24-48 saat, 37°C). Kolonilerin gözlenmesinin ardından üzerlerine 10 mM p-nitrofenil asetat çözeltisi spreylendi. p-NPA’nın p-nitrofenol ve asetata ayrışması ve dolayısıyla karbonik anhidraz enzim aktivitesinin varlığı, şeffaf p-NPA’nın sarı renge dönmesi ile gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.2: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 Üreaz Testi. U17 ekilen petri (solda). Üre agar besiyeri (sağda)



Şekil 4.3: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 Karbonik Anhidraz Testi. U17 ekilen petri (solda). Triptik soy agar (sağda)

4.2.2 pH'nın etkisi

Üreolitik aktivite ve kalsiyum karbonat çökeliminin ortam pH'ı ile doğrudan ilişkili olduğu ve her suşun kendine özgü bir optimal pH değerinin olduğu bilinir (Omeregic ve diğ. 2017) ancak bu değer yaklaşık 8.0 olduğunu ifade eden araştırmacılara rağmen (Stocks-Fischer ve diğ. 1999; Gorospe ve diğ. 2013), pH: 6.0-11.00 aralığında bakteriyel kalsiyum karbonat çökelimini gösteren çalışmalar mevcuttur (Stocks-Fischer ve diğ. 1999; Ferris ve diğ. 2003; Lee ve diğ. 2003; Dupraz ve diğ. 2009; Dhama ve diğ. 2013; Vahabi ve diğ. 2015; Stabnikov ve diğ. 2013). Bu nedenle kalsiyum karbonat çökeliminde kullanılacak olan herhangi bir izolat, bakteri türü ya da suşu için pH aralığının optimize edilmesi gerekir.

Çalışmamızda KMO besiyeri başlangıç pH'nın bakteriyel kalsiyum karbonat çökelimine etkisini belirlemede pH: 6.0-10.0 aralığı test edildi. Genel olarak, inkübasyon süresince bakterinin minimum ve maksimum kalsiyum karbonat çökelim miktarı pH:6'da 1517-1675 mg/L, pH: 6.5'de 1535-1954 mg/L, pH: 7'de 1358-1577 mg/L, pH:7.5'de 648-1161 mg/L, pH: 8'de 509-1149, pH: 9'da 85-774 mg/L ve pH: 10'da 40-321 mg/L olarak gözlemlendi. En yüksek kalsiyum karbonat miktarı pH: 6.50'de 5. günde (1954±63,5 mg/L) gözlemlenirken, ilk pH'nın 6.0 olduğu ortamda

sonuçlar oldukça yakın olarak kaydedildi. 5. günden itibaren başlangıç pH'ının 7.50'yi aştığı durumlarda kalsiyum karbonat miktarında keskin bir azalma gözlemlendi. İzolatımızın, pH: 6-10 gibi oldukça geniş bir aralıkta 14 gün boyunca (pH: 10.0 hariç) dikkate değer oranda çökelim yaptığı tespit edildi. Kalsiyum karbonat çökeli mi için optimum başlangıç pH'sı 6.5 olup, bu pH'da maksimum 1954 mg/L CaCO₃ üretilirken, en düşük çökelim alkali pH'da (pH: 9.0 ve pH:10.0) gerçekleşti. pH: 8.0'den sonra CaCO₃ miktarındaki azalma ve pH: 10.0'da inkübasyonun 14. gününde CaCO₃ ökelmesinin olmaması, bakterinin enzimatik aktivitesinin yüksek pH'da azaldığını ve alkali ortamda çökelim yapamadığını düşündürmüştür (Tablo 4.1).

Bacillus amyloliquefaciens CMB01 ile yapılan bir çalışmada en yüksek çökelim oranına pH 8.0 ve pH 9.0'da ulaşıldığı (sırasıyla 5,83 ve 4,16 mg CaCO₃ /OD₆₀₀), bu oranın pH 7.0 ve pH 10'da 2,42 ve 2,24 mg CaCO₃ /OD₆₀₀, olduğu bildirildi (Lee ve diğ. 2003). *Bacillus subtilis* 168 ve *Bacillus subtilis* FBC5 ile gerçekleştirilen bir çalışmada, pH:7.1 ve pH: 8.8 aralığında modifiye edilen B4 besiyerinde tüm pH değerlerinde ve 30 günlük inkübasyon süresi boyunca CaCO₃ mineral oluşumu gözlemlendi ve en yüksek çökelim pH: 8'de gerçekleştiği tespit edildi (Marvasi ve diğ. 2010). İnan Damavand Bölgesi'nde yer alan üç mağaradan izole edilen *Bacillus* sp. CT, *Bacillus* sp. LS1, *Bacillus* sp. CE1 ve *Bacillus* sp. CD1 suşları pH: 7.00, pH: 9.00 ve pH: 11.00 başlangıç pH'sında modifiye edilmiş B4 besiyerinde 30°C'de 60 saat süre ile inkübe edildi ve tüm suşlarda pH: 7.00 ve pH:9.00'da ortalama 10. saatten itibaren OD (600nm)'de artış gözlemlendi. Başlangıç pH'ı 7.00 olan besiyerindeki OD artışı tüm suşlarda pH'ı 9.00 olan besiyerindeki artışın yaklaşık 2 katı olarak tespit edilirken, pH'ı 11.00 olan besiyerlerinde tüm suşlarda OD değişimi inkübasyon süresinde oldukça düşük olarak kaydedildi (Vahabi ve diğ. 2015). *Bacillus pasteurii* ATCC 6453 ile gerçekleştirilen bir çalışmada ise kalsiyum karbonat çökeli mi için ortam pH'ının 8.3 ve üzeri olması gerektiği, ancak pH: 9.00'dan itibaren çökelim hızla azalma trendine girdiği ifade edildi (Stocks-Fischer ve diğ. 1999). Bizim alışmamızda da başlangıç pH'larından bağımsız olarak ortam pH'ı ilk günden itibaren 8.0'ın üzerinde seyrederken, pH değerinin 9.0'ı aşmasıyla birlikte çökelim miktarında keskin bir düşüş görüldü (Tablo 4.1). Bu sonuçlar araştırmacıların bulguları ile benzerlik arz etmektedir.

Tablo 4.1. *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine başlangıç pH'sının etkisi (CaCO₃ mg/L; 333 mM Üre, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, t=37°C).

<i>Kalsiyum Karbonat Miktarı (mg/L)</i>					
Başlangıç pH	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
6.0	1675±119,0	1950±28,0	1644±67,0	1596±12,5	1517±8,5
6.5	1733±34,5	1954±63,5	1649±33,0	1535±25,5	1677±10,5
7.0	1473±22,5	1549±29,0	1577±9,0	1358±213,0	1550±2,5
7.5	1161±5,0	681±42,0	648±16,0	686±41,5	745±9,5
8.0	1149±23,0	625±61,0	611±5,5	524±14,0	509±0,0
9.0	774±29,5	162±6,0	135±9,0	111±9,0	85±9,0
10.0	321±13,0	65±4,5	40±2,0	62±10,5	-
<i>Son pH</i>					
Başlangıç pH	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
6.0	8,30±0,02	8,56±0,05	8,65±0,01	8,30±0,06	8,24±0,10
6.5	8,66±0,01	8,56±0,09	8,75±0,05	8,58±0,04	8,62±0,01
7.0	8,65±0,02	8,60±0,04	8,68±0,07	8,54±0,01	8,59±0,00
7.5	8,64±0,02	8,34±0,05	8,56±0,01	8,57±0,05	8,44±0,03
8.0	8,61±0,01	8,51±0,04	8,55±0,03	8,58±0,08	8,64±0,00
9.0	8,20±0,01	9,16±0,02	9,16±0,03	9,16±0,01	9,22±0,04
10.0	8,43±0,02	9,28±0,02	9,35±0,01	9,37±0,01	-

4.2.3 Sıcaklık Etkisi:

Bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliminin enzimatik bir aktivite sonucu meydana gelmesi sebebiyle sıcaklığın da pH gibi önemli bir faktör olduğu bilinir. Ürenin katalizinin türe özgü enzimatik bir aktivite sonucu meydana gelmesi kalsiyum karbonat çökelimi çalışmalarında optimal sıcaklığın tespit edilmesinin önemini ve gerekliliğini ortaya koyar. Birçok araştırmacı çalışmalarında sıcaklığın üreaz aktivitesi üzerine etkisini araştırarak üre katalizinin türe özgü optimal sıcaklık aralığını (Ferris ve diğ. 2003; Mitchell ve Ferris 2005; Okdawha ve Li 2010; De Muynck ve diğ. 2013; Yu ve diğ. 2019) ve sıcaklığın mineralize edilen kalsiyum karbonat miktarı ve kristal yapısı üzerinde de doğrudan etkili olduğunu bildirmiştir (Zamarreno ve diğ. 2009; Kim ve diğ. 2018).

Literatür bilgilerinin ışığında yerel izolatımız *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökeliminin optimal sıcaklık değerinin tespit edilmesi

amacıyla, başlangıç pH'sına göre modifiye edilen kalsiyum mineralizasyon ortamında 20, 25, 30, 37 ve 42°C'de çalışıldı. *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin en iyi kalsiyum karbonat çökelimini 5. gün ve 37°C'de gerçekleştirdiği gözlemlendi (Tablo 4.2). Bu sonuçlara en yakın sıcaklıklar 20 ve 25°C olarak bulunurken, bu sonuçlar doğal olarak toprakta bulunan U17'nin dış ortam koşullarında üreme başarısını göstermesi açısından önemlidir. Nitekim Malezya'da yerel *Bacillus megaterium* ile gerçekleştirilen bir çalışmada araştırmacılar, toprak bakterilerinin toprak sıcaklığına karşı daha az hassas olduğunu, ancak 30°C ve üzeri sıcaklıklara da üreaz enzim aktivitesi için bakterinin ihtiyaç duyduğunu bildirmişlerdir (Ng ve diğ. 2012).

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, *Bacillus amyloliquefaciens* U17 suşu, 20°C'de 1668-1880 mg/L, 25°C'de 1734,5-1887 mg/L, 30°C'de 1391-1846 mg/L, 37°C'de 1535,5-1954 mg/L ve 42°C'de 1202-1832 mg/L oranlarında CaCO₃ üretti. U17 izolatının 20 ve 25°C'de mineral çökelimi yapabilmesi ve bu sıcaklıklardaki mineral miktarının 30 ve 37°C'deki mineral miktarı ile yarışması dikkat çekicidir. Bilindiği üzere, bakterinin izole edildiği İsrafil deresinin bulunduğu bölge genel olarak serin ve kalsiyumca zengin dere yatağıdır. Dolayısıyla 20°C ve 25°C gibi düşük sıcaklıklarda bakteri tarafından üretilen CaCO₃ miktarının yüksek olması, bakterinin izole edildiği yer olan İsrafil deresinin kalsiyumca zengin toprak yapısıyla ilişkilidir.

Ayrıca, bakterimizin düşük gelişim sıcaklıklarında da kalsiyum karbonat çökelim yeteneği açısından iyi bir potansiyele sahip olması nedeniyle, ilerde daha detaylı optimizasyon çalışmaları yapılarak soğuk bölgelerde örneğin kumlu zeminlerin dayanımının artırılması gibi yerinde ıslah çalışmalarında bu bakterinin kullanım potansiyelinin araştırılması yeni bir çalışma konusunu da oluşturmuştur. Nitekim laboratuvarımızda yapılan bir yüksek lisans tez çalışmasında yine İsrafil deresinden izole edilen yerel bir suşun (*Bacillus aerius* U2) 20°C'de yüksek miktarda kalsiyum karbonat üretimi rapor edilmiştir (Şensoy ve diğ. 2017).

Tablo 4.2: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine asıcaklığın etkisi (mg/L) (333 mM Üre, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, pH: 6.5).

<i>Kalsiyum Karbonat Miktarı (mg/L)</i>					
°C	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
20	1808±52,0	1880±116,0	1809±36,0	1668±97,0	1776±28,0
25	1786±18,0	1808±144,0	1887,5±4,0	1734,5±24,0	1871±33,0
30	1846±18,0	1391±79,0	1620±47,0	1535±70,0	1708,5±0,0
37	1733±34,5	1954±63,5	1649±33,0	1535,5±25,5	1677±10,5
42	1773±57,0	1202±130,0	1589,5±82,0	1658±85,0	1832±44,0
<i>Son pH</i>					
°C	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
20	7,88±0,01	8,05±0,02	8,22±0,20	8,88±0,01	8,23±0,40
25	7,88±0,01	8,95±0,01	8,76±0,06	9,06±0,02	8,87±0,04
30	7,84±0,02	9,11±0,01	9,02±0,06	9,03±0,02	9,17±0,04
37	8,65±0,01	8,53±0,11	8,75±0,01	8,57±0,04	8,62±0,01
42	7,80±0,01	9,21±0,01	9,02±0,04	9,06±0,11	9,07±0,02

Üreaz hidrolizi için optimal sıcaklık, türe özgüdür ve 20-37°C arasında değişir (Ferris ve diğ. 2004; Okwadha ve Li2010; Mitchell ve Ferris 2005; Omoregei ve diğ. 2017, Şensoy ve diğ. 2017). *Bacillus sphaericus*, *Sporosarcina ureae* DSM317, *Sporosarcina psychrophilia* ve *Sporosarcina pasteurii*, farklı sıcaklıklarda (10°C, 20°C, 28°C ve 37°C) geliştirildi ve en yüksek kalsiyum karbonat miktarına *Bacillus sphaericus* ve *Sporosarcina psychrophilia* ile 10°C'de, *Sporosarcina ureae* DSM317 ile 20°C'de ve *Sporosarcina pasteurii* ile 37°C'de ulaşıldı (De Muynck ve diğ. 2013). *Sporosarcina pasteurii* ile yapılan bir diğer biyoçimentolama çalışmasında kalsiyum karbonat çökelimi için optimum sıcaklık geniş bir aralıkta araştırıldı (5, 10, 20, 30, 35, 40, 45 ve 50°C) ve bakterinin en yüksek çökelim yaptığı sıcaklık 40°C olarak tespit edildi (Yu ve diğ. 2019). *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01 suşu ile üç farklı sıcaklıkta kalsiyum karbonat çökeliminin araştırıldığı bir çalışmada ise 30°C'deki CaCO₃ miktarının (6,4 mg/mL) 25 ve 37°C'dekinden daha fazla olduğu (5,4 mg/mL ve 5,9 mg/mL) bildirildi (Lee ve diğ. 2003).

Bilindiği gibi mikroorganizmaların gelişme ortam sıcaklığı, hem mikroorganizmalarda morfolojik değişikliklere sebep olur hem de onların enzim salgılaması ve enzim stabilitesini etkiler. Özellikle üreolitik bakterilerde önemli olan üreaz ve karbonik anhidraz aktivitesi üzerindeki etkisinden dolayı sıcaklık, kontrol edilmesi gereken kritik bir faktördür. Çünkü üreaz enzim üretimi bir organizmadan

diğerine değişkenlik gösterecektir. Sonuç olarak, elde ettiğimiz verilerimizle literatür bilgileri kıyaslandığında, bakteri türlerindeki sıcaklık derecelerindeki bu çeşitlilik, kalsiyum karbonat çökeliminde sıcaklığın türe özgü olduğunu ve özellikle yerel izolatlar başta olmak üzere her suş için optimizasyonun mutlaka yapılması gerektiğini de doğrular niteliktedir.

4.2.4 Ürenin Etkisi

Doğada mikroorganizmalar tarafından azot ve enerji kaynağı olarak kullanılan üre, organizmalar tarafından hidroliz edildiğinde ortam pH'sının artışına sebep olması (Mobley ve Hausinger 1989; Fujita ve diğ. 2008) ve yüksek iyon bağlama kapasitesine sahip negatif yüzey alan yoğunluğunu arttırarak kalsiyum karbonat çökelimini olumlu yönde etkilemesi (Ma ve diğ. 2020) nedeniyle oldukça önemlidir. Ortam pH'sının artışının, amonyak üretimini teşvik ettiği ve bu sayede mikro çevredeki fazla kalsiyumun CaCO₃ olarak çökelmesine neden olduğu bilinir (Harkes ve diğ. 2010). Bu nedenle mikroorganizmanın gereksinim duyduğu üre konsantrasyonunun bilinmesi önemlidir ve birçok araştırmacı tarafından kalsiyum karbonat çökelimi için en uygun başlangıç üre konsantrasyonu araştırılır (De Muynck ve diğ. 2010; Okwadha ve Li 2010; Ducassa-Lapeyrousse ve diğ. 2017). Bazı araştırmacılar ise, bakterilerce hidrolize edilerek karbonat iyonlarının oluşması ve çökelime fırsat tanınması gibi iyi özelliklerinin yanı sıra amonyum iyonları oluşturarak ortam pH'mı yükseltmesi ve toksik amonyum oluşumu sebebiyle üre konsantrasyonunun çok dikkatli ayarlanması gerektiğini vurgular (Jaubertie ve Rendell 2003; Harkes ve diğ. 2010; Ducassa-Lapeyrousse ve diğ. 2017; Chaparro-Acuña ve diğ. 2018). Ürenin bakteriyel protein üretiminde azot kaynağı olması sebebiyle iyi bir yapı taşı teşkil ettiği bilinse de (Hamzah ve diğ. 2013), yüksek üre konsantrasyonunun bakteri biyokütlesinde azalmaya sebep olması da mümkündür (Cheng ve Cord-Rowish 2013). Çalışmamızda, tüm bu sebeplerle ve bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliminde türe özgü etkiye sahip olması nedeniyle yerel izolatımızın en iyi çökelim yaptığı başlangıç üre konsantrasyonunun belirlenmesine önem verildi.

Bu amaçla 25-350 mM üre içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelimi test edildi. Tablo 4.3'te

verilen sonuçlara göre bakterimiz, 25 mM üre varlığında 1438-1843 mg/L, 50 mM'da 1245-1662 mg/L, 100 mM'da 1014-1723 mg/L, 200 mM'da 919-1790 mg/L, 250 mM'da 809-1704 mg/L, 333 mM'da 1535-1954 mg/L ve 350 mM'da 900-1418 mg/L kalsiyum karbonat üretti. En yüksek CaCO₃ miktarına ulaşılan 5. günde 25 mM ve 333 mM üre konsantrasyonlarında kalsiyum karbonat miktarlarının birbirine yakın olması sebebiyle (1863±18,5 mg/L ve 1954±63,5 mg/L) çalışmaya basit bir ortamda 25 mM üre konsantrasyonu ile devam edilmesine karar verildi. Bu sayede amonyum konsantrasyonunun da minimize edilmesi amaçlandı. Ürenin yüksek konsantrasyonlarda *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859'nin suşunun kalsit çökelişini olumsuz etkilediği ve 0,05-0,25 M gibi düşük üre konsantrasyonlarında çökeliş miktarının daha yüksek olduğu (Okwadha ve Li 2010), *Bacillus sphaericus* LMG22557'nin kalsit çökelişini için ise optimum üre konsantrasyonunun 0.5 M olduğu bildirilmiştir (De Muynck ve diğ. 2010).

Tablo 4.3: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelişine üre konsantrasyonunun etkisi (mg/L) (pH:6.5, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, t=37°C).

Kalsiyum Karbonat Miktarı (mg/L)					
Üre (mM)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	1765±11,0	1863±18,5	1696±49,0	1420±21,5	1438±8,0
50	1622±62,0	1487±42,5	1662±124,0	1490±1,5	1245±47,0
100	1713±73,5	1130±38,0	1723±0,0	1402±75,0	1014±33,5
200	1518±8,5	1063±73,5	1790±37,5	1219±88,0	919±4,5
250	1493±13,0	1344±139,0	1704±9,0	1205±119,5	809±21,0
333	1733±34,5	1954±63,5	1649±33,0	1535±25,5	1677±10,5
350	1418±10,0	1080±5,5	1416±79,5	1171±18,5	900±3,5
Son pH					
Üre (mM)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	8,79±0,01	8,58±0,10	8,58±0,02	8,48±0,01	8,72±0,13
50	8,77±0,05	8,80±0,01	8,66±0,12	8,58±0,01	8,83±0,15
100	8,65±0,15	8,89±0,00	8,65±0,00	8,72±0,13	9,00±0,02
200	8,85±0,01	8,84±0,01	8,60±0,15	8,88±0,01	9,01±0,02
250	8,85±0,01	8,64±0,20	8,70±0,03	8,84±0,01	8,91±0,00
333	8,65±0,01	8,54±0,11	8,75±0,01	8,57±0,04	8,60±0,01
350	8,85±0,01	8,85±0,02	8,67±0,04	8,89±0,02	8,87±0,01

4.2.5 Kalsiyum Kaynakları Olarak Kalsiyum Klorür, Kalsiyum Laktat, Kalsiyum Nitrat ve Kalsiyum Asetatın Etkisi

Bakteriyel üreazın ortamdaki üreyi katalize ederek karbondioksit, bikarbonat ve amonyum açığa çıkarması dolayısıyla pH artışına sebep olduğu ve bu esnada negatif yüklü hücre zarı sayesinde çözülmüş Ca^{+2} iyonlarını yakalayarak bir nükleasyon alanı oluşturan bakteri hücreleri vasıtasıyla $CaCO_3$ çökelinin gerçekleştiği bilinir (Achal ve Pan 2011). Dolayısıyla ortamdaki Ca^{+2} iyonlarının varlığı, kalsiyum karbonat çökelinin devamlılığı için oldukça önemlidir (Amarokoon ve diğ. 2017). Bu nedenle, $CaCO_3$ çökelim çalışmasının gerçekleştirileceği besiyeri ortamına eklenen farklı kalsiyum kaynaklarının bakteriyel çökeline etkisi birçok araştırmacı tarafından araştırılır (Gorospa ve diğ. 2013; Achal ve Pan 2014, Xu ve diğ. 2015; Zhang ve diğ. 2015; Seifan ve diğ. 2016; Lapeyrosse ve diğ. 2017; Seifan ve Berenjian 2018). Literatürde kalsiyum iyonunun metabolik süreçlerde kullanılmadığını (Silver ve diğ. 1975), aksine ortamda kalsiyum iyonu fazlalığının çökeliyi indüklediğini belirten çalışmaların yanı sıra (Seifan ve diğ. 2016), artan kalsiyum konsantrasyonunun bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliyi arttırdığını belirten çalışmalar da bulunur (Hammes ve diğ. 2003; Okdawha ve Li 2010).

Bu bilgiler ışığında yerel izolatımızın $CaCO_3$ çökeline etkisini belirlemek için inorganik kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum klorür, kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat ile organik kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum laktat kullanılmıştır.

Bacillus amyloliquefaciens U17'nin kalsiyum karbonat çökeliğinde başlangıç kalsiyum klorür konsantrasyonunun etkisini tespit etmek amacıyla 25-1000 mM $CaCl_2$ aralığı test edildi. Minimum ve maksimum kalsiyum karbonat miktarları sırasıyla; 25 mM'da 1535-1954 mg/L, 50 mM'da 856-1356 mg/L, 100 mM'da 777-1660,5 mg/L, 250 mM'da 840-2035,5 mg/L, 500 mM'da 1073,5-2139 mg/L, 75 mM'da 1136,5-2306,5 mg/L ve 1000 mM'da 1339-2815,5 mg/L olarak tespit edildi (Tablo 4.4). *Bacillus amyloliquefaciens* U17 en yüksek kalsiyum karbonat çökeliğine (2815 mg/L $CaCO_3$) 1000 mM $CaCl_2$ içeren KMO besiyerinde ulaşmış olmakla birlikte bakteriyel kalsiyum karbonat varlığı mineralojik analizlerle doğrulanmamıştır. Ayrıca yüksek tuz varlığında hücre gelişimin olumsuz etkilendiği de gözlenmiştir. Dolayısıyla çalışmada hesaplanan çökeltinin $CaCO_3$ 'tan daha ziyade

besiyerindeki Ca^{+2} olabileceği düşünülmüştür. Tekrar deneylerimizde hem stabil olması hem de bakteri gelişimine olumsuz etkisinin olmaması nedeniyle en iyi üretimin gerçekleştiği tuz konsantrasyonu 25 mM olarak kabul edilmiştir (1954 mg/L CaCO_3 , inkübasyonun 5. gününde).

Tablo 4.4: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine CaCl_2 konsantrasyonunun etkisi (mg/L) (pH:6.5, 333 mM Üre, 25 mM NaHCO_3 , t=37°C).

Kalsiyum Karbonat Miktarı (mg/L)					
CaCl_2(mM)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	1733 ±34,5	1954 ±63,5	1649 ±33,0	1535 ±25,5	1677 ±10,5
50	1356,5±49,5	856±65,0	926±2,0	951,5±28,5	729,5±1,5
100	1660,5±56,5	846±9,0	1003,5±48,5	955,5±11,5	777±33,0
250	2035,5±112,5	1064,5±15,5	1132±35,0	1134±23,0	840±35,0
500	2139±27,0	1326±58,0	1159,5±8,5	1168±44,0	1073,5±37,5
750	2306,5±57,5	1428,5±100,5	1364,5±38,5	1684±29,0	1136,5±24,5
1000	2815,5±11,5	1558,5±49,5	1339±131,0	1996±37,0	1423±27,0
Son pH					
CaCl_2(mM)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	8,65±0,01	8,56±0,09	8,75±0,00	8,57±0,04	8,62±0,01
50	8,79±0,05	8,61±0,09	8,72±0,09	8,52±0,04	8,55±0,10
100	8,68±0,01	8,61±0,01	8,73±0,01	8,42±0,02	8,33±0,05
250	8,50±0,04	8,37±0,02	8,47±0,03	8,36±0,01	8,40±0,01
500	8,33±0,02	8,14±0,00	8,28±0,03	8,17±0,00	8,12±0,04
750	7,96±0,04	7,84±0,03	8,06±0,04	7,90±0,02	7,92±0,05
1000	8,11±0,04	7,89±0,01	8,12±0,00	8,14±0,11	7,94±0,13

Yüksek kalsiyum klorür konsantrasyonunun bakteriyel çökelime inhibisyon etkisi (Seifan ve diğ. 2016) ve yüksek konsantrasyonlarda üre (20 ve 50 g/L) ve kalsiyum klorürün (30 ve 75 g/L) hem enzimatik aktiviteyi ve hem de bakterilerde gelişimi inhibe ettiği (Nemati ve diğ. 2005) bazı çalışmalarla bildirilmiştir. Üstelik 50 mg/L ve üzerinde kalsiyum konsantrasyonunun *Sporosarcina pasteurii*'nin üreaz enzim aktivitesini %40-50 oranında inhibe ederek çökelti miktarını azalttığı da rapor edilmiştir (Gorospe ve diğ. 2013). Literatür bilgileriyle uyumlu olan çalışmamızda, SEM analizlerinde de yüksek konsantrasyonlarda kalsiyum klorür varlığında mineral morfolojisi yüzeyde kalın bir tabakanın olmasından dolayı gözlenemedi ve dolayısıyla mineral tipi ve varlığı tam olarak doğrulanamadı. SEM analizinden elde edilen veriler ışığında, kristal morfolojisinin rahatlıkla tanımlanabildiği 25 mM

CaCl₂'in sonuçlarının daha güvenilir olduğu sonucuna varıldı ve optimizasyon şartları için 25 mM CaCl₂ kullanılmasına karar verildi.

Kalsiyum karbonat morfolojisinin ve miktarının besiyeri kompozisyonundan etkilendiği bilinir (De Muynck ve diğ. 2008). Ancak farklı kalsiyum kaynaklarının kullanımının çökeltim miktarına etkilerinin araştırıldığı çalışmalar kısıtlıdır. Çalışmalar genellikle ortaya çıkan mineral profilleri (Van Tittelboom ve diğ. 2010; Achal ve diğ. 2011; Gorospe ve diğ. 2013; Achal ve diğ. 2014; Xu ve diğ. 2014; Seifan ve diğ. 2016; Otlewska ve Gutarowska 2016) ve farklı kalsiyum kaynakları ile hazırlanan ortamlardaki bakteriyel kalsiyum karbonat çökeltiminin betonda çatlak onarımı, sıva iyileştirme ya da zemin iyileştirmede kullanım potansiyeli üzerine yoğunlaşmıştır (Zhang ve diğ. 2015; Lapeyrusse ve diğ. 2017; Pan ve diğ. 2019). Kalsiyum klorid, kalsiyum laktat, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetatın bakteriyel çökeltim etkisinin test edildiği bir çalışmada, *Bacillus licheniformis* ATCC 9789, *Lysinibacillus sphaericus* ATCC 4525, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus sphaericus* NZRM 4381 suşları en yüksek CaCO₃ miktarına kalsiyum klorür varlığında ulaşmıştır (Seifan ve diğ. 2016). Benzer bir başka çalışmada kalsiyum klorür, kalsiyum oksit, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat içeren besiyerinde geliştirilen *Bacillus* sp. CR2'nin en iyi çökeltim potansiyeli kalsiyum klorür (2,32 mg/kuru hücre ağırlığı mg) ile hazırlanan ortamda tespit edildi (Achal ve Pan 2014).

Çalışmada inorganik kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum klorür dışında kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat, organik kalsiyum kaynağı olarak da kalsiyum laktat kullanılmıştır (Tablo 4.5) ve kalsiyum kaynakları KMO ortamına 25 mM oranında ilave edilmiştir. *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin tüm kalsiyum kaynaklarında en yüksek çökeltim oranına 5. günde eriştiği ve kalsiyum nitrat içeren KMO besiyerinde inkübasyonun 5. gününde ulaştığı belirlendi (3282±10,0 mg/L). Diğer taraftan, kalsiyum klorür ve kalsiyum laktat ile modifiye edilen KMO besiyerinde elde edilen CaCO₃ miktarı birbirine yakınken (sırasıyla 1954±63,5 mg/L ve 1822±79,0 mg/L), kalsiyum asetat ile modifiye edilen besiyerinde bu miktarın az (1176±107,5 mg/L) olduğu gözlemlendi. Çalışma sonuçlarımızın aksine *Bacillus cereus*, en yüksek kalsiyum karbonat çökeltimini kalsiyum asetat varlığında (2,5 g/L) gerçekleştirmiştir (Pan ve diğ. 2019). Sonuçlar arasındaki farklılıkların hem tür

farklılığından kaynaklandığı hem de kalsiyum asetatın çözünürlüğünün az olması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Tablo 4.5: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelimine kalsiyum kaynaklarının etkisi (mg/L) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, t=37°C, pH: 6.50) ve son pH dereceleri.

Kalsiyum Karbonat Miktarı (mg/L)					
Kalsiyum Kaynağı (25 mM)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
Kalsiyum klorür	1733±34,5	1954±63,5	1649±33,0	1535±25,5	1677±10,5
Kalsiyum nitrat	2156±52,0	3282±10,0	3006±38,0	2518±30,0	2070±62
Kalsiyum laktat	1537±21,5	1822±79,0	1804±21,5	1480±38,0	1127±13,5
Kalsiyum asetat	864±24,5	1176±107,5	1093±64,0	922±70,5	892±54,0
Son pH					
Kalsiyum kaynağı	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
Kalsiyum klorür	8,65±0,00	8,54±0,11	8,75±0,00	8,59±0,06	8,62±0,01
Kalsiyum nitrat	8,12±0,04	8,14±0,03	8,25±0,02	8,33±0,03	8,55±0,07
Kalsiyum laktat	8,58±0,12	8,74±0,13	8,82±0,12	8,86±0,05	8,96±0,07
Kalsiyum asetat	7,75±0,01	7,89±0,01	8,02±0,01	8,13±0,04	8,25±0,02

4.2.6 Hücre İnokulasyon Oranının Etkisi

Kalsiyum karbonat çökelim sürecinde bakterilerin üre hidrolizi ile çökelim için gerekli olan alkali ortamı oluşturduğu (Ferris ve diğ. 1987) ve yüzeylerindeki EPS ve negatif iyon grupları ile kalsiyum karbonat kristallerinin tutunması için nükleasyon zonları oluşturarak kristal miktar ve profilinde belirleyici rol oynadıkları (Al Salloum ve diğ. 2017; Dhama ve diğ. 2014) bilinir. Ayrıca artan hücre konsantrasyonunun daha büyük kristal boyutu oluşumunda etkisi olduğu da belirtilir (Al Thawadi ve Cord-Ruwisch 2012). Bakteri hücre boyutu, hücre sekresyon oranı, hücrenin organik ve inorganik materyaller ile etkileşimleri ve elektrostatik yük yoğunluğu gibi türe özgü birçok faktörün kristal morfolojisinde etkili olduğu ifade edilir (Tang ve diğ. 2020).

Tablo 4.6: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökeline hücre inokulasyon oranının etkisi (mg/L) (pH:6.5, 25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, t=37°C).

<i>Kalsiyum Karbonat Miktarı (mg/L)</i>						
CaCl ₂ (mM)	İnok Oranı (%)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	10	1733±34,5	1954±63,5	1649±33,0	1535±25,5	1677±10,5
	15	1420±51,0	1478,5±92,5	1671,5±53,5	1568,5±41,5	1744±54,0
	20	1385±24,0	1515,5±47,5	1683,5±84,5	1560±88,0	1576±11,0
500	10	2139±27,0	1326±58,0	1159,5±8,5	1168±44,0	1073,5±37,5
	15	1232±31,0	1454,5±2,5	1653,5±127,5	1384±0,0	1675±151,0
	20	1451,5±75,5	1413,5±9,5	1350,5±37,5	1276±32,0	1498,5±77,5
1000	10	2815,5±11,5	1558,5±49,5	1339±131,0	1996±37,0	1423±27,0
	15	1683,5±87,5	2026,5±58,5	1947±54,0	1605,5±48,5	2137,5±58,5
	20	1464,5±136,5	1847±17,0	2051,5±40,5	1864,5±18,5	2140±44,0
<i>Son pH</i>						
CaCl ₂ (mM)	İnok Oranı (%)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	10	8,65±0,01	8,54±0,11	8,75±0,00	8,57±0,04	8,62±0,01
	15	8,70±0,02	8,66±0,08	8,60±0,01	8,48±0,05	8,36±0,05
	20	8,76±0,02	8,68±0,01	8,54±0,01	8,50±0,02	8,41±0,02
500	10	8,34±0,03	8,13±0,01	8,28±0,03	8,18±0,00	8,12±0,04
	15	8,20±0,03	8,24±0,03	8,09±0,11	8,10±0,03	8,06±0,17
	20	8,28±0,00	8,36±0,09	8,25±0,04	8,23±0,05	8,20±0,05
1000	10	8,11±0,04	7,89±0,01	8,12±0,00	8,06±0,14	7,94±0,13
	15	7,99±0,06	7,98±0,01	7,99±0,01	7,86±0,06	7,96±0,02
	20	8,09±0,01	8,08±0,02	8,10±0,03	7,95±0,00	7,98±0,03

Hücre inokulasyon oranının bakteriyel çökeline etkisinin test edilmesi için, KMO besiyerine bakteri kültüründen %10, %15 ve %20 oranlarında inoküle edildi. Ayrıca kalsiyum klorürün gerçek etkisinin belirlenebilmesi amacıyla düşük, orta ve yüksek tuz konsantrasyonu da test edildi. 500 mM ve 1000 mM tuz varlığında elde edilen bakteriyel çökeltinin kalsiyum karbonat doğrulaması mineralojik analizlerle gösterilememiştir. Bu nedenle buradaki çökelinin Ca⁺² varlığıyla ilişkili olduğu daha kuvvetli olarak kabul edilmiştir (Tablo 4.6). Ayrıca 25 mM tuz konsantrasyonunda hücre inokulasyon oranındaki artışa bağlı olarak dikkate değer bir artış göstermemesi de dikkati çekmiştir. Bizim bulgularımızın aksine, *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859'un inokulasyon oranı ile CaCO₃ çökelim miktarında lineer bir artış

bildirilmiştir (Okdawha ve diğ. 2010). Yine benzer şekilde *Sporosarcina pasteurii* ile yapılan bir diğer çalışmada %1, %2, %3, %4 ve %5 oranında artan hücre konsantrasyonu ile çökelti arasında lineer ilişki tespit edilmiştir (Zhao ve diğ. 2019).

4.2.7 Ajitasyonun etkisi

Çalkalamalı inkübasyonun *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökeline etkisi 100 rpm ve 150 rpm çalkalama hızlarında çalışıldı. Yüksek çalkalama hızının kalsiyum karbonat çökeline olumlu yönde etki ettiği gözlenirken, en yüksek çökelim miktarı 150 rpm çalkalama hızında 5. günde 1513 miligram CaCO₃/litre olarak hesaplandı (Tablo 4.7). Çalkalama hızı arttığında son pH değerlerinde ve dolayısıyla çökelim miktarında yükselme olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.7: Çalkalama hızının *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökeline etkisi (mg/L) (pH:6.5, 25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, 25 mM CaCl₂, t=37°C) ve son pH.

<i>Kalsiyum Karbonat Miktarı (mg/L)</i>					
Ajitasyon (rpm)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
100	1230±90	1368±100	1190±22	962±14	836±66
150	1226±86	1513±37	1164±30	1016±48	920±64
<i>Son pH</i>					
Ajitasyon (rpm)	1. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
100	8,25±0,13	8,18±0,04	8,30±0,01	8,31±0,03	8,42±0,02
150	8,54±0,04	8,64±-10	8,72±0,02	8,80±0,01	8,77±0,01

Bu sonuçlar *Arthrobacter sulfureus* W4/124, *Bacillus atrophaeus* II/39/3 ve *Bacillus muralis* I/2/3 suşları ile 100-180 rpm aralığında gerçekleştirilen çalışmanın bulguları ile paralellik göstermiştir. Araştırmacılar artan ajitasyon hızının *Bacillus muralis* suşları hariç (%20 artış) tüm suşlarda %60'a yakın oranda çökelim artışı sağladığını bildirirlerken (Otlewska ve Gutarowska 2016), bulgularımız ile uyumlu bu sonuçlar aerobik olan bakterilerde ajitasyonun kalsiyum karbonat çökeline olumlu etki gösterdiğini ortaya koymasından önemlidir.

4.2.8 Amonyum Konsantrasyonu

Üre hidrolizine ek olarak kalsiyum karbonat çökeliminin gerçekleşmesi bakteri kültür ortamının alkalileşmesi için amonyum üretimine de bağlıdır. Atmosferik amonyağın insan sağlığına ciddi zararlar teşkil edebileceği bilinir. Dolayısıyla bakteriyel kalsiyum karbonat çökeli ile yapılacak olan endüstriyel uygulamalarda amonyum miktarının fazlalığı istenmeyen bir sonuçtur (Sutton ve diğ. 2008). Aynı şekilde bakteriyel beton üretiminde amonyum tuzunun varlığı, nitrifikasyon bakterilerinin etkisi ile amonyumun nitrik asite dönüştürülmesi sonucu beton yapılarında tuz hasarı oluşturabilir ve betonda tuz hasarı ile ilgili bazı riskler ortaya çıkarabilir. (De Muynck ve diğ. 2010).

Çalışmamızda süpernatanttaki amonyum konsantrasyonu, Hach marka Nessler Amonyum Tayin Kiti ile spektrofotometrik olarak hesaplandı. Optimum şartlarda hazırlanan örneklerde (50 mL) inkübasyon sürelerinin sonunda amonyum azotu ($\text{NH}_3\text{-N}$) miktarı mg/L cinsinden hesaplandı.

Tablo 4.8: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından yapılan çökelim şartlarında amonyum azotu ($\text{NH}_3\text{-N}$) analiz sonuçları (mg /L).

İnkübasyon Süresi	Amonyum Azotu ($\text{NH}_3\text{-N}$) (mg/L)
12. Saat	4,345±0,045
1. gün	5,330±0,010
2. gün	5,430±0,020
3. gün	5,345±0,055
4. gün	5,340±0,030
5. gün	5,315±0,015
7. gün	5,290±0,020
10. gün	5,285±0,015
14. gün	5,240±0,030

Amonyum azotu miktarının 12-24. saatler arasında artış gösterdiği, 1. günden itibaren ise yaklaşık olarak aynı miktarlarda seyrettiği tespit edildi. Amonyum azotu miktarı Dünya Sağlık Örgütü'nün çevre sağlık kriterlerine uygun kabul ettiği kriterlere uyumlu (Azami 17 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ /Litre; World Health Organization, 1986) ve beton uygulaması için kabul edilebilir sınırların oldukça altında olduğu tespit edildi. Öte yandan ilk 12. saat içerisinde amonyum azotu varlığı üreolitik aktivitenin inkübasyonun ilk saatlerinde başladığını kanıtlar nitelikteydi (Tablo 4.8).

Tüm çökelim parametreleri incelendiğinde bakterinin 25 mM üre, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 37°C sıcaklıkta ve pH_{başlangıç}: 6,5'ta en iyi kalsiyum karbonat çökelimi yaptığı anlaşıldı. Bu parametrelerin bir arada kontrolü ve çökelimin doğrulanması amacıyla çalışma tekrar edildi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'in çökelim parametrelerinde kalsiyum karbonat miktarı (25 mM üre, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, sıcaklık: 37°C, pH_{başlangıç}: 6,5).

İnkübasyon süresi	KOB/ml (x10 ⁻⁴)	CaCO ₃ (mg/L)	Son pH
6. saat	9,21	828 ± 11,5	7,41
12. saat	12,44	1284 ± 65,5	7,77
18. saat	16,79	1368 ± 46,0	7,84
1. gün	18,02	1528 ± 90,5	7,92
2. gün	17,56	1770 ± 25,5	8,07
3. gün	14,92	2008 ± 112,0	8,18
4. gün	12,74	2096 ± 81,5	8,23
5. gün	10,91	2248 ± 74,0	8,28
7. gün	7,22	2072 ± 104,0	8,34
10. gün	4,09	1616 ± 23,5	8,41
14. gün	1,73	1477 ± 56,0	8,52

Bacillus amyloliquefaciens U17'nin inkübasyonun ilk anlarından itibaren, düşük hücre konsantrasyonuna rağmen kalsiyum karbonat çökelimi yapmaya başladığı, 12. saatten itibaren pH ve çökelimin doğrusal artış gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.9). En yüksek koloni oluşturan birim sayısına 1 gün içinde ulaşmasına rağmen ortam pH'ı 8'e ulaşana kadar çökelim miktarının aynı ölçüde artmadığı gözlemlendi. Bu durum üreolitik aktivitenin pH ile birlikte arttığı ve kalsiyum karbonat çökelimi için optimum pH'ın 8.0 olduğunu ifade eden çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Stocks-Fischer ve diğ. 1999; Gorospe ve diğ. 2013). İlk 24 saatlik gelişme periyodunda hücre gelişimi diğer inkübasyon sürelerine kıyasla düşük olmasına rağmen, hücrelerden salınan üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin miktarı, kalsiyum karbonat çökelimi için yeterli olmuştur. Çalışmamızda ilk 4 günlük inkübasyonda CaCO₃ miktarında ve hücre sayısında düzenli bir artış gözlemlendi. Bu artış genel olarak inkübasyonun 5. ve 7. günlerinde kalsiyum karbonat miktarında maksimuma ulaşmıştır. Bu süreden sonra ise kalsiyum karbonat çökeliminde düşüş gözlenirken, bu azalmanın hücre tarafından salınan enzim

miktarından, ortamdaki kalsiyum miktarından ve ortamın alkali pH'ya kayması gibi birçok faktörden kaynaklandığı düşünöldü.

Yerel izolatomız *Bacillus amyloliquefaciens* U17, literatürde üreolitik bakteriler aracılığıyla kalsiyum karbonat çökeliğini etkilediğı bilinen pH, sıcaklık, üre ve kalsiyum iyon konsantrasyonu, farklı kalsiyum kaynakları, hücre yoğunluğu ve ajitasyon faktörlerinin tümü açısından değerlendirildi. Yerel bir izolat olması dolayısıyla son yıllarda araştırmacılar tarafından çalışılan üreolitik bakterilerle benzer ve farklı özellikler gösterdiği belirlendi. Bu durum üre hidrolizi ile kalsiyum karbonat çökeliğini ve bunu belirleyen faktörlerin türe hatta zaman zaman suşa özgü olması ile açıklanabilir. Nitekim aynı türün farklı suşları olan *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01 (Lee ve diğ. 2003) ve *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350'ye (Mohebbi ve diğ. 2019) kıyasla farklılıklar göstermesi bunun kanıtıdır. Bu çalışma *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin izole edilerek tanımlanması, kayıt altına alınması, üreaz ve karbonik anhidraz enzim varlıklarının ve kalsiyum karbonat çökeliğini yapabildiğinin tespit edilmesi, optimum koşullarda mineral profilinin çıkarılması ve ilk defa beton uygulamasında kullanılması sebebiyle önem taşır ve özgündür.

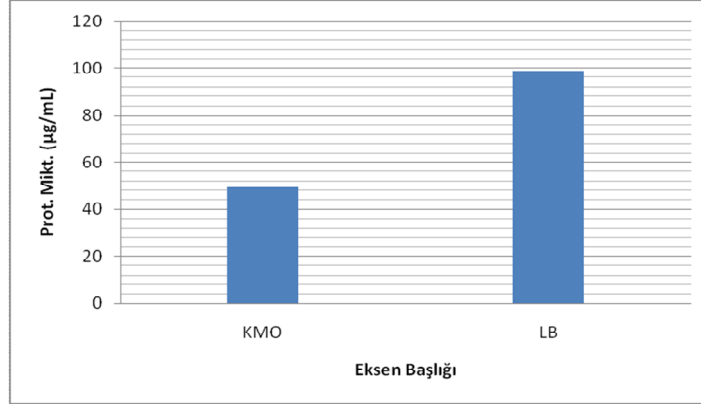
4.3 Enzim Analizleri (Analitik Metotlar)

4.3.1 Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Bacillus amyloliquefaciens U17'den elde edilen enzim ekstraktlarının toplam protein konsantrasyonları Lowry ve ark (1951) tarafından geliştirilen metot ile hesaplandı ve Sığır Serum Albümini (BSA) standart protein olarak kullanıldı. BSA standart kalibrasyon eğrisi EK C'te verildi. KMO ortamı bakterinin çökeliğini gerçekleştirmediği koşullarında, Lauria Bertani Miller ortamı ise çökeliğini gerçekleştirmedeği koşullarda toplam protein miktarının belirlenebilmesi amacıyla kullanıldı.

Tablo 4.10: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin toplam protein miktarları

Besiyeri	Prot. Mikt. (µg/mL)	dH2O	SDB
KMO	49,61	-0,39	16,54
LB	98,58	48,58	32,86

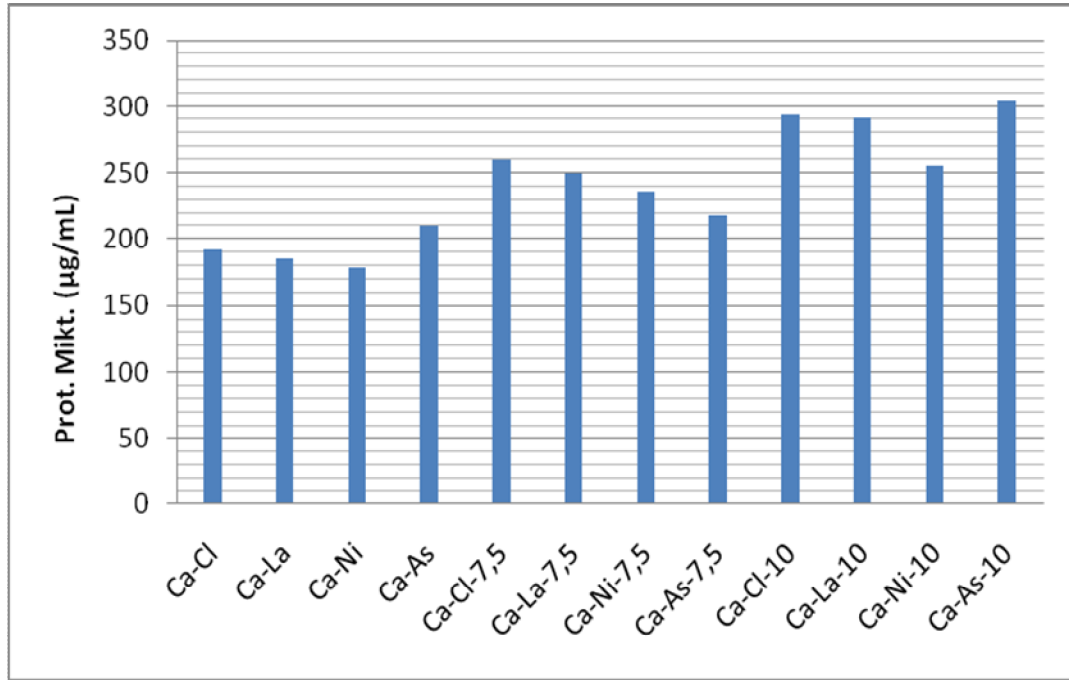


Şekil 4.4: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin toplam protein miktarları

Bacillus amyloliquefaciens U17'nin modifiye KMO ortamında ürettiği toplam protein konsantrasyonunun modifiye Lauria-Bertani Miller ortamında ürettiği total protein miktarının yaklaşık yarısı kadar olduğu tespit edildi (Tablo 4.10, Şekil 4.4).

Tablo 4.11: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı oranlarda maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin total protein miktarları

KMO	Prot. Mikt. (µg/mL)	dH2O	SDB
Ca-Klorür	191,40	141,40	63,80
Ca-Laktat	184,95	134,95	61,65
Ca-Nitrat	178,21	128,21	59,40
Ca-Asetat	209,72	159,72	69,91
KMO (%7.5 Yeast)	Prot. Mikt. (µg/mL)	dH2O	SDB
Ca-Klorür	259,63	209,63	86,54
Ca-Laktat	249,54	199,54	83,18
Ca-Nitrat	236,16	186,16	78,72
Ca-Asetat	218,31	168,31	72,77
KMO (%10 Yeast)	Prot. Mikt. (µg/mL)	dH2O	SDB
Ca-Klorür	293,11	243,11	97,70
Ca-Laktat	291,41	241,41	97,14
Ca-Nitrat	254,61	204,61	84,87
Ca-Asetat	303,26	253,26	101,09



Şekil 4.5: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı oranlarda maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinden ekstre edilen hücrelerin total protein miktarları

Bacillus amyloliquefaciens U17'nin ürettiği toplam protein konsantrasyonu ve üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitelerine farklı kalsiyum kaynaklarının etkilerinin tespit edilmesi amacıyla KMO besiyeri 25 mM oranında farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak modifiye edilmiştir. Maya ekstraktının protein miktarı ve enzim aktivitesine etkisinin anlaşılması amacıyla 2 farklı konsantrasyonda (%7,5 ve %10) çalışılmıştır. Ayrıca, deney besiyerine eklenmeden önce petriden nutrient broth ortamına alınarak aktiveleştirilen bakteriler 1'er gün arayla 2 defa %10 oranında nutrient broth besiyerine alınarak aktiveleştirme safhası uzatılmış, bakteriyel aktivitenin mümkün olan en yüksek oranına ulaşması amaçlanmıştır (Tablo 4.11, Şekil 4.5).

4.3.2 Üreaz ve Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi

Karbonik anhidraz çinko içeren bir metalloenzimdir ve karbondioksit ve bikarbonatın tersinir katalizinde rol alır. Üre bulunmayan ortamda yeterli karbondioksit, kalsiyum iyonu ve nükleasyon zonu varlığında kalsiyum karbonat çökeliminde görev alır (Castro-Alonso ve diğ. 2019). Bakteriyel kalsiyum karbonat

çökeliimi çalışmalarında nadiren araştırılmasına rağmen, literatürde karbonik anhidraz enzim aktivitesinin kalsiyum karbonat çökeliimine etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Örneğin; *Bacillus megaterium* AP6, *Bacillus* sp. AP4 ve *Bacillus simplex* AP9'un karbonik anhidraz enzim aktiviteleri sırasıyla 1,87 U/mg protein, 1,41 U/mg protein 1,49 U/mg protein olarak hesaplandı ve üç bakterinin ürettiği kristal yapıları XRD aracılığıyla kalsit olarak tanımlandı (Achal ve Pan 2011). Hindistan'da mangrov sedimanından izole edilen *Bacillus altitudinis* M3 ve *Bacillus altitudinis* M8'in karbonik anhidraz enzim aktiviteleri sırasıyla 44 U/mg ve 76 U/mg olarak tespit edildi ve çökelen kalsiyum karbonatın kalsit formunda olduğu belirtildi (Nathan ve Ammini 2019). Bu çalışmalarda elde edilen sonuçların bizim çalışmamızdaki karbonik anhidraz enzim miktarından farklı olması, CA enziminin de türe özgü özellikte olmasından kaynaklanır.

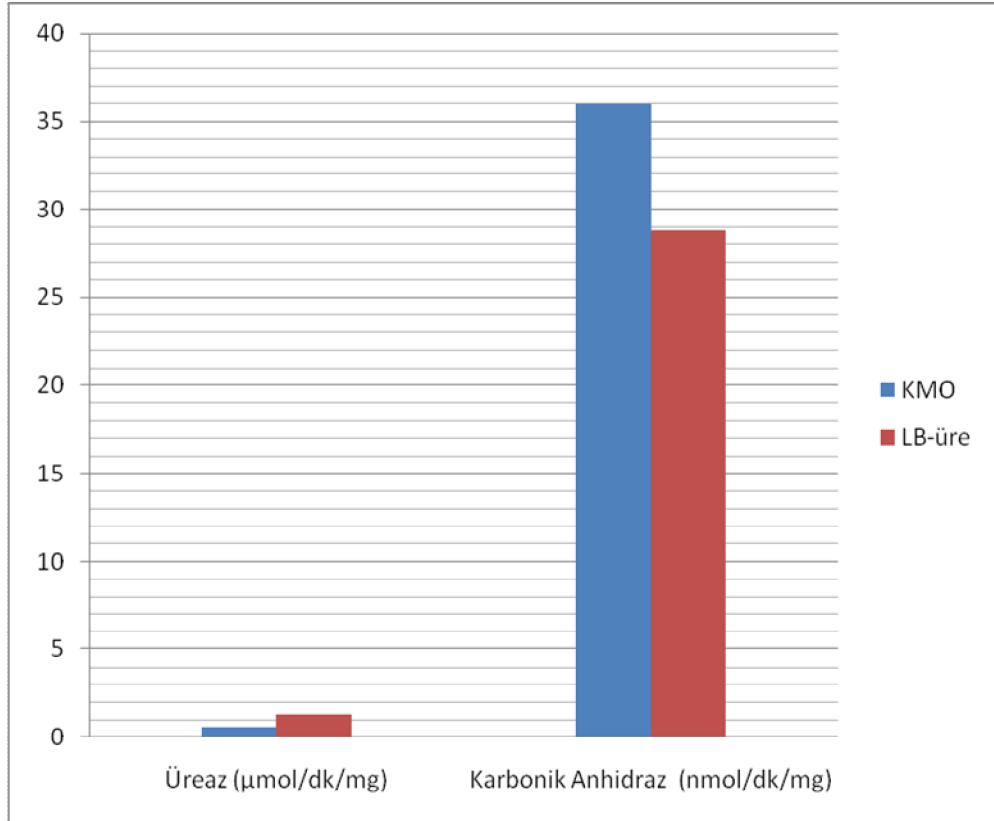
Üreaz nikel içeren bir metalloenzimdir ve ürenin katalizinde rol alır. Üreaz enzim aktivitesi pH, sıcaklık, bakteri konsantrasyonu, bakteri türü gibi birçok faktör tarafından regüle edilir ve üreaz bazlı kalsiyum karbonat çökeliim çalışmalarında sıklıkla kullanılır. Örneğin; *Pararhodobacter* sp. SO1'in üreaz enzim karakterizasyon çalışmasında aktivite $1,66 \pm 0,415$ U/ml olarak hesaplandı (Fujita ve diğ. 2017). Malezya'da kireç taşı mağarasından izole edilerek tanımlanan ve üreolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenen *Sporosarcina pasteurii* WJ-4'ün üreaz enzim aktivitesi 21,53 mol üre/dk ve CaCO₃ mineral miktarı 17,26 mg/ml olarak hesaplandı (Omoriege ve diğ. 2018). Piezotolerant *Bacillus* sp. NIOTVJ5'in üreaz enzim aktivitesi 554,03 U/ml ve kalsiyum karbonat miktarı 1,8 g/L'dir (Rangamaran ve Shanmugam 2019).

Tablo 4.12'de sunulan sonuçlara göre, *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin üreaz enzim aktivitesi KMO besiyerinde $0,615 \pm 0,092$ µmol/min/mg ve LB-üre besiyerinde ise $1,315 \pm 0,021$ µmol/min/mg'dır. Üreaz enzim aktivitesi KMO ile karşılaştırıldığında LB-üre besiyerinde yaklaşık olarak 2 kat daha fazladır. Üreaz enzim aktivitesine ilaveten karbonik anhidraz enzim aktivitesi de belirlenmiştir. Bakterinin karbonik anhidraz enzim aktivitesi KMO'da $36,03 \pm 5,48$ nmol/min/mg ve LB-üre besiyerinde ise $28,82 \pm 3,31$ nmol/min/mg olarak hesaplandı (Tablo 4.12, Şekil 4.6). Sonuçlarımıza benzer olarak, yüksek enzim aktivitesine sahip *Bacillus* ve *Pseudomonas* gibi birçok bakteri suşu yüksek miktarda CaCO₃ çökeltir (Dhami ve ark., 2014; Nonakaran ve diğ. 2015).

Üreaz enzim aktivitesi, azot içeriği gibi çevresel koşullar ile düzenlenir. KMO ve LB'nin azot miktarı farklıdır. Bu nedenle, enzim aktivitesi iki ortamda farklı olarak tespit edildi. Bu çalışmada, yüksek CaCO₃ çökelişini gösteren *Bacillus amyloliquefaciens* U17 suşu, üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri için iki farklı ortamda test edildi. Sonuçlar U17'nin yüksek üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitesine sahip olduğunu gösterdi. Bu sonuçlara ek olarak, çalışmamızda ilk kez bu enzim aktivitelerinin farklı ortamlarda değiştiği gösterildi.

Tablo 4.12: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri

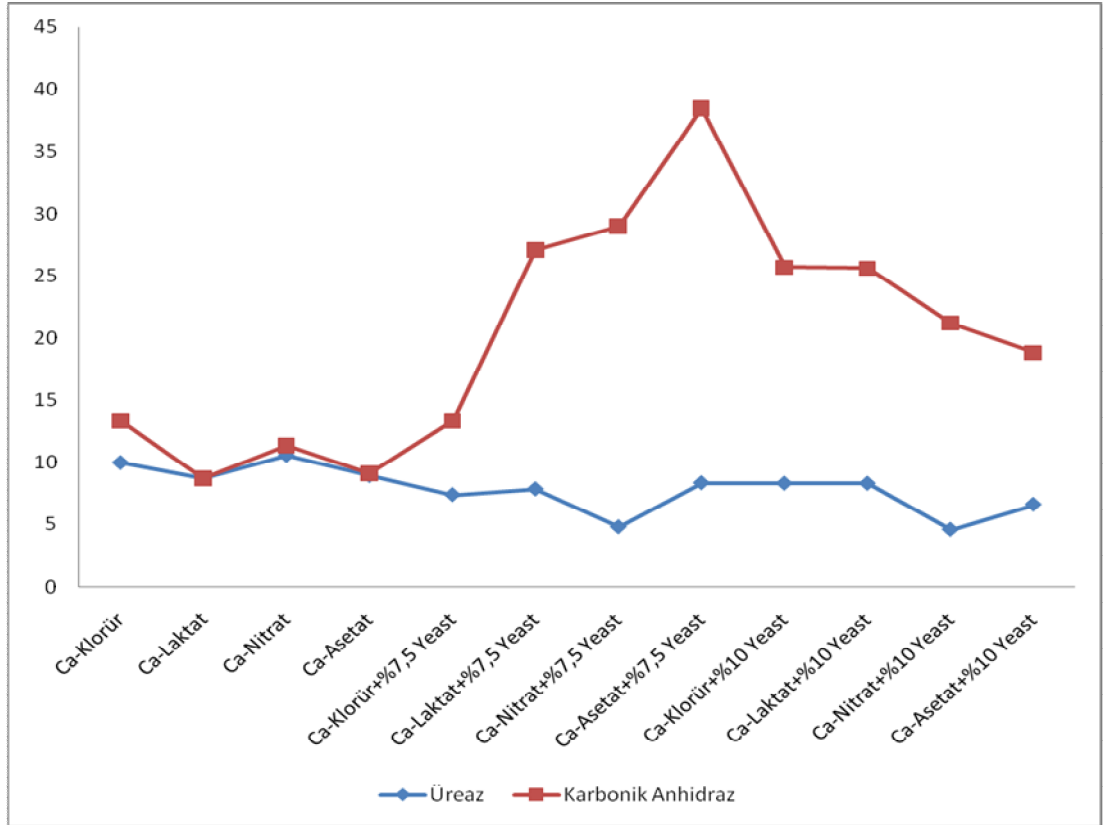
Üreaz Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol/dk/mg}$)		Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi (nmol/dk/mg)	
KMO	LB-Üre	KMO	LB-Üre
0,615 \pm 0,092	1,315 \pm 0,021	36,03 \pm 5,48	28,82 \pm 3,31



Şekil 4.6: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin modifiye KMO ve LB-üre (25 mM üre) besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri

Tablo 4.13: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri

Üreaz Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol/dk/mg}$)		Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi (nmol/dk/mg)	
Ca-Klorür	9,980 \pm 0,184	Ca-Klorür	13,375 \pm 0,290
Ca-Laktat	8,680 \pm 0,099	Ca-Laktat	8,705 \pm 0,148
Ca-Nitrat	10,560 \pm 0,240	Ca-Nitrat	11,375 \pm 0,757
Ca-Asetat	8,925 \pm 0,092	Ca-Asetat	9,125 \pm 0,431
Ca-Klorür+%7,5 Yeast	7,380 \pm 0,099	Ca-Klorür+%7,5 Yeast	13,340 \pm 0,311
Ca-Laktat+%7,5 Yeast	7,840 \pm 0,057	Ca-Laktat+%7,5 Yeast	27,075 \pm 0,389
Ca-Nitrat+%7,5 Yeast	4,765 \pm 0,134	Ca-Nitrat+%7,5 Yeast	29,010 \pm 0,467
Ca-Asetat+%7,5 Yeast	8,340 \pm 0,014	Ca-Asetat+%7,5 Yeast	38,435 \pm 0,516
Ca-Klorür+%10 Yeast	8,300 \pm 0,057	Ca-Klorür+%10 Yeast	25,690 \pm 0,453
Ca-Laktat+%10 Yeast	8,295 \pm 0,177	Ca-Laktat+%10 Yeast	25,620 \pm 0,453
Ca-Nitrat+%10 Yeast	4,555 \pm 0,035	Ca-Nitrat+%10 Yeast	21,210 \pm 0,891
Ca-Asetat+%10 Yeast	6,595 \pm 0,049	Ca-Asetat+%10 Yeast	18,825 \pm 0,318



Şekil 4.7: *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinde üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri

Farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı oranlarda maya ekstraktının (%7,5 ve %10) *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitelerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, U17'nin maya ekstraktı eklenmeyen ortamda en yüksek üreaz enzim aktivitesini kalsiyum nitrat ile hazırlanan besiyerinde ($10,560 \pm 0,240$ $\mu\text{mol/dk/mg}$), en yüksek karbonik anhidraz enzim aktivitesini ise kalsiyum klorür ile hazırlanan besiyerinde ($13,375 \pm 0,290$ nmol/dk/mg) gösterdiği görüldü. Artan maya ekstraktı konsantrasyonunun U17'nin üreaz enzim aktivitesini azalttığı, karbonik anhidraz enzim aktivitesini ise tüm deney gruplarında arttırdığı gözlemlendi. Ancak bu artış tüm deney gruplarında aynı şekilde gözlenmemiş, karbonik anhidraz enzim aktivitesinin kalsiyum klorür besiyerinde %10 maya ekstraktı ile hazırlanan besiyerinde ($25,690 \pm 0,453$ nmol/dk/mg) %7,5 maya ekstraktı ile hazırlanan besiyerindeki ($13,340 \pm 0,311$ nmol/dk/mg) aktiviteye göre daha yüksek olduğu, bunun aksine %7,5 maya ekstraktı ile hazırlanan kalsiyum laktat, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat besiyerlerindeki karbonik anhidraz enzim aktivitelerinin (Sırasıyla $27,075 \pm 0,389$ nmol/dk/mg , $29,010 \pm 0,467$ nmol/dk/mg ve $38,435 \pm 0,516$ nmol/dk/mg), %10 maya ekstraktı ile hazırlanan kalsiyum laktat, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat besiyerlerindeki karbonik anhidraz enzim aktivitelerine kıyasla (Sırasıyla $25,620 \pm 0,453$ nmol/dk/mg , $21,210 \pm 0,891$ nmol/dk/mg ve $18,825 \pm 0,318$ nmol/dk/mg) daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 4.13, Şekil 4.7).

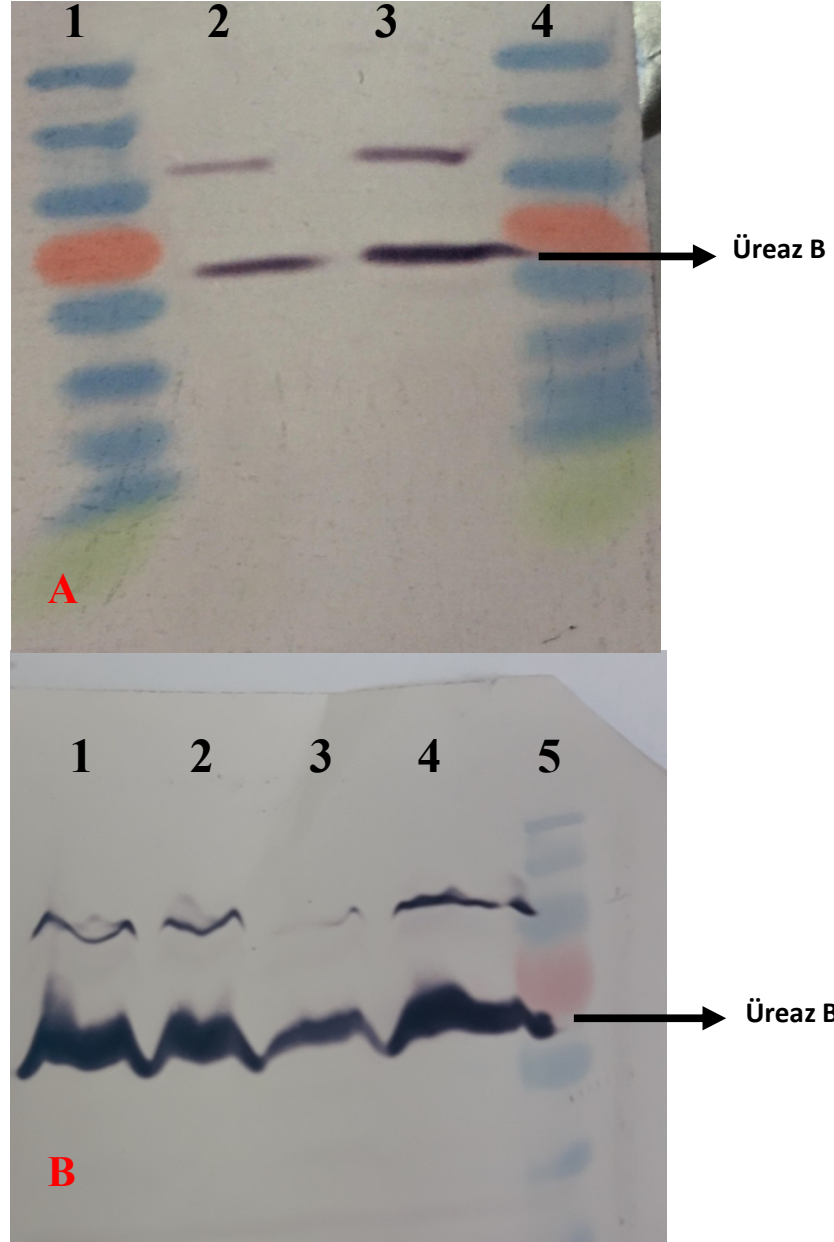
Bacillus sp. CR2'nin farklı kalsiyum kaynakları (kalsiyum klorür, kalsiyum nitrat, kalsiyum oksit ve kalsiyum asetat) ile modifiye edilen ortamlardaki üreaz enzim aktiviteleri araştırıldı ve en yüksek üreaz enzim aktivitesi kalsiyum klorür besiyerinde (432 U ml^{-1}) kaydedilirken bunu sırasıyla kalsiyum nitrat (418 U ml^{-1}), kalsiyum asetat (401 U ml^{-1}) ve kalsiyum oksit besiyerlerindeki (389 U ml^{-1}) üreaz enzim aktivitelerinin takip ettiği tespit edildi (Achal ve diğ. 2014).

4.3.3 Üreaz Protein Seviyesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda enzim aktivitelerinin farklı ortamlarda gösterdiği değişimler western blot çalışmaları ile de doğrulandı ve U17 üreaz protein seviyesi, immünokimyasal olarak western blot ile belirlendi. Deneylerimizde *Helicobacter pylori* üreaz enzimine karşı hazırlanmış poliklonal antikor kullanıldı (Şekil 4.4). Bu çalışmada, KMO besiyerinde geliştirilen hücrelere kıyasla LB-üre'de geliştirilen hücrelerin immünoreaktif üreaz bandının boyanma yoğunluğunda bir artış gözlemlendi. Western blot sonuçlarının densitometrik taramasına göre iki ortamda yaklaşık 5 kat fark gözlemlendi. Üreaz alt biriminden biri olan Üreaz B, LB besiyerine kıyasla KMO ortamında indüklendi (Şekil 4.8 A).

Çalışmamızda farklı kalsiyum kaynaklarının üreaz protein seviyesine etkisi araştırıldı. 25 mM kalsiyum klorür, kalsiyum laktat, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat ile modifiye edilen KMO besiyerinde üreaz bantları tespit edildi. Ancak densitometrik taramalar sonucunda farklı kalsiyum kaynakları ile modifiye edilmiş KMO ortamlarında üreaz B indükleme oranında belirgin farklar gözlemlenmedi (Şekil 4.8 B).

Çalışmamızda her ne kadar farklı besiyerlerinde (KMO ve LB-üre) ve farklı kalsiyum kaynakları ile modifiye edilen KMO besiyerlerinde üreaz bantlarının gözlemlenmesi ile üreaz protein seviyeleri tespit edilse de üreaz indüksiyonunun altında yatan mekanizmaları çözmek için gelecekte daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.



Şekil 4.8: Üreaz B protein bantları. Western blot ile analiz edilmiştir. **A)** *Bacillus amyloliquefaciens* U17 KMO ve LB-üre ortamında geliştirilmiştir. Hatlar: 1, Protein marker, 2, LB-üre besiyerinde U17 üreaz B proteini, 3, KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 4, protein marker. **B)** *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin farklı kalsiyum kaynakları (25 mM) ve farklı maya ekstraktı ile modifiye edilen KMO besiyerlerinde üreaz protein seviyesi. Hatlar: 1 Kalsiyum asetat KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 2 Kalsiyum nitrat KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 3 Kalsiyum laktat KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 4 Kalsiyum klorid KMO besiyerinde U17 üreaz B proteini, 5) Moleküler kütle standardı

4.4 Mineralojik Analizler

Bakteriyel kalsiyum karbonat çökelimi ve potansiyel endüstriyel ve çevresel kullanım alanlarına ilişkin çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen ve bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliminde kristal polimorfizmasına ilişkin bilgiler oldukça sınırlıyken, son yıllarda mineral fazı ve morfolojisinin türe (ya da suşa) özgü olduğu (Hammes ve diğ. 2003) ve EPS'de yer alan proteinlere özgü farklılıklar göstermesi dolayısıyla bakteri genetiği ile doğrudan alakalı olduğu bilinir (Ercole ve diğ. 2012). Bakteri, bir yandan enzim aktivitesi sonucu ortamın saturasyon oranını arttırırken, öte yandan nükleasyon zonu teşkil eden yüzeyi ile heterojen bir çökelim ortamı meydana gelmesine sebep olur. Bu esnada kimyasal olarak birbirinin aynısı olan fakat görünümleri farklı olan polimorfların meydana gelmesini sağlar (Schultze-Lam ve diğ. 1996). Kristal oluşumundaki morfolojik farklılıkların üreaz aktivitesindeki farklılıklar nedeniyle suşa özgü olabildiği gibi, bakterilerin gelişme ortamı veya içeriği de kristal tipini etkilemektedir (Tepe ve diğ. 2019; Akyol ve diğ. 2017).

Aragonit, kalsit ve vaterit en yaygın CaCO_3 mineral tipleridir. Vaterit, kalsit oluşumunda geçiş formudur; doğal çevrelerde ve laboratuvar şartlarında bakteriler tarafından yaygın olarak sentezlenir. Kalsit ise bakteriyel CaCO_3 'ün termodinamik olarak stabil formudur (Tourney ve Ngwenya 2009, Wang ve Becker, 2009). Kalsiyum karbonatın 3 adet anhidrik kristalin (kalsit, aragonit ve vaterit) ve 3 adet amorf fazı (monohidro kalsit, amorf kalsiyum ACC) mevcuttur (Antony ve diğ. 2011). Bu üç kristal faz polimorf arasında termodinamik açıdan en stabil olan kalsit iken, en az stabil olan ise vaterittir (Wu ve diğ. 2004).

Literatürde farklı bakteri türleri ve çökelim ortamları ile farklı amaçlarla gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışma mevcuttur. *Bacillus pasteurii* ATCC 6453 ile gerçekleştirilen bir çalışmada, kalsiyum karbonat çökeliminin artan hücre konsantrasyonu ve başlangıç kalsiyum iyon konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği ve ortaya çıkan minerallerin kalsit olduğu bildirildi (Stocks-Fischer ve diğ. 1999). Idaho nehir yatağında ağır metal remediasyonunda yerel izolat *Bacillus pasteurii*'nin çevresel koşulları iyileştirdiği ve kalsit çökelimi yaptığı belirtildi (Fujita ve diğ. 2000). Porlu medya geçirgenliğinin azaltılmasının amaçlandığı bir diğer çalışmada *Proteus vulgaris* bakterisi farklı üre ve sıcaklık

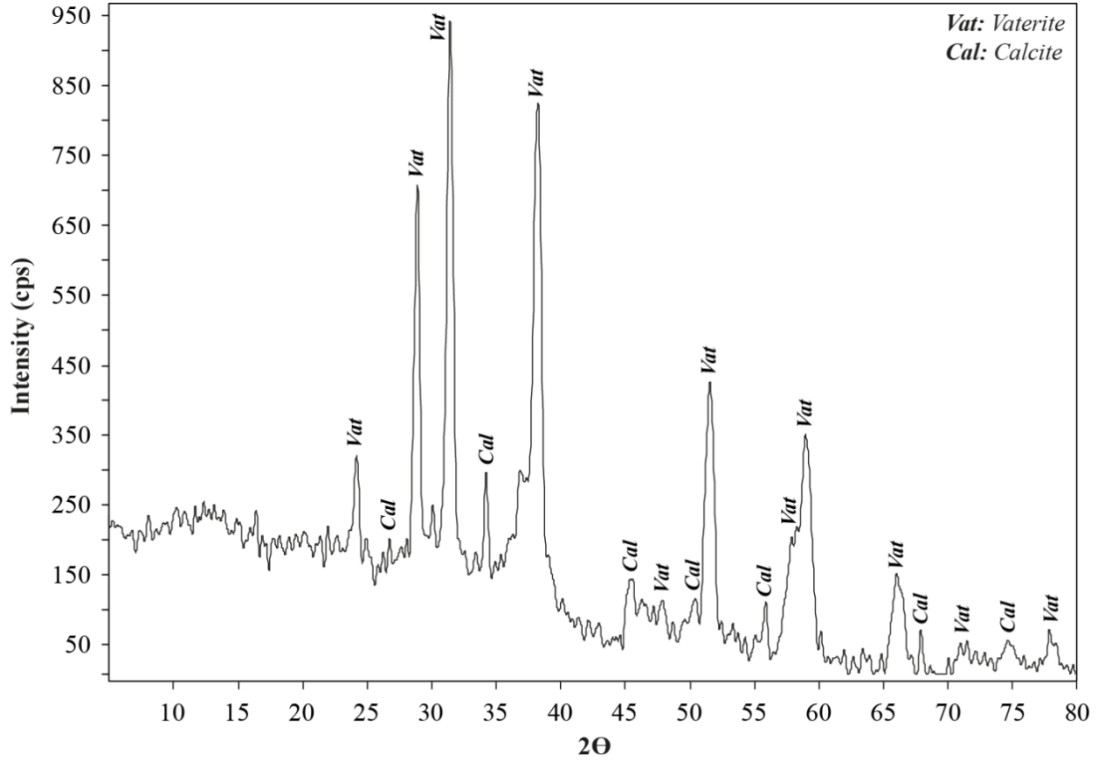
koşullarında çalışıldı ve artan üre konsantrasyonu ve sıcaklık ile çökeltim artışı ve gözenekli yapıda %12'ye kadar azalma tespit edildi (Nemati ve Voordouw 2003).

Bacillus sphaericus ile gerçekleştirilen beton ve sıva yüzey onarımı çalışmalarında, gaz ve sıvı geçirgenliğinde belirgin ölçüde azalma ve bakteri tatbik edilen yüzeylerde karakteristik rhombohedral kalsit kristalleri tespit edildi (De Muynck ve diğ. 2008). *Bacillus pasteurii* NCIM 2477, *Bacillus lentus* NCIB 8773 ve *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6871 kültürlerinin uygulandığı briketlerde su emme kapasitesi kontrol örneğine göre %11 az tespit edilirken (%14), gerçekleştirilen SEM analizlerinde kalsit kristalleri tanımlandı (Sarda ve diğ. 2009). Hindistan Andha Pradesh bölgesinden izole edilen ve 16s rDNA ile tanımlaması yapılan 5 izolatta bakteri türünün kalsiyum karbonat çökeltimine etkisi araştırıldı, tümünde kalsiyum karbonat çökeltimi tespit edilirken (kalsit) farklı izolatlarda kalsit morfolojisinde çeşitlilikler tespit edildi (Dhami ve diğ. 2013). Yunanistan'da mermer yüzeyin iyileştirilmesinde *Bacillus pumilus* ACA-DC-4061 kültürü kullanıldı ve mermer yüzeyinin vaterit kristalleri ile kaplandığı SEM analizleri ile ispatlandı (Daskalakis ve diğ. 2015).

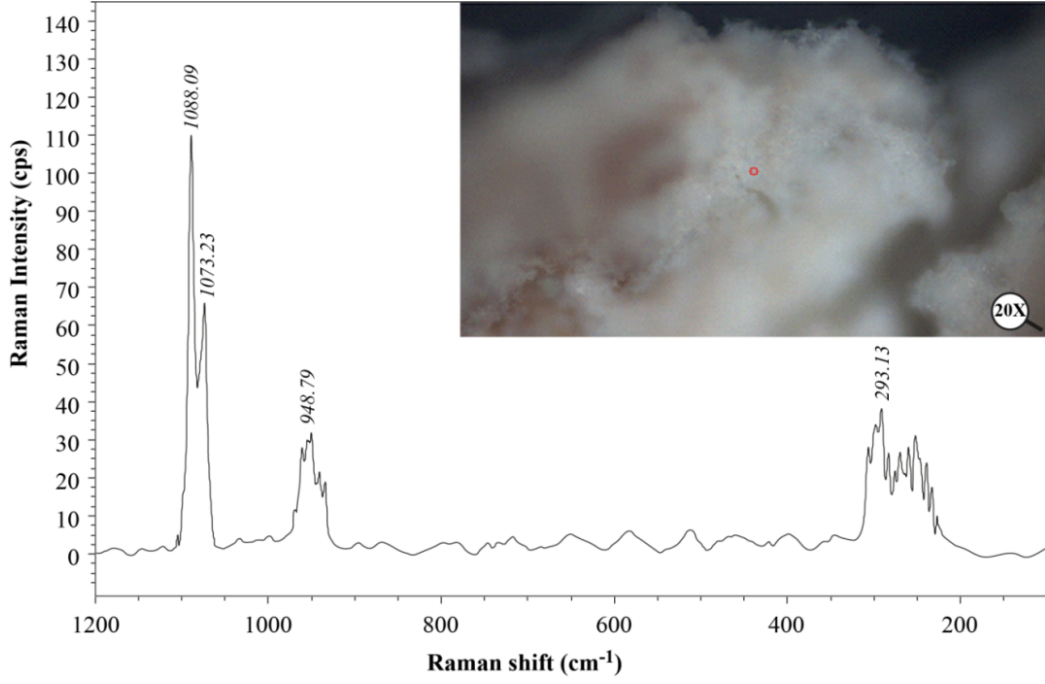
Farklı seviyede sıva çatlaklarına *Bacillus sphaericus* kültürü uygulaması yapılan çalışmada, tüm çatlaklarda ve çatlakların su geçirgenliğinde belirgin ölçüde azalma gözlenirken hegzagon şekilli kalsiyum karbonat kristalleri tespit edildi (Choi ve diğ. 2017). Bir diğer çalışmada *Bacillus sphaericus*'un üreolitik aktivite sonucu ürettiği kalsiyum karbonat kristallerinin XRD analizinde %37,57 oranında kalsit, %56,17 oranında vaterit ve %6,25 oranında karbon tespit edildi (Azmi ve diğ. 2018).

Çalışmamızda ise *Bacillus amyloliquefaciens* U17 suşu tarafından daha önce çalışılan optimal koşullarda üretilen bakteriyel ürün kurutulmuş toz haline getirildi ve CaCO₃'ün mineral yapısını doğrulamak için XRD, XRF, CRS, SEM ve EPMA analizleri yapıldı. XRD analizinde karakteristik kalsit ve vaterit pikleri gözlemlendi (Şekil 4.9). Si (%0,1598), P (%3,9), Cl (%1,26), Ca (%29,25), Mg (%0,011), Zn (242,2 ppm), Sr (11,2 ppm), Zr (10,3 ppm), Ba (13,9 ppm) ve U (17,7 ppm) elementlerinin, XRF analizindeki diğer elementlere kıyasla biraz daha fazla olduğu kaydedildi. U17 suşu tarafından üretilen toz numunenin CRS analizi ile Raman kayımlarına göre benzersiz CaCO₃ pikleri gösterildi (Şekil 4.10). SEM analizi sonucunda da kalsit ve vaterit mineralleri açıkça gözlemlendi (Şekil 4.11). *Bacillus*

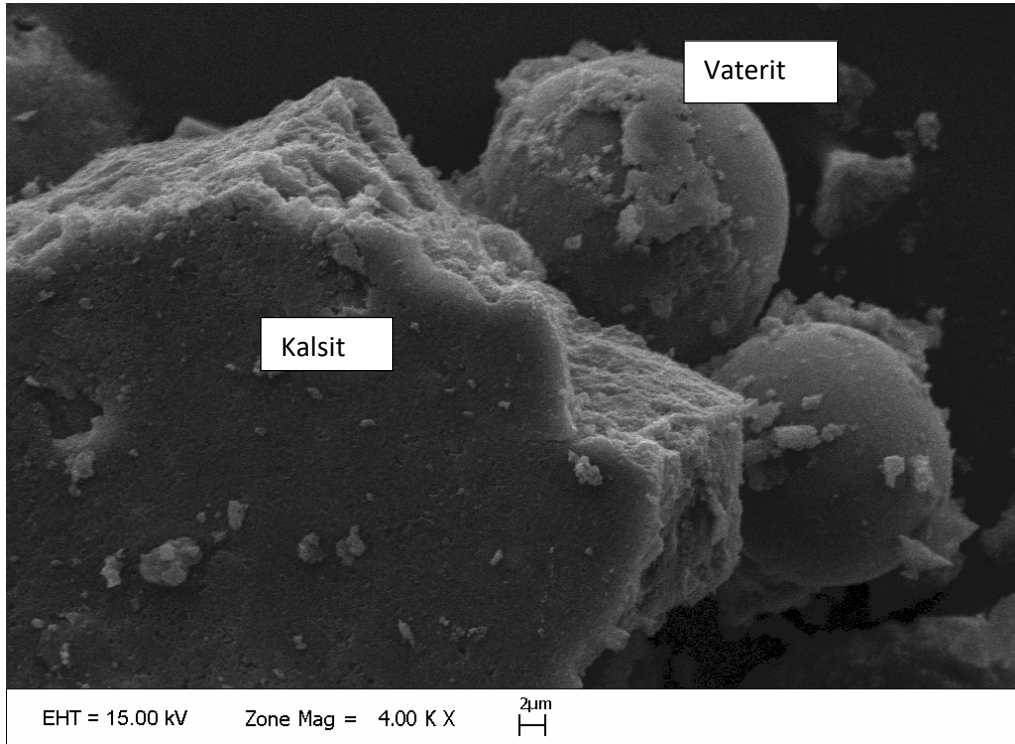
amyloliquefaciens CMB01 ile gerçekleştirilen çalışmada pH: 8.00 ve 30°C’de üretilen kalsiyum karbonatın rhombohedral prokristalin yapıda kalsit olduğu bildirilirken (Lee 2003), *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350 ile kum erozyonunun laboratuvar ölçeğindeki stabilizasyon çalışmasında, kum örneklerinde karakteristik kalsit piklerine rastlandı (Mohebbi ve diğ. 2019). Literatür bilgilerine göre laboratuvar koşullarında bakterilerin genel olarak kalsit veya vaterit mineral tiplerini ürettiği görülmektedir.



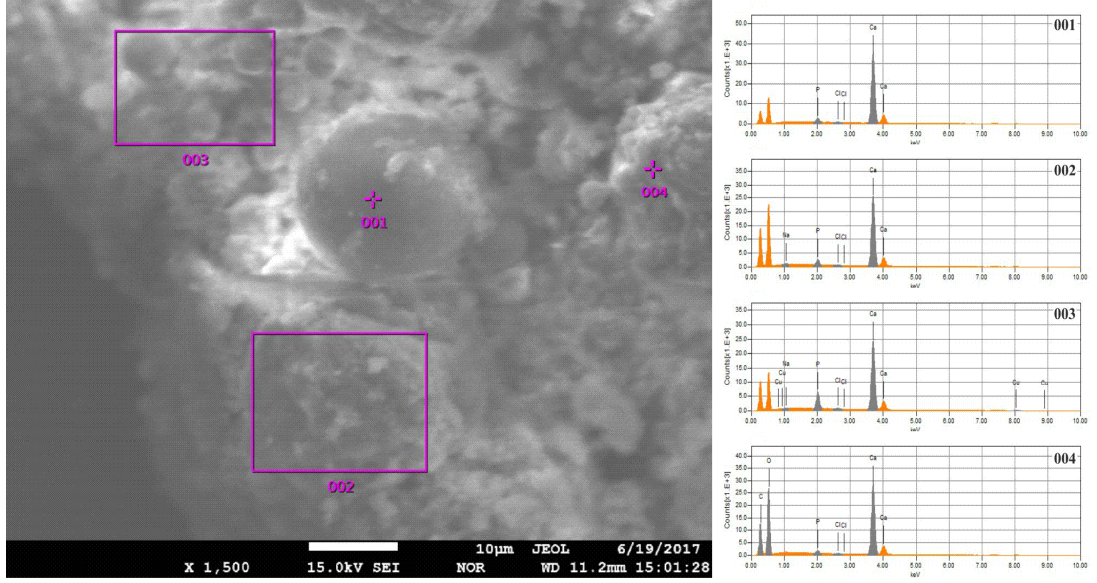
Şekil 4.9: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin XRD profili (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)



Şekil 4.10: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin CRS analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)



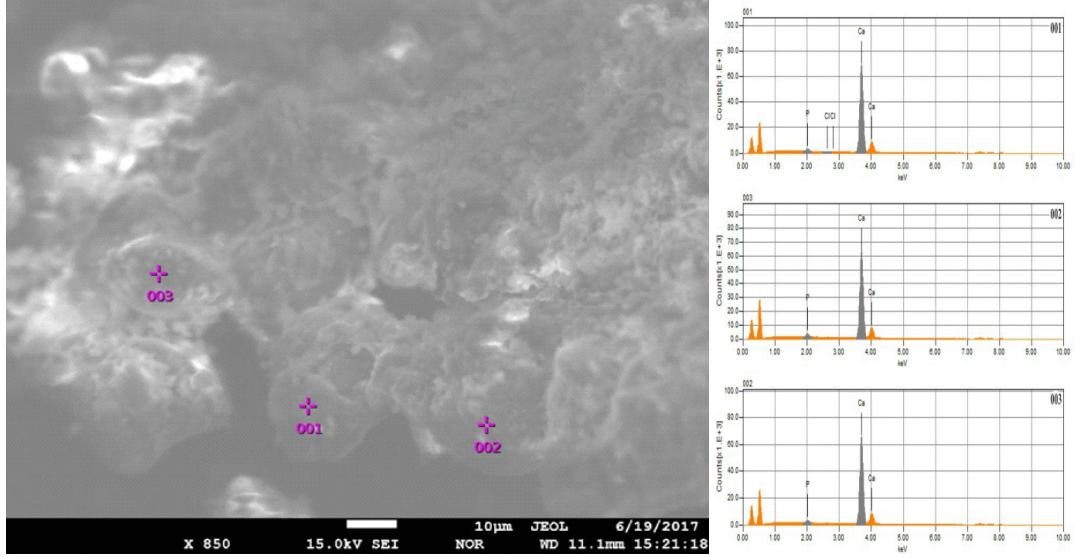
Şekil 4.11: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin SEM analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)



Şekil 4.12: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)

Tablo 4.14: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.12'ye ait veri)

Formül	Nokta 001		Alan 002		Alan 003		Nokta 004	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)
Ca	96,4	95,05	94,65	93,02	85,80	83,18	97,47	96,81
Cl	0,70	0,79	0,69	0,76	1,02	1,12	0,32	0,36
P	3,25	4,17	4,01	5,11	11,08	13,90	2,21	2,84
Na	-	-	0,65	1,11	0,48	0,81	-	-
Cu	-	-	-	-	1,62	0,99	-	-
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



Şekil 4.13: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO_3 , %10 inokulasyon oranı, $t=37^\circ\text{C}$, pH: 6.50)

Tablo 4.15: 25 mM kalsiyum klorür içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.13'e ait veri)

Formül	Nokta 001		Nokta 002		Nokta 003	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)
Ca	98,12	97,65	98,40	97,94	95,77	94,60
Cl	0,27	0,31	-	-	-	-
P	1,58	2,04	1,60	2,06	4,23	5,40
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Aynı numunenin iki farklı bölümünden yapılan EPMA nitel analizleri (Şekil 4.12 ve 4.13; Tablo 4.14-4.15) ile CaCO_3 ve rhombohedral vaterit kristalleri, ilgili şekillerde açıkça gözlemlendi. Nokta ve alan analizi sonuçlarına göre yüksek oranda Ca elementi ve özellikle düşük Cl oranı tespit edildi. Mineralojik analizlerimiz bir önceki deney sonuçlarımızı doğrular niteliktedir. Diğer bir deyişle, yerel izolatomuzun enzim aktivitesinin bir sonucu olarak ortamdaki CaCl_2 'in, kalsiyum karbonat kristallerine dönüştürüldüğü kanıtlandı. Bakteriyel çökeltini (kalsiyum karbonat) yapısında Na, P ve Cu oranlarının düşük olduğu bulundu. Cu varlığının, kalsiyum karbonat çökeltiminde görev alan enzimlerinin yapısından kaynaklanırken Na ve P'nin bakterinin kendi genetik yapısından dolayı ortamda mevcut olduğu düşünüldü.

Mineralojik analizlere *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin optimum koşullarında organik kalsiyum kaynakları ile (25 mM) modifiye edilmiş KMO besiyerlerinden (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50) elde edilen minerallerin CRS (Şekil 4.10-4.15) ve EPMA (Şekil 4.20-4.24; Tablo 4.17-4.19) analizleri ile devam edildi. Modifiye edilen KMO'lardan toplanan mineral örnekleri 2'şer noktada analiz edildi. Kalsiyum laktat (Şekil 4.14-4.15) ve kalsiyum nitrat (Şekil 4.16-4.17) KMO örneklerinde kalsit ve vaterit CRS pikleri tespit edilirken, kalsiyum asetat KMO örneğinin analiz edilen 2 noktasında da (Şekil 4.18-4.19) sadece vaterit CRS pikleri kayıt altına alındı. Aynı örneklerin çok sayıda nokta ve alan üzerinde gerçekleştirilen EPMA analizlerinde (Şekil 4.20-4.24; Tablo 4.17-4.19) tüm örneklerde katmanlı kalsit ve küresel vaterit kristalleri tespit edildi.

Tablo 4.16: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından farklı kalsiyum kaynakları ile hazırlanmış besiyerinde çökeltimi gerçekleştirilen CaCO₃ miktarı (mg/L, min-maks.) ve türü

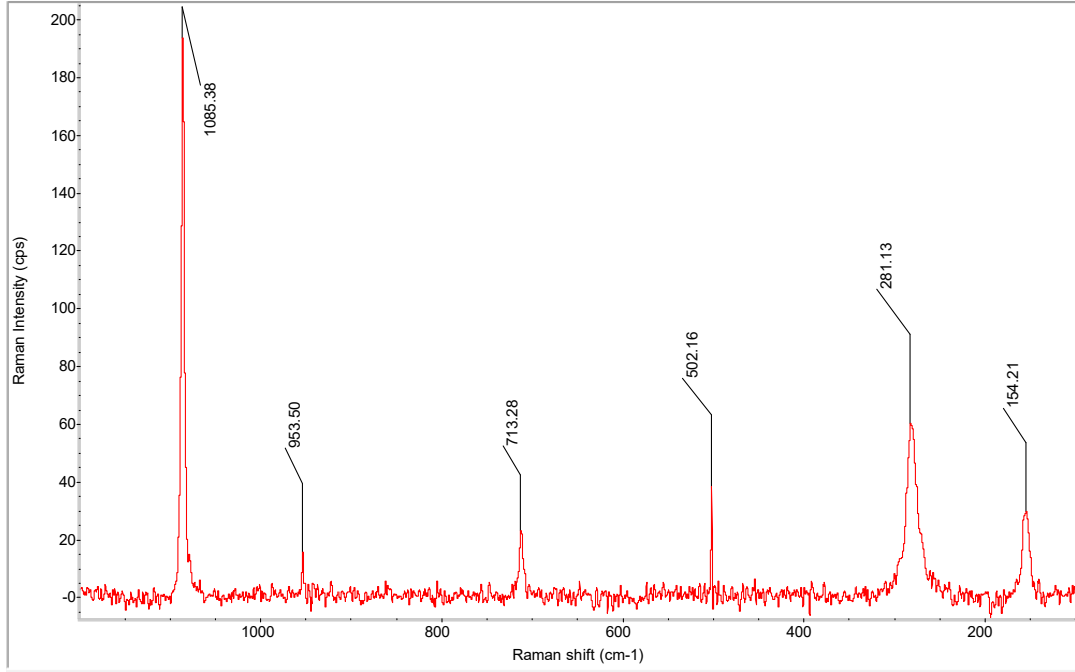
Kalsiyum Kaynağı	Üretilen CaCO ₃ Miktarı (mg/L)	Üretilen CaCO ₃ Türü
Ca-klorür	1528-2248	Kalsit/Vaterit
Ca-laktat	2070-3282	Kalsit/Vaterit
Ca-nitrat	1127-1822	Kalsit/Vaterit
Ca-asetat	864-1176	Vaterit

Kalsiyum klorür, kalsiyum laktat, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat ile hazırlanan KMO ortamlarından elde edilen bakteriyel çökeltilerin kalsiyum karbonat kristal tipini doğrulayan mineralojik analizlere Şekil 4.9-4.24 ve Tablo 4.14-4.19'da yer verilmiştir. Tablo 4.16'da ise daha önceki optimizasyon çalışmalarından elde edilen, farklı kalsiyum kaynakları ile hazırlanan besiyerlerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ miktarı (mg/L) ve mineralojik analizler sonucu ortaya çıkan CaCO₃ kristal türü toplu olarak sunulmuştur.

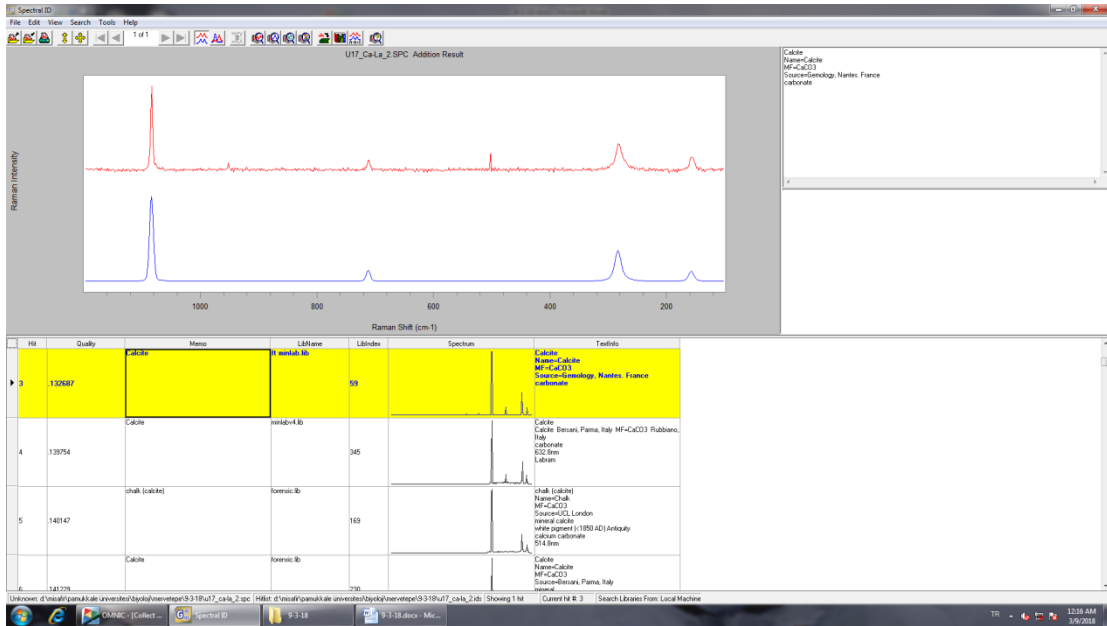
Bu bulgular literatürdeki bazı çalışmalar ile paralellik göstermiştir. Örneğin, *Sporosarcina pasteurii* ile yapılan çalışmada kalsiyum klorürlü ortamda sadece kalsit mineral tipi belirlenirken, kalsiyum laktat, kalsiyum asetat ve kalsiyum glukonat varlığında ise sadece vaterit yapıları SEM aracılığıyla gözlemlendi (Gorospe ve diğ. 2013). *Bacillus* sp. CR2 suşu ise kalsiyum klorür, kalsiyum oksit, kalsiyum asetat ve kalsiyum nitratın kalsiyum kaynakları olarak kullanıldığı çalışmada mineralojik analizler sonrasında (XRD, SEM, FTIR) tüm ortamlarda belirgin kalsit kristalleri,

kalsiyum asetat ortamında ise kalsit kristallerine ilaveten daha az oranlarda vaterit ve aragonit kristalleri oluşturmuştur.

Farklı kalsiyum kaynaklarına göre mineral morfolojisi de değişebilir. Örneğin; kalsiyum asetat marul benzeri veya lamellar şeklinde vateriti indüklerken, kalsiyum laktat ve kalsiyum glukonat küresel formda vaterit oluşturmaktadır (Tai ve Chen 1998). Bir diğer çalışmada *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün farklı kalsiyum karbonat kaynakları ile (kalsiyum klorür, kalsiyum nitrat, kalsiyum asetat) hazırlanan biyojenik sıva örneklerinde kalsiyum nitrat ve klorür ile iyileştirme yapılan sıva örneklerinde kalsit, kalsiyum asetat ile hazırlanan sıva örneğinde ise aragonit ve vaterite rastlanmıştır (Zhang ve diğ. 2014). Benzer çökelim ortamlarında çalışılan bakterilerin oluşturdukları kalsiyum karbonat kristallerinin birbirinden farklı olması bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliminin türe ve suşa spesifik özellikleri ile açıklanabilir.

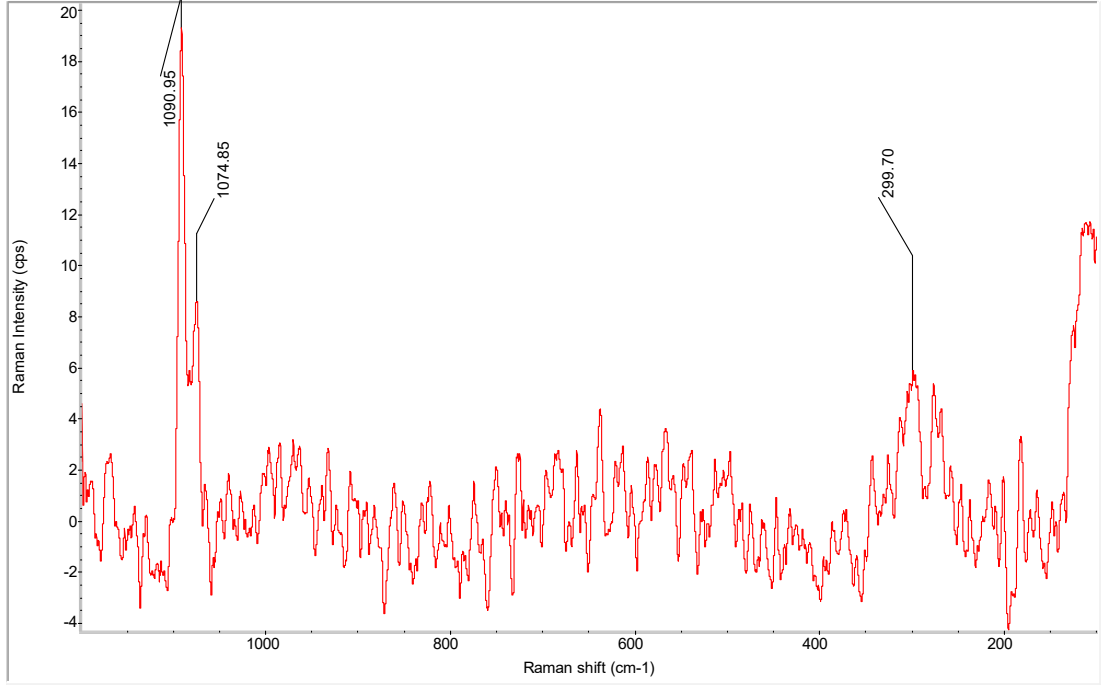


A

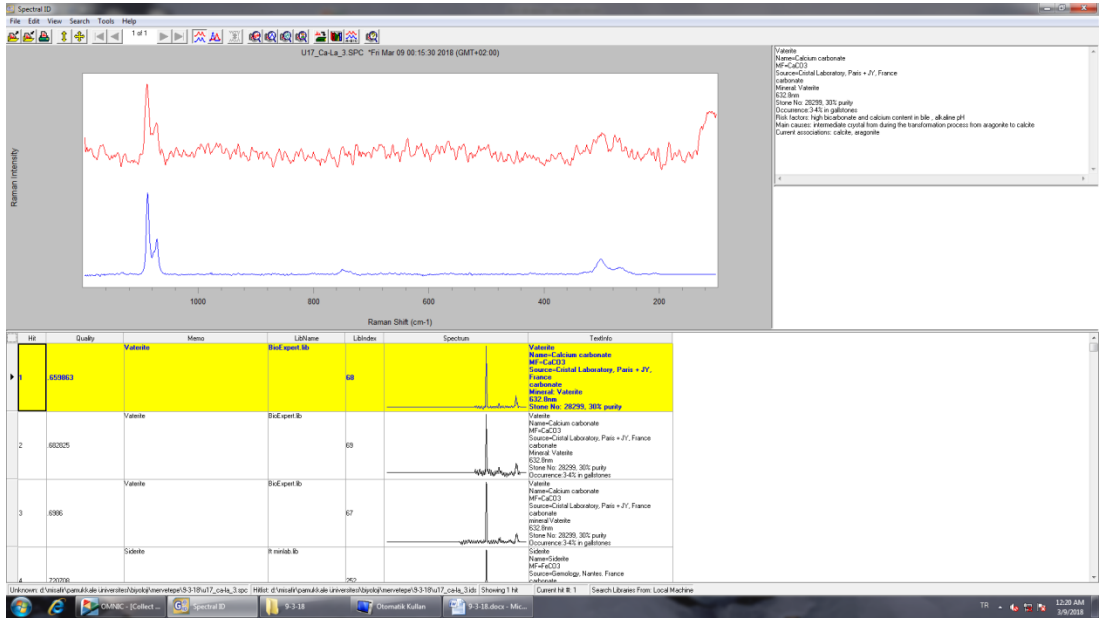


B

Şekil 4.14: 25 mM kalsiyum laktat içeren besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve kalsit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)

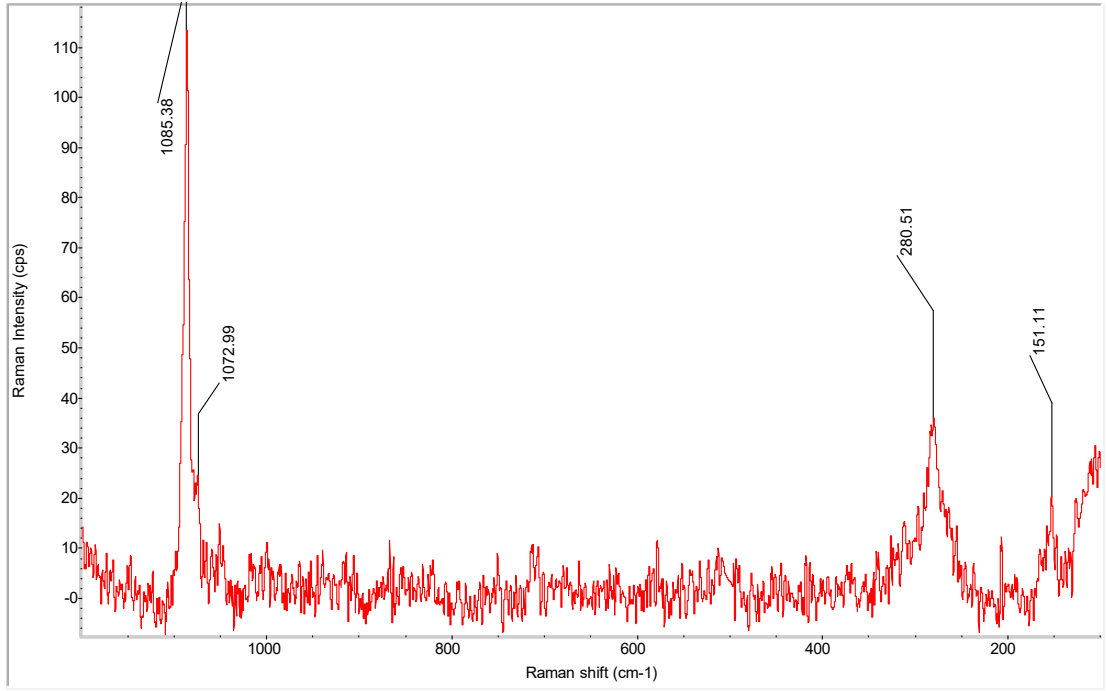


A

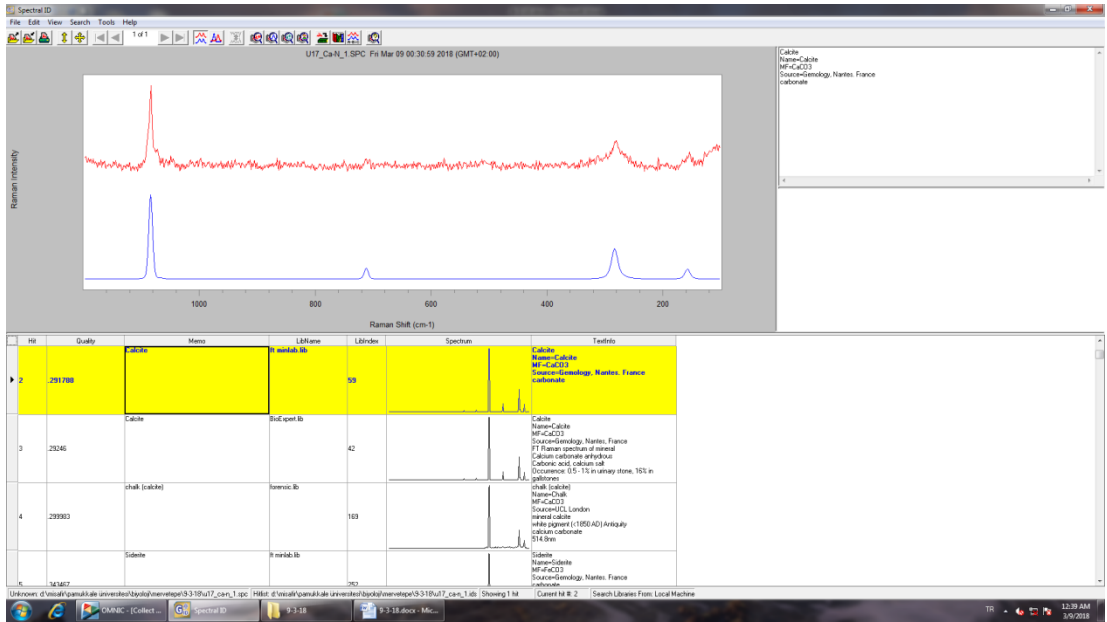


B

Şekil 4.15: 25 mM kalsiyum laktat içeren besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)

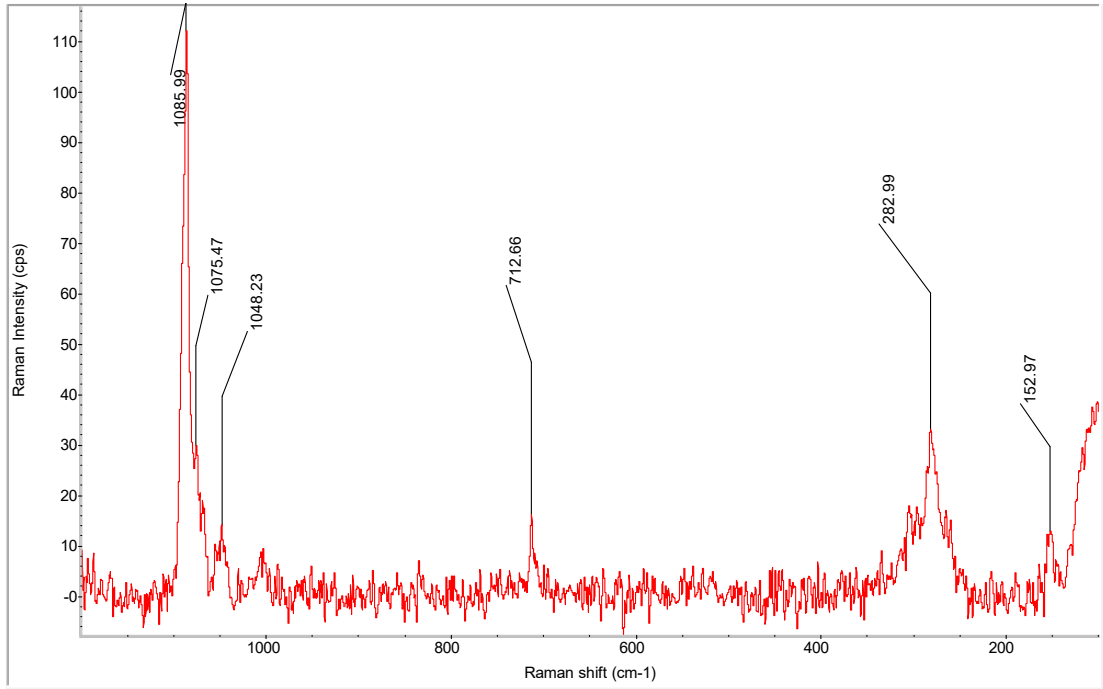


A

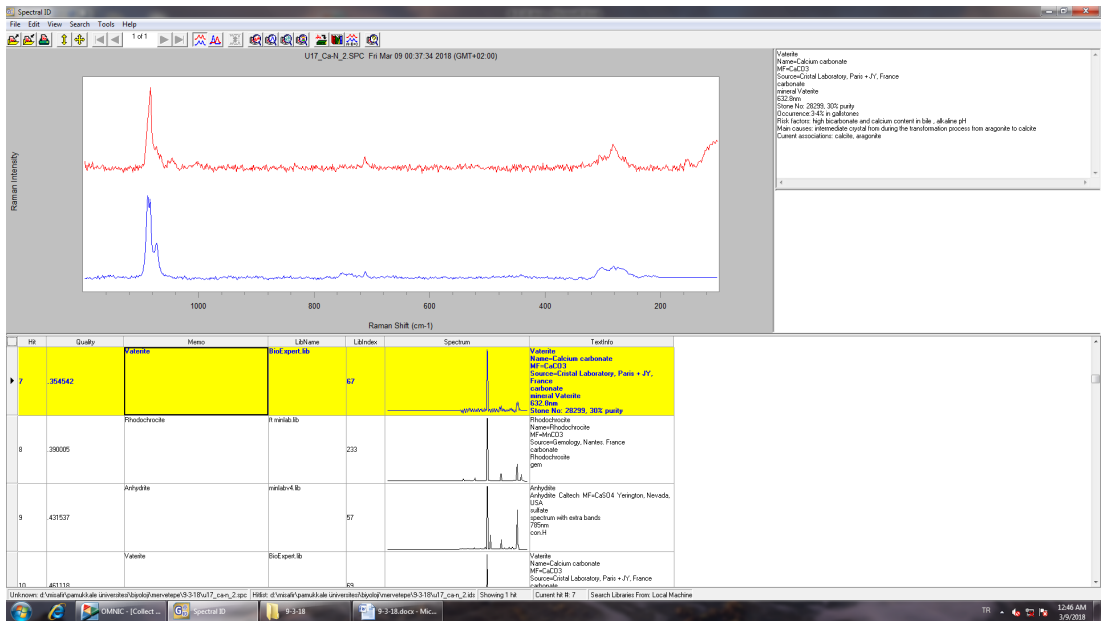


B

Şekil 4.16: 25 mM kalsiyum nitrat içeren besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve kalsit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)

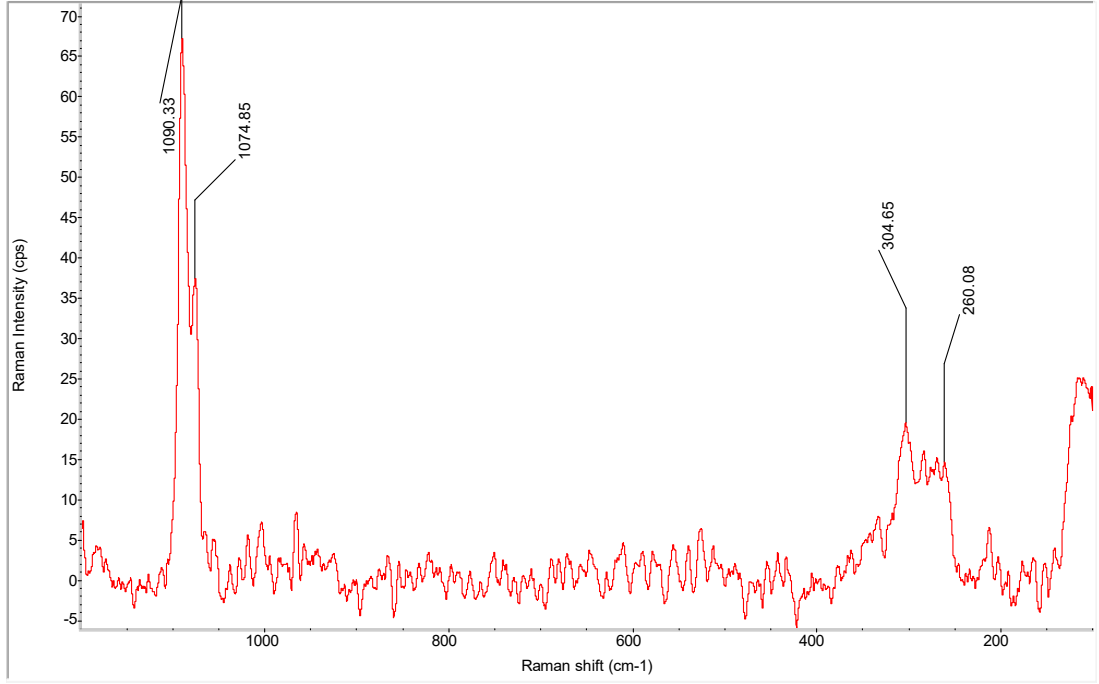


A

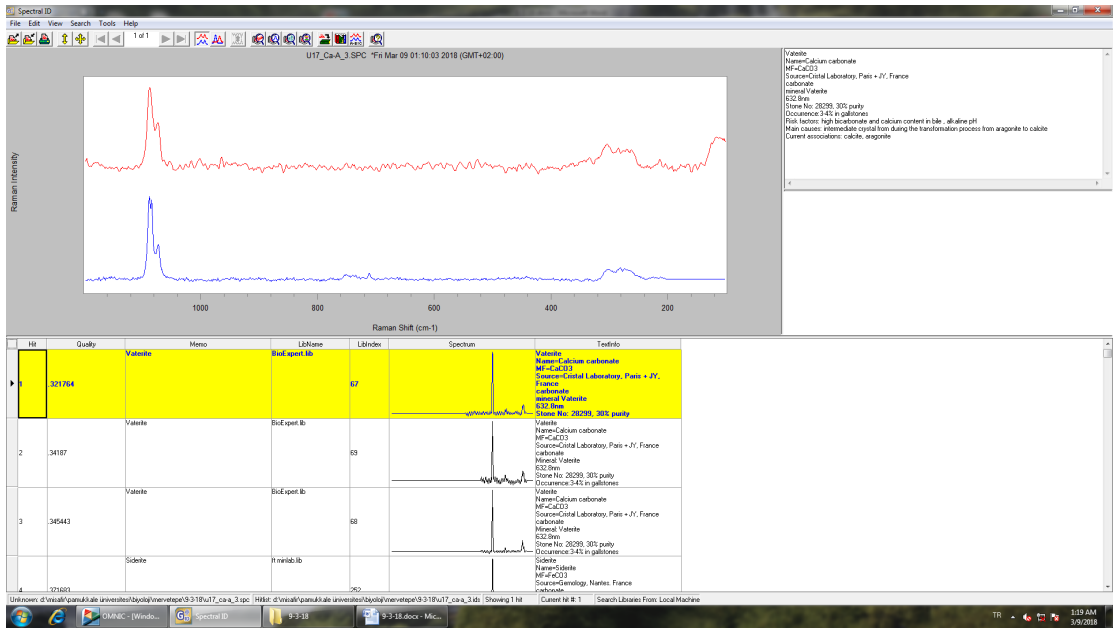


B

Şekil 4.17: 25 mM kalsiyum nitrat içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)

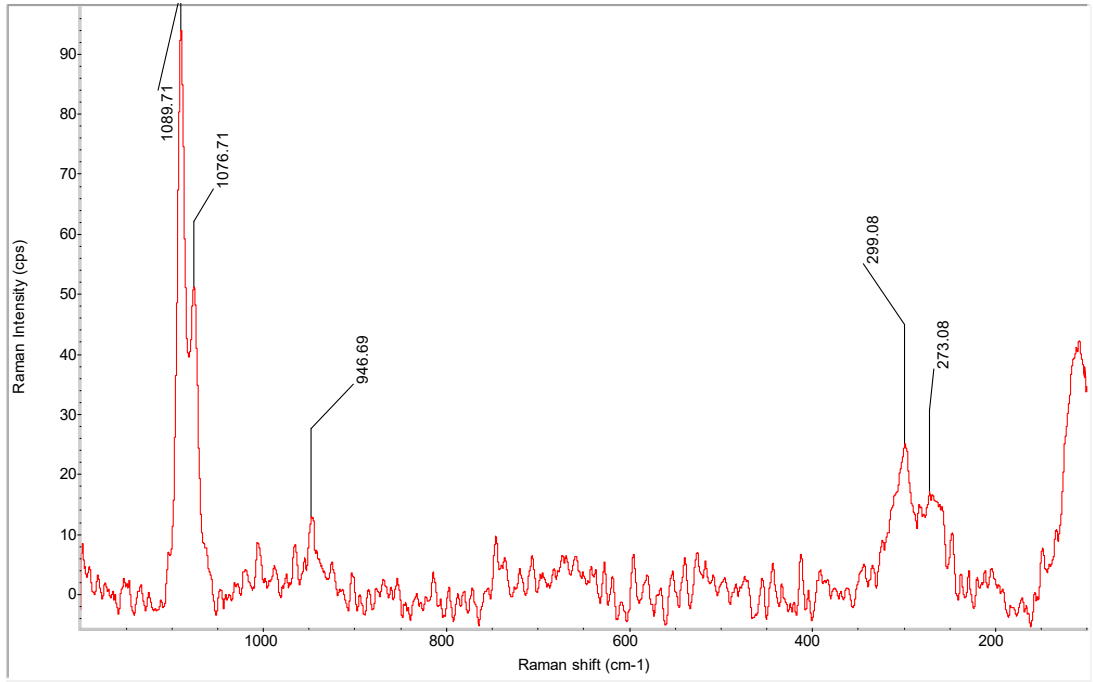


A

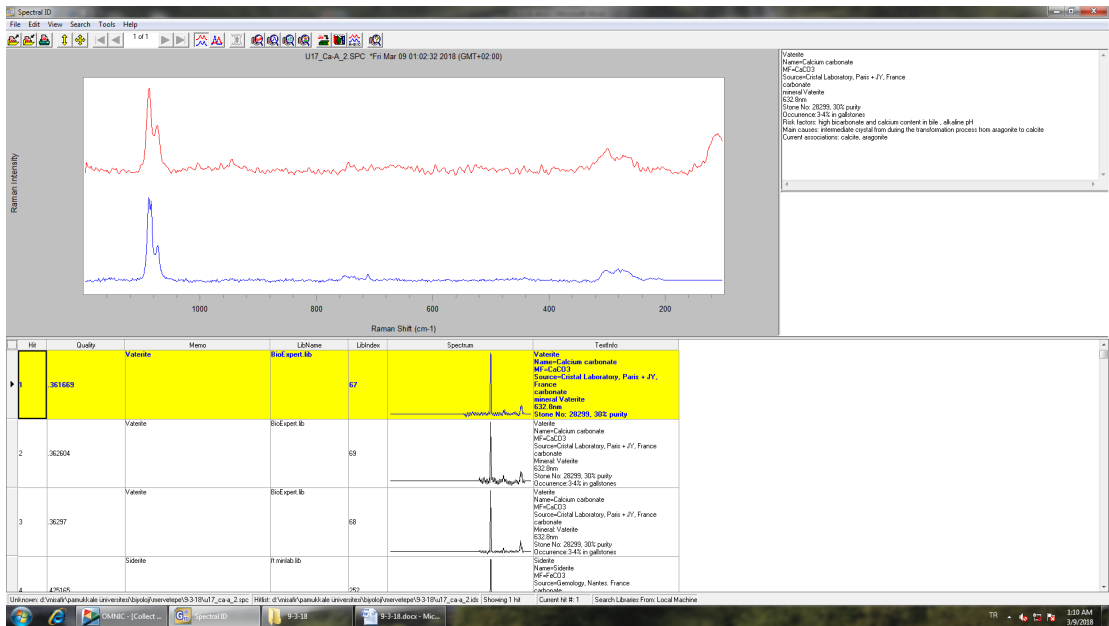


B

Şekil 4.18: 25 mM kalsiyum asetat içeren besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)

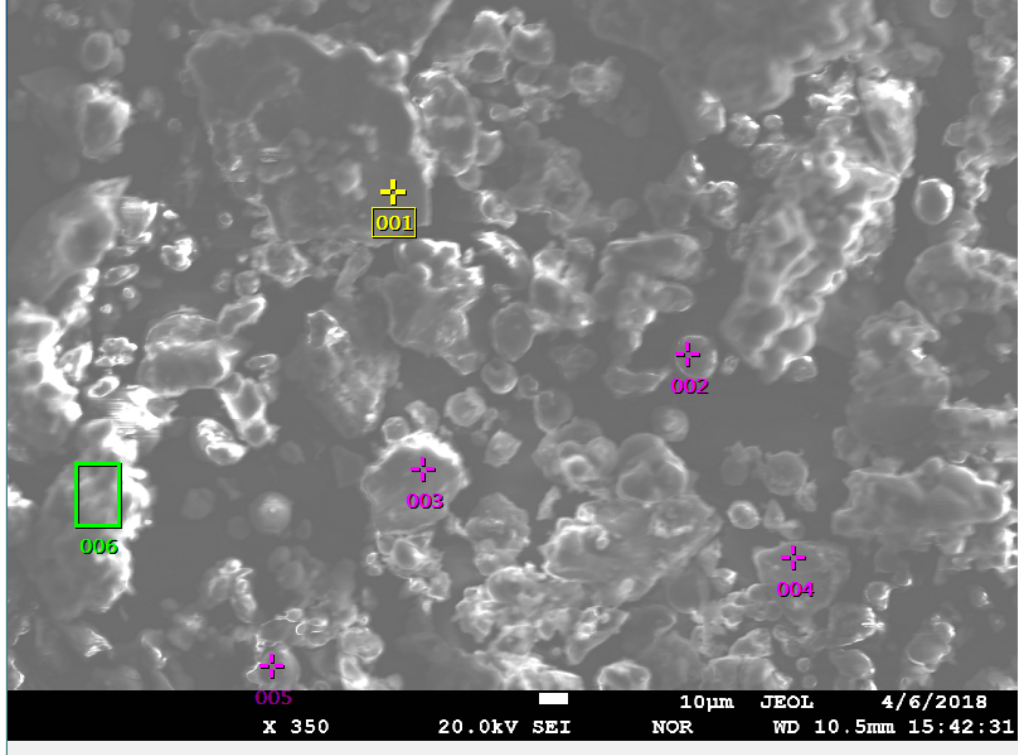


A

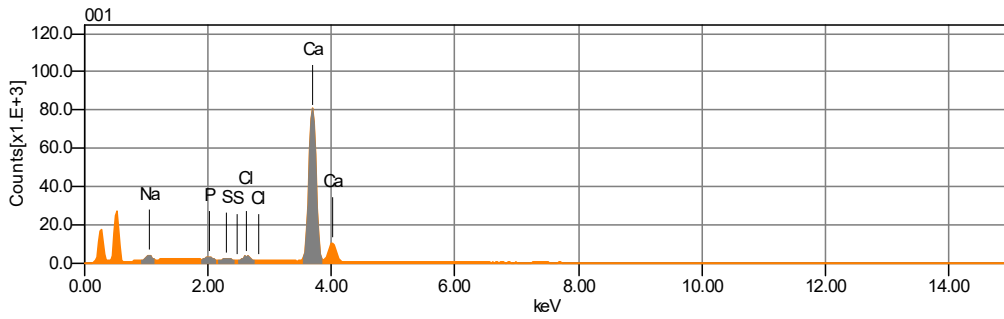


B

Şekil 4.19: 25 mM kalsiyum asetat içeren besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin CRS analizi (A) ve vaterit pikleri (B) (25 mM Üre, 25 mM NaHCO₃, %10 inokulasyon oranı, t=37°C, pH: 6.50)



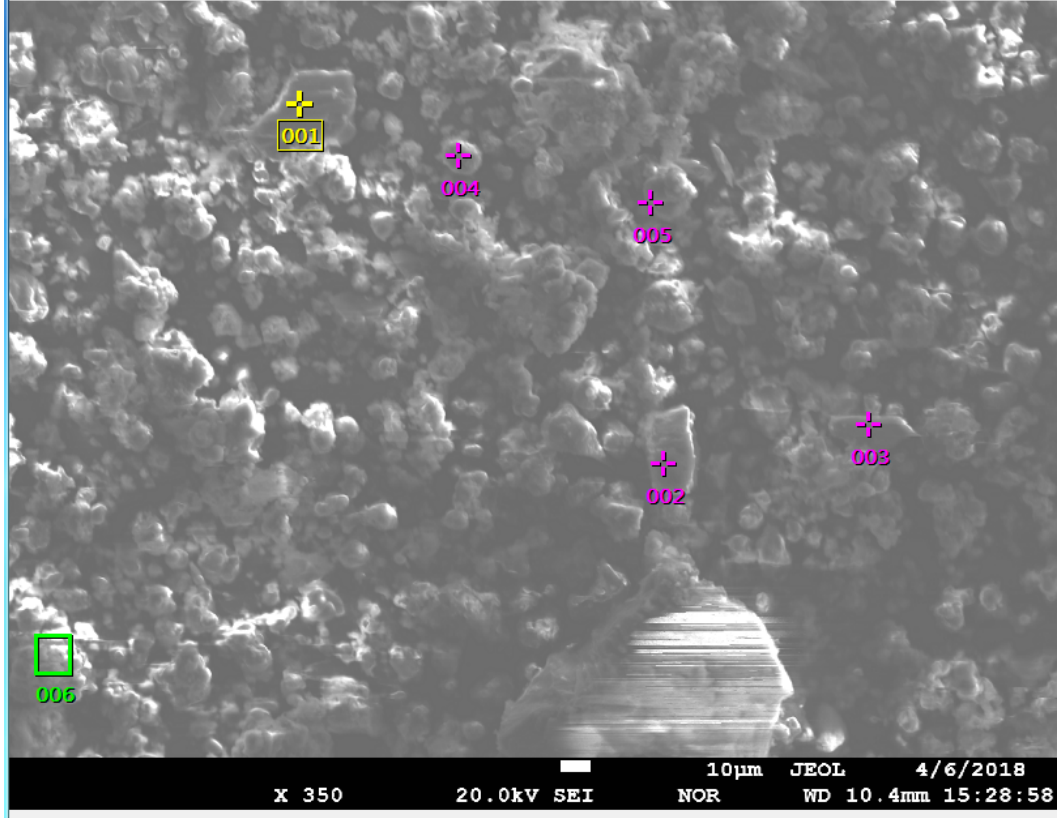
Şekil 4.20: 25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO_3 , %10 inokulasyon oranı, $t=37^\circ\text{C}$, pH: 6.50)



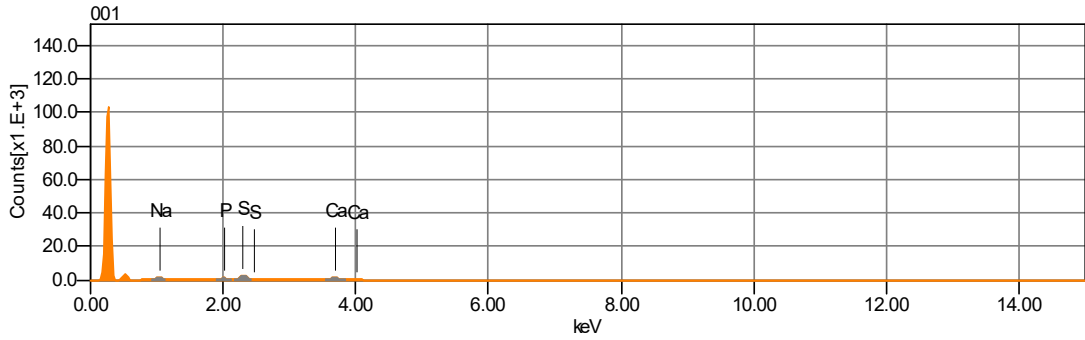
Şekil 4.21: 25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer noktalar EK-D’te sunulmuştur)

Tablo 4.17: 25 mM kalsiyum laktat içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.20’ye ait veri)

Formül	Nokta 001		Nokta 002		Nokta 003		Nokta 004		Nokta 005		Alan 006	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)
Na_2O	2,36	2,17	1,22	1,12	0,49	0,45	0,34	0,31	4,20	2,01	2,54	2,35
P_2O_5	2,34	0,94	2,37	0,95	1,89	0,75	1,12	0,45	8,79	3,67	4,18	1,69
SO_3	1,44	1,02	-	-	-	-	0,51	0,36	1,21	0,89	1,45	1,04
Cl	0,96	1,55	-	-	0,27	0,43	0,12	0,20	1,41	2,36	1,57	2,54
CaO	92,91	94,33	96,41	97,93	97,35	98,36	97,91	98,69	84,89	89,08	90,25	92,37
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



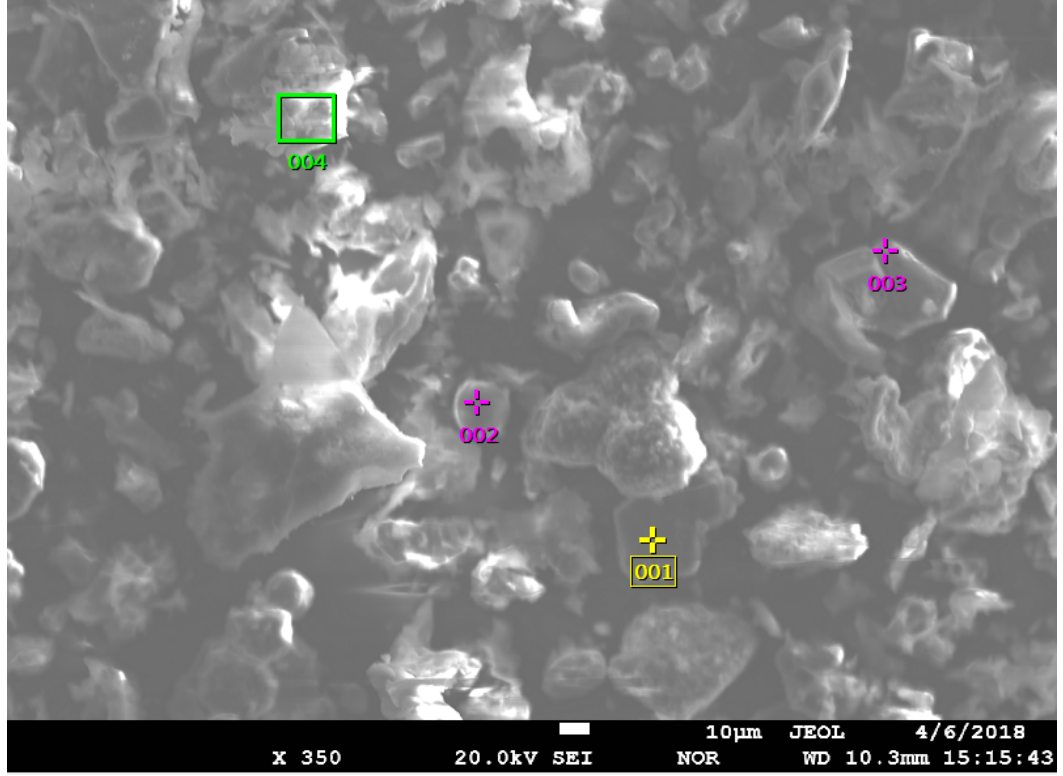
Şekil 4.22: 25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO_3 , %10 inokulasyon oranı, $t=37^\circ\text{C}$, pH: 6.50)



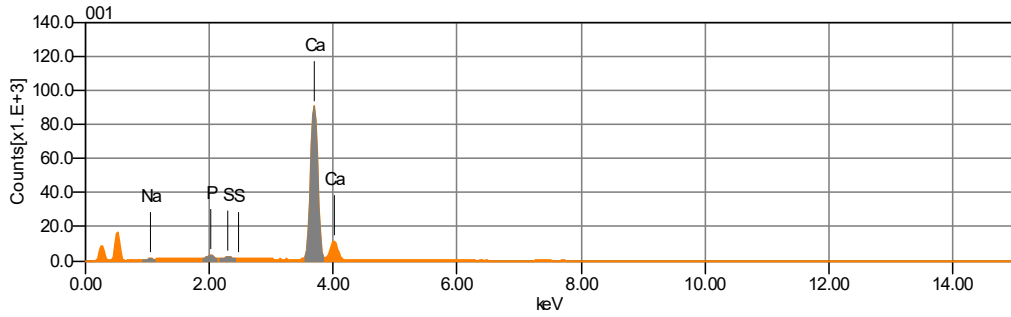
Şekil 4.23: 25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer noktalar EK-D’te sunulmuştur)

Tablo 4.18: 25 mM kalsiyum nitrat içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.22’ye ait veri)

Formül	Nokta 001		Nokta 002		Nokta 003		Nokta 004		Nokta 005		Alan 006	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)
Na_2O	17,20	19,80	1,14	1,04	-	-	1,5	1,62	1,23	1,13	1,76	1,62
P_2O_5	10,43	5,24	1,75	0,70	-	-	3,20	1,29	2,70	1,08	2,48	0,99
SO_3	45,00	40,12	-	-	0,90	0,63	1,34	0,96	-	-	0,47	0,34
Cl	-	-	0,34	0,55	-	-	0,33	0,54	1,17	1,87	0,30	0,48
CaO	27,37	34,83	96,78	97,72	99,10	99,37	93,38	95,59	94,90	95,93	94,99	96,57
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



Şekil 4.24: 25 mM kalsiyum asetat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA analizi (25 mM Üre, 25 mM NaHCO_3 , %10 inokulasyon oranı, $t=37^\circ\text{C}$, pH: 6.50)



Şekil 4.25: 25 mM kalsiyum asetat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer noktalar EK-D’te sunulmuştur)

Tablo 4.19: 25 mM kalsiyum asetat içeren KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.24’e ait veri)

Formül	Nokta 001		Nokta 002		Nokta 003		Alan 004	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Atom (%)
Na_2O	0,30	0,28	0,80	0,73	0,41	0,37	20,60	20,44
P_2O_5	2,30	0,93	1,81	0,72	1,67	0,67	17,26	7,48
SO_3	1,38	0,99	0,97	0,69	1,33	0,94	-	-
Cl	-	-	0,30	0,48	-	-	8,51	14,77
SiO_2	-	-	-	-	-	-	2,40	2,45
K_2O	-	-	-	-	-	-	3,01	1,97
CaO	96,01	97,81	96,13	97,38	96,60	98,01	48,21	52,88
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

4.5 Beton Analizleri

Yapı elemanlarının bağlayıcılığını ve dayanıklılığını arttırmak amacıyla son yıllarda yoğun bir şekilde alternatif, sürdürülebilir ve çevreci çözüm arayışlarının sürdüğü günümüzde, mineral üretebilme ve kimyasal maddelerle etkileşime geçmek suretiyle bağlayıcı özelliklere sahip olabilmeleri sebebiyle üreolitik bakteriler sıklıkla beton çalışmalarında kullanılır (Achal ve Kawasaki 2016). Genellikle betonda çatlak onarımı, betonun porozitesinin azaltılması, zemin biyoçementasyonu ve kendi kendini iyileştirebilen biyolojik beton üretimi çalışmalarına ağırlık verilir (Wu ve diğ. 2019; Shanmuga-Priya ve diğ. 2019; Wu ve diğ. 2020; Noeiaghaei ve diğ. 2017; De Muynck ve diğ. 2008; Bernardi ve diğ. 2014).

Çalışmamızın bu aşamasında; kalsiyum karbonat çökeli ve enzim aktivitesini etkileyen faktörleri titizlikle çalışarak optimize ettiğimiz, literatüre kıyasla yüksek enzim aktivitesi ve kalsiyum karbonat çökeline sahip olduğunu bildiğimiz *Bacillus amyloliquefaciens* U17 yerel izolatımızın betonun basınç dayanımı ve kılcal su emme özelliklerine etkisi araştırıldı. Kontrol bakterisi olarak *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 kültürü kullanıldı.

Öncelikli olarak beton örnekleri hazırlanarak basınç dayanımı ve kılcal su emme analizleri gerçekleştirildi. Beton numunelerinin petrografik ve mineralojik analizleri (CRS, EPMA, FESEM, FESEM-EDS) gerçekleştirildi.

4.5.1 Beton Örnekleri CRS Analizleri

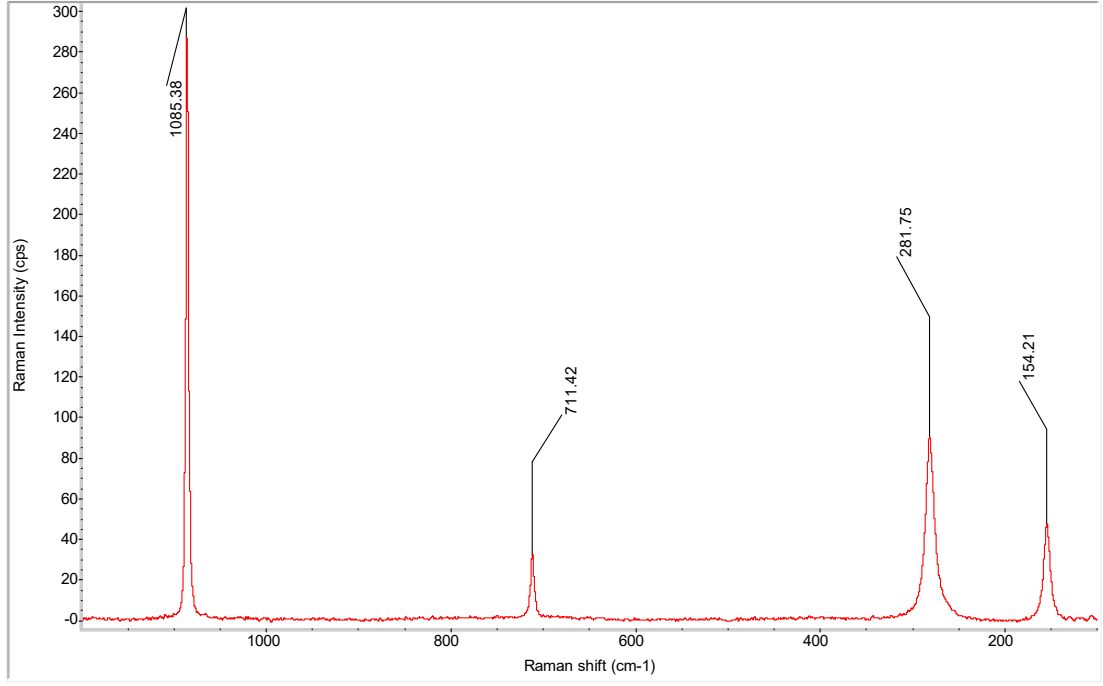
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği CRS analizlerinde beton bileşenlerinden karakteristik dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) pikleri (Şekil 4.26) ve biyojenik kaynaklı olabileceği düşünülen kalsit pikleri tespit edildi.

Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği CRS analizinde kalsit piki gözlemlenirken (Şekil 4.27) şahit beton numunesinde ortorombik fayalit kristalleri ve chalk (kalsit) kristalleri tespit edildi (Şekil 4.28).

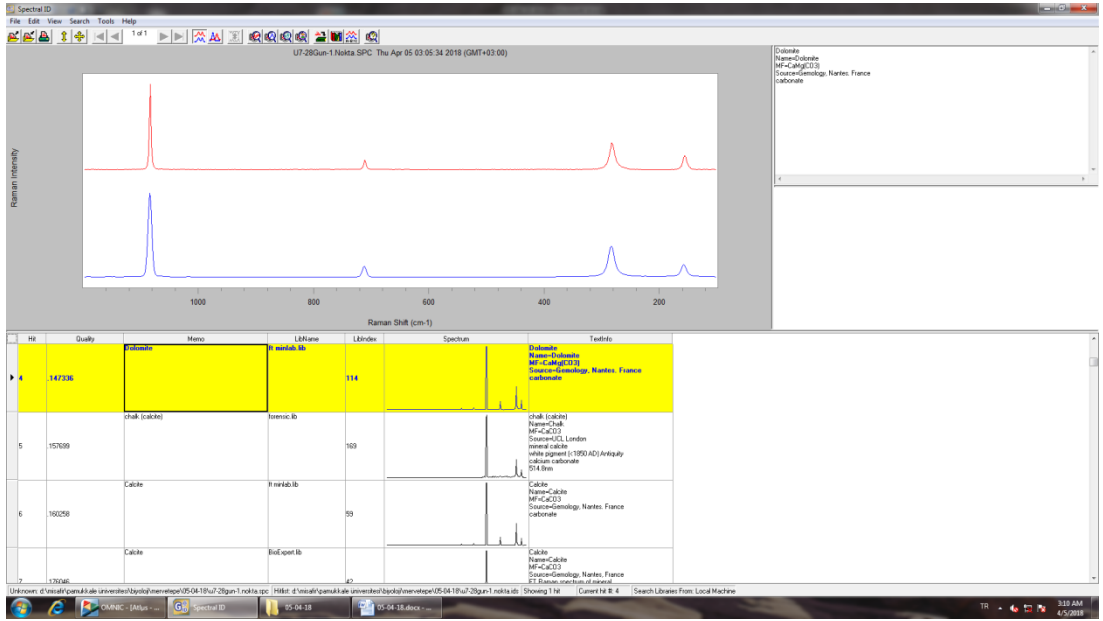
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği CRS analizlerinde biyojenik kaynaklı olabileceği düşünülen kalsit pikleri tespit edilirken, dolomit benzeri beton elemanı yapılarına rastlanmadı (Şekil 4.29). *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği CRS analizinde kalsit piki gözlemlenirken (Şekil 4.30), şahit beton numunesinde beton numunelerinde gözlenmesi beklenen, betonu oluşturan elemanlarda doğal olarak bulunabilen siderit (FeCO_3) kristalleri tespit edildi (Şekil 4.31). Yapılan mineralojik analizlerde siderit kristallerine bakteri ilaveli beton örneklerinde rastlanılmaması dikkat çekicidir. Ayrıca analizler bakteri ilaveli beton örneklerinde bakteriyel kalsit oluşumunun varlığını doğrular niteliktedir.

Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği CRS analizlerinde karbonat (CaCO_3) yapıları tespit edilmiş olmakla birlikte bu yapıları doğrudan bakteri etkisi ile betonda gerçekleşen yapılar olarak adlandırmak mümkün değildir. Bu karbonat yapılarının biyojenik kaynaklı olup olmadığı ya da betonun doğal yapı elemanları ile ilişkili olup olmadıklarına dair somut bir çıkarımda bulunulamamaktadır (Şekil 4.32).

Öte yandan *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği ve 90. güne ait şahit beton örneğinin CRS analizlerinde kalsit pikleri net bir biçimde gözlenmiştir (Şekil 4.33 ve 4.34).

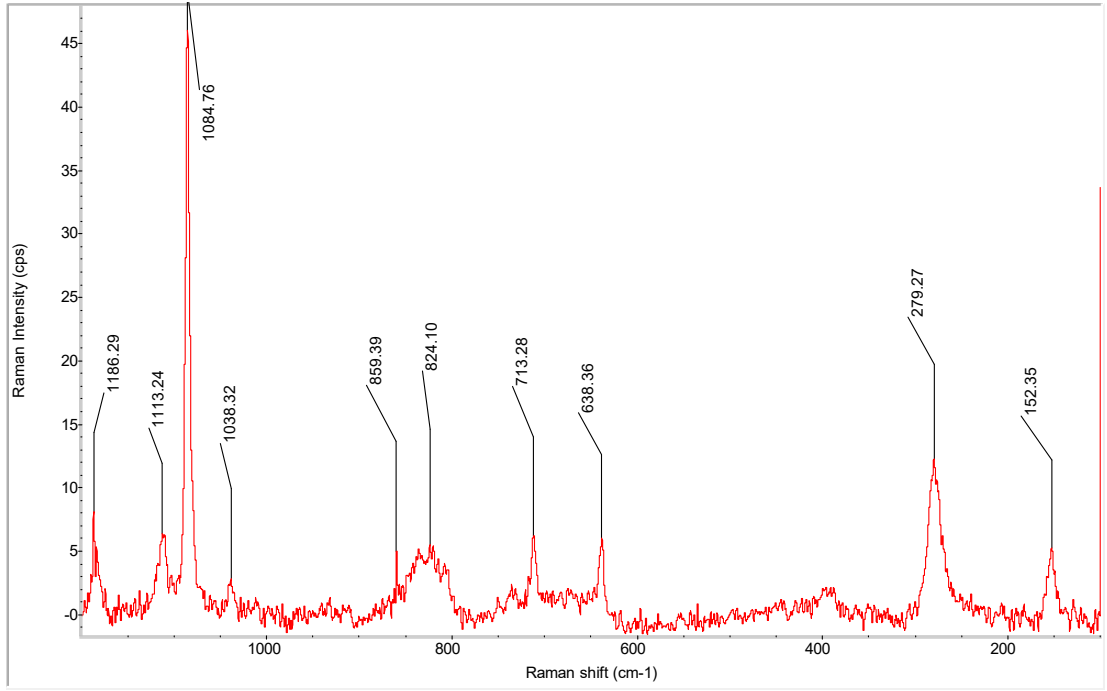


A

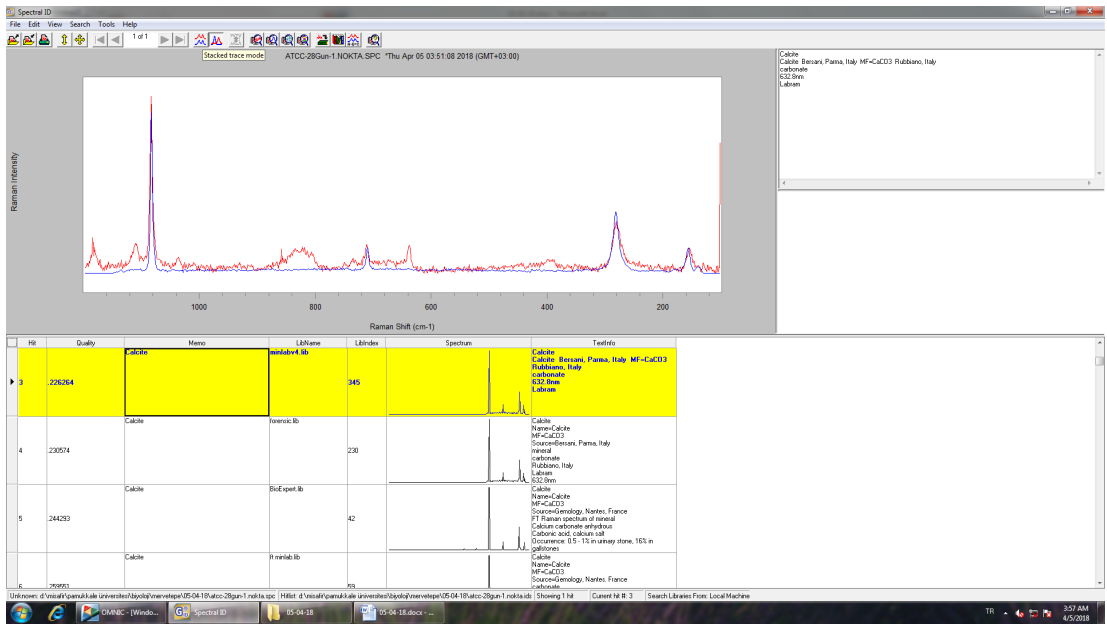


B

Şekil 4.26: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen dolomit pikleri (B)

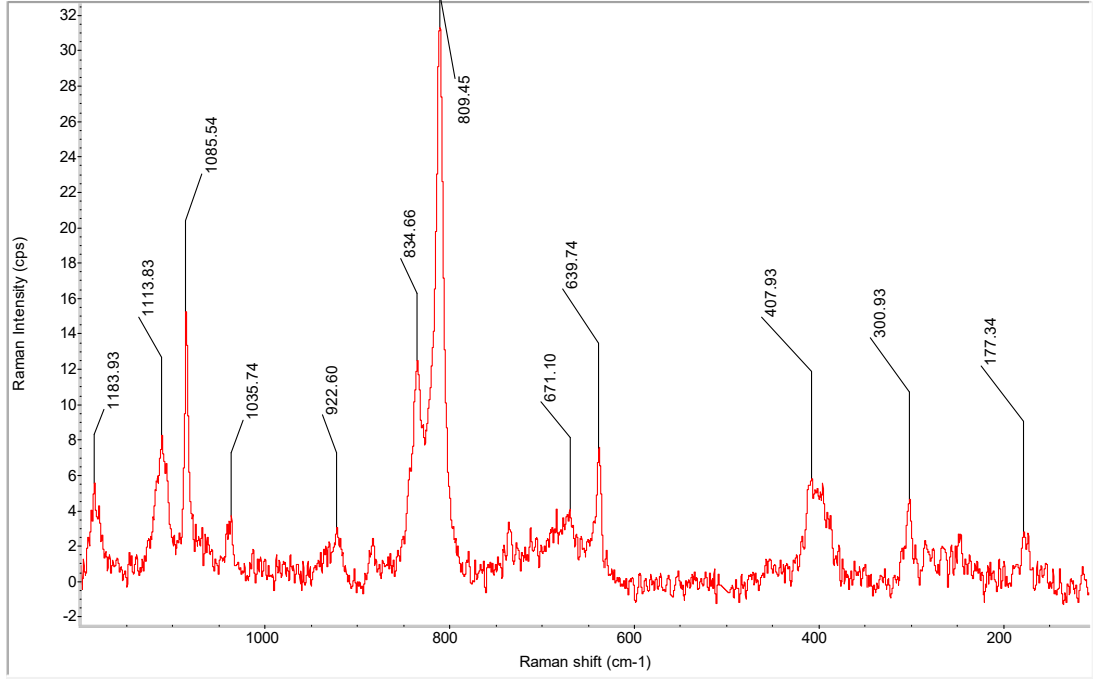


A



B

Şekil 4.27: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B)

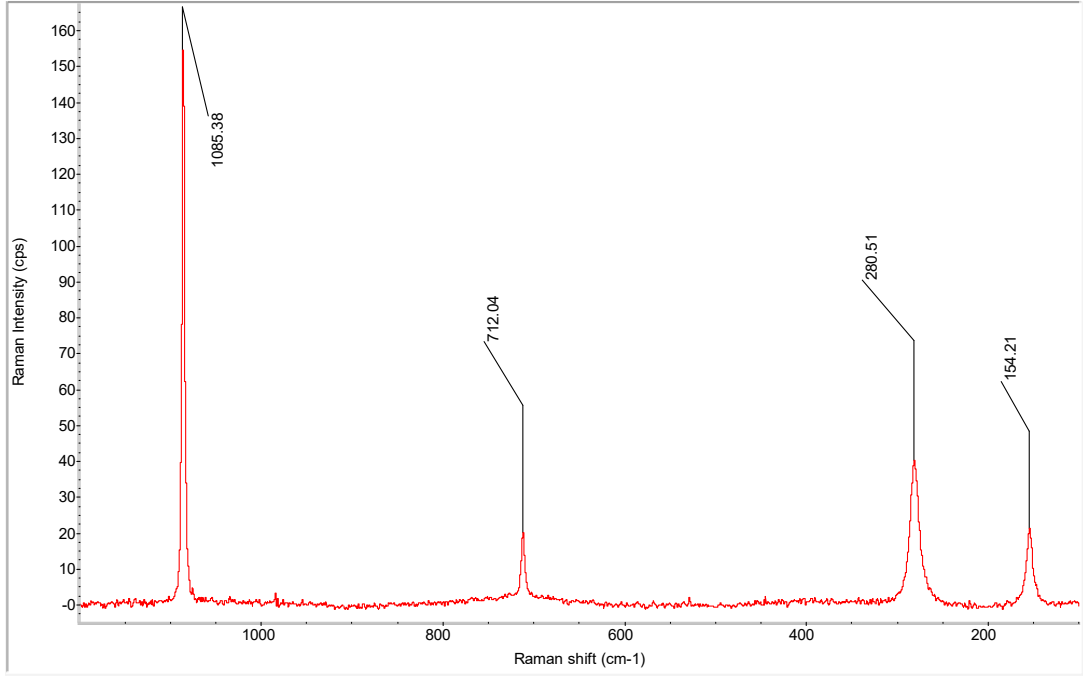


A

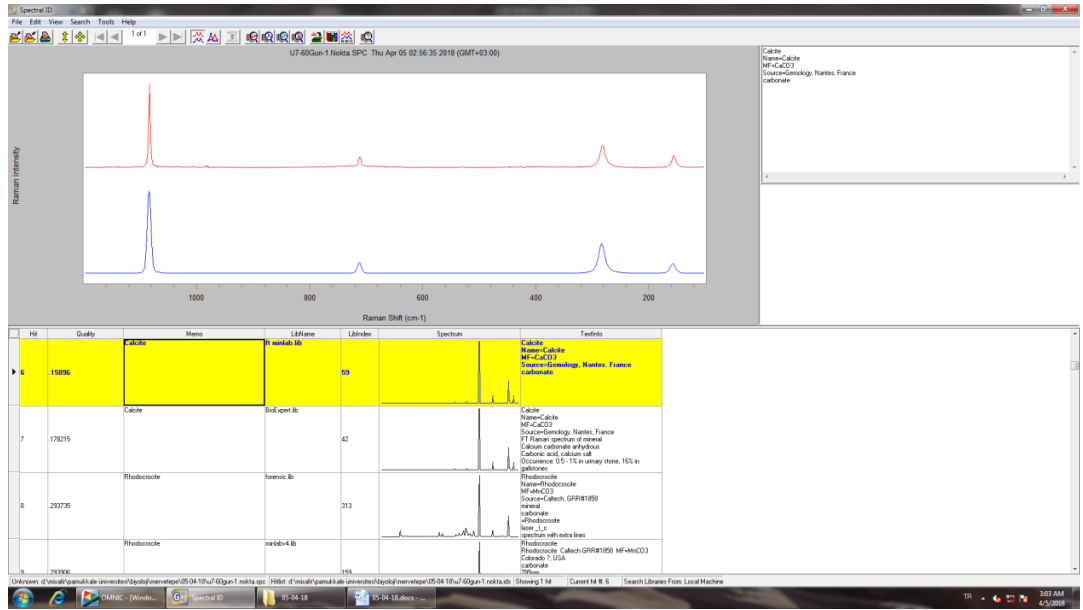


B

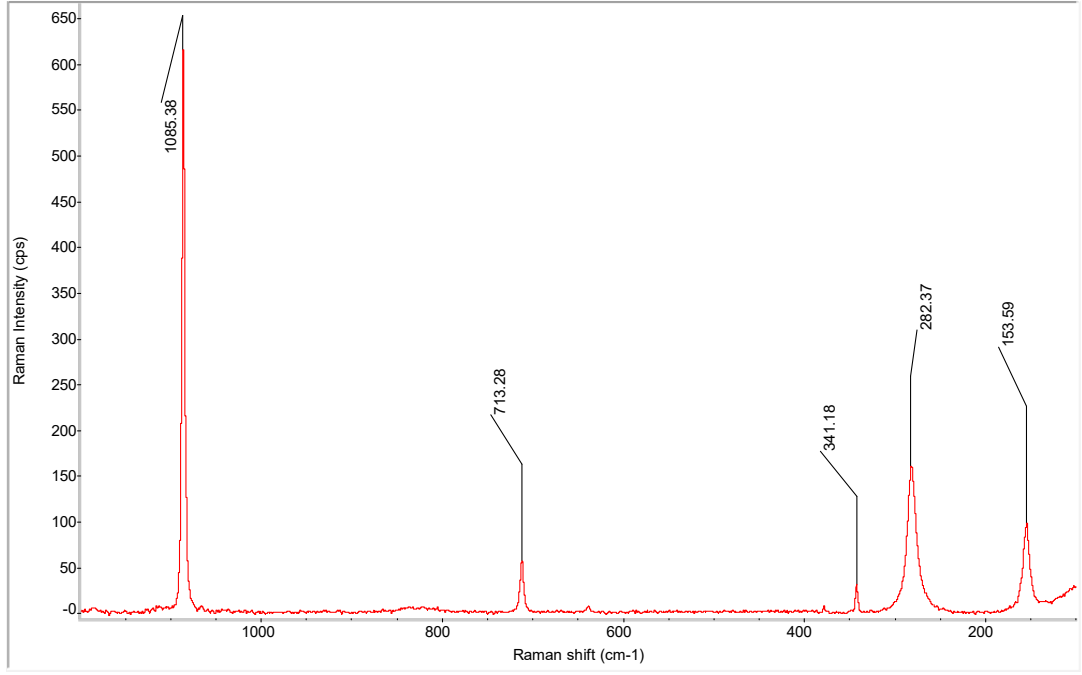
Şekil 4.28: Şahit beton örneğinin 28. gün CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik fayalitik pikleri (B)



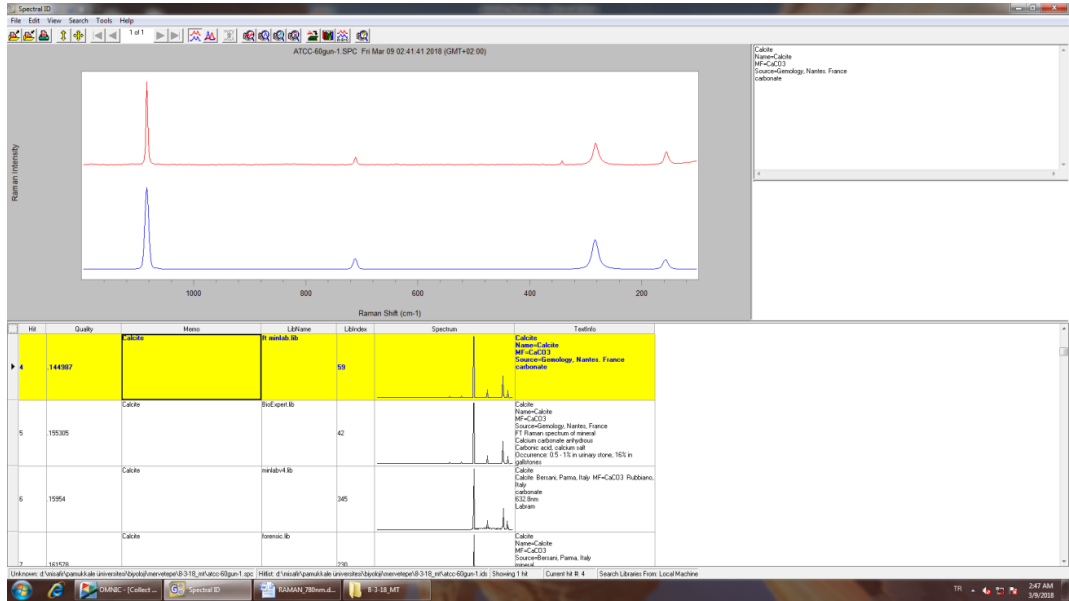
A



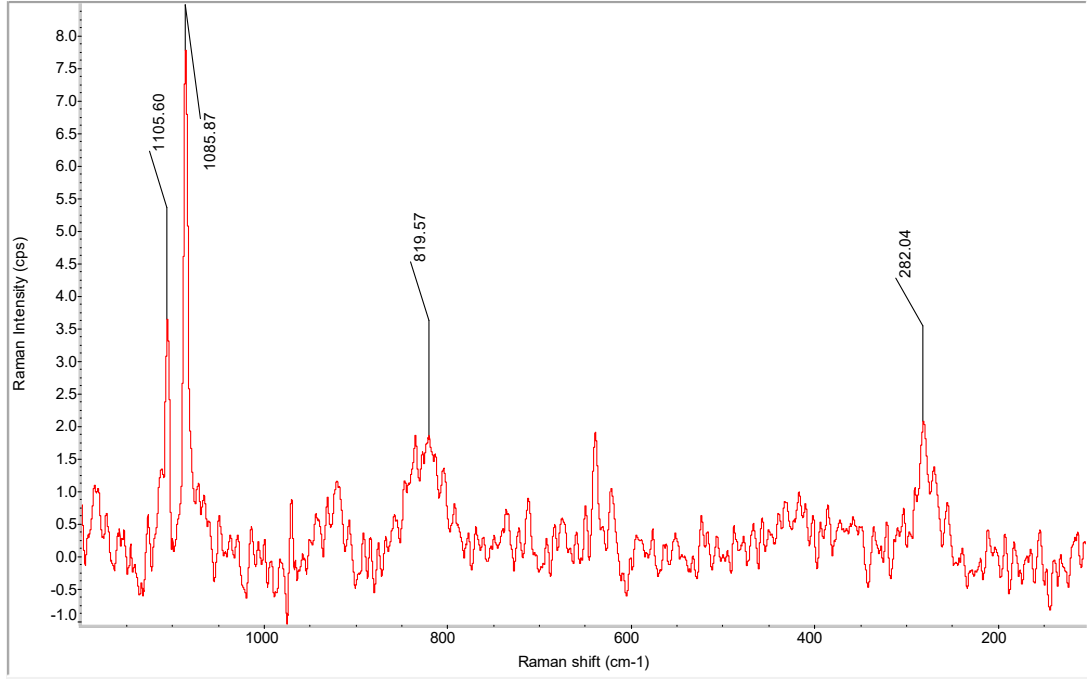
Şekil 4.29: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B)



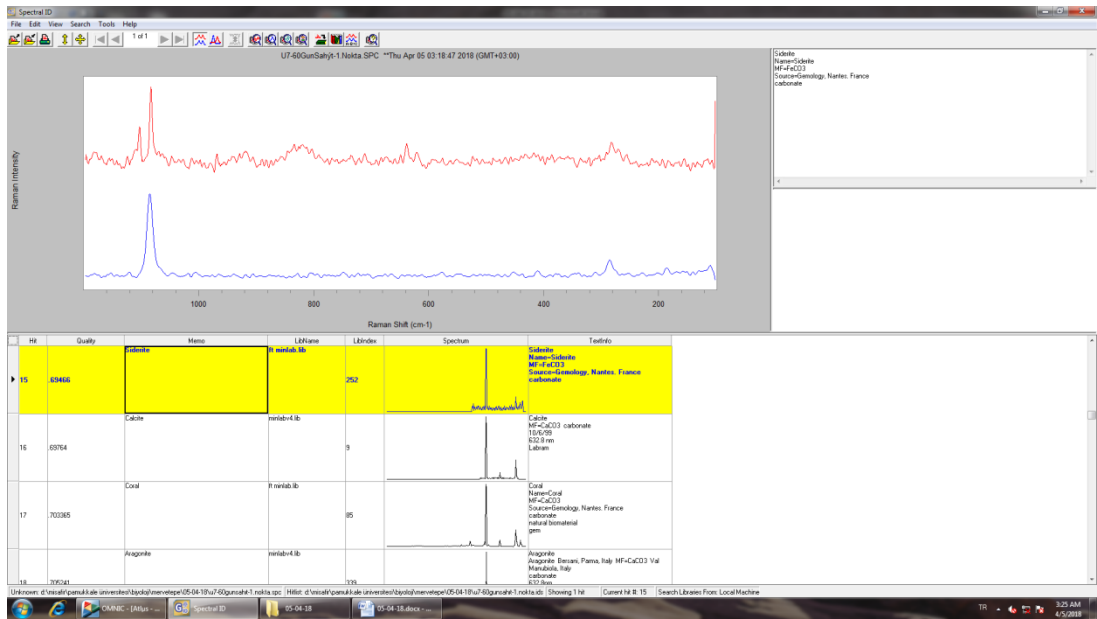
A



Şekil 4.30: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B)

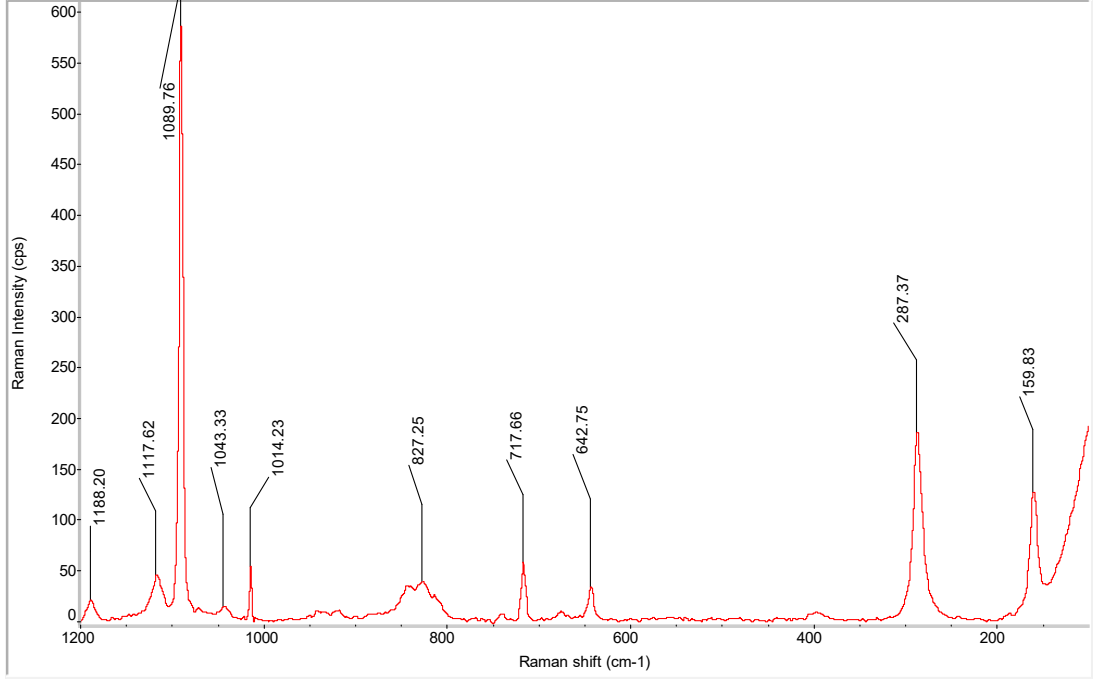


A

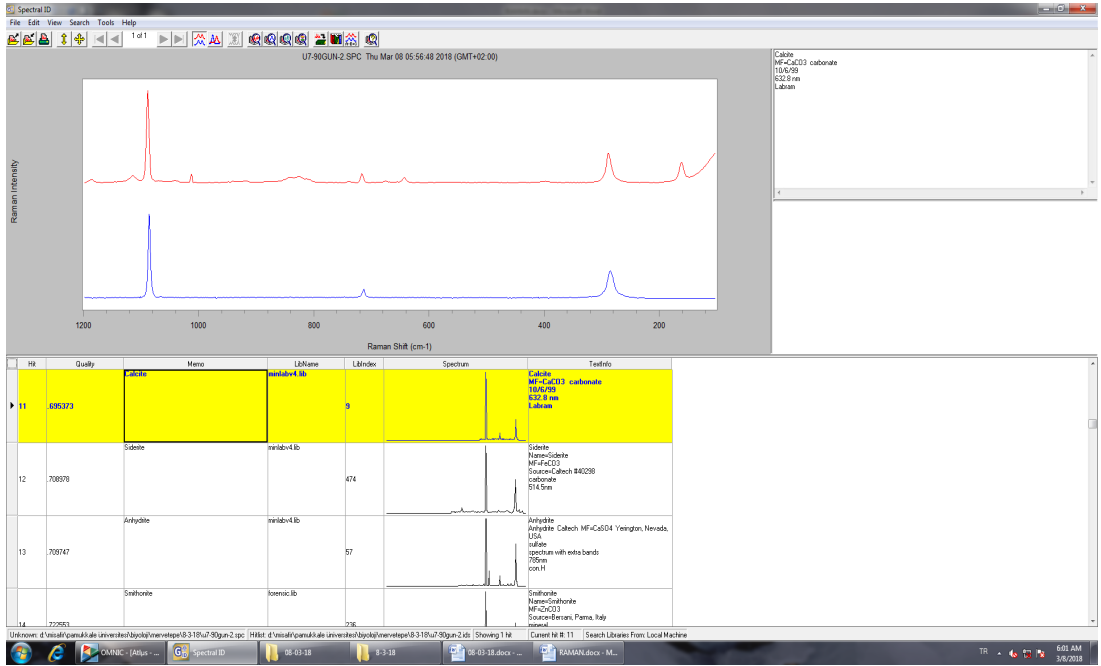


B

Şekil 4.31: 60. gün şahit beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik siderit pikleri (B)

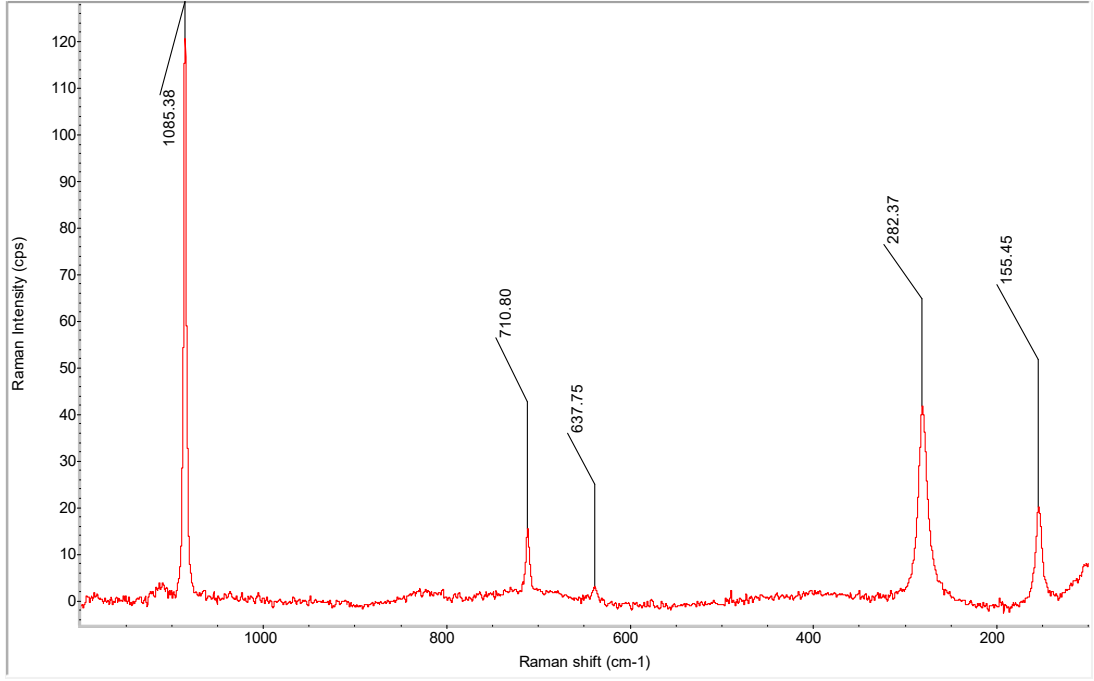


A

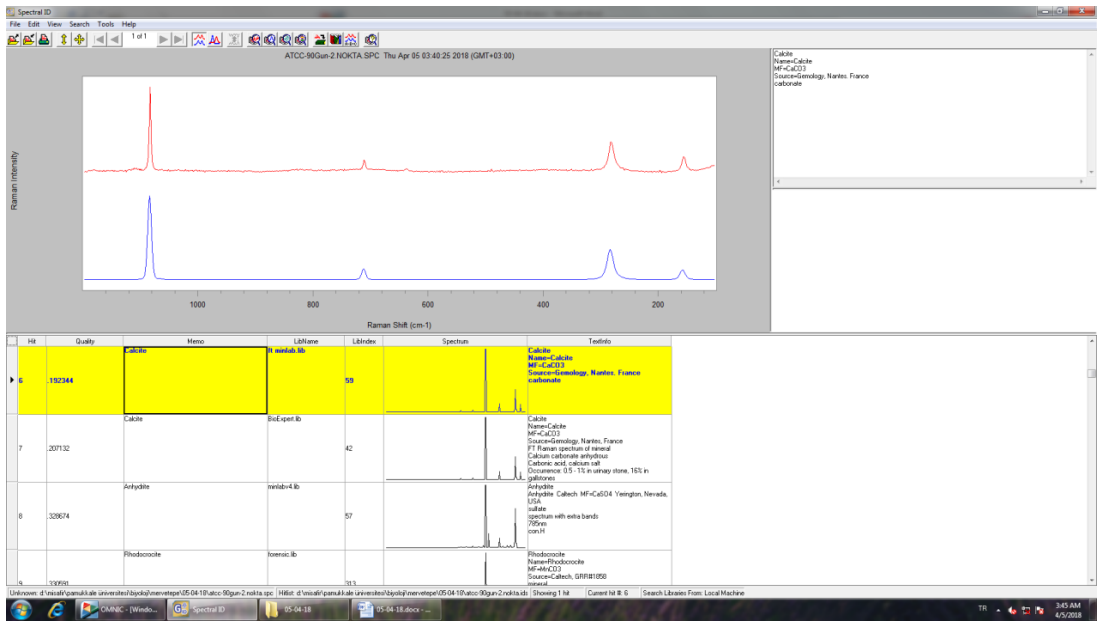


B

Şekil 4.32: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen CaCO₃ pikleri (B)

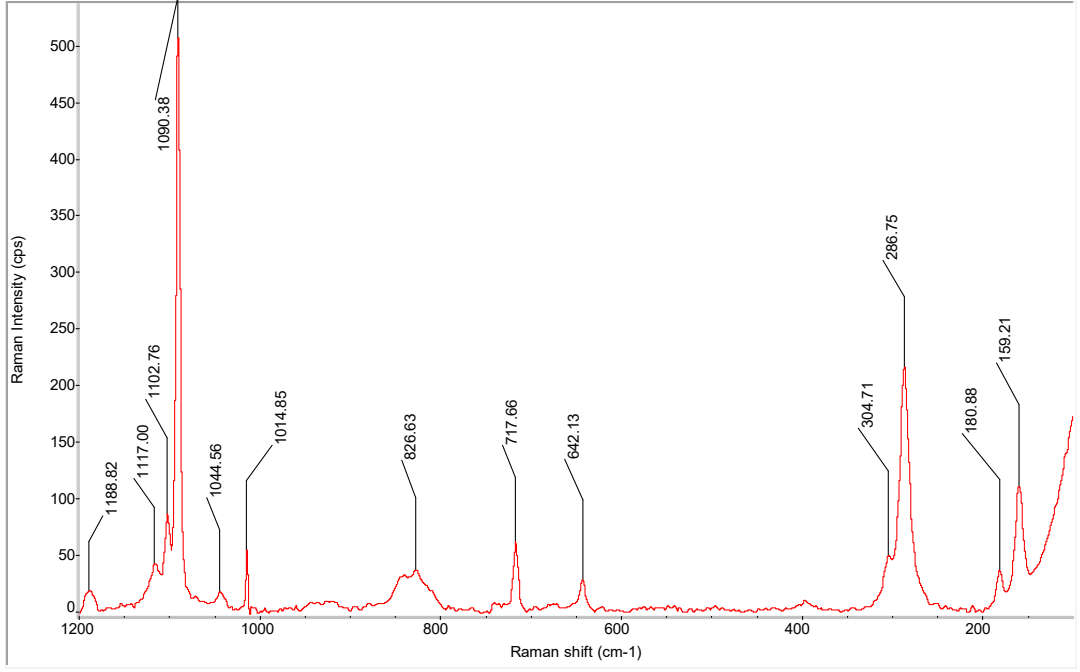


A

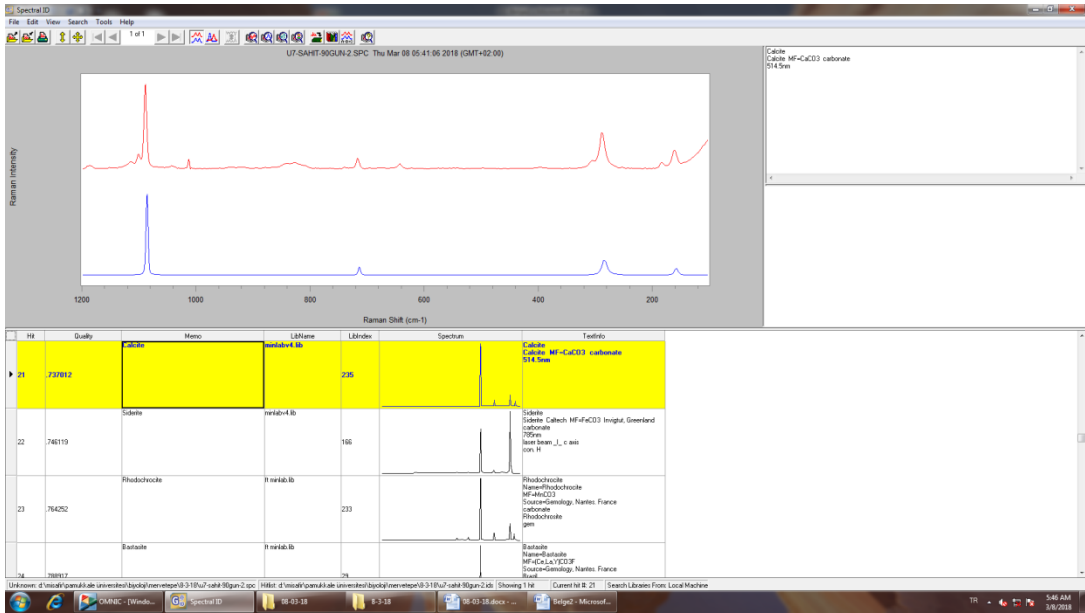


B

Şekil 4.33: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen karakteristik kalsit pikleri (B)



A



B

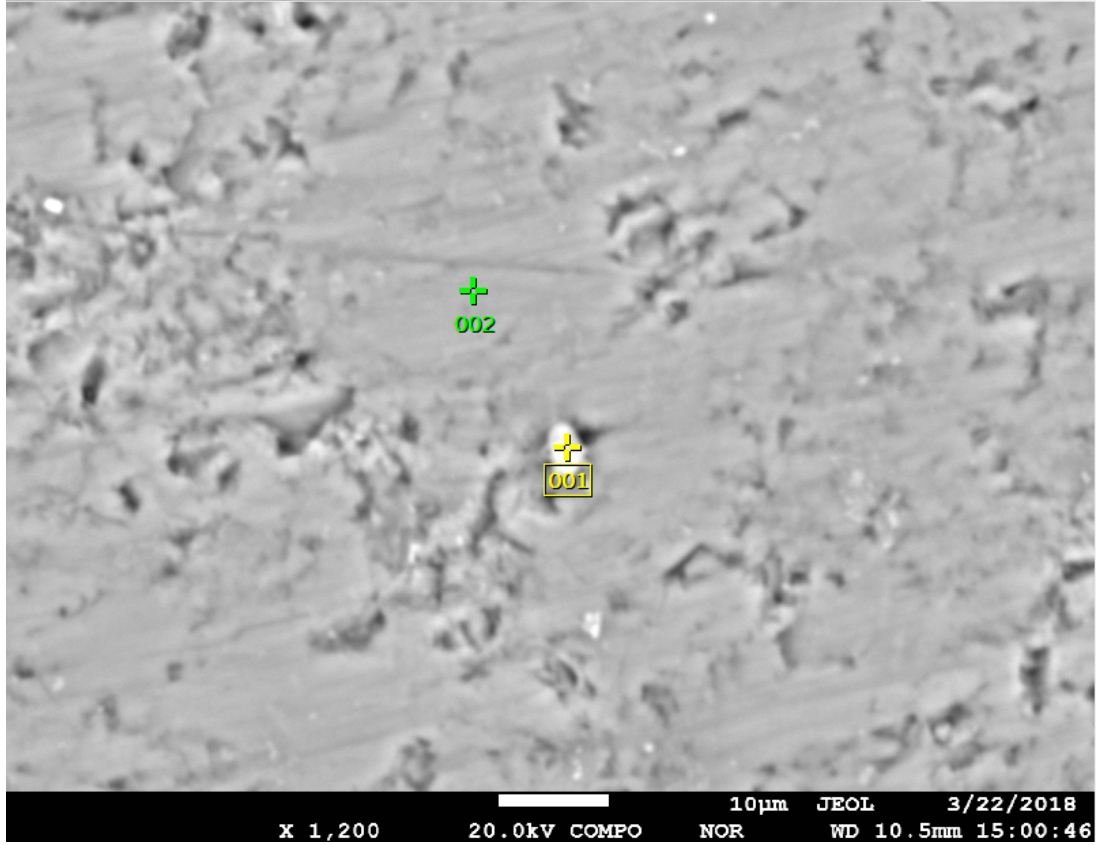
Şekil 4.34: 90. gün şahit beton örneği CRS analizi (A) ve tespit edilen kalsit pikleri

4.5.2 Beton Örnekleri EPMA Analizleri

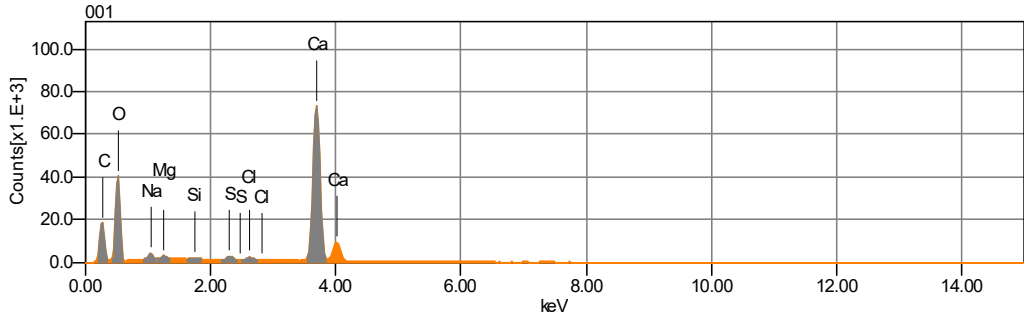
Bacillus amyloliquefaciens U17 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneklerinin EPMA analizlerinde beton yapısında bulunması beklenen Na, Mg, S, Si, Al, Fe yanı sıra karbonat yapıları da tespit edildi. 28. gün şahit beton örneği EPMA analizinde ise belirgin farklılıklar gözlemlenmedi. Ortaya çıkan mineral ve bileşenlerin biyojenik kaynaklı olup olmadıkları ya da betonda doğal olarak bulunan elemanlar olup olmadıkları net olarak karar verilememiş olmakla birlikte bakteriyel karbonat varlığı CRS analizleriyle doğrulandı. EPMA analizlerinin, FESEM-EDS analizleri ile paralel sonuçlar içerdiği görüldü (Şekil 4.35-4.39, Tablo 4.20-4.22).

Bacillus amyloliquefaciens U17 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneklerinin EPMA analizlerinde beton yapısında bulunması beklenen Na, Mg, S, Si, Al, Fe yanı sıra Fe oksit yapıları ve yüksek oranda kalsiyum karbonat yapıları tespit edildi, U17 60. gün beton örneğinde Fe oksitlerinin yanı sıra Ti ve Cr oksitlerine de rastlanmış, bu yapıların biyojenik kökenli olabilecekleri düşünülse de ortaya çıkan mineral ve bileşenlerin biyojenik kaynaklı olup olmadıkları ya da betonda doğal olarak bulunan elemanlar olup olmadıklarına ilişkin belirgin bulgular 60. gün örneklerinde de tespit edilemedi (Şekil 4.41-4.44, Tablo 4.22 ve 4.23).

Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneğinin EPMA analizlerinde tüm noktalarda yüksek miktarlarda CaCO_3 içeriğine, bunun yanı sıra beton yapısında rastlanması beklenen Mg, S, Si, Al elementlerine de rastlandı (Şekil 4.45 ve 4.46, Tablo 4.25). Bununla beraber *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneklerinin EPMA analizlerinde beton yapısında bulunması beklenen Na, Mg, S, Si, Al, oksit yapıları ve yüksek oranda kalsiyum karbonat yapıları tespit edildi ancak analizlerde tespit edilen Zn elementi beton yapıları yahut biyojenik kökenli bir oluşum ile ilişkilendirilemedi (Şekil 4.47 ve 4.48, Tablo 4.26). 90. gün şahit beton numunesinin EPMA analizleri sonucunda yüksek oranda karbonata ve doğal beton elementlerine rastlandı (Şekil 4.49 ve 4.50, Tablo 4.27). Tüm bu EPMA sonuçları beraber incelendiğinde, U17 ve ATCC beton numuneleri ile şahit beton numunesi arasında belirgin bir fark tespit edilemedi (Şekil 4.35-4.50, Tablo 4.20-4.27).



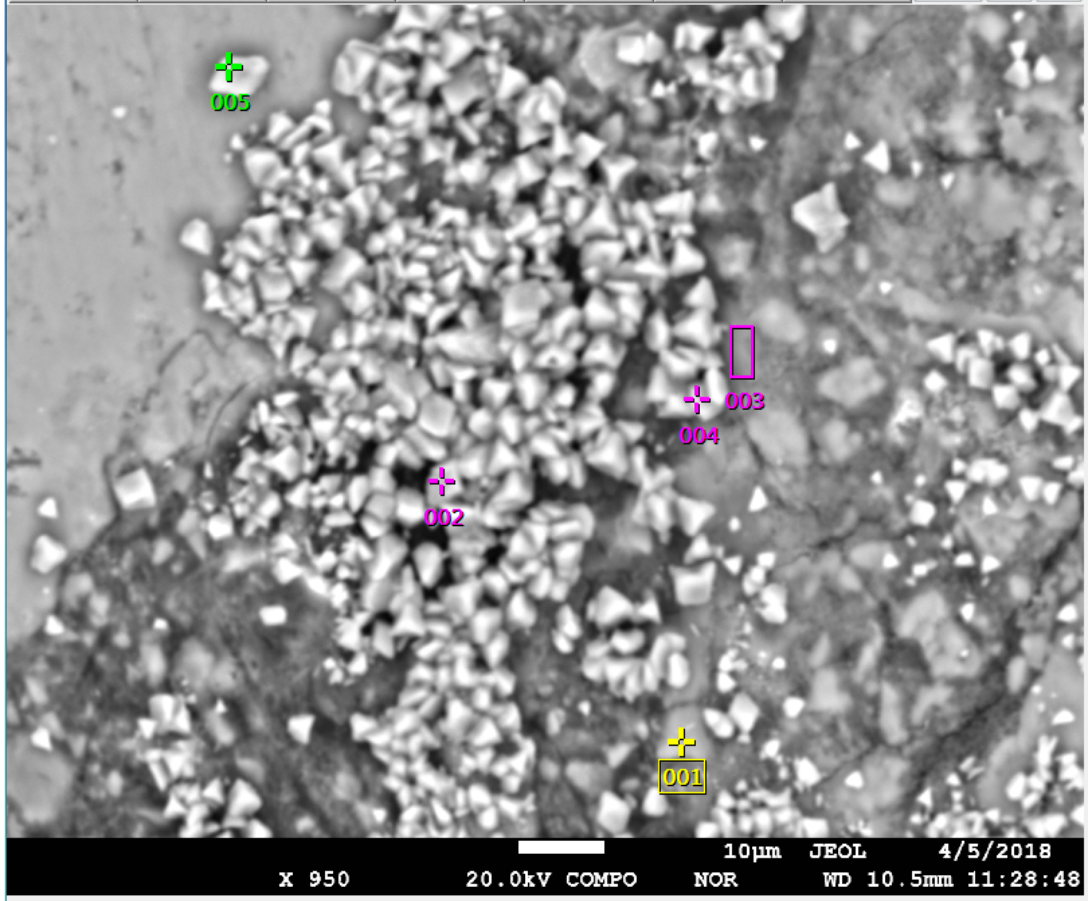
Şekil 4.35: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA analizi



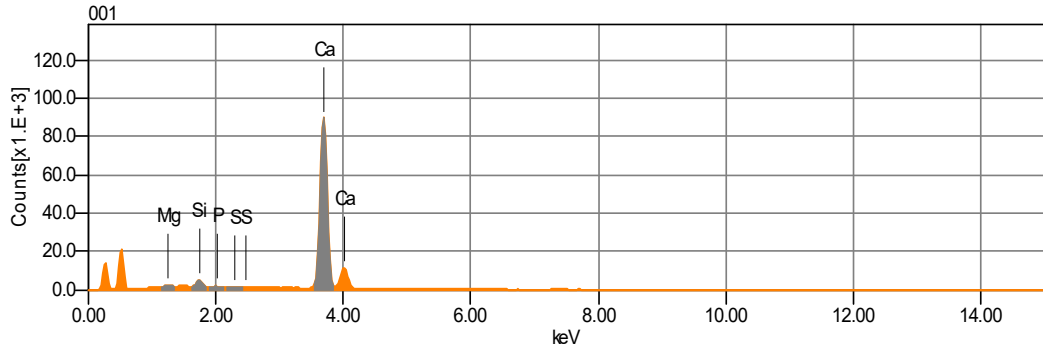
Şekil 4.36: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA 1 nolu nokta analizi (İlgili diğer nokta EK-D’te sunulmuştur)

Tablo 4.20: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.35’e ait veri)

Formül	Nokta 001		Nokta 002	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)
Na ₂ O	2,33	2,11	-	-
MgO	1,55	2,16	-	-
SiO ₂	0,72	0,68	-	-
SO ₃	2,49	1,75	-	-
Cl	0,63	1,00	-	-
CaO	92,27	93,31	100,00	100,00
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00



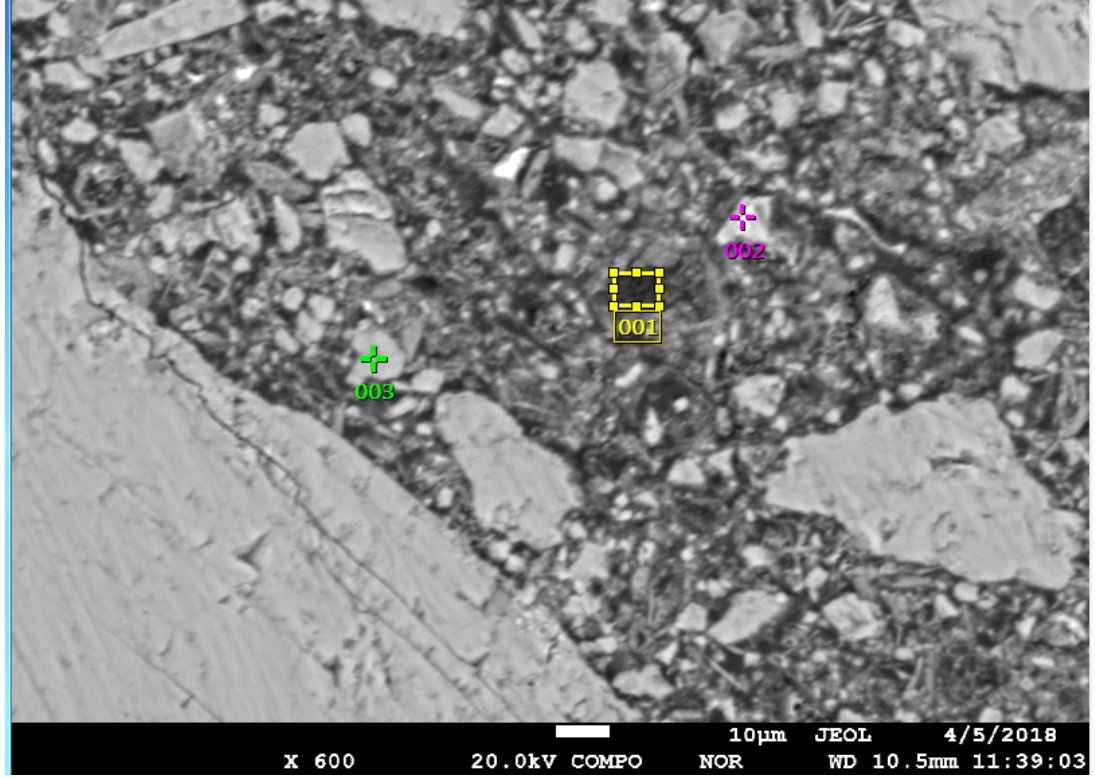
Şekil 4.37: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA analizi



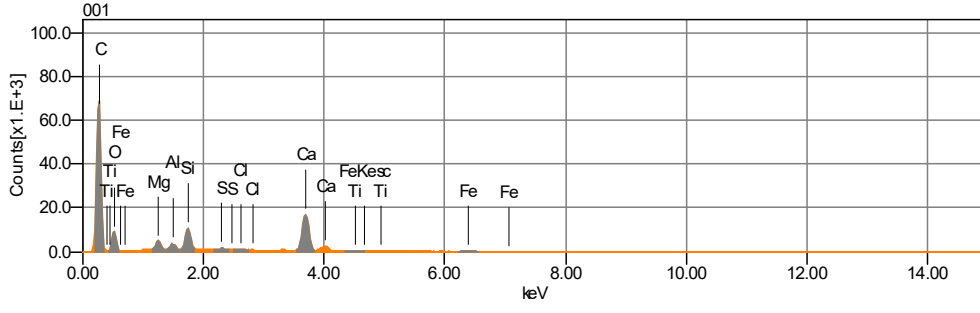
Şekil 4.38: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer nokta ve alanlar EK-D’te sunulmuştur)

Tablo 4.21: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.37'ye ait veri)

Formül	Nokta 001		Nokta 002		Alan 003		Nokta 004		Nokta 005	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Atom (%)
MgO	1,16	1,61	2,93	4,16	2,75	3,92	2,64	3,64	1,00	1,39
SiO ₂	3,43	3,21	17,58	16,72	19,14	18,26	1,04	0,96	0,50	0,47
P ₂ O ₅	0,44	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
SO ₃	0,35	0,25	1,72	1,23	1,56	1,12	-	-	-	-
Al ₂ O ₃	-	-	2,47	1,39	2,02	1,13	-	-	-	-
Na ₂ O	-	-	-	-	0,40	0,37	-	-	-	-
TiO ₂	-	-	-	-	0,50	0,36	-	-	-	-
FeO	-	-	3,32	2,64	2,86	2,28	-	-	-	-
Cl	-	-	0,81	1,30	0,38	0,61	-	-	-	-
CaO	94,62	94,76	71,17	72,56	70,38	71,94	96,31	95,39	98,50	98,15
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



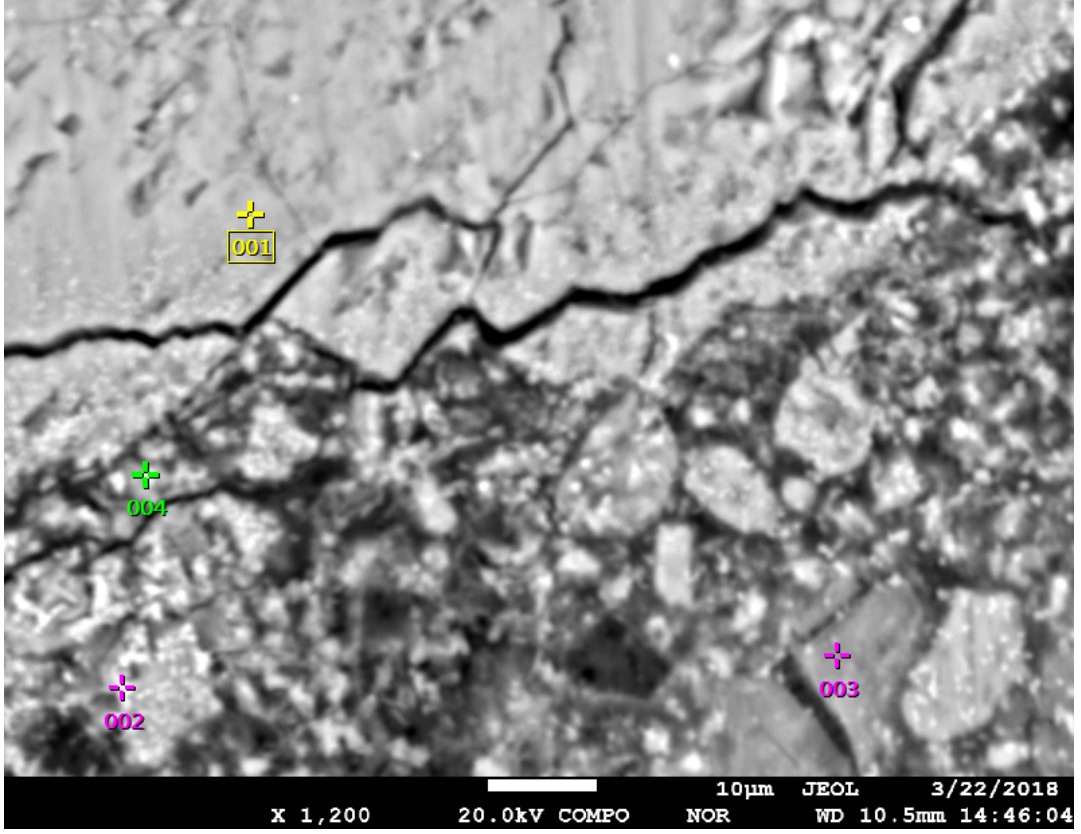
Şekil 4.39: 28. gün şahit beton örneği EPMA analizi



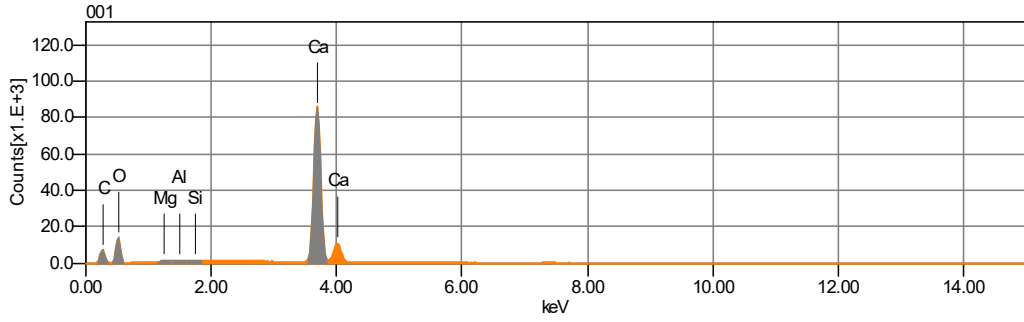
Şekil 4.40: 28. gün şahit beton örneği 1 nolu alan EPMA analizi (İlgili diğer noktalar Ek D’te sunulmuştur)

Tablo 4.22: 28. gün şahit beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.39’a ait veri)

Formül	Alan 001		Nokta 002		Nokta 003	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)
MgO	9,44	13,49	4,20	6,63	-	-
SiO ₂	26,31	25,22	7,00	7,40	-	-
P ₂ O ₅	-	-	-	-	-	-
SO ₃	2,27	1,63	0,73	0,58	-	-
Al ₂ O ₃	5,92	3,34	17,03	10,61	-	-
Na ₂ O	-	-	0,30	0,30	-	-
TiO ₂	1,61	1,16	1,67	1,33	-	-
FeO	5,01	4,02	20,52	18,15	-	-
Cl	0,63	1,02	-	-	-	-
CaO	48,81	50,13	48,54	55,00	100,00	100,00
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



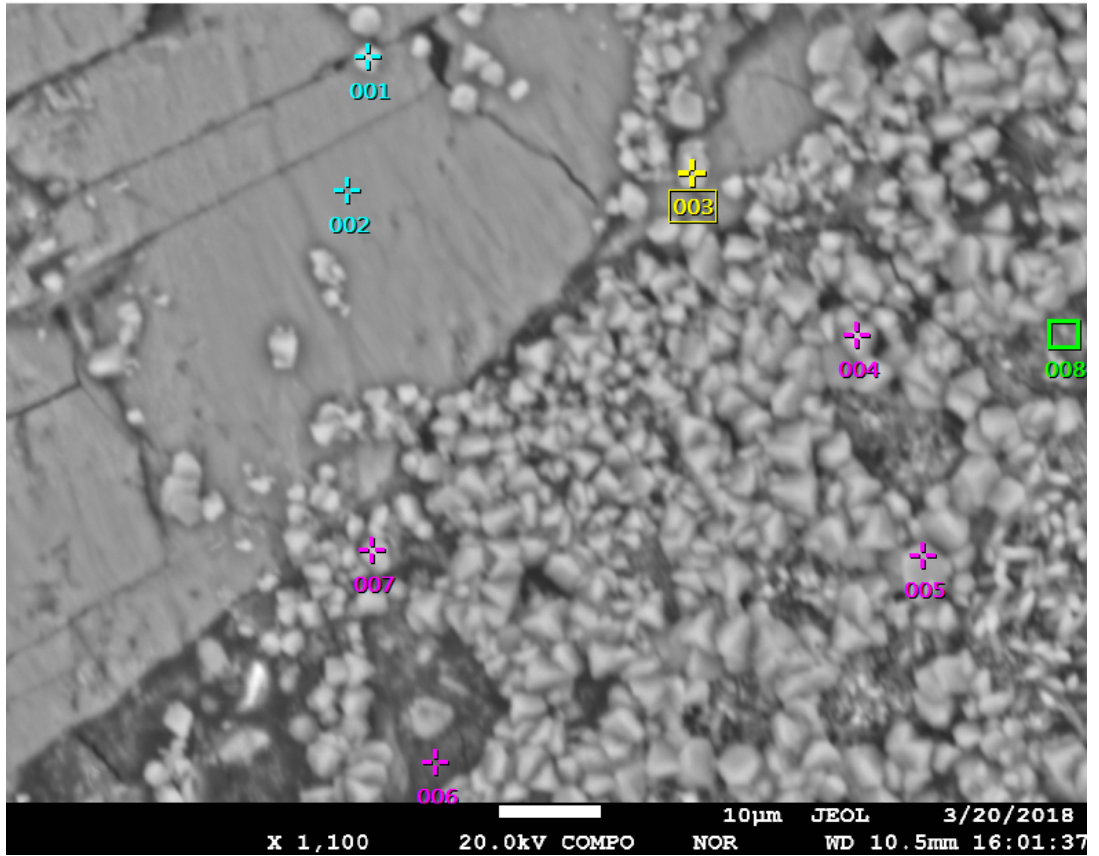
Şekil 4.41: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA analizi



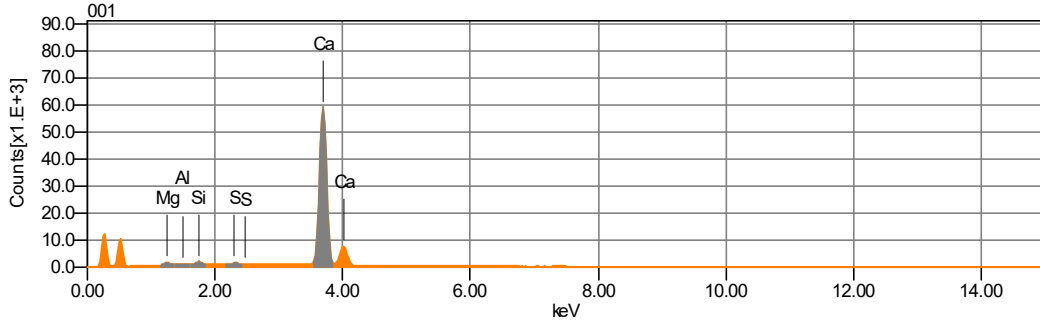
Şekil 4.42: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer noktalar EK 4'de sunulmuştur)

Tablo 4.23: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.41'e ait veri)

Formül	Nokta 001		Nokta 002		Nokta 003		Nokta 004	
	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)
MgO	0,58	0,81	2,85	4,13	3,19	4,61		
SiO ₂	0,50	0,46	15,50	15,05	35,95	34,88	17,78	17,64
K ₂ O	-	-	2,06	1,27	-	-		
SO ₃	-	-	1,53	1,12	3,65	2,66		
Al ₂ O ₃	0,29	0,16	5,67	3,24	2,32	1,33	8,23	4,81
Na ₂ O	-	-	2,30	2,17	-	-	3,01	2,90
Cr ₂ O ₃	-	-	-	-	0,44	0,17		
TiO ₂	-	-	-	-	0,51	0,37		
FeO	-	-	-	-	2,78	2,26	3,47	2,88
Cl	-	-	0,18	0,29	0,88	1,45		
CaO	98,63	98,56	69,91	72,73	50,28	52,28	67,50	71,77
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



Şekil 4.43: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA analizi



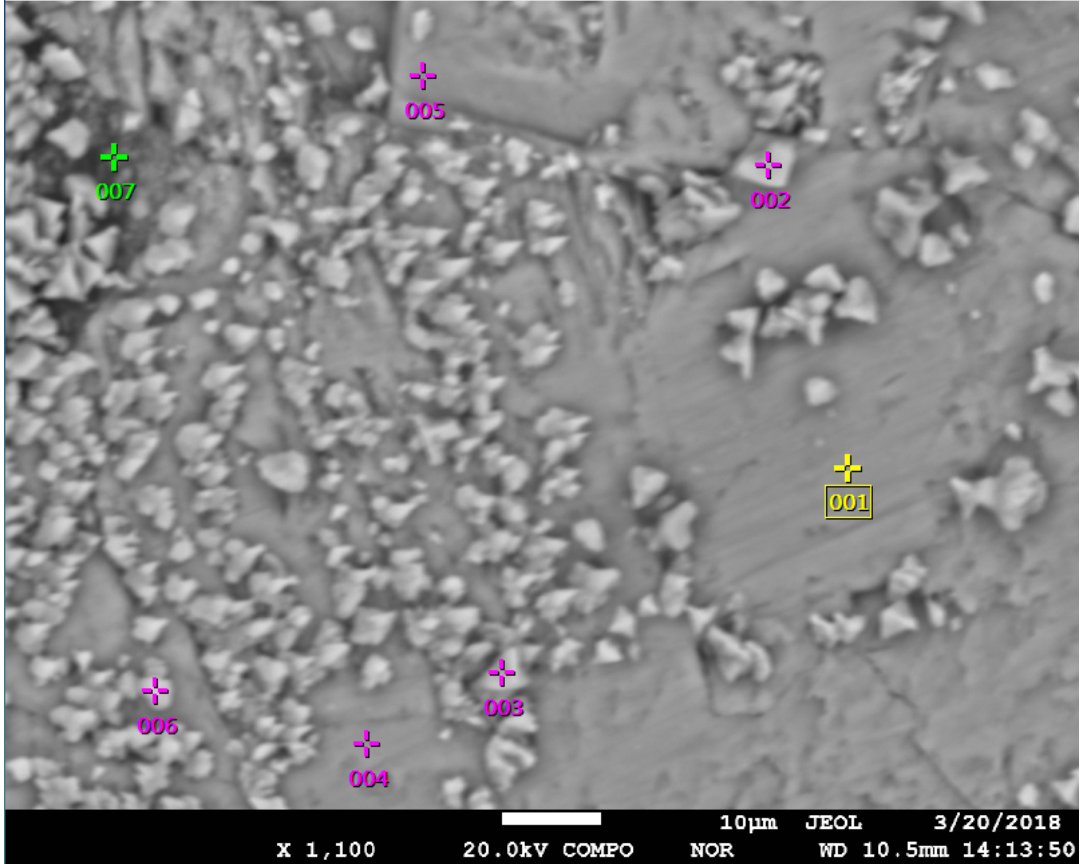
Şekil 4.44: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer nokta ve alan analizleri EK D’te sunulmuştur)

Tablo 4.24: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.41’e ait veri)

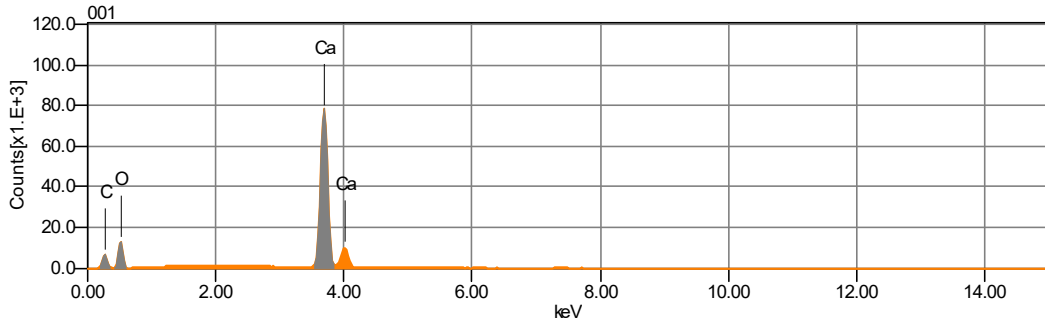
Formül	Nokta 001		Nokta 002		Nokta 003		Nokta 004	
	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)
MgO	1,03	1,43	0,58	0,81	3,22	4,44	-	-
SiO ₂	1,24	1,15	0,68	0,63	2,55	2,36	-	-
SO ₃	0,60	0,42	-	-	0,69	0,48	-	-
Al ₂ O ₃	0,35	0,19	-	-	-	-	-	-
Na ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-
FeO	-	-	-	-	-	-	-	-
Cl	-	-	-	-	-	-	-	-
CaO	96,78	96,80	98,74	98,56	93,54	92,72	100,00	100,00
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tablo 4.24 (devamı): *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.41’e ait veri)

Formül	Nokta 005		Nokta 006		Nokta 007		Alan 008	
	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)
MgO	2,76	3,83	5,11	7,70	2,79	3,86	2,60	3,67
SiO ₂	1,56	1,45	39,34	39,78	1,97	1,83	16,16	15,32
SO ₃	0,67	0,47	1,29	0,98	0,99	0,69	-	-
Al ₂ O ₃	0,79	0,43	13,01	7,75	-	-	3,32	1,86
Na ₂ O	-	-	0,65	0,63	-	-	-	-
FeO	-	-	4,77	4,03	-	-	-	-
Cl	-	-	0,48	0,83	-	-	-	-
CaO	94,22	93,82	35,35	38,30	94,24	93,62	77,92	79,15
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



Şekil 4.45: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA analizi



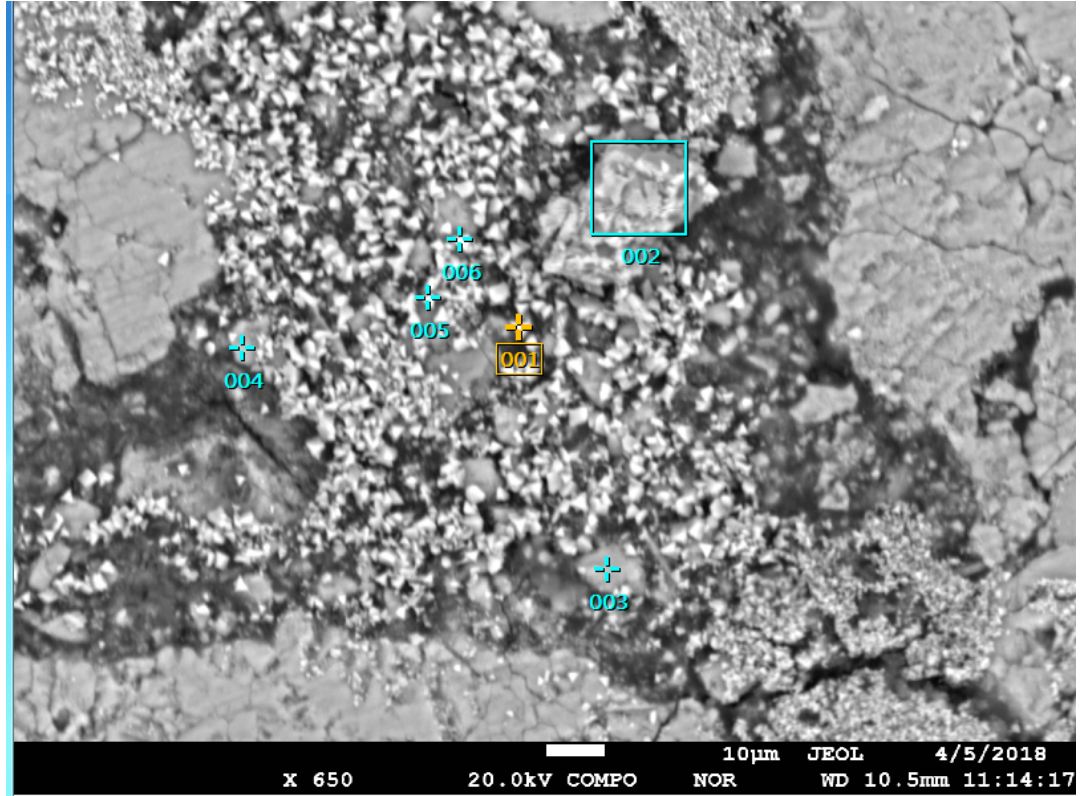
Şekil 4.46: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer nokta analizleri EK D'te sunulmuştur)

Tablo 4.25: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.45'e ait veri)

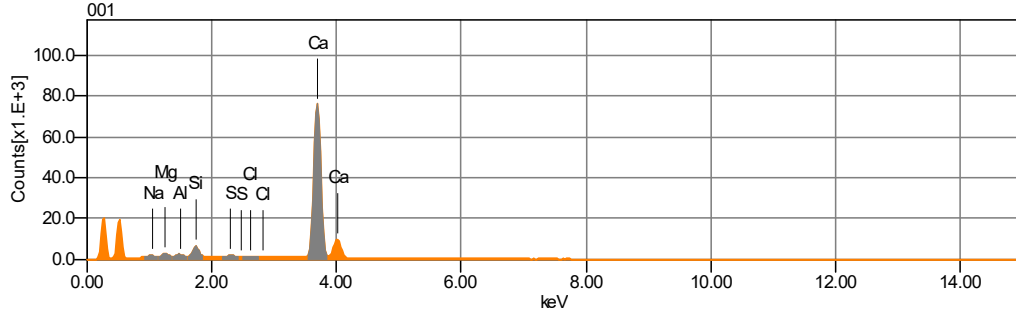
Formül	Nokta 001		Nokta 002		Nokta 003		Nokta 004	
	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)
MgO	-	-	0,45	0,62	1,26	1,74	-	-
SiO ₂	-	-	-	-	0,67	0,62	-	-
SO ₃	-	-	0,59	0,41	-	-	-	-
Al ₂ O ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
CaO	100,00	100,00	98,97	98,97	98,07	97,63	100,00	100,00
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tablo 4.25 (devamı): *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.45'e ait veri)

Formül	Nokta 005		Nokta 006		Nokta 007	
	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)
MgO	-	-	0,99	1,37	2,51	3,54
SiO ₂	-	-	-	-	9,65	9,13
SO ₃	-	-	-	-	-	-
Al ₂ O ₃	-	-	-	-	3,73	2,08
CaO	100,00	100,00	99,01	98,63	84,10	85,24
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



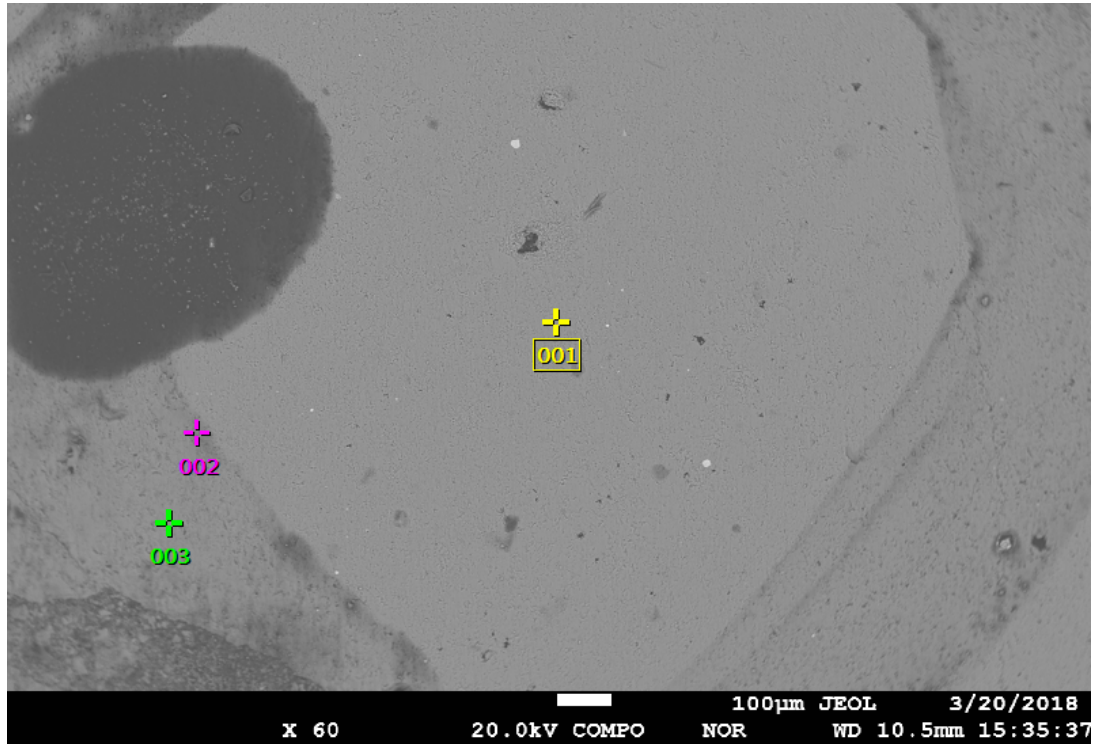
Şekil 4.47: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA analizi



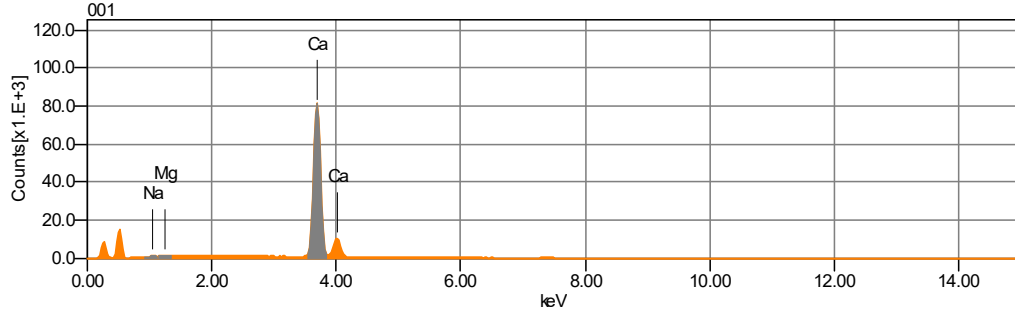
Şekil 4.48: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 1 nolu nokta EPMA analizi (İlgili diğer nokta analizleri EK D’te sunulmuştur)

Tablo 4.26: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.47’ye ait veri)

Formül	Nokta 001		Alan 002		Nokta 003		Nokta 004		Nokta 005		Nokta 006	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)
Na ₂ O	0,72	0,65	-	-	-	-	1,62	1,52	0,55	0,50	0,51	0,47
MgO	1,64	2,29	0,53	0,73	0,41	0,57	3,06	4,41	4,21	5,85	1,12	1,56
Al ₂ O ₃	1,02	0,56	0,48	0,26	1,70	0,95	5,56	3,17	1,78	0,98	0,77	0,42
SiO ₂	5,40	5,06	1,71	1,60	2,90	2,73	22,55	21,82	6,14	5,72	5,32	4,99
SO ₃	0,89	0,63	0,34	0,24	-	-	1,82	1,32	1,05	0,74	0,90	0,63
Cl	0,20	0,32	0,08	0,12	-	-	0,59	0,96	0,15	0,24	0,09	0,15
ZnO	-	-	-	-	-	-	1,23	0,88	-	-	-	-
CaO	90,14	90,50	96,87	97,04	94,62	95,49	63,57	65,91	86,12	85,98	91,29	91,77
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



Şekil 4.49: 90. gün şahit beton örneği EPMA analizi

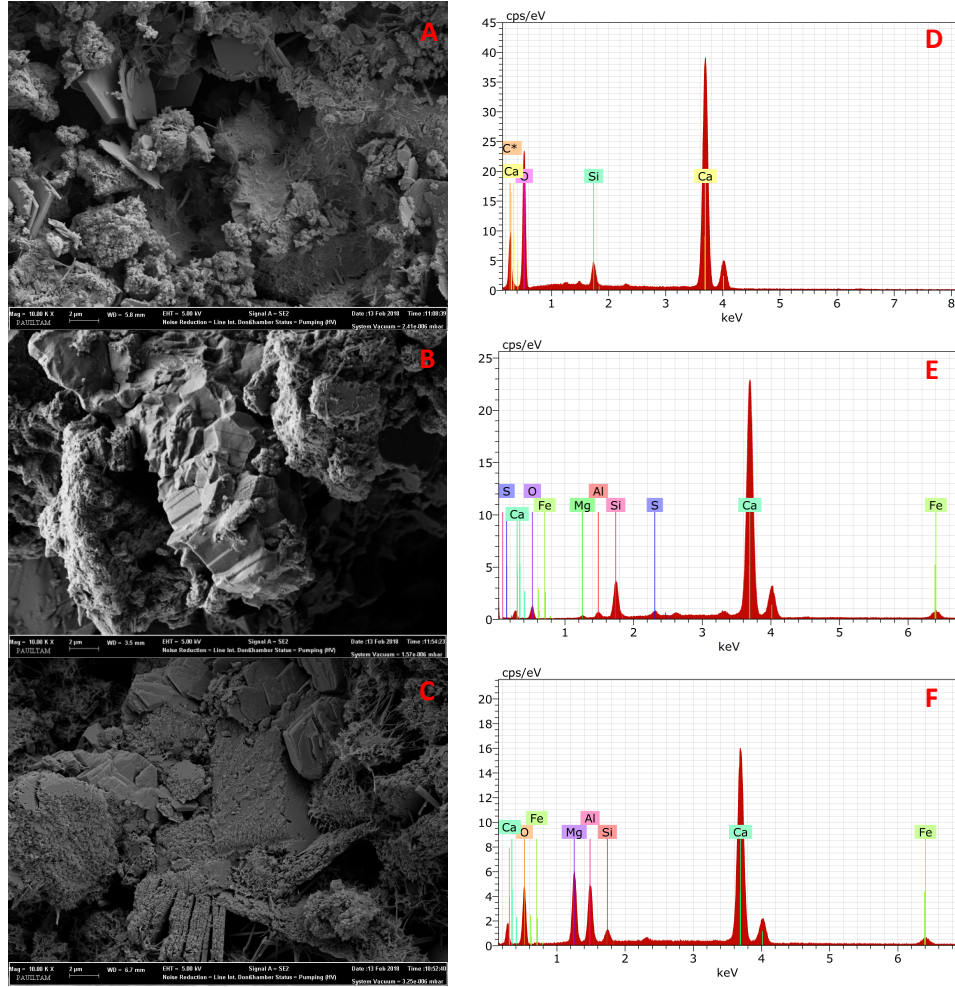


Şekil 4.50: 90. gün şahit beton örneği 1 nolu alan EPMA analizi (İlgili diğer noktalar EK D’te sunulmuştur)

Tablo 4.27: 90. gün şahit beton örneği EPMA kantitatif analizi (Şekil 4.49’a ait veri)

Formül	Alan 001		Nokta 002		Nokta 003	
	Kütle (%)	Atom (%)	Kütle (%)	Atom (%)	Atom (%)	Kütle (%)
MgO	0,47	0,66	0,47	0,65	1,06	1,47
SO ₃	-	-	1,02	0,72	-	-
Cr ₂ O ₃	-	-	0,68	0,25	-	-
Na ₂ O	0,23	0,21	-	-	-	-
CaO	99,29	99,13	97,84	98,38	98,94	98,53
Toplam	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

4.5.3 Beton Örnekleri FESEM Analizleri



Şekil 4.51: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği FESEM görüntüsü (A) ve EDS analizi (D); *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği FESEM görüntüsü (B) ve EDS analizi (E); 28. gün şahit beton örneği FESEM görüntüsü (C) ve EDS analizi (F)

Bacillus amyloliquefaciens U17 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneklerinin FESEM görüntüleri incelendiğinde, her iki numune ve şahit betonda beton elemanlarından, priz ısısı ile ortaya çıkan etrenjit kristalleri ve karbonat yapıları gözlemlendi ancak bunun dışında belirgin farklılıklar tespit edilemedi (Şekil 4.51).

4.5.4 Basınç Dayanımı ve Kılcal Su Emme Analizleri

Akça Beton A.Ş. Hacıyüplü (Denizli) beton santralinde TS EN 206 ve TS EN 12350-1 standartlarına uygun olarak hazırlanan beton numunelerinin basınç dayanımı ve kılcal su emme testleri, FEBLAB Yapı Test ve Kalibrasyon Laboratuvarında yapıldı. *Bacillus amyloliquefaciens* U17 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 eklenerek hazırlanan örneklerin basınç dayanımı testinin sonuçları incelendiğinde U17 ile hazırlanan betonun basınç dayanımının şahit numuneye ve ATCC 6453 ile hazırlanan numuneye göre daha düşük olduğu tespit edildi. U17 ile hazırlanan betonun basınç dayanımı 28. günde 11,45 MPa (10,90-12,00), 60. günde 12,39 MPa (11,89-12,89) ve 90. günde 12,83 mPa (12,33-13,4) aynı anda dökülerek analize tabi tutulan şahit betonun basınç dayanımı 28. günde 13,94 MPa (13,50-15,26), 60. günde 14,71 MPa (13,88-15,54) ve 90. günde 15,54 mPa (14,87-16,23) hesaplanırken, 28. gün kılcal su emme sonuçları U17 için % 0,83 (%0,82-0,85) iken şahit beton örneği için %0,72 (0,66-0,78) olarak kaydedildi. ATCC 6453 ile hazırlanan betonun basınç dayanımı 28. günde 15,75 MPa (15,23-16,27), 60. günde 16,71 MPa (16,15-17,46) ve 90. günde 18,39 MPa (17,93-18,69) aynı anda dökülerek analize tabi tutulan şahit betonun basınç dayanımı 28. günde 15,86 MPa (15,22-16,37), 60. günde 16,87 MPa (16,19-18,10) ve 90. günde 18,75 MPa (18,42-19,03) hesaplanırken, 28. gün kılcal su emme sonuçları ATCC için % 0,78 (%0,75-0,82) iken şahit beton örneği için %0,72 (0,66-0,78) olarak kaydedildi (Tablo 4.26-4.29).

Bizim bulgularımızın aksine *Bacillus subtilis* MTCC 441 kültürü ile hücre konsantrasyonunun betonun basınç dayanımına etkisinin 3 farklı konsantrasyonda (10^3 - 10^5 - 10^7 hücre/mL) araştırıldığı çalışmada en yüksek basınç dayanımının kontrol örneği ve diğer konsantrasyonlarda hazırlanan betonlara kıyasla 10^5 hücre/mL bakteri kültürü ile hazırlanan beton örneğinde (28. günde, 50MPa) tespit edildiği; 3., 7. ve 28. günlerde yapılan ölçümlerin tümünde en düşük su emme oranının aynı beton örneğinde gözlemlendiği ve 28. gün sonunda su emme oranının %27 azalma gösterdiği bildirildi (Mondal ve Gosh 2018). Benzeri bir çalışmada 30×10^5 cfu/mL oranında betona eklenen *Bacillus megaterium* ile hazırlanan beton örneğinin basınç dayanımının kontrol örneğine göre %25 daha yüksek olduğu tespit edilirken (Andalib ve diğ. 2016), *Bacillus subtilis* ile hazırlanan betonun 28, 56, 90 ve 150.

günde yapılan basınç dayanımı ve kılcal su emme analizleri sonucunda bakteriyel betonun şahit betona kıyasla %5,5 daha yüksek basınç dayanımına ve %44,3 daha az kılcal su emme oranına sahip olduğu bildirildi (Salmasi ve Mostofinejat 2020).

Tablo 4.28: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 ile hazırlanan bakteriyel betonun basınç dayanımı

Analiz ile ilgili Bilgiler	Basınç Dayanımı Sonuçları (MPa)		
	Gün	U17	ŞAHİT
28	Nu 1.	11,07	15,26
	Nu 2.	11,60	13,76
	Nu 3.	12,00	13,50
	Nu 4.	11,83	14,09
	Nu 5.	11,51	13,54
	Nu 6.	10,90	13,51
	Ort.	11,45	13,94
60	Nu 1.	11,89	15,54
	Nu 2.	12,89	13,88
	Ort.	12,39	14,71
90	Nu 1.	12,33	16,23
	Nu 2.	12,70	14,87
	Nu 3.	13,47	15,53
	Ort.	12,83	15,54

Tablo 4.29: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 ile hazırlanan bakteriyel betonun su emme analizi

Analiz ile ilgili Bilgiler	Kılcal Su Emme Analizi Sonuçları (%)						
	Gün	Numune	U17			ŞAHİT	
28			Kuru Ağırlık (gr)	Doygun Kuru Yüzey Ağırlığı (gr)	% Su Emme	Kuru Ağırlık (gr)	Doygun Kuru Yüzey Ağırlığı (gr)
	Nu 1.	7792,2	7856,2	%0,82	7831,0	7883,0	%0,66
	Nu 2.	7698,0	7763,5	%0,85	7433,0	7491,3	%0,78

Tablo 4.30: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 ile hazırlanan bakteriyel betonun basınç dayanımı

Analiz ile ilgili Bilgiler	Basınç Dayanımı Sonuçları (MPa)		
	Gün	ATCC 6453	ŞAHİT
28	Nu 1.	15,23	16,27
	Nu 2.	15,81	16,21
	Nu 3.	16,27	16,02
	Nu 4.	15,85	15,07
	Nu 5.	15,28	16,37
	Nu 6.	15,97	15,22
	Ort.	15,75	15,86
60	Nu 1.	17,46	16,32
	Nu 2.	16,15	16,19
	Nu 3.	16,52	18,10
	Ort.	16,71	16,87
90	Nu 1.	17,93	19,03
	Nu 2.	18,69	18,42
	Nu 3.	18,56	18,81
	Ort.	18,39	18,75

Tablo 4.31: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 ile hazırlanan bakteriyel betonun su emme analizi

Analiz ile ilgili Bilgiler	Kılcal Su Emme Analizi Sonuçları (%)						
	Gün	ATCC 6453			ŞAHİT		
28	Numune	Kuru Ağırlık (gr)	Doğun Kuru Yüzey Ağırlığı (gr)	% Su Emme	Kuru Ağırlık (gr)	Doğun Kuru Yüzey Ağırlığı (gr)	% Su Emme
	Nu 1.	7797,0	7855,1	%0,75	7799,0	7846,6	%0,61
	Nu 2.	7732,0	7795,3	%0,82	7898,0	7935,9	%0,48

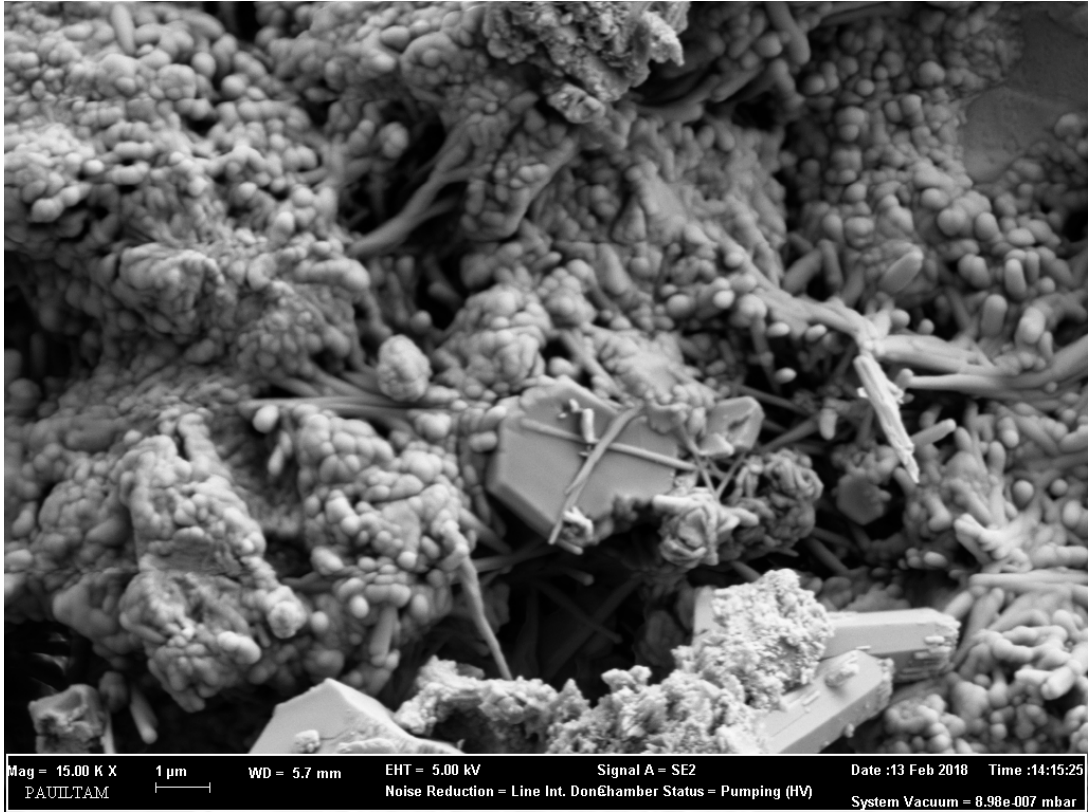
Betonun durabilitesi açısından geçirimsizlik büyük önem arz eder. Hem U17 hem de ATCC 6453 ile hazırlanan 28. gün beton numunelerinde % su emme oranları şahit betona göre bir miktar (sırasıyla %17 ve %40) daha yüksektir. Bu sonuçlar ışığında test ve kontrol organizmalarımız ile modifiye edilen betonların şahit betona karşı üstünlüğü gözlemlenememiştir (Tablo 4.28 ve 4.30). Bizim bulgumuzun aksine, araştırmacılar türe özgü olan bir özellik olan üreaz aktivitesinin çimentasyon için önemli bir faktör olduğunu ifade ederek *Bacillus pasteurii*'nin düşük üre konsantrasyonunda daha fazla kalsiyum karbonat birikimi yapması dolayısıyla daha güçlü ve daha az su emme oranına sahip olan (%14 daha az) bir beton ürettiklerini bildirdiler (Chunxiang ve diğ 2009).

Bacillus sphaericus bakterisinin çimento betonuna eklendiği bir diğer çalışmada, konvensiyonel beton karışımının basınç dayanımını %13,75, %14,78 ve %18,35 oranında ve beton sertliğini de %30,76, %46,15 ve %32,21 oranlarında arttığı bildirildi (Gavimath ve diğ. 2010). Ayrıca, *Bacillus* sp. sporlarının doğrudan eklendiği beton örneklerinde 4 ayın sonunda por genişliğinin 1 µm azaldığı ve *Bacillus* cinsi bakterilerin kendisini iyileştiren beton uygulamalarında kullanılabileceği ifade edildi (Jonkers ve diğ. 2010). *Bacillus subtilis* JC3 model bakterisi ile gerçekleştirilen bir çalışmada ise bakteri inokulumu yapılan beton karışımı örneklerinin basınç dayanımında artış olduğu bildirildi (Reddy ve diğ. 2010). Uçucu küllü beton karışımları üzerinde gerçekleştirilen mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi araştırmasında, *Sporosarcina pasteurii* inokule edilen deney grubu örneklerinin 28 günün sonunda %22 oranında daha yüksek basınç dayanımına sahip oldukları ve su geçirgenliğinde ise 4 kat azalma tespit edildiği bildirildi (Chahal ve diğ. 2012).

Son yıllarda mikrobiyolojik yollarla çatlak onarımı üzerine yoğunlaşan çalışmalarda ümit vaat edici sonuçlar elde edildiği bilinir. Örneğin, *Bacillus* sp. ile biyoçimento çatlaklarında 27.2 mm'lik iyileşme ve basınç dayanımında kontrol grubuna göre %40 artış sağlanabilirken (Achal ve diğ. 2013), mikrokapsüllü bakteri sporları aracılığıyla kendini iyileştirebilen beton üzerine yapılan araştırmalarda, *Bacillus sphaericus* LMG 22557 inokule edilen numunelerin artan inokulasyon oranlarında 28. günün sonunda % 48-80 oranlarında iyileşme gösterdikleri (maksimum çatlak genişliği 970 µm) ve su geçirgenliğinin 10 kat azaldığı tespit edildi (Wang ve diğ. 2014). Bir diğer çalışmada 16S rRNA ile tanımlanan bakteri

izolatları (*Bacillus megaterium* BSKAU, *Bacillus licheniformis* BSKNAU ve *Bacillus flexus* BSKNAU) *Bacillus megaterium* MTCC 1684 ile kalsiyum karbonat çökeli mi özellikleri ile beton çatlaklarını iyileştirebilme potansiyelleri açısından kıyaslanarak, basınç dayanımının bakterilere göre sırasıyla %12,1, %10,6 ve %6,1 arttığı ve taramalı elektron mikroskop analizleri sonucunda 28. günün sonunda her üç izolatta da çatlak iyileştirme özelliği ve çatlakların kalsit kristalleri ile doldurulduğu tespit edildi (Krishnapvira ve diğ. 2015).

Çalışma sonuçlarımız literatürde verilen bilgilerle kıyaslandığında başarılı bir sonuç elde edilmemiş olarak görülmekle birlikte özellikle 90. güne ait SEM görüntüsünde hala bakterilerin varlığının görülmesi (Şekil 4.52), bakterilerin beton ortamı gibi oldukça zor şartlarda canlı kalabildiklerini göstermiştir.



Şekil 4.52: *Bacillus amyloliquefaciens* U17 ilaveli beton örneğinin 90.gün sonunda SEM analizi (yoğun çubuk formunda bakteri hücreleri net olarak görülmektedir)

Bakteri türü, tipi, sporlu olup olmaması, inokulasyon oranı ya da kullanılan beton tipi bu tür çalışmaların sonuçlarını etkileyebilir. Diğer taraftan, CRS, EPMA ve FESEM analizleri ile beton örneklerinde bakteriyel kalsit varlığının tespit edilmiş olması bakterilerin C8 betonunda az da olsa kalsiyum karbonat çökeli mi

yapabildiklerini de göstermiştir. Bir diğer olumlu sonuç da *Bacillus amyloliquefaciens* U17'nin kalsiyum karbonat çökelimi sonucunda açığa çıkan amonyum oranının Dünya Sağlık Örgütü'nün kabul ve tavsiye ettiği sınırların oldukça altında kalmasıdır.

Bacillus amyloliquefaciens U17'nin yüksek üreaz enzim aktivitesine sahip olması, yüksek miktarda kalsiyum karbonat çökelimi yapabilmesi ve 90. gün beton örneğinde varlığının tespit edilmesine rağmen betonun fiziksel özelliklerinde belirgin bir iyileşme gösterememesinin sebepleri düşünüldüğünde, bakteri kültürünün beton karışımına doğrudan tatbikinin beton karışımında normalde su ve çimento etkileşimi ile gerçekleşen hidratasyon süreçlerini olumsuz etkilemiş olabileceği yahut bu kültür içeriğinin betonda beklenen sertleşme zamanlamasını geciktirmesi dolayısı ile düşük basınç dayanımı gösterdiği düşünülebilir. Bunun yanı sıra beton karışımına ilave edilen besiyerindeki bakteri konsantrasyonunun basınç dayanımında belirgin değişiklikler ortaya çıkarabilecek miktarın altında kalmış olabileceği yorumlanabilir. Yine bakteri açısından düşünüldüğünde, beton içerisinde varlığını koruyabilmiş olmasına rağmen, besiyerinin çimento karışımına ilavesi sonrasında, bakterinin ihtiyaç duyduğu besin tuzlarına erişimde güçlük yaşamış olması da basınç dayanımında belirgin bir fark gözlemlenememiş olmasının sebeplerinden biri olabilir. Bu nedenle daha detaylı çalışmalara ve analizlere ihtiyaç duyulduğu açıktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kalsiyumca zengin İsrafil dere yatağından izole edilen yerel bir izolat olan *Bacillus amyloliquefaciens* suşu U17'nin CaCO_3 üretimi, üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri araştırıldı. *B. amyloliquefaciens* U17'nin, 37°C sıcaklıkta, 6.5 başlangıç pH'ında, % 10 inokulasyon oranında, inkübasyonun 5.gününde, 25 mM üre, 25 mM CaCl_2 ve 25 mM NaHCO_3 içeren ortamda 2248 ± 74 mg/L CaCO_3 çökelişi yaptığı tespit edildi. Çalışmada, CaCO_3 çökelişinin hücre gelişiminin ilk aşamasında başladığı ve üssel büyüme aşamasında da kalsiyum karbonat miktarının arttığı görüldü. Bakteriyel CaCO_3 çökelişinin gelişiminin durağan ve ölüm aşamalarında da devam ettiği gözlemlendi. Bakteriyel çökelişinin CaCO_3 olduğu XRD, XRF, CRS ve EPMA analizleri ile doğrulandı ve küçük kalsitlerle birlikte vateritlerin baskın olduğu görüldü. Bu sonuçlara ek olarak, iki farklı ortamdaki (KMO ve LB-üre) üreaz ve karbonik anhidraz protein seviyesinin spesifik aktiviteleri western blot analizi ile doğrulandı. Yerel suşumuzun ve kontrol organizmasının betonun basınç dayanımına ve kılcal su emmeye olan etkisi araştırıldı. Her iki bakterinin de beton dayanımına olumlu ve belirgin bir etkisi tespit edilemedi.

Sonuç olarak, yerel izolatımız, kalsiyum karbonat çökelişi ve enzim aktivitesi açısından literatürde ilgili çalışmalarda bakteriler ile yarışır özellikte olup, kalsiyum karbonat çökelişi açısından iyi bir potansiyele sahiptir. Özellikle gelişimin erken evresinden itibaren kalsiyum karbonat çökelişi yapması, hızlı enzim aktivitesini göstermiştir. Beton çalışmasında belirgin bir etki tespit edilmemesine rağmen, doğrudan betona ilave edilmek yerine immobilize sistemler geliştirilerek kendi kendini iyileştiren beton araştırmalarında, sıva/çatlak onarımında, yüzey kaplamada veya tarihi yapı restorasyonu gibi uygulama alanlarında yerel izolatlarımızın kullanım potansiyellerinin ortaya konması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

Achal, V., Pan, X. and Zhang, D., “Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1 based on microbially induced calcite precipitation”, *Ecol. Eng.* 37, 1601–1605. (2011).

Achal, V., Mukerjee, A., & Reddy, M. S., “Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures”, *Constr. Build. Mater.*, 48, 1-5. (2013).

Achal V. and Pan X., “Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2”, *Appl Biochem Biotechnol* 173, 307–317. (2014).

Achal, V., Kawasaki, S., “Biogrout: a novel binding material for soil improvement and concrete repair”. *Front. Microbiol.*, 7, 314. (2016).

Akyol E., Bozkaya Ö., Doğan N.M., “Strengthening sandy soils by microbial methods”, *Arab. J. Geosci.*, 10(15), 1-8. (2017).

Al-Ansari, M., Abu-Taqa, A. G., Hassan, M. M., Senouci, A., Milla, J., “Performance of modified self-healing concrete with calcium nitrate microencapsulation”, *Const. Build. Mater.*, 149, 525-534. (2017).

Algaifi, H. A., Bakar, S. A., Alyousef, R., Sam, A. R. M., Ibrahim, M. W., Shahidan, S., Salami, B. A, Bio-inspired self-healing of concrete cracks using new *B. pseudomycooides* species. *J. Mater. Res. Technol*, 12, 967-981. (2021).

American Public Health Association (APHA), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th Ed. American Public Health Association, Washington, DC. (1989).

Al-Salloum, Y., Abbas, H., Sheikh, Q. I., Hadi, S., Alsayed, S., Almusallam, T., "Effect of some biotic factors on microbially-induced calcite precipitation in cement mortar", *Saudi J. Biol. Sci.*, 24(2), 286-294. (2017).

Al-Qabany, A., Soga, K., Santamarina, C., "Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation", *J. Geotech. Geoenviron.*, 138(8), 992-1001. (2012).

Al-Thawadi, S., Cord-Ruwisch, R., "Calcium carbonate crystals formation by ureolytic bacteria isolated from Australian soil and sludge". *J. Adv. Sci. Eng. Res.*, 2(1), 12-26. (2012).

Amaarokoon, G.N.N.N., Kawasaki, S., "Factors Affecting Sand Solidification Using MICP with *Pararhodobacter* sp.", *Mater. Trans.*, M-M2017849. (2017).

Amidi, S., Wang, J., "Surface treatment of concrete bricks using calcium carbonate precipitation", *Const. Build. Mater.*, 80, 273-278. (2015).

Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., So, J. S., "Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications" *Springerplus*, 5(1), 1-26. (2016).

Andalib, R., Abd Majid, M. Z., Hussin, M. W., Ponraj, M., Keyvanfar, A., Mirza, J., Lee, H. S., "Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete", *Const. Build. Mater.*, 118, 180-193. (2016).

Arınc, E., Arslan, Ş., Bozcaarmutlu, A., Adalı, O., "Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung", *Food. Chem. Toxicol.* 45(1), 107-118. (2007).

Arias, J. L., Fernández, M. S., "Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization", *Chem. Rev.*, 108(11), 4475-4482. (2008).

Armstrong, J.M., Myers, D.V, Verpoorte, J.A., Edsall, J.T. “Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases”, *J. Biol. Chem.* 241(21), 5137-5149. (1966).

Arpajirakul, S., Pungrasmi, W., Likitlersuang, S., “Efficiency of microbially-induced calcite precipitation in natural clays for ground improvement”, *Constr. Build. Mater.*, 282, 122722. (2021).

Azmi, M. S., Lin, T. S., Tajarudin, H. A., Makhtar, M. M. Z., Daud, Z., “Characterisation of Calcium Carbonate Formed by *Bacillus sphaericus* Using Urea”, *Int. J. Integr. Eng.*, 10(9), (2018).

Bai, Y., Guo, X., Li, Y., Huang, T., “Experimental and visual research on the microbial induced carbonate precipitation by *Pseudomonas aeruginosa*”, *AMB Express* 7, 57. (2017).

Bang, S. S., Galinat, J. K., Ramakrishnan, V., “Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*”, *Enzyme Microb. Technol.*, 28(4-5), 404-409. (2001).

Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Ona-Nguema, G., Skouri-Panet, F., Ferard, C., “Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization”. *Comptes Rendus Geosc.*, 343(2-3), 160-167. (2011).

Bernardi, D., DeJong, J. T., Montoya, B. M., Martinez, B. C., “Bio-bricks: Biologically cemented sandstone bricks”, *Constr. Build. Mater.*, 55, 462-469. (2014).

Bhattacharyya, R., Prakash, V., Kundu, S., Srivastva, A. K., Gupta, H. S., Mitra, S., “Long term effects of fertilization on carbon and nitrogen sequestration and aggregate associated carbon and nitrogen in the Indian sub-Himalayas”, *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 86(1), 1-16. (2010).

Bundur, Z. B., Kirisits, M. J., Ferron, R. D., “Biomaterialized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength”, *Cem. Conc. Res.*, 67, 237-245. (2015).

Burne, R. A., Chen, Y. Y. M., “Bacterial ureases in infectious diseases”, *Microbes and Infection*, 2(5), 533-542. (2000).

Castanier, S., Le Metayer-Levrel G., Perthuisot, J. P., “Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiogeologist point of view”, *Sediment Geol* 126, 9–23. (1999).

Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., Balagurusamy, N., “Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: microbiological and molecular concepts”, *Front. Mater. Sci.*, 6, 126. (2019).

Chahal, N., Siddique, R., Rajor, A., “Influence of Bacteria on the Compressive Strength, Water Absorption and Rapid Chloride Permeability of Fly Ash Concrete”, *Const. Build. Mater.*, 28, 351-356. (2012).

Chaparro-Acuña S.P., Becerra-Jiménez M.L., Martínez-Zambrano J.J., Rojas-Sarmiento H.A., “Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process”, *Acta Agron.* 67 (2), 277-288. (2018).

Charpe, A. U., Latkar, M. V., Chakrabarti, T., “Microbially assisted cementation—A biotechnological approach to improve mechanical properties of cement”, *Const. Build. Mater.*, 135, 472-476. (2017).

Chaturvedi, S., Chandra, R., Rai, V., “Isolation and characterization of *Phragmites australis* (L.) rhizosphere bacteria from contaminated site for bioremediation of colored distillery effluent”. *Ecol.Eng.*, 27(3), 202-207. (2006).

Chekroun, K. B., Rodríguez-Navarro, C., González-Muoz, M.T., “Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by *Myxococcus xanthus*: implications for recognition of bacterial carbonates”, *J. Sediment. Res.*, 74, 868–876. (2004)

Chen, L., Shen, Y., Xie, A., Huang, B., Jia, R., Guo, R., Tang, W., “Bacteria-mediated synthesis of metal carbonate minerals with unusual morphologies and structures”. *Crys Growth Des* 9, 743–754. (2009).

Chen, H. J., Peng, C. F., Tang, C. W., Chen, Y. T. “Self-healing concrete by biological substrate”, *Materials*, 12(24), 4099. (2019).

Chen, H. J., Chen, M. C., Tang, C. W. “Research on Improving Concrete Durability by Biomineralization Technology”, *Sustainability*, 12(3), 1242. (2020).

Cheng, L., Shahin, M. A., Cord-Ruwisch, R., “Bio-cementation of sandy soil using microbially induced carbonate precipitation for marine environments”, *Géotechnique*, 64(12), 1010-1013. (2014).

Cheng, L., Shahin, M. A., Cord-Ruwisch, R., “Bio-cementation of sandy soil using microbially induced carbonate precipitation for marine environments”. *Géotechnique*, 64(12), 1010-1013. (2014).

Choi, S. G., Wang, K., Wen, Z., Chu, J., “Mortar crack repair using microbial induced calcite precipitation method”, *Cem. Conc. Compos.*, 83, 209-221. (2017).

Christensen W.B., “Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and para colon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types”, *J. Bacteriol.* 52(4), 461. (1946).

Chunxiang, Q., Jianyun, W., Ruixing, W., Liang, C., “Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO₃ by *Bacillus pasteurii*”. *Mater. Sci. Eng., C*, 29(4), 1273-1280. (2009).

Daskalakis, M. I., Rigas, F., Bakolas, A., Magoulas, A., Kotoulas, G., Katsikis, I., Mavridou, A., “Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece”, *Int. Biodeterior.*, 99, 73-84. (2015).

DeJong, J. T., Fritzges, M. B., Nüsslein, K., “Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear”, *J. Geotech. Geoenviron.*, 132(11), 1381-1392. (2006).

DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C., Nelson, D. C., “Bio-mediated soil improvement”, *Ecol. Eng.*, 36(2), 197-210. (2010).

De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., Verstraete, W., “Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone”, *Ecol Eng*, 36(2), 99–111. (2010).

Dhami N.K., Reddy M.S., Mukherjee A., “Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites”, *J Microbiol Biotechnol*. 23(5), 707-14. (2013).

Douglas, S., Beveridge, T. J., “Mineral formation by bacteria in natural microbial communities” *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26(2), 79-88. (1998).

Ducasse-Lapeyresse, J., Gagné, R., Lors, C., Damidot, D., “Effect of calcium gluconate, calcium lactate, and urea on the kinetics of self-healing in mortars”, *Const. Build. Mater.*, 157, 489-497. (2017).

Dupraz, C., Visscher, P. T., “Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats”, *Trends Microbiol.*, 13(9), 429-438. (2005).

Dupraz, S., Parmentier, M., Ménez, B., Guyot, F., “Experimental and numerical modeling of bacterially induced pH increase and calcite precipitation in saline aquifers”, *Chem. Geol.*, 265(1-2), 44-53. (2009).

Ercole, C., Bozzelli, P., Altieri, F., Cacchio, P., Del Gallo, M., “Calcium carbonate mineralization: involvement of extracellular polymeric materials isolated from calcifying bacteria”, *Microsc. Microanal.*, 18(4), 829-839. (2012).

Ersan Y.Ç., Da Silva F.B., Boon N., Verstraete W., De Beli N., “Screening of bacteria and concrete compatible protection materials”, *Const. Build. Mater.* 88, 196–203. (2015).

Ey, P.L., 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., Mourits F.M., “Bacteriogenic mineral plugging”, *J. Can. Pet. Technol.*, 35, 56. (1996).

Ferris, F.G., Phoenix, V., Fujita, Y., Smith, R.W., “Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20°C in artificial groundwater”, *Geochim Cosmochim Acta*, 68(8), 1701–1722. (2004).

Fujita, Y., Redden, G. D., Ingram, J. C., Cortez, M. M., Ferris, F. G., Smith, R. W., “Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis”. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 68(15), 3261-3270. (2004).

Fujita, Y., Taylor, J. L., Gresham, T. L., Delwiche, M. E., Colwell, F. S., McLing, T. L., Smith, R. W., “Stimulation of microbial urea hydrolysis in groundwater to enhance calcite precipitation”, *Environ. Sci. Technol.*, 42(8), 3025-3032. (2008).

Ganendra, G., De Muynck, W., Ho, A., Arvaniti, E. C., Hosseinkhani, B., Ramos, J. A., Boon, N., “Formate oxidation-driven calcium carbonate precipitation by *Methylocystis parvus* OBBP”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(15), 4659-4667. (2014).

Garrit, M. G., *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology* (Eds) Volume 2, Baltimore, MD. (2005).

Gat, D., Ronen, Z., Tsesarsky, M., “Long-term sustainability of microbial-induced CaCO₃ precipitation in aqueous media”, *Chemosphere*, 184, 524-531. (2017).

Gavimath, C. C., Mali, B. M., Hooli, V. R., Mallpur, J. D., Patil, A. B., Gaddi, D., Ravishankera, B. E., “Potential application of bacteria to improve the strength of cement concrete”, *International journal of advanced biotechnology and research*, 3(1), 541-544. (2012).

Gorospe C.M., Han S.H., Kim S.G., Park J.Y., Kang C.H., Jeong J.H., So J.S., “Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558”, *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 18, 903–908. (2013).

Gupta, S., Kua, H. W., Dai Pang, S., “Healing cement mortar by immobilization of bacteria in biochar: An integrated approach of self-healing and carbon sequestration”, *Cem. Conc. Compos.*, 86, 238-254. (2018).

Hammes, F. and Verstraete, W., “Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation”, *Rev. Sci. Biotechnol.* 1, 3–7. (2002).

Hammes, F., Seka, A., De Knijf, S., Verstraete, W., “A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater”, *Water Res.*, 37, 699–704. (2003).

Hamzah, M. O., Golchin, B., Tye, C. T. “Determination of the optimum binder content of warm mix asphalt incorporating Rediset using response surface method”, *Constr. Build. Mater.*, 47, 1328-1336. (2013).

Harkes, M. P., van Paassen, L. A., Booster, J. L., Whiffin, V. S., van Loosdrecht, M.C.M. “Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement”, *Ecol Eng*, 36 (2), 112–117. (2010).

Hendriks, C., Graus, W., van Bergen, F., “Global carbon dioxide storage potential and costs”, *Ecofys, Utrecht*, 64. (2004).

Henze, J., Randall, D. G., “Microbial induced calcium carbonate precipitation at elevated pH values (> 11) using *Sporosarcina pasteurii*”, *J. Environ. Chem. Eng.*, 6(4), 5008-5013. (2018).

Herzog, H. J., Drake, E. M., “Carbon dioxide recovery and disposal from large energy systems”, *Annual review of energy and the environment*, 21(1), 145-166. (1996).

Hsu, C. M., Huang, Y. H., Nimje, V. R., Lee, W. C., Chen, H. J., Kuo, Y. H., Chen, C. Y., “Comparative study on the sand bioconsolidation through calcium carbonate precipitation by *sporosarcina pasteurii* and *bacillus subtilis*”, *Crystals*, 8(5), 189. (2018).

Jauberthie, R., Rendell, F., “Physicochemical study of the alteration surface of concrete exposed to ammonium salts”. *Cem. Conc. Res.*, 33(1), 85-91. (2003).

Jiang, N. J., Yoshioka, H., Yamamoto, K., Soga, K., “Ureolytic activities of a urease-producing bacterium and purified urease enzyme in the anoxic condition: Implication for subsurface sand production control by microbially induced carbonate precipitation (MICP)”, *Ecol. Eng.*, 90, 96-104. (2016).

Jongvivatsakul, P., Janprasit, K., Nuaklong, P., Pungrasmi, W., Likitlersuang, S., “Investigation of the crack healing performance in mortar using microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) method”, *Const. Build. Mater.*, 212, 737-744. (2019).

Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Çopuroğlu, O., Schlangen, E. A., “Application of Bacteria as a Self-Healing Agent for the Development of Sustainable Concrete”, *Ecol. Eng.*, 36, 230-235. (2010).

Jroundi, F., Gonzalez-Muñoz, M. T., Garcia-Bueno, A., Rodriguez-Navarro, C., “Consolidation of archaeological gypsum plaster by bacterial biomineralization of calcium carbonate”, *Acta biomater.*, 10(9), 3844-3854. (2014).

Karimi, N., Mostofinejad, D., “*Bacillus subtilis* bacteria used in fiber reinforced concrete and their effects on concrete penetrability”. *Constr. Build. Mater.*, 230, 117051. (2020).

Kawaguchi, T., Decho, A. W., “A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO₃ polymorphism”, *J.Cryst. Growth.* , 240(1-2), 230-235. (2002).

Khamehchiyan, M., Rowshanbakht, K., Reza Nikudel, M., H Sajedi, R., “Biological improvement of sandy soil by microbial induced carbonate precipitation”. *Journal of Kerbala University*, 8(3), 100-110. (2012).

Krishnapriya, S., Babu, D. V., “Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete”. *Microbial. Res.*, 174, 48-55. (2015).

Khushnood, R. A., Qureshi, Z. A., Shaheen, N., Ali, S., “Bio-mineralized self-healing recycled aggregate concrete for sustainable infrastructure”, *Sci.Total Environ.*, 703, 135007. (2020).

Lee, Y.N. “Calcite Production by *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01”. *J.Mikrobiol.*, 41, 4, 345-348. (2003).

Lee, Y. S., Park, W., “Current challenges and future directions for bacterial self-healing concrete”, *Appl. Microbial.biotechnol.*, 102(7), 3059-3070. (2018).

Li, M., Cheng, X., Guo, H., “Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil”. *Int. Biodeter. Biodeg.* 76, 81–85. (2013).

Liang, S., Chen, J., Niu, J., Gong, X., Feng, D. “Using recycled calcium sources to solidify sandy soil through microbial induced carbonate precipitation. *Mar. Georesources & Geotech.*, 38(4), 393-399. (2020).

Lors, C., Ducasse-Lapeyrousse, J., Gagné, R., Damidot, D., “Microbiologically induced calcium carbonate precipitation to repair microcracks remaining after autogenous healing of mortars”, *Constr. Build. Mater.*, 141, 461-469. (2017).

Lowenstam, H. A., “Minerals formed by organisms”, *Science*, 211(4487), 1126-1131. (1981).

Lowenstam, H. A., Weiner, S., “Mineralization by organisms and the evolution of biomineralization”, *Biomineralization And Biological Metal Accumulation*, 191-203, Springer, Dordrecht. (1983).

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., “Protein measurement with the folin phenol reagent”. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265-275. (1951).

Ma, L., Pang, A. P., Luo, Y., Lu, X., Lin, F., “Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii*”, *Microb. Cell Fact.*, 19(1), 1-12. (2020).

Mahanty, B., Kim, S., Kim, C. G., “Assessment of a biostimulated or bioaugmented calcification system with *Bacillus pasteurii* in a simulated soil environment”, *Microb. Ecol.* 65(3), 679-688. (2013).

Maheswaran, S., Dasuru S.S., Rama Chandra Murthy A., Bhuvaneshwari B., Ramesh Kumar V., Palani G.S., Iyer N.R., Krishnamoorthy S., Sandhya S. “Strength improvement studies using new type wild strain *Bacillus cereus* on cement mortar”, *Curr. Sci.*, 106(1), 50-57. (2014).

Marín, S., Cabestrero, O., Demergasso, C., Olivares, S., Zetola, V., Vera, M., “An indigenous bacterium with enhanced performance of microbially-induced Calcium carbonate biomineralization under extreme alkaline conditions for concrete and soil-improvement industries”, *Acta Biomater.* 120, 304-317. (2021).

Marvasi, M., Visscher, P. T., Perito, B., Mastromei, G., Casillas-Martínez, L., “Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* etfA mutant”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 71(3), 341-350. (2010).

McConnaughey, T. A., Whelan, J. F., “Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake”, *Earth-Sci. Rev.*, 42(1-2), 95-117. (1997).

Mitchell A.C., Ferris F.G., “The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: temperature and kinetics dependence”, *Geochim. Gosmochim. Acta.* 69, 4199–4210. (2005).

Mobley, H., Hausinger, R. “Microbial ureases: Significance, Regulation and Molecular Characterisation”, *Microbiol Rev*, 52(1), 85–108. (1989).

Mohebbi, M. M., Habibagahi, G., Niazi, A., Ghahramani, A., “A laboratory investigation of suppression of dust from wind erosion using biocementation with *Bacillus amyloliquefaciens*”, *Scientia Iranica*, 26(5), 2665-2677. (2019).

Mondal, S., Ghosh, A. D.,”Investigation into the optimal bacterial concentration for compressive strength enhancement of microbial concrete”. *Const. Build. Mater.*, 183, 202-214. (2018).

Mortensen, B. M., Haber, M. J., DeJong, J. T., Caslake, L. F., Nelson, D. C., “Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation”, *J. Appl. Microbiol.*, 111(2), 338-349. (2011).

Mudgil, D., Baskar, S., Baskar, R., Paul, D., Shouche, Y.S., “Biomining potential of *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus stabekisii* and *Staphylococcus epidermidis* strains in vitro isolated from Speleothems, Khasi Hill Caves, Meghalaya, India”, *Geomicrobiol.* 35(8), 675-694. (2018).

Nain, N., Surabhi, R., Yathish, N. V., Krishnamurthy, V., Deepa, T., Tharannum, S. “Enhancement in strength parameters of concrete by application of *Bacillus* bacteria”, *Const. Build. Mater.*, 202, 904-908. (2019)

Nathan, V. K., Ammini, P., “Carbon Dioxide Sequestering Ability of Bacterial Carbonic Anhydrase in a Mangrove Soil Microcosm and Its Bio-mineralization Properties”, *Water, Air, Soil. Pollut.*, 230(8), 1-12. (2019).

Nguyen, T. H., Ghorbel, E., Fares, H., Cousture, A., “Bacterial self-healing of concrete and durability assessment”, *Cem. Cont. Compos.*, 104, 103340. (2019).

Noeiaghahi, T., Mukherjee, A., Dhama, N., Chae, S. R., “Biogenic deterioration of concrete and its mitigation technologies”, *Constr. Build Mater.*, 149, 575-586. (2017).

Nonakaran, S. H., Pazhouhandeh, M., Keyvani, A., Abdollahipour, F. Z., Shirzad, A., “Isolation and identification of *Pseudomonas azotoformans* for induced calcite precipitation”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 31(12), 1993-2001. (2015).

Okwadha, G.D.O., Li, J. “Optimum conditions for microbial carbonate precipitation”, *Chemosphere*, 81(9), 1143–1148. (2010).

Okuy, T. O., Rodrigues, D. F., “Optimized carbonate micro-particle production by *Sporosarcina pasteurii* using response surface methodology”. *Ecol. Eng.*, 62, 168-174. (2014).

Omeregic, A.I., Khoshdelnezamiha, G., Senian, N., Ong, D.E.L., Nissom, P.M., “Experimental optimisation of various cultural conditions on urease activity for isolated *Sporosarcina pasteurii* strains and evaluation of their biocement potentials”, *Ecol. Eng.* 109, 65–75. (2017).

Otlewska, A., Gutarowska, B., “Environmental parameters conditioning microbially induced mineralization under the experimental model conditions”, *Acta Biochim. Pol.*, 63(2), 343-351. (2016).

Pacheco-Torgal, F., Labrincha, J. A., “The future of construction materials research and the seventh UN Millennium Development Goal: A few insights”, *Const. Build. Mater.*, 40, 729-737. (2013).

Pachaivannan, P., Hariharasudhan, C., Mohanasundram, M., Bhavani, M. A. “Experimental analysis of self healing properties of bacterial concrete”, *Mater. Today: Proc.*, 33, 3148-3154. (2020).

Pan, L., Li, Q., Zhou, Y., Song, N., Yu, L., Wang, X., .Huo, J., “Effects of different calcium sources on the mineralization and sand curing of CaCO₃ by carbonic anhydrase-producing bacteria”. *RSC Advances*, 9(70), 40827-40834. (2019).

Phang, I. R. K., San Chan, Y., Wong, K. S., Lau, S. Y., “Isolation and characterization of urease-producing bacteria from tropical peat”. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 13, 168-175. (2018).

Phillips, A.J., Gerlach, R., Lauchnor, E., Mitchell, A.C., Cunningham, A. B., Spangler, L., “Engineered applications of ureolytic biomineralization:a review”, *Biofouling*, 29(6), 715–33. (2013).

Prasad, C. V. S. R., Lakshmi, T. V. “Effect of *Bacillus subtilis* on abrasion resistance of Bacterial Concrete”, *Int. J. App. Eng. Res.*, 13(16), 12663-12666. (2018).

Priest, F. G., “Systematics and ecology of Bacillus. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics”, 1-16. (1993).

Priyom, S. N., Islam, M. M., Shumi, W. “The Utilization of *Bacillus Subtilis* Bacteria to Improve the Mechanical Properties of Concrete”, *J. Civ. Eng.* 7(1), 97-108. (2021).

Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V., Bang, S.S., “Remediation of concrete using micro-organisms”, *ACI Mater J* 1, 3–9. (2001).

Ramanan, R., Krishnamurthi K., Vinayagamoorthy, N., Rankumar, K. M., Sivanesan, S. D., Chakrabati, T., “Purification and characterization of a novel plant-type carbonic anhydrase from *Bacillus subtilis*”, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 14, 32-37. (2009).

Rangamaran, V. R., Shanmugam, V. K., “Biocalcification by piezotolerant *Bacillus* sp. NIOTVJ5 isolated from deep sea sediment and its influence on the strength of concrete specimens”, *Marine Biotech.*, 21(2), 161-170. (2019).

Raut, H. S., Sarode, D. D., Lele, S. S., “Biocalcification using *B. Pasteurii* for strengthening brick masonry civil engineering structures”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 191-200. (2013).

Rauner, N., Meuris, M., Dech, S., Godde, J., Tiller, J. C., “Urease-induced calcification of segmented polymer hydrogels—A step towards artificial biomineralization”, *Acta biomater.*, 10(9), 3942-3951. (2014).

Reddy, S., Rao, M., Aparna, P., Sasikala, C. H., “Performance of standard grade bacterial (*Bacillus subtilis*) concrete”, *Asian J. Civ. Eng. (Build Housing)*, 11, 43-55. (2010).

Riveros, G. A., Sadrekarimi, A., “Liquefaction resistance of Fraser River sand improved by a microbially-induced cementation”, *Soil. Dyn. Earthq. Eng.*, 131, 106034. (2020).

Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K.B., Gonzalez-Munoz, M.T., “Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* induced carbonate biomineralization”, *Applied and Environ. Microbiol.* 69, 2182–2193. (2003).

Salmasi, F., Mostofinejad, D., “Investigating the effects of bacterial activity on compressive strength and durability of natural lightweight aggregate concrete reinforced with steel fibers”, *Constr. Build. Mater.*, 251, 119032. (2020).

Sarda, D., Choonia, H. S., Sarode, D. D., Lele, S. S., “Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36(8), 1111-1115. (2009).

Suliman, M. F., Sarsam, S. I. “Behavior of Bacterial Concrete under Freezing and Thawing Cycles”, *J. Adv. Civ. Eng. Const. Mater.*, 1(1), 40-50. (2018).

Schultze-Lam, S., Fortin, D., Davis, B. S., Beveridge, T. J., "Mineralization of bacterial surfaces", *Chemical Geology*, 132(1-4), 171-181. (1996).

Seifan, M., Samani, A. K., Berenjian, A., "Induced calcium carbonate precipitation using *Bacillus* species", *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 100(23), 9895-9906. (2016).

Seifan, M., Berenjian, A., "Application of microbially induced calcium carbonate precipitation in designing bio self-healing concrete", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 34(11), 1-15. (2018).

Sensoy, T., Bozbeyoglu, N.N., Dogan, N.M., Bozkaya, O., Akyol, E., "Characterization of Calcium Carbonate Produced by ureolytic bacteria (*Sporocarcina pasteurii* ATCC 6453 and *Bacillus aerius* U2) and Effect of Environmental Conditions on Production of Calcium Carbonate", *15th International Conference on Environmental Science and Technology*. (2017).

Shaffer, G., "Long-term effectiveness and consequences of carbon dioxide sequestration", *Nat. Geosci*, 3(7), 464-467. (2010).

Shaheen, N., Khushnood, R. A., Khaliq, W., Murtaza, H., Iqbal, R., Khan, M. H., "Synthesis and characterization of bio-immobilized nano/micro inert and reactive additives for feasibility investigation in self-healing concrete", *Const. Build. Mater*, 226, 492-506. (2019).

Shahid, S., Aslam, M. A., Ali, S., Zameer, M., Faisal, M. "Self-healing of cracks in concrete using *Bacillus* strains encapsulated in sodium alginate beads", *Chemistry Select*, 5(1), 312-323. (2020).

Shanmuga-Priya, T., Ramesh, N., Agarwal, A., Bhusnur, S., Chaudhary, K., "Strength and durability characteristics of concrete made by micronized biomass silica and bacteria—*Bacillus sphaericus*", *Constr. Build. Mater*. 226, 827–838. (2019).

Siddique, R., Nanda, V., Kunal, Kadri, E.H., Khan, M.I., Singh, M., Rajor, A., “Influence of bacteria on compressive strength and permeation properties of concrete made with cement baghouse filter dust”, *Constr. Build. Mater.*, 106, 461–469. (2016).

Sierra-Beltran, M. G., Jonkers, H. M., Schlangen, E., “Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair”, *Const. Build. Mater.*, 67, 344-352. (2014).

Silver, S., Toth, K., Scribner, H., “Facilitated transport of calcium by cells and subcellular membranes of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.* 122, 880–885. (1975).

Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V., Li, Y., “Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand”. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(8), 1453-1460. (2013).

Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K., Bang, S.S., “Microbiological precipitation of CaCO₃”, *Soil. Biol. Biochem.* 31,1563–1571. (1999).

Soon, N.W., Lee, L.M., Khun, T.C., Ling, H.S., “Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite precipitation”, *KSCE J. Civ. Eng.*, 17(4), 718–728. (2013).

Qian, C., Pan, Q., Wang, R., “Cementation of sand grains based on carbonate precipitation induced by microorganism” *Sci. China Technol.*, 53(8), 2198-2206. (2010).

Qiu, J., Tng, D. Q. S., Yang, E. H., “Surface treatment of recycled concrete aggregates through microbial carbonate precipitation”, *Constr. Build. Mater.*, 57, 144-150. (2014).

Tai, C. Y., Chen, F. B., “Polymorphism of CaCO₃, precipitated in a constant-composition environment”, *AIChE Journal*, 44(8), 1790-1798. (1998).

Tang, C. S., Yin, L. Y., Jiang, N. J., Zhu, C., Zeng, H., Li, H., Shi, B., “Factors affecting the performance of microbial-induced carbonate precipitation (MICP) treated soil: a review”, *Environ. Earth Sci*, 79(5), 1-23. (2020).

Tepe, M., Arslan, Ş., Koralay, Doğan, N.M. “Precipitation and characterization of CaCO₃ of *Bacillus amyloliquefaciens* U17 strain producing urease and carbonic anhydrase”, *Turk. J. Biol.*, 43, 198-208. (2019).

Tiano, P., “Stone reinforcement by calcite crystal precipitation induced by organic matrix macromolecules”, *Stud. Conserv.*, 40(3), 171-176. (1995).

Thompson, J. B., Ferris, F. G., “Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water”, *Geology*, 18(10), 995-998. (1990).

Tourney, J., Ngwenya, B. T., “Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism”, *Chem. Geol.*, 262(3-4), 138-146. (2009).

Tredici, S. M., Buccolieri, A., Tanini, L., Calcagnile, M., Manno, D., Alifano, P., “Calcite-forming *Bacillus licheniformis* thriving on underwater speleothems of a hydrothermal cave”, *Geomicrobiol.*, 35(9), 804-817. (2018).

Vahabi, A., Ramezani pour, A. A., Sharafi, H., Zahiri, H. S., Vali, H., Noghabi, K. A., “Calcium carbonate precipitation by strain *Bacillus licheniformis* AK 01, newly isolated from loamy soil: a promising alternative for sealing cement-based materials”, *J. Basic. Microbiol.*, 55(1), 105-111. (2015).

Van Tittelboom, K., De Belie, N., De Muynck, W., Verstraete, W., “Use of bacteria to repair cracks in concrete”. *Cem. Concr. Res.*, 40(1), 157-166. (2010).

Vashisht, R., Shukla, A. “Potential application of bacteria to improve the self-healing and strength of concrete”, *Int. J. Build. Pathol. Rehab.*, 5(1), 1-13. (2020).

Wang, J., Becker, U., “Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO₃)”. *Am. Min.*, 94(2-3), 380-386. (2009).

Wang, J.Y., Soens, H., Verstraete, W., De Belie, N., “Self-healing Concrete by Use of Microencapsulated Bacterial Spores”, *Cem. Conc. Res.*, 56, 139-152. (2014).

Wang, L., Wang, J., Xu, Y., Chen, P., Yuan, J., Qian, X., “Novel surface treatment of concrete bricks using acid-resistance mineral precipitation”, *Const. Build. Mater.*, 162, 265-271. (2018).

Warren, L.A., Maurice, P.A., Parmar, N., Ferris, F.G., “Microbially mediated calcium carbonate precipitation: Implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants”, *Geomicrobiol. J.*, 18, 93–115. (2001).

Warthmann, R., van Lith, Y., Vasconcelos, C., McKenzie, J. A., Karpoff, A. M., “Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments”, *Geology*, 28(12), 1091-1094. (2000).

Weatherburn, M.W., “Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia”, *Anal. Chem.* 39(8), 971-974. (1967).

Whiffin, V.S., van Paassen, L.A., Harkes, M.P., “Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique”, *Geomicrobiol.*, 24(5), 417-423. (2007).

Wiktor, V., Jonkers, H. M., “Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete”. *Cem. and Concr. Comp.*, 33(7), 763-770. (2011).

World Health Organization. *Ammonia*. World Health Organization. (1986).

Wu, M., Hu, X., Zhang, Q., Xue, D., Zhao, Y., “Growth environment optimization for inducing bacterial mineralization and its application in concrete healing”, *Const. Build. Mater.*, 209, 631-643. (2019).

Wu, M., Hu, X., Zhang, Q., Cheng, W., Xue, D., Zhao, Y., “Application of bacterial spores coated by a green inorganic cementitious material for the self-healing of concrete cracks”, *Cem. Concr. Compos*, 113, 103718. (2020).

Xu, J., Wang, X., “Self-healing of concrete cracks by use of bacteria-containing low alkali cementitious material”, *Const. Build. Mater.*, 167, 1-14. (2018).

Yu, X., Qian, C., Xue, B., “Loose sand particles cemented by different bio-phosphate and carbonate composite cement”, *Const. Build. Mater.*, 113, 571-578. (2016).

Yu, X., Zhan, Q., Qian, C., Ma, J., Liang, Y., “The optimal formulation of bio-carbonate and bio-magnesium phosphate cement to reduce ammonia emission”, *J. Clean Prod.*, 240, 118156. (2019).

Zamarreño, D. V., Inkpen, R., May, E., “Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(18), 5981-5990. (2009).

Zhang, Y., Guo, H. X., Cheng, X. H., “Influences of calcium sources on microbially induced carbonate precipitation in porous media”, *Mater. Res. Innov.*, 18(sup2), S2-79. (2014).

Zhang, Z., Weng, Y., Ding, Y., Qian, S., “Use of genetically modified bacteria to repair cracks in concrete”, *Materials*, 12(23), 3912. (2019).

Zhao, Y., Ge, F., Yang, Y., “Factors affecting bio-cemented typical silt from middle and lower reaches of Yellow River”, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 304, No. 2, p. 022061). IOP Publishing. (2009).

7. EKLER

EK A-Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Üre Agar Besiyeri

1 g/L Pepton from meat, 1 g/L D (+) Glikoz, 5 g/L Sodyum Klorür, 2 g/L Potasyum Dihidrojen Fosfat, 0.012 g/L Fenol Red, 12 g/L Agar-Agar ile hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilir. Otoklav sonrası 45°C’ye soğutulup, üzerine 50 mL/L hesabıyla 0,22 µm çaplı şırınga filtresi ile steril edilmiş %40 üre çözeltisi eklenir, karıştırılır ve steril petrilere dökülür.

Triptik Soy Agar

15 g/L Pepton from kazein, 5 g/L Soya peptonu, 5 g/L Sodyum Klorür, 15 g/L Agar-Agar ile hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilir.

Kalsiyum Mineralizasyon Ortamı

3.0 g/l Nutrient Broth, 2,77 g/L Kalsiyum Klorür, 2 g/L Sodyum Bikarbonat ve 333 mM üreden oluşur. Ancak üre ısısı etkisi ile bozulacağından besiyerine otoklav sonrası 45°C’ye soğutulup eklenir. Besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilir.

Lauria-Bertani Besiyeri

10 g/L Tripton, 10 g/L Sodyum Klorür, 5 g/L Maya Ekstraktı ile hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilir.

EK B-Çalışmada Kullanılan Reaktif ve Kimyasallar

Stok Üre Çözeltisi

120,12 g üre 1 L dH₂O içerisinde çözülerek hazırlanır. 0,22 µm gözenek genişliğine sahip steril şırınga filtreden geçirilerek steril edilir.

5N Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi

104,2 mL %37 saflıkta HCl toplam hacim 250 ml olacak şekilde dH₂O ile hazırlanır.

5N Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi

20 g Sodyum Hidroksit 80 mL dH₂O içinde çözülür.

KMO Tampon Çözeltisi

1,179 g Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Disodyum Tuzu Dihidrat (Na₂EDTA.2H₂O, Sigma) ve 780 mg Magnezyum Sülfat Heptahidrat (MgSO₄.7H₂O, Merck) tartılarak 50 mL dH₂O'da çözülür. 16,9 g Amonyum Klorür (NH₄Cl) 143 mL yoğun Amonyum Hidroksit (NH₄OH, Merck) çözeltisine ilave edilerek 250 mL'ye dH₂O ile tamamlanır.

Standart EDTA Çözeltisi

3,723 g Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Disodyum Tuzu Dihidrat (Na₂EDTA.2H₂O, Sigma) 1000 mL dH₂O içerisinde çözülür.

10 mM Paranitrofenilasetat Çözeltisi (p-NPA)

0,091 g 4-nitrofenil Asetat (p-NPA, Sigma) 50 mL %100 Asetonitril (C₂H₃N, Sigma) içerisinde çözülerek hazırlanır.

Bazik Bakır Çözeltisi (1 pay reaktif 1, 1 pay reaktif 2 ve 100 pay reaktif 3)

Reaktif 1: %2 CuSO₄.5H₂O

Reaktif 2: %2 NaKC₄H₄O₆.4H₂O

Reaktif 3: %2 Na₂CO₃ (0,1 N NaOH içinde)

Lowry Reaktifi (1:1 oranında dH₂O: Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi)

Liziz Tamponu

1 mM Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF proteaz inhibitörü), 1 mM Aminokaproikasit (ϵ -ACA) içeren potasyum fosfat tamponudur.

Tris-Glisin Tamponu

144 g/L Glisin, 30 g/L Tris içeren tampondur.

Tris-buffered salin (TBST)

20 mL 1 M Tris-HCl ile pH 7.4'e ayarlanır 29,44 g/L NaCl, 0,5 ml Tween 20, % 5 yağsız süt tozu eklenerek dH₂O 1000 mL'e tamamlanır).

ALP Çözeltisi

2,67 mL TRIS tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

4 mL 1M NaCl

820 μ l MgCl₂ (100 mM)

40 μ l ZnCl₂ (100 mM)

96 μ l Diethanolamin

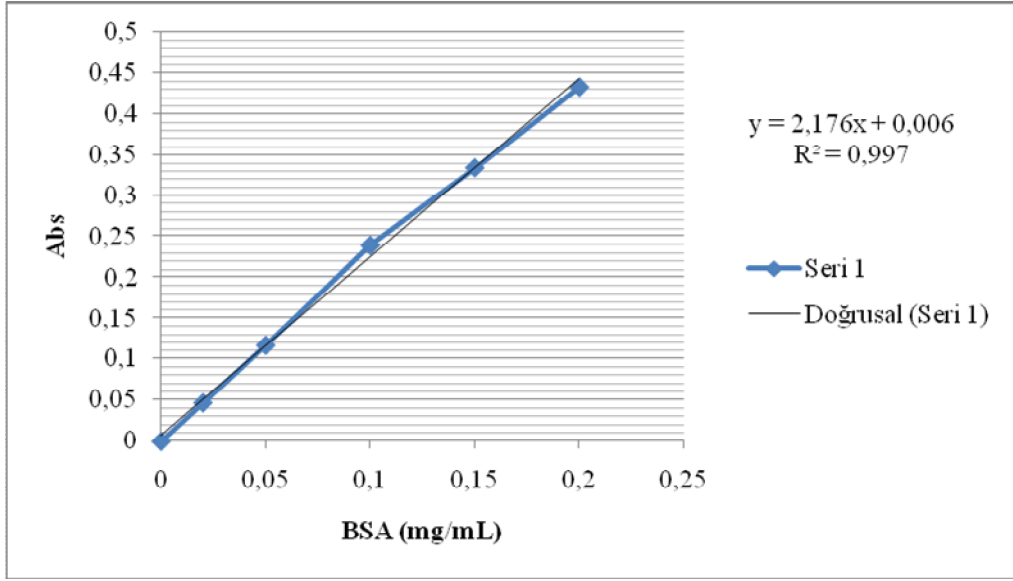
0,0122 g NBT (Nitrobluetetrazoliumchloride)

dH₂O (40 mL'ye tamamlanarak sature TRİS ile ph: 9,55'e ayarlanır)

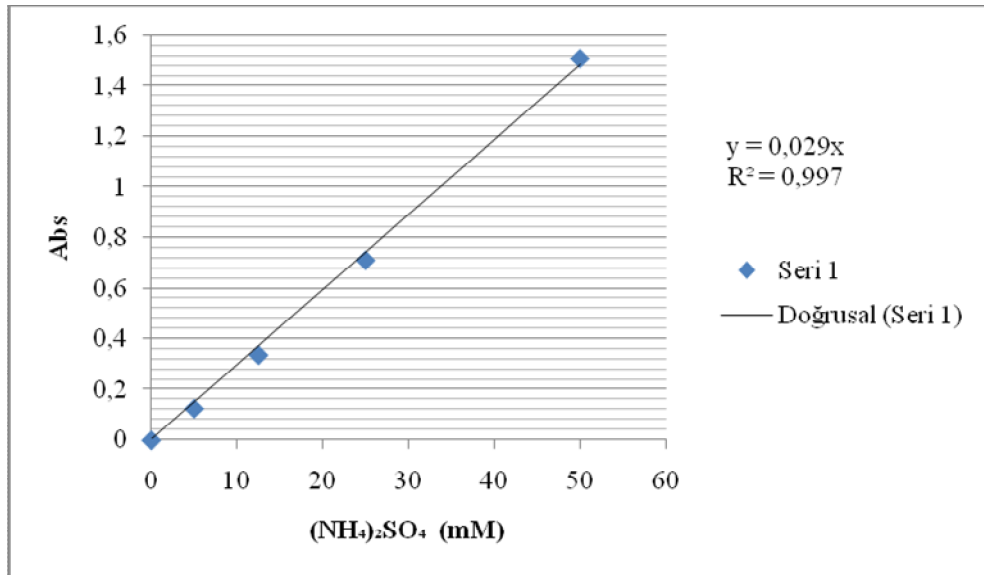
0,0054 g BCIP (5-brmo-4-chloro-3-indolyl)

0,0020 g Fenozin (1 mL dH₂O içerisinde çözünür, 270 μ l çözeltiye eklenir, ışığa karşı hassastır)

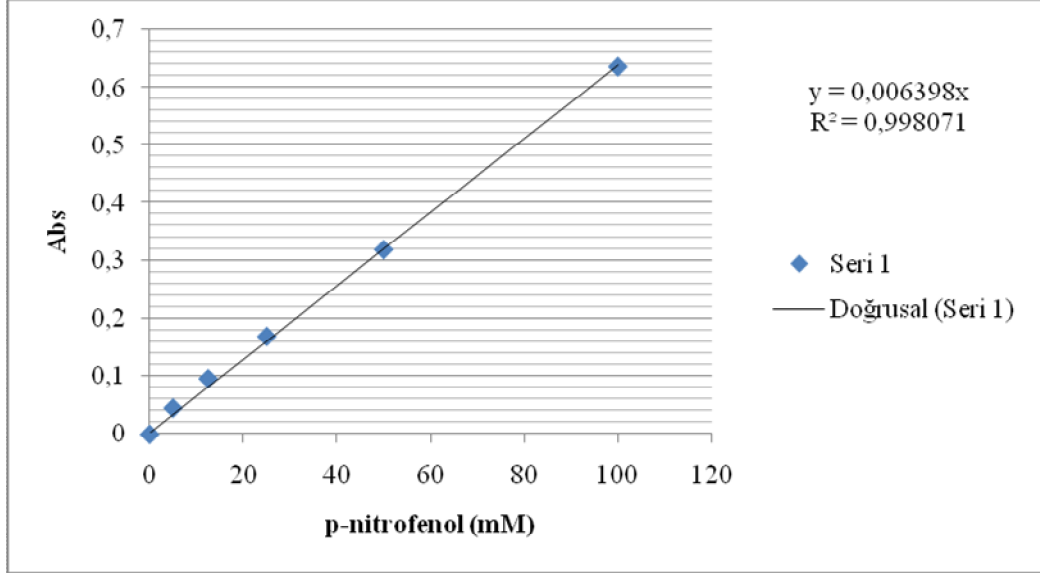
EK C-Enzim Deneylerinde Kullanılan Standart Kalibrasyon Eğrileri



BSA Standart Kalibrasyon Eğrisi



Amonyum Sülfat Standart Kalibrasyon Eğrisi



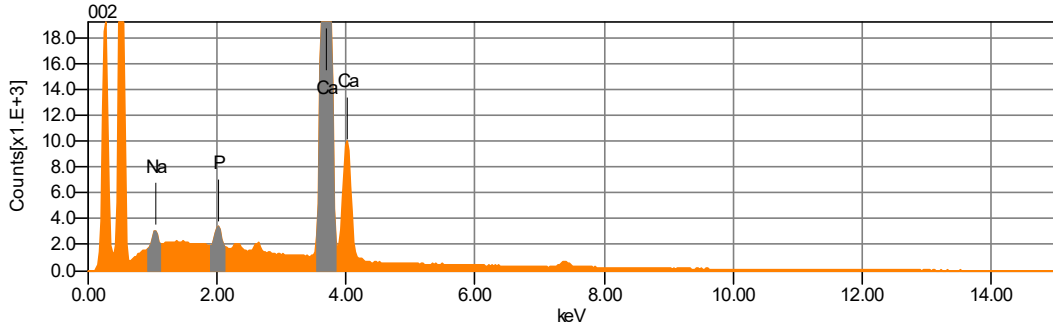
P-nitrofenol Standart Kalibrasyon Eğrisi

***Seri 1:** Farklı konsantrasyonlarda spektrofotometrik olarak okunan absorbans değerleri

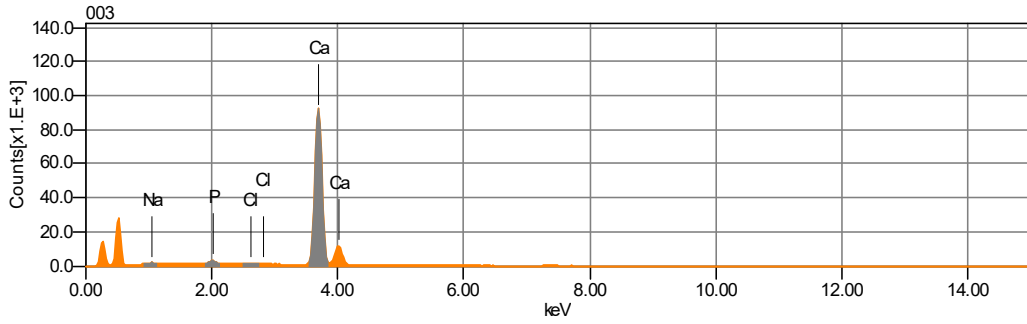
****Doğrusal Seri 1:** Artan konsantrasyonlarda spektrofotometrik olarak okunan absorbans değerlerinin lineer artışını gösteren doğru

EK D-EPMA Nokta ve Alan Analizleri

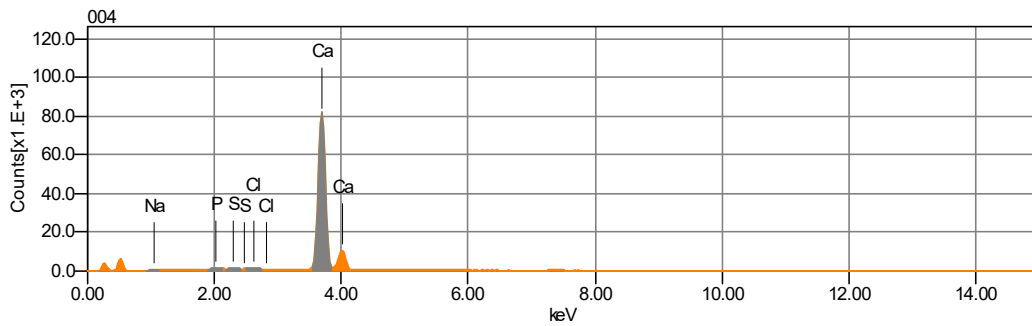
Farklı Kalsiyum Kaynakları ile Hazırlanan KMO Besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 Tarafından Üretilen CaCO_3 Kristallerinin EPMA Nokta ve Alan Analizleri



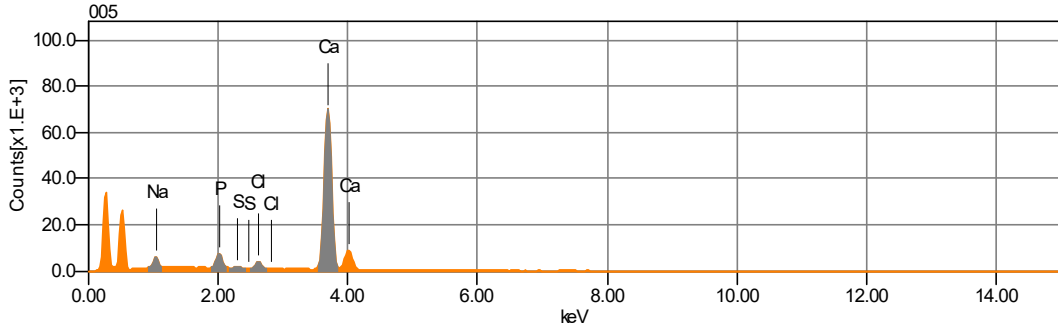
25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.20'ye ait veriler)



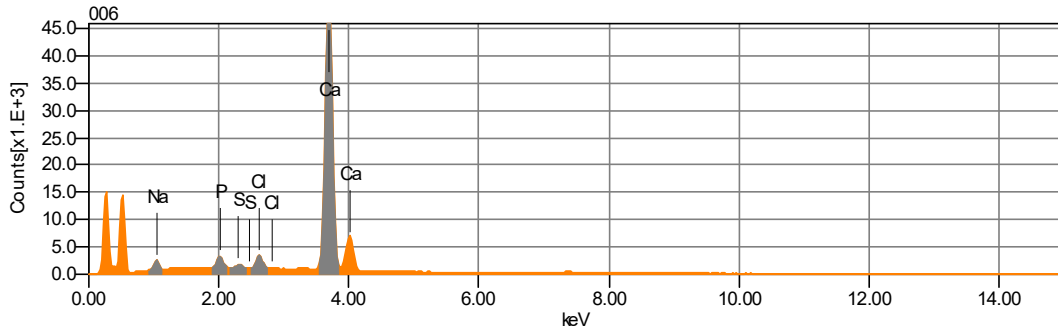
25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 3 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.20'ye ait veriler)



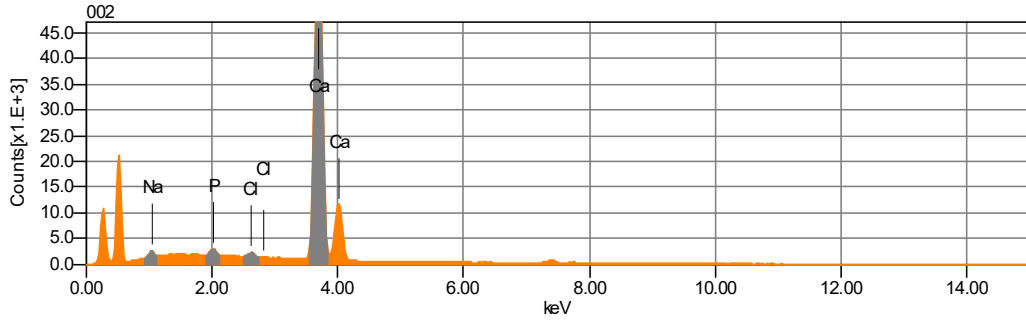
25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 4 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.20'ye ait veriler)



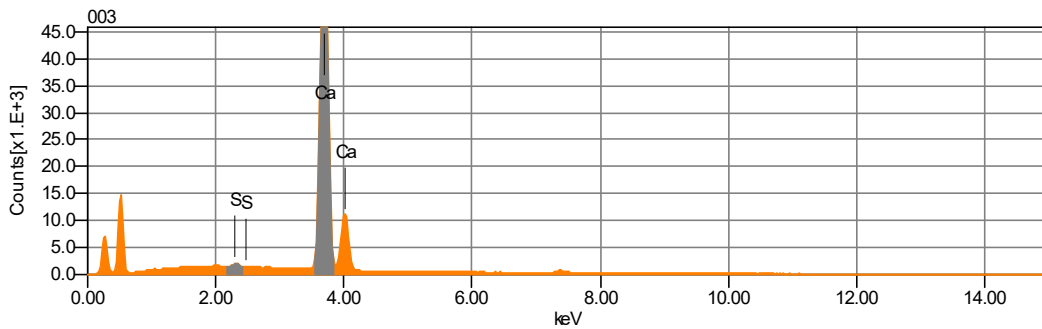
25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 5 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.20'ye ait veriler)



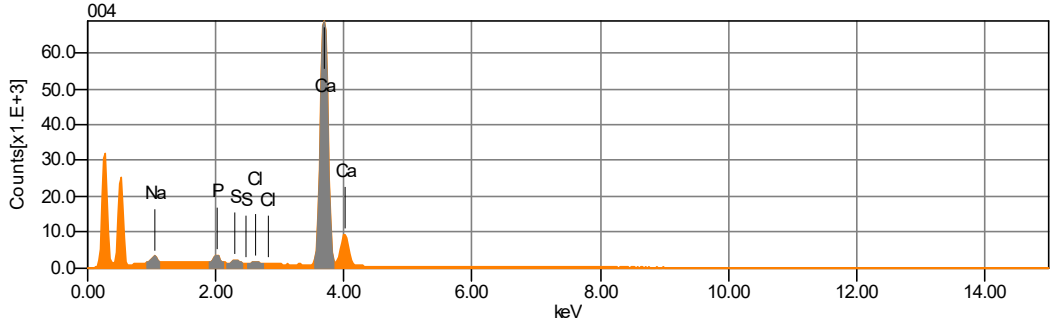
25 mM kalsiyum laktat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 6 nolu alan EPMA analizi (Şekil 4.20'ye ait veriler)



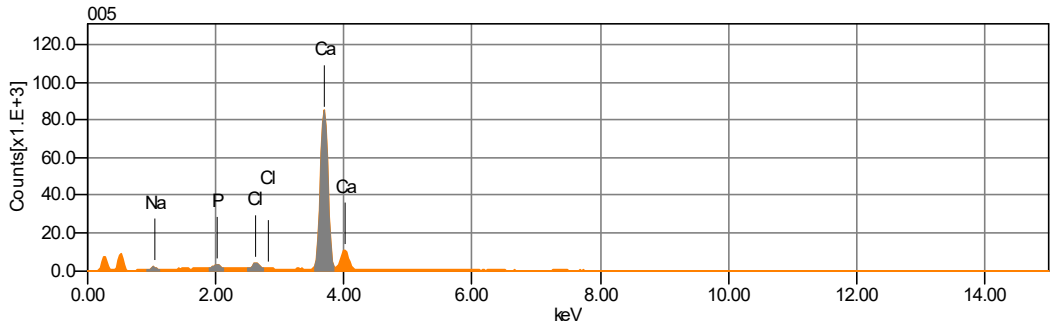
25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.21'e ait veriler)



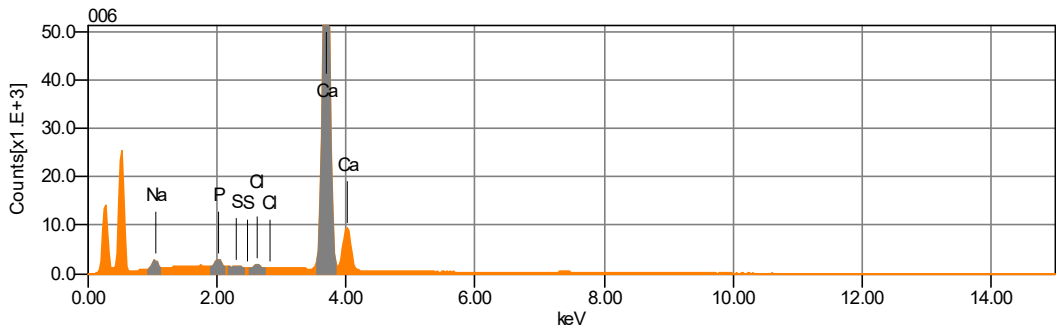
25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 3 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.21'e ait veriler)



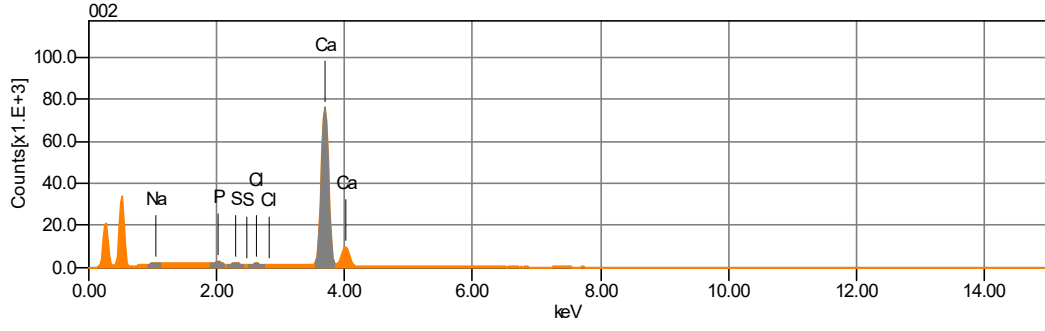
25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 4 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.21'e ait veriler)



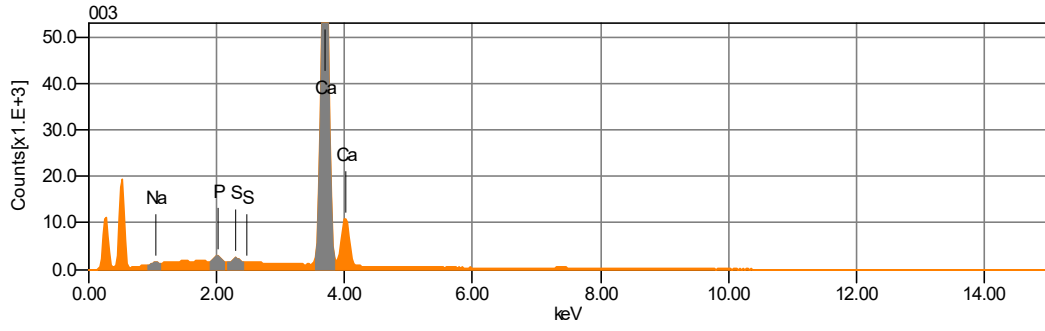
25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 5 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.21'e ait veriler)



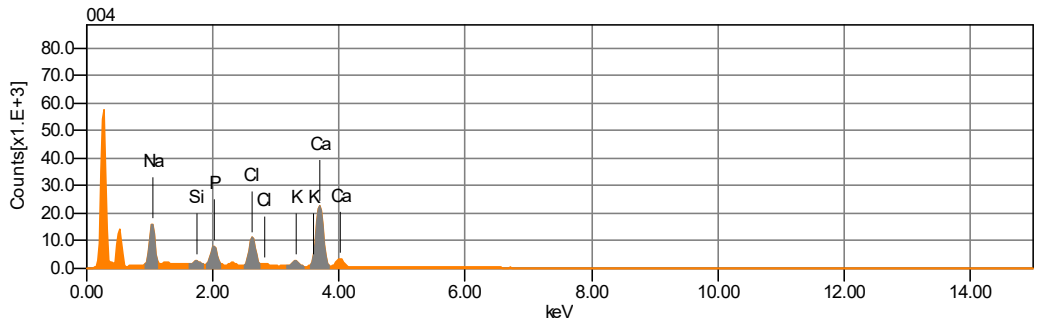
25 mM kalsiyum nitrat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 6 nolu alan EPMA analizi (Şekil 4.21'e ait veriler)



25 mM kalsiyum asetat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.24'e ait veriler)

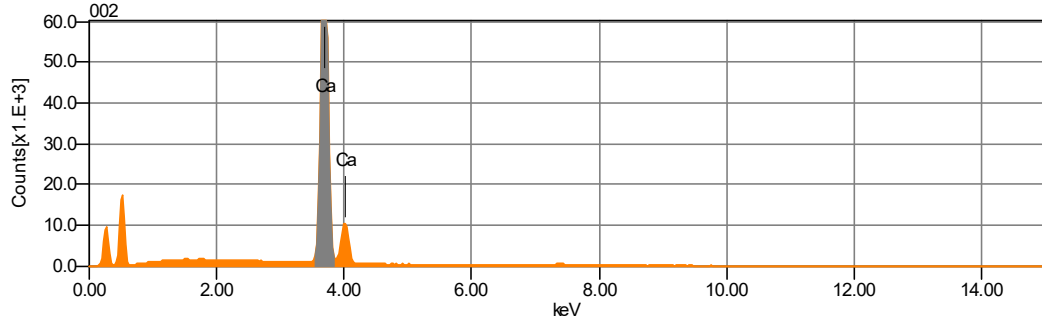


25 mM kalsiyum asetat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 3 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.24'e ait veriler)

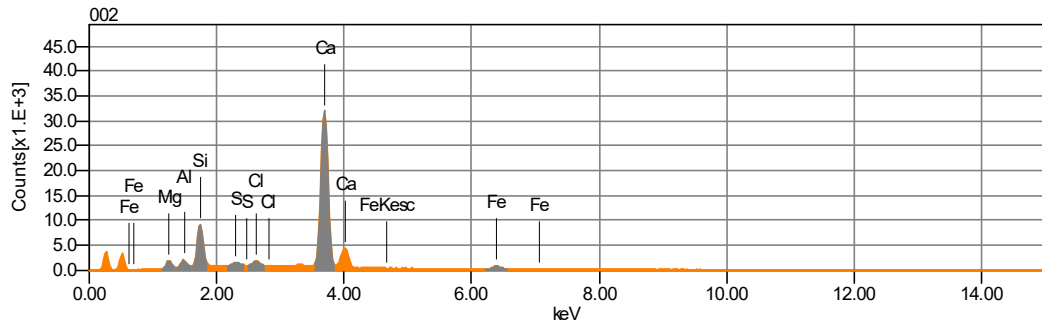


25 mM kalsiyum asetat KMO besiyerinde *Bacillus amyloliquefaciens* U17 tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin 4 nolu alan EPMA analizi (Şekil 4.24'e ait veriler)

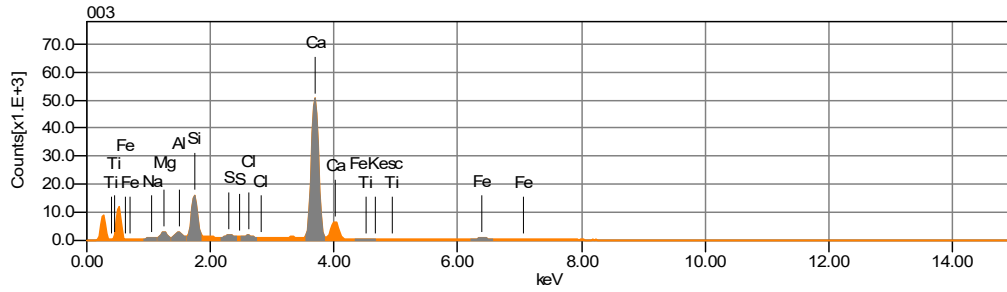
Beton Örneklerinin Kristallerinin EPMA Nokta ve Alan Analizleri



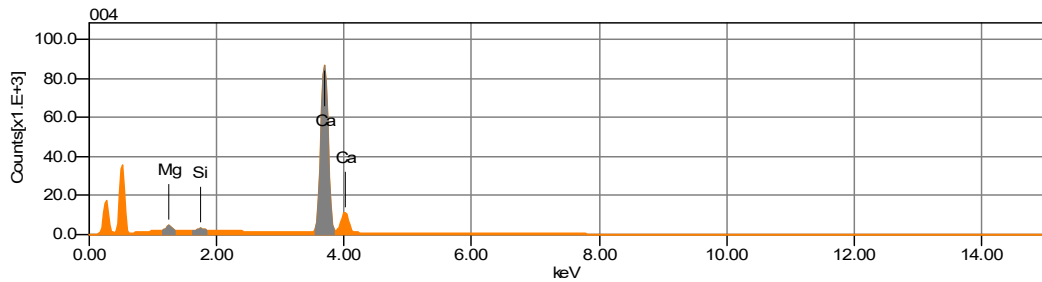
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği EPMA 2 nolu nokta analizi (Şekil 4.35'e ait veri)



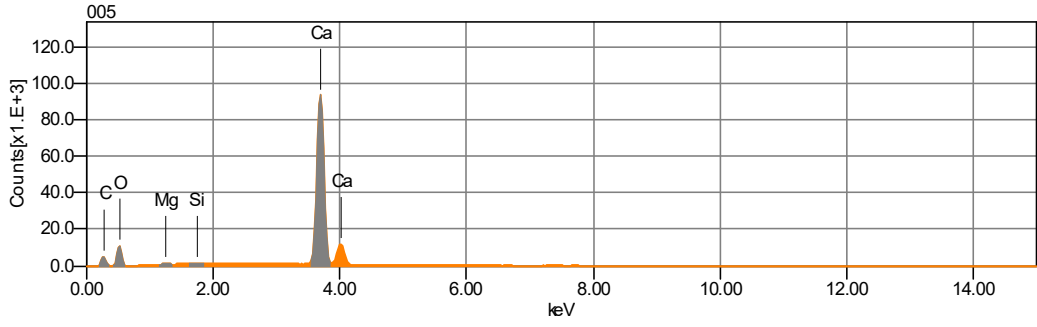
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4. 37'ye ait veri)



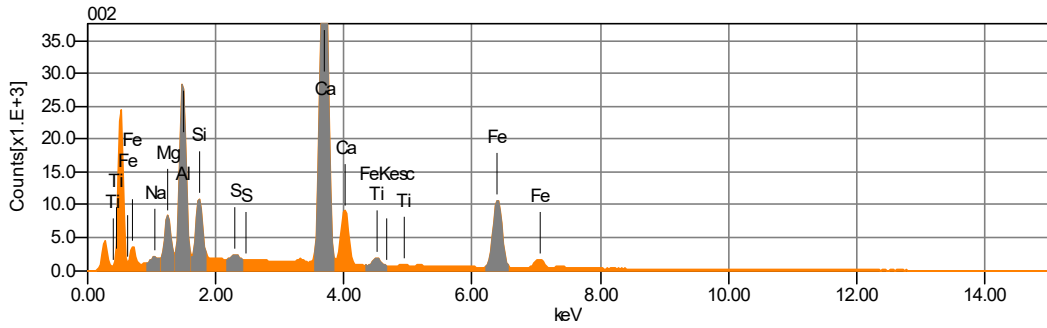
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği 3 nolu alan EPMA analizi (Şekil 4. 37'ye ait veri)



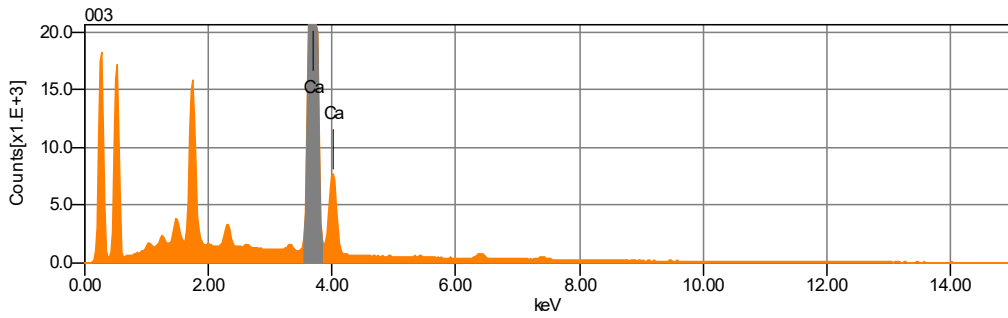
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği 4 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4. 37'ye ait veri)



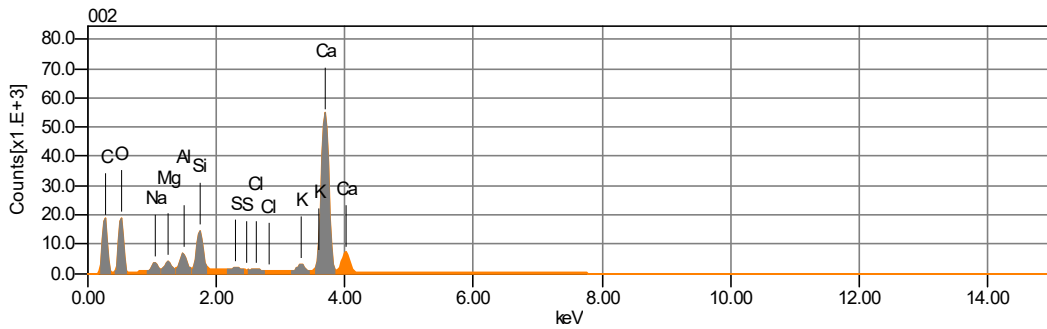
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 28. gün beton örneği 5 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4. 37'ye ait veri)



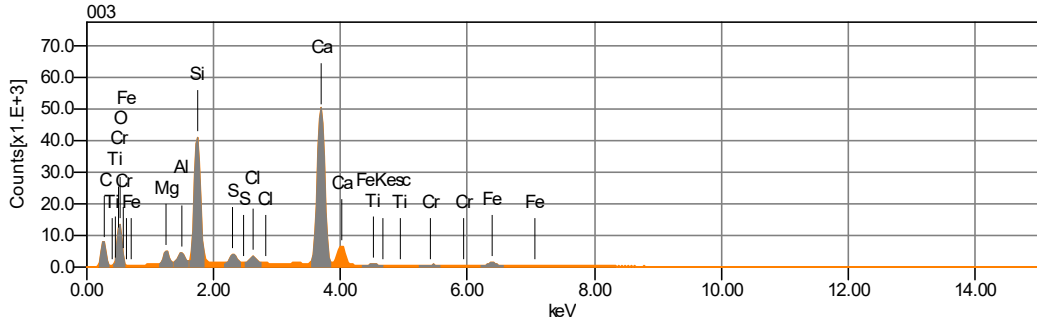
28. gün şahit beton örneği 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.39'a ait veri)



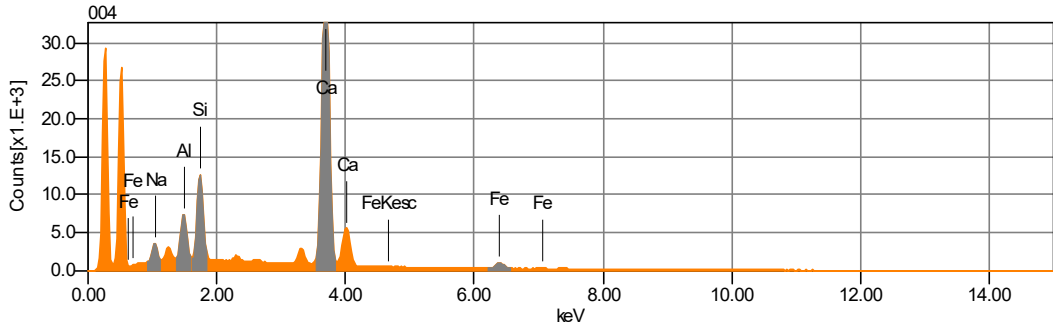
28. gün şahit beton örneği 3 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.39'a ait veri)



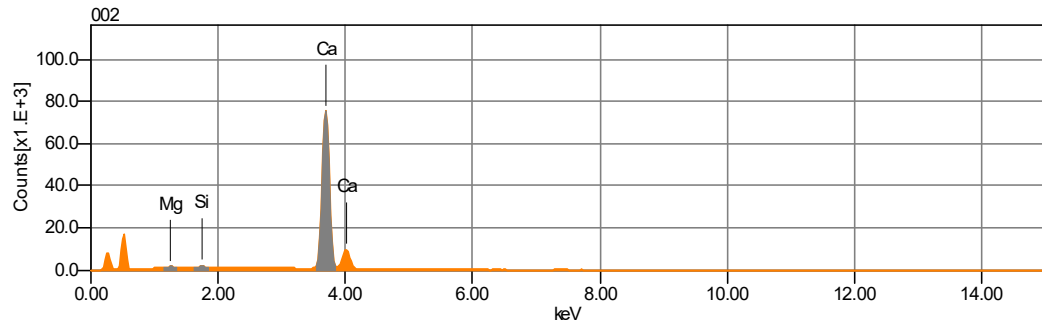
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.41'e ait veri)



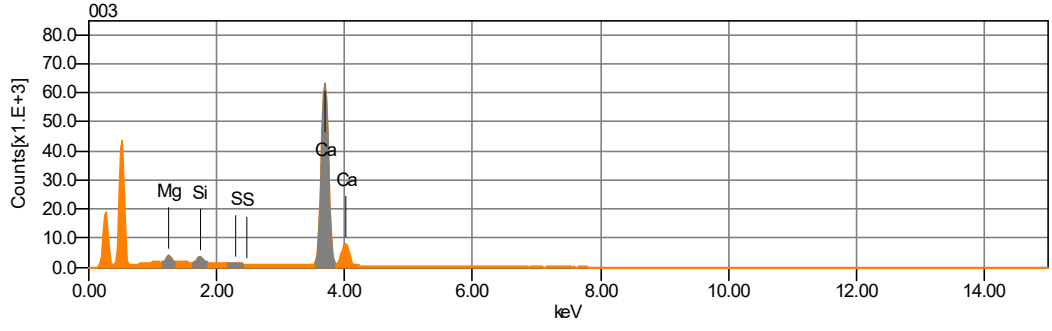
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 3 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.41'e ait veri)



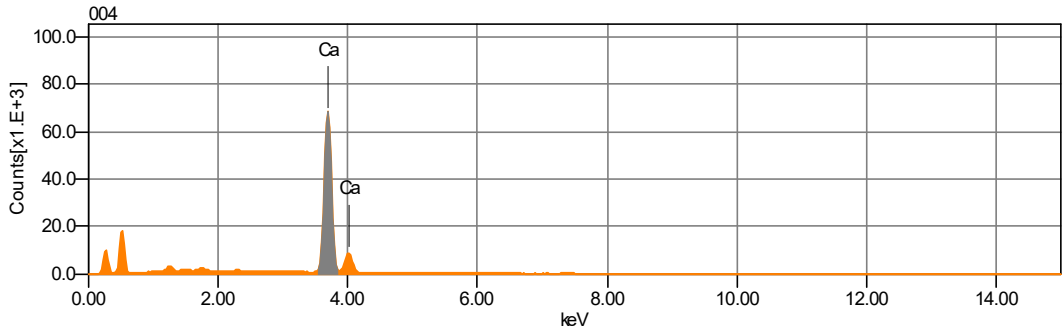
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 4 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.41'e ait veri)



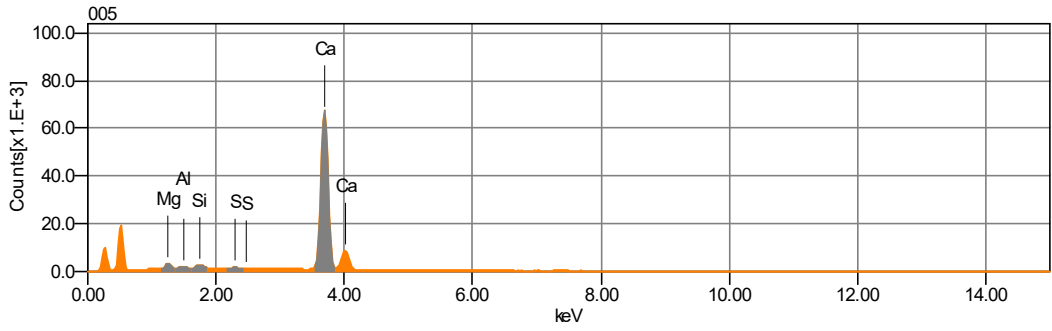
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.41'e ait veri)



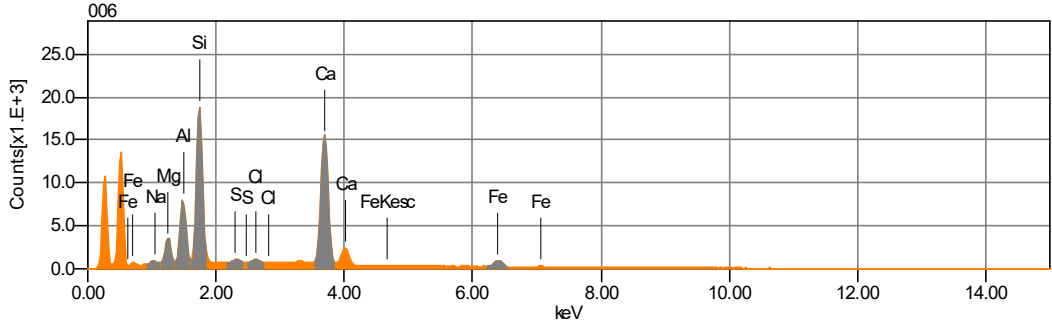
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 3 nolu alan EPMA analizi (Şekil 4.43'e ait veri)



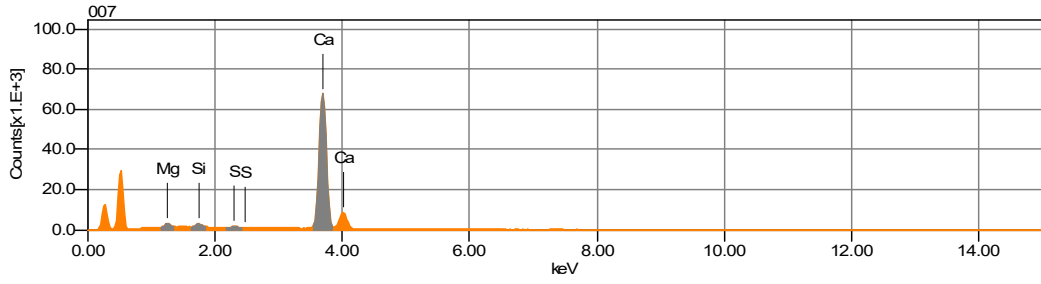
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 4 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.43'e ait veri)



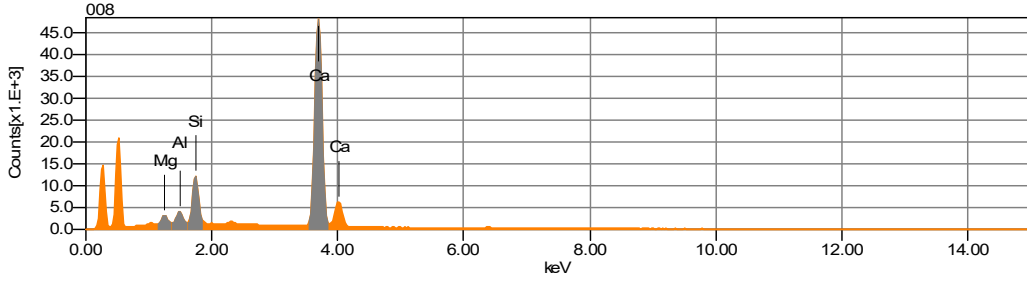
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 5 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.43'e ait veri)



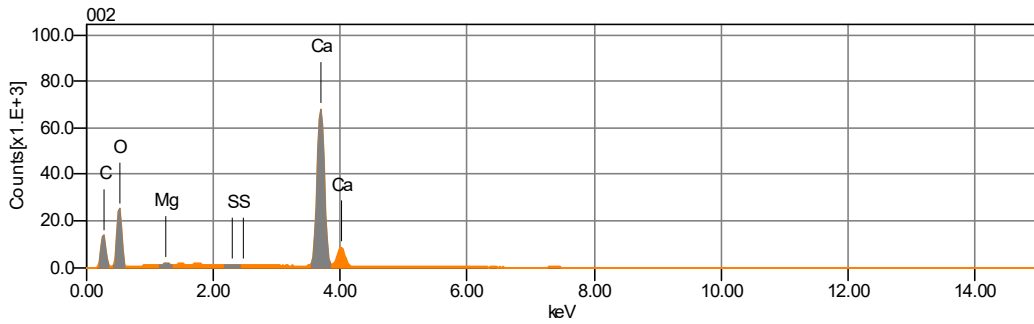
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 6 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.43'e ait veri)



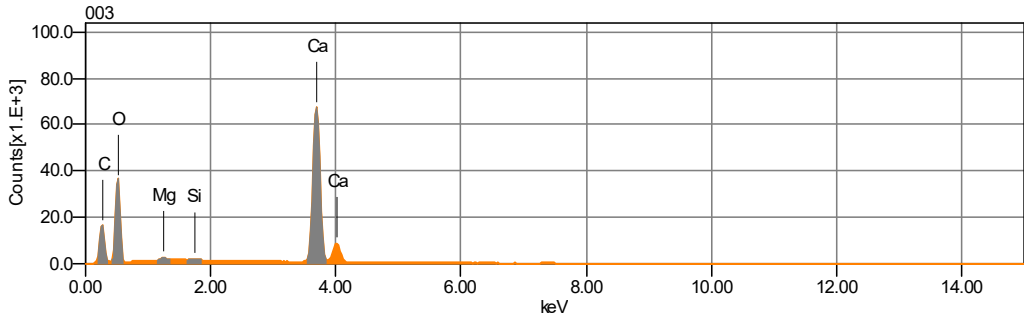
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 7 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.43'e ait veri)



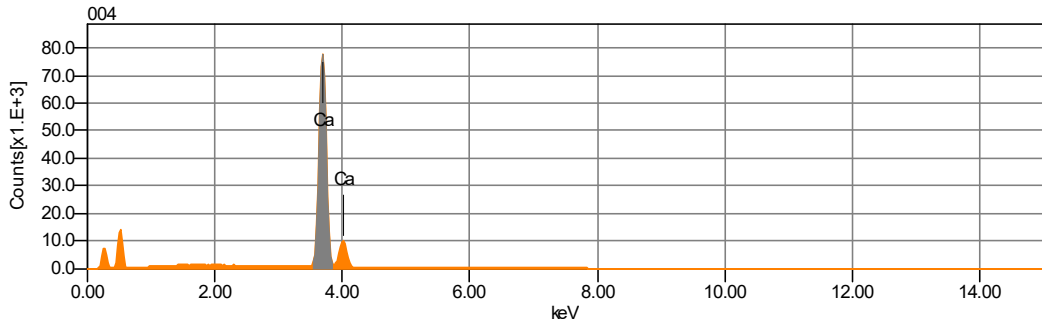
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 60. gün beton örneği 8 nolu alan EPMA analizi (Şekil 4.43'e ait veri)



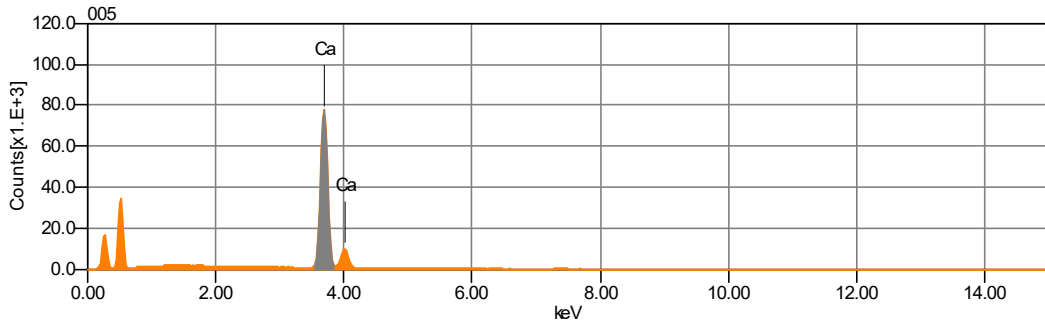
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.45'e ait veri)



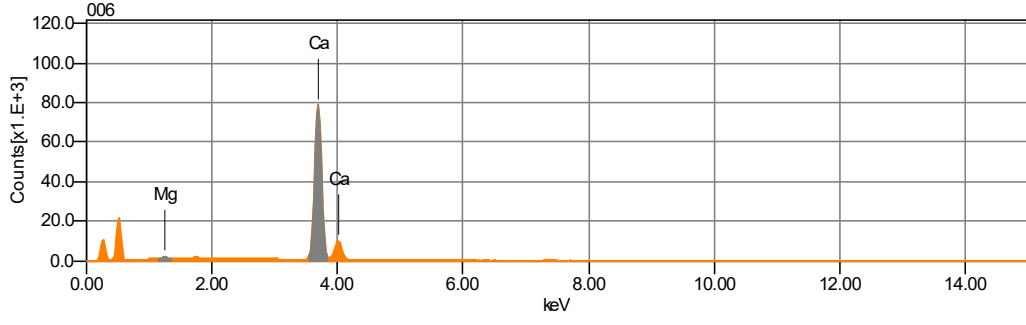
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 3 nolu nokta EPMA analizi
(Şekil 4.45'e ait veri)



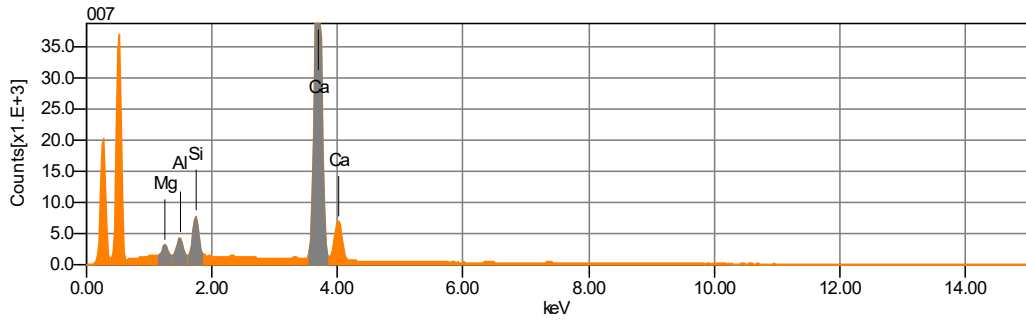
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 4 nolu nokta EPMA analizi
(Şekil 4.45'e ait veri)



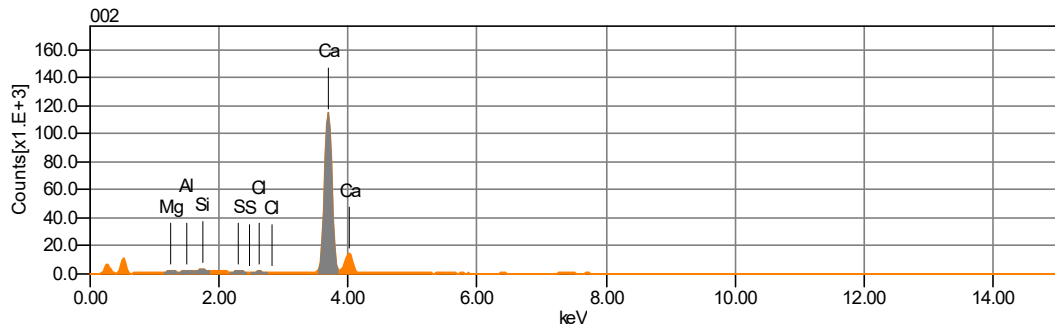
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 5 nolu nokta EPMA analizi
(Şekil 4.45'e ait veri)



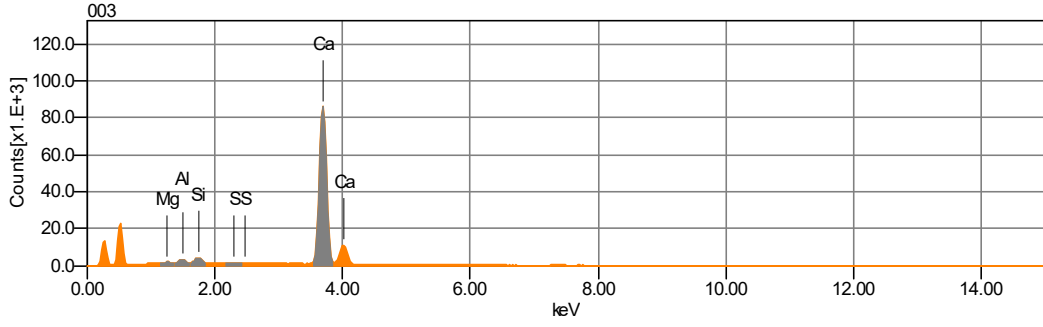
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 6 nolu nokta EPMA analizi
(Şekil 4.45'e ait veri)



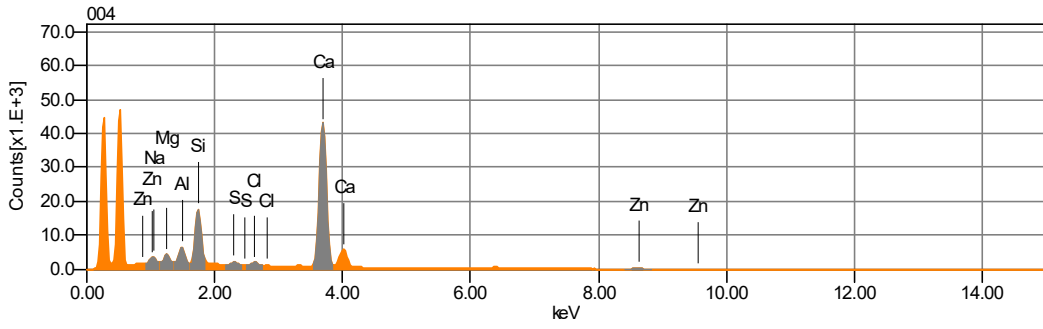
Bacillus amyloliquefaciens U17 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 7 nolu nokta EPMA analizi
(Şekil 4.45'e ait veri)



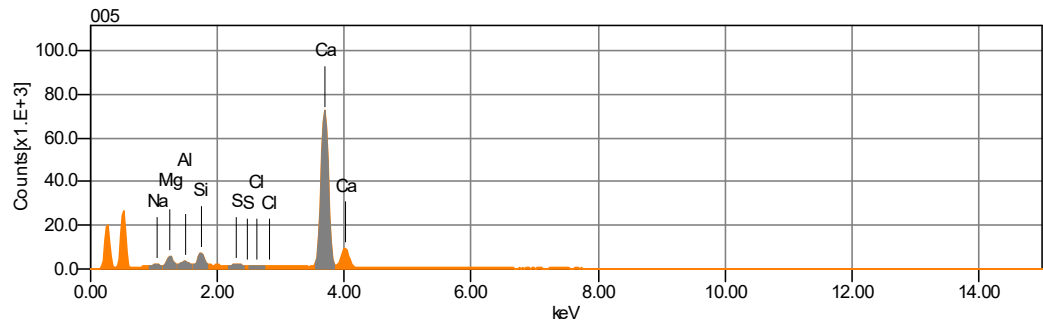
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 2 nolu alan EPMA analizi (Şekil 4.47'ye ait veri)



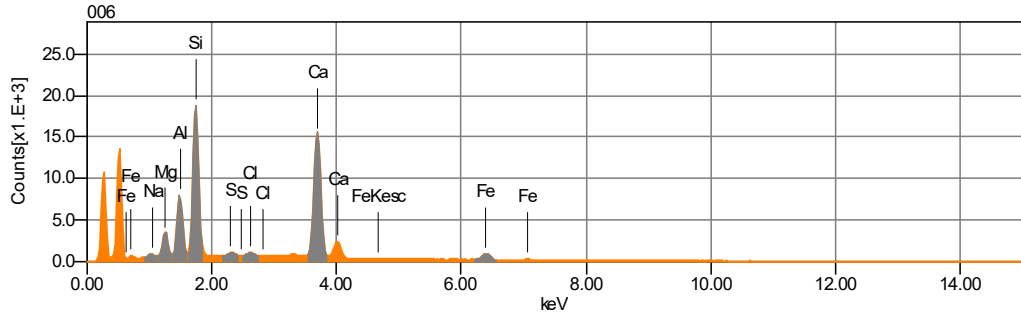
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 3 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.47'ye ait veri)



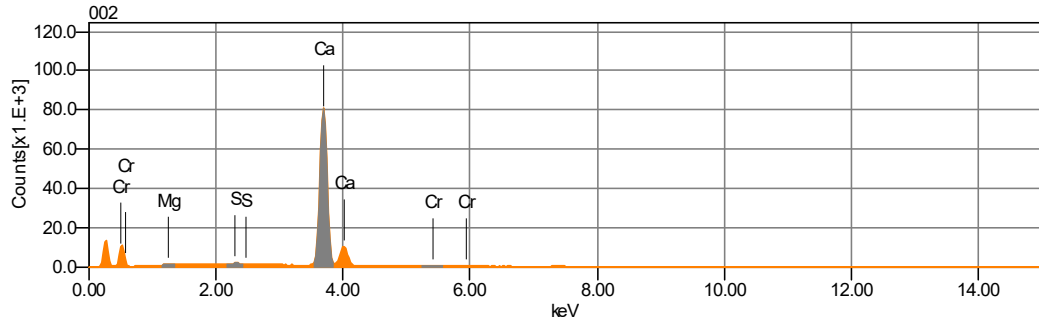
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 4 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.47'ye ait veri)



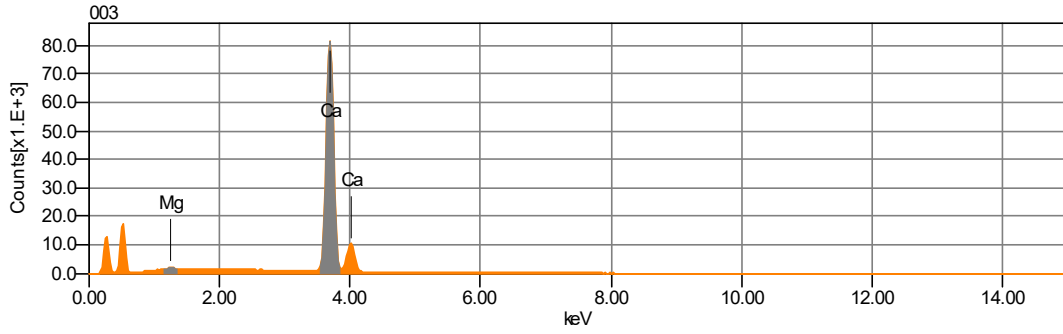
Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 5 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.47'ye ait veri)



Sporosarcina pasteurii ATCC 6453 eklenerek hazırlanan 90. gün beton örneği 6 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.47'ye ait veri)



90. gün şahit beton örneği 2 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.49'a ait veri)



90. gün şahit beton örneği 3 nolu nokta EPMA analizi (Şekil 4.49'a ait veri)