



**ZEMİN İYİLEŞTİRME İÇİN KULLANIM
POTANSİYELİ OLAN *Viridibacillus arenosi*
BAKTERİSİNİN UYGULAMALARDAKİ
KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Merve DURMAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Özlem BARIŞ**

2020
(Her hakkı saklıdır.)

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

ZEMİN İYİLEŞTİRME İÇİN KULLANIM POTANSİYELİ OLAN *Viridibacillus arenosi* BAKTERİSİNİN UYGULAMALARDAKİ KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ

(Determination of the Characteristics of Potential *Viridibacillus arenosi* of Bacteria for Soil Improvement)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve DURMAZ

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Erzurum
Erzurum, 2020

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Merve DURMAZ tarafından hazırlanan “*ZEMİN İYİLEŞTİRME İÇİN KULLANIM POTANSİYELİ OLAN Viridibacillus arenosi BAKTERİSİNİN UYGULAMALARDAKİ KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ*” başlıklı çalışması 16 / 07 / 2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Genel Biyoloji Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN
Atatürk Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Harun AKOĞUZ
Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Unvan Ad SOYAD

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında sunulan “Zemin iyileştirme için kullanım potansiyeli olan *Viridibacillus arenosi* bakterisinin uygulamalardaki karakteristiklerinin belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	4	30
Kuramsal Temeller	15	30
Materyal ve Yöntem	3	35
Bulgular	7	20
Tartışma	4	20
Tezin Geneli	8	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Merve DURMAZ	Prof. Dr. Özlem BARIŞ
24.6.2020	24.6.2020
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, büyük bir sabır ve özveride bulunan, danışmanım, Sayın Prof. Dr. Özlem BARIŞ'a ve Atatürk Üniversitesi Biyolojoloji Bölüm Başkanlığına ve kıymetli personeline teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmada kullanılan zeminlerin temini, kalıpların hazırlanması ve çeşitli ölçümlerin alınmasında yardımlarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Harun AKOĞUZ ve çeşitli basamaklarda bilgisini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Murat ÖZDAL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi ve manevi, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen kıymetli babam Necati DURMAZ ve annem Fatma DURMAZ'a ve her zaman yanımda olan kardeşlerim Büşra ve Semanur'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteğini benden esirgemeyen her düştüğümde kaldıran, beni hep destekleyen ve “yaşıyorsak her şey mümkündür” diyerek imkân tanımayan, anne baba ayrı kardeşim dediğim dostum Ebru ÇELİK'e de teşekkür ederim.

Merve DURMAZ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEMİN İYİLEŞTİRME İÇİN KULLANIM POTANSİYELİ OLAN *Viridibacillus arenosi* BAKTERİSİNİN UYGULAMALARDAKİ KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Merve DURMAZ

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Amaç: Bu çalışmayla *Viridibacillus arenosi* K64'ün zemin içindeki karakteristiklerini belirlemek amacıyla zeminlere verilen kültürlerde, zeminlerden geçen süzüntüde ve zemin dışında kültürlerdeki üreaz aktivitesi, pH değerleri, zeminlerde oluşturduğu kalsit miktarları, zeminlere uygulamadan önce ve sonra bakteri konsantrasyonu ve canlılığı ile iyileştirilen zeminlerin mukavemet değerleri belirlenmiştir.

Yöntem: Üreaz aktivitesi için Nessler yöntemi, oluşan kalsit miktarını ölçmek için %15'lik HCl muamele, bakteri canlılığı için inokülasyon ve bakteri yoğunluğu için spektrofotometrik analizler yapılmıştır.

Bulgular: Uygulama sonuçlarına göre üreaz aktivitesinin zamana bağlı olarak, bakterinin yaşam döngüsüyle paralel devam ettiği belirlenmiştir. Uygulama yapılan zeminlerde kalsiyum karbonat oluştuğu ve serbest basınç mukavemetinin yüksek olduğu ve bakteri canlılığının uygulama sonrasında devam ettiği belirlenmiştir.

Sonuç: Kullanılan izolatın zemin iyileştirme potansiyelinin üreaz aktivitesi ile doğru orantılı olarak değiştiği ve bakterinin canlılığının önemli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri, MICP, Zemin iyileştirme, *Viridibacillus arenosi*, Kalsit

Temmuz 2020, 74 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF THE CHARACTERISTICS *Viridibacillus arenosi* OF BACTERIA USING POTENTIAL FOR SOIL IMPROVEMENT

Merve DURMAZ

Supervisor: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Purpose: With this study, in order to determine the characteristics of *Viridibacillus arenosi* K64 in the soil, the urease activity in the cultures given to the soil, the culture permeate through the grounds and the cultures outside the ground, pH viability and bacterial concentration before and after application to the ground, and the strength values of the formed grounds It has been identified.

Method: Nessler method for urease activity, 15% HCl treatment in calculating the amount of calcite formed, serial dilution for bacterial viability, and spectrophotometric analysis for bacterial density.

Findings: As a result of the application, it was determined that urease activity continues parallel to the life cycle of the bacteria depending on the time. It has been determined that calcium carbonate is formed on the applied surfaces and its strength is high and bacterial viability continues after application.

Results: It has been determined that the isolate used has ground improvement potential.

Keywords: Bacteria, MICP, Soil improvement, *Viridibacillus arenosi*, Calcite

July 2020, 74 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	8
Mikrobiyal CaCO ₃ Oluşumunun Kullanım Alanları.....	8
MICP (Mikrobiyal Kaynaklı Kalsit Çökmesi).....	8
Biyosimentolama	14
Mikrobiyal CaCO ₃ Oluşum Mekanizmaları ve Biyomineralizasyon.....	15
Sülfat indirgeyen bakterilerle yapılan sülfat indirgenmesi	18
Nitrat redüksiyonuyla yapılan denitrifikasyon	18
Siyanobakteriyel fotosentez	19
Amonifikasyon.....	19
Ürolitik bakterilerle gerçekleşen üre hidrolizi	20
MATERYAL ve YÖNTEM	24
Materyal	24
Kullanılan alet ve cihazlar.....	24
Uygulamada kullanılan bakteri izolatu	24
Uygulamada kullanılan kültür ortamı ve çözeltilerin hazırlanışı.....	25
Kalıpların ve deney ortamının hazırlanması	25
Zemin	26
Yöntem.....	27
Üreaz aktivitesi için standart grafik oluşturulması.....	27
Üreaz aktivitesinin belirlenmesi.....	27
Zeminlere uygulanan kültürlerin pH değişimlerinin izlenmesi	29

Kalsiyum karbonat oluşumunun ölçülmesi.....	29
CaCO ₃ çökmesi sonucu oluşan zeminlerdeki canlılık aktivitesinin belirlenmesi.	30
İyileştirme yapılan zeminlerin mukavemet testi	30
ARAŞTIRMA BULGULARI	31
Üreaz Aktivitesi İçin Standart Grafik Oluşturulması.....	31
Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	31
pH Değişimi	39
Kalsiyum Karbonat Oluşumu.....	41
Canlılık Aktivitesi	42
Bakteri Yoğunluğu	43
Serbest Basınç Deneyi.....	43
TARTIŞMA.....	44
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Farklı bakteriler ve biyolojik mineralizasyon potansiyelleri	6
Tablo 2. Kullanılan zemine ait analiz sonuçları	27
Tablo 3. Zeminlere verilen kültürlerin A_{450} nm'deki absorbens değerleri (48 saatlik)	32
Tablo 4. Zeminde kullanılan kültürlerin zemin dışında A_{450} nm'deki absorbens değerleri	33
Tablo 5. Zeminlerden geçen TSB kültürünün A_{450} nm'deki absorbens değerleri	35
Tablo 6. Zeminlerden geçen TSB+CaCl ₂ kültürünün A_{450} nm'deki absorbens değerleri.....	35
Tablo 7. Zeminden geçen kültürünün 450 nm'deki absorbens değerleri (2 numaralı numune)	38
Tablo 8. Bir numaralı zemindeki bakterinin koloni sayıları ve büyüklükleri.....	42
Tablo 9. İki numaralı zemindeki bakterinin koloni sayıları ve büyüklükleri	43
Tablo 10. Zeminlere verilen kültürlerin A_{600} nm'deki bakteri yoğunlukları.....	43
Tablo 11. Mikrobiyal olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökmesi için reaksiyon şartları.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bıyoçimentolama sonrasında kil kümesinin kalsit kristal kabuğu	5
Şekil 2. Yüzeyde ve partiküller arası temaslarda CaCO_3 kaplamalı <600µm silis kumu tarama elektron mikroskobu görüntüsü.	7
Şekil 3. Her ortamda mikrobiyal karbonat çökmesine neden olan metabolizmalar oranı.....	9
Şekil 4. Mikroorganizmada oluşan üre enzim aktivitesi tarafından başlatılan kalsiyum karbonat çökeltisi mekanizması	11
Şekil 5. Bakteriyel kalsiyum karbonat çökelişi	11
Şekil 6. SEM görüntüleri, <i>S. pasteurii</i> , <i>B. subtilis</i> ve <i>E. coli</i> 20 g/L üre (Normal) ile TSB içinde yetiştirilmiş ve 1 mol/L CaCl_2 ve 1 mol/L üre ilave edilmiş (MICP). Şekillerdeki beyaz oklar bakteri hücrelerini göstermektedir. Tüm ölçek çubukları 2 µm'dir	12
Şekil 7. (A) kalsit, (B) aragonit, (C) vaterit. Mikrobiyal oluşumların ve minarellerin yakın ilişkisi ayrıca hücre şekilli çukurlar (D) ve septa (E) görülebilir. Bakteri ve kristallerin birbirine olan tutunması da görülmektedir (F).....	14
Şekil 8. Farklı metabolizmalar tarafından indüklenen mikrobiyal karbonat çökmesi.....	16
Şekil 9. Mikroorganizmaların CaCO_3 oluşum mekanizmaları.....	17
Şekil 10. Deney düzeneği.....	26
Şekil 11. İyileştirmede kullanılan silis kumu	26
Şekil 12. Amonyum konsantrasyonu standart grafiği	31
Şekil 13. Zeminlerde kullanılan kültürlerin A_{450} nm'deki absorbans değerleri (48 saatlik).....	32
Şekil 14. Zeminlerde kullanılan kültürlerin üreaz aktiviteleri (48 saatlik)	33
Şekil 15. Zeminde kullanılan kültürlerin A_{450} nm'deki absorbans değerleri	34
Şekil 16. Zeminde kullanılan kültürlerin üreaz aktivitesi	34
Şekil 17. Zeminlerden geçen TSB+ CaCl_2 kültürünün A_{450} nm'deki absorbans değerleri.....	36
Şekil 18. Zeminlerden geçen TSB kültürünün A_{450} nm'deki absorbans değerleri.....	36
Şekil 19. Zeminlerden geçen TSB+ CaCl_2 kültürünün üreaz aktivitesi (1 numaralı numune) .	37
Şekil 20. Zeminlerden geçen TSB kültürünün üreaz aktivitesi (1 numaralı numune).....	37
Şekil 21. Zeminlerden geçen kültürün absorbans değerleri (2 numaralı numune)	38
Şekil 22. Zeminlerden geçen kültürlerin üreaz aktivitesi (2 numaralı numune)	39
Şekil 23. 48 saat boyunca oluşan pH değerleri	39
Şekil 24. Kültürlerin zemin dışındaki pH değişimi	40

Şekil 25. Bir numaralı numunenin 10 günlük pH değişimi.....	40
Şekil 26. İki numaralı numunenin uygulama süresince pH değişimi (2 numaralı numune)	41
Şekil 27. Numunelerin kalsit miktarları	42
Şekil 28. Uygulama boyunca zemindeki pH değişimi	48



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
et al	Ve diğerleri
g	Gram
Kg	Kilogram
kPa	Kilopaskal
m	Metre
M	Molar
m ³	Metreküp
mg	Miligram
MICP	Mikrobiyal aracılı kalsit çökmesi
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD600	Dalga boyu
pH	Suyun asit ve alkalitesini anlatan logaritmik ölçü birimi
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
vd	Ve diğerleri
µL	Mikro litre

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
SRB	Sülfat redüksiyon bakterisi
TSA	Tripticase soy agar
UCS	Serbest basınç mukavemeti
UPB	Üreaz pozitif bakterisi
HCl	Hidroklorik asit
L	Litre
IRB	Demir redüksiyon bakterisi

GİRİŞ

Mikroorganizmalar yerkürenin hemen her yerinde karşımıza çıkabilen yüksek metabolik çeşitlilik gösteren yaşam formlarıdır. İlk ortaya çıkışlarından günümüze kadar ekosistemlerin oluşumuna katılmış ve canlılık için büyük önemi olan jeolojik döngülerin parçası ve yürütücüleri olmuşlardır. Doğal süreçler içerisinde mikroorganizmaların katkıları gezegenimizi yaşanabilir kılmış ve metabolik çeşitlilik sağlamıştır. İnsanoğlu ilk zamanlarında farkında olmadan mikroorganizmaların metabolik özelliklerini kullanmaya başlamıştır. Ekmeğin mayalanmasından itibaren başlayan bu uygulamalar günümüzde modern fermentasyon süreçlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Arda 2000; Madigan and Martinko 2006).

Mikroorganizmalar sadece fermentasyon süreçlerinde kullanılmamaktadır. Ayrıca günümüzde önemli metabolik ve genetik araştırmaların yürütüldüğü çok sayıda model organizma da özellikle bakterilerden oluşmaktadır. Çeşitli maddelerin sentezi ve dönüşümü için yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar büyük ekonomik öneme sahiptir. Büyük mikroorganizma çeşitliliği içerisinde oldukça küçük oranda insan, hayvan veya bitkilerde hastalık yapan ve gıda bozulmasına sebep olan örneklerde bulunmakla birlikte doğrudan sağlığı etkilediği için genellikle çekinilen ve tehlikeli olarak kabul edilen mikroorganizmalar mevcuttur. Bilimsel ilkeler ve belirli kurallar (aseptik teknikler) çerçevesinde çalışıldığında mikroorganizmalar çok büyük fayda sağlayabilmektedir. Özellikle mikroorganizmaların teknoloji üretmek için kullanılabilmesi zaman içinde yeni uygulama alanları ortaya çıkarmıştır (Arda 2000; Madigan and Martinko 2006).

Biyoteknoloji; canlı varlıkların, onların oluşturduğu ürünlerin veya canlıya ait bilginin, herhangi bir problemini çözmede ya da yararlı ürünlerin üretilmesinde kullanılan bir bilimdir. Biyoteknolojinin konuları arasında; tıp, ilaç sanayi, insan hastalıklarının tanı ve teşhisinde kullanılan materyaller, tıbbi ürünlerin üretilmesinde, aşılar, enzim üretimi, vb. çalışmaları görmemiz mümkündür. Bitkilerin ıslahında, gıdaların işlenmesinden tekstil ve temizlik ürünlerinin elde edilmesinde kadar biyoteknolojinin faydalarını sayabiliriz. Tüm bunların elde edilmesinde kullanılan mikroorganizmalar hayatın her anında karşımıza çıkmaktadır (Thieman and Palladino 2013). Büyük bir araştırma alanı olarak mikroorganizmalar birçok diğer araştırma sahası içinde kullanılabilmektedir. Sağlık, gıda ve tarım gibi sektörlerde doğrudan etkileri gözlemlenebildiği için oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak ekonomik üretim süreçlerinde yer almaları onları endüstriyel amaçlarla da kullanılmasını

sağlamaktadır. Günümüzde antibiyotik üretiminden - çeşitli etken maddelerin üretimine, alkollerin, önemli asitlerin (sitrik asit vb.) üretimine ve birçok vitaminin elde edilmesine kadar birçok süreçte doğrudan kullanılmaktadırlar. Ancak insanoğlunun bitmeyen beklentileri sürekli yeni alanlarda araştırma ve uygulamalara ihtiyaç duymaktadır.

Gelişen insan nüfusu ve teknolojinin bir sonucu olarak insanların kalabalık toplumlar halinde birlikte yaşama eğilimleri artmaktadır. Nüfus yoğunluklarının dar bölgelerde ki hızlı artışı ve bu nüfusun barınma istekleri oldukça büyük önem taşımaktadır. Yeni yerleşim yerlerinin açılması veya çok katlı bina yapma ile ilgili ihtiyaçlar ortaya çıkmaktadır. Özellikle ekonomik gerekçeler nedeniyle problemlili zeminlerde bina yapımı gerekebilmektedir. Bu durumlarda zemin mukavemetini arttıracak farklı uygulamalar bulunmaktadır. Uygulama çeşitliliğine karşın, mevcut uygulamaların çevreye verdiği zararı azaltmak ve/veya çevreye uyumlu yeni teknikler geliştirmek oldukça büyük önem taşımaktadır. Özellikle gevşek zeminlerde sıvılaşma sorununa çözüm olarak uygulanabilirliği araştırılan tekniklerden birisi de biyolojik yolla yapılan uygulamalardır (DeJong *et al.* 2010; Akoğuz 2014). Dünyamızda hızla artan nüfusa bağlı olarak kullanılabilir yaşam alanları daralmış ve bu durum mevcut yapıların yetersiz kalmasına sebep olmuştur. Örneğin; Çin ve Hindistan'da neredeyse 10 milyona yakın insanın büyük şehirlerde barınması için yapılan binaların zemin iyileştirmeye ihtiyaç duyulacak derecede kötü olduğu belirtilmektedir (DeJong *et al.* 2010). Artan nüfusunun ihtiyaçlarına cevap vermek amacıyla kurulan inşaat sahaları azalmış ve gevşek zeminlerde de yapılar inşa etme zorunluluğu oluşmuştur. Bu durumda da yapılar için uygun olmayan zeminlerin iyileştirilmesi söz konusu olmuştur. Bunun için kullanılan geleneksel yöntemler oldukça pahalı, sürekli denetim ve bakım maliyeti gerektirmektedir (DeJong *et al.* 2010; Li 2015).

Zeminlerin iyileştirilmesinde zamanında ve doğru bir müdahale yapılmadığı takdirde, zemindeki daha fazla problemler oluşacak ve bunun sonucunda maliyet artacaktır. Zemin iyileştirmede mikroorganizmaların kullanılması günümüzdeki çalışmalarda bir artış gösterse de konuyla ilgili araştırma ve denemeler yeni değildir (Dapples 1942; Rhoads 1974; McCall and Tevesz 1982; Meadows and Meadows 1991).

Biyolojik iyileştirme yöntemi, zeminin yüksek bakım maliyetini azaltarak çevreye dost bir yöntemi hedeflemektedir. Mikroorganizmaların doğada yaygın olması, metabolik çeşitlilikleri, geliştirilmelerinin kolay olması ve maliyetinin düşük olması bu tekniğin sürdürülebilirliğini arttırmıştır (DeJong *et al.* 2010). Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökmesi (MICP = Microbial Induced Calcium Precipitation) tekniği, sürdürülebilir, doğa dostu ve yemyeşil bir teknik olarak ortaya çıkarılmıştır (Sharma and Ramkrishnan 2016).

Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen kalsit oluşumu hem fiziksel hem de kimyasal yollarla gerçekleşmektedir. Bilinen en belirgin ve en güzel örnek kabuklu deniz canlılarıdır. Kalsit oluşturma yeteneği olan bakteriler çok büyük bir öneme sahip olmasına rağmen çok az sayıda bilim insanının dikkatini çekmiştir (Riding 2000; Northup and Lavoie 2001). Kalsit oluşumu sadece deniz canlılarında değil tatlı su ve karasal ekosistemler içinde önemli bir fenomendir (Northup and Lavoie 2001; Barton and Jurado 2007; Barış 2009).

Mikrobiyal faaliyet sonucunda üre, üreaz vasıtasıyla karbondioksit (CO_2) ve amonyağa (NH_3) parçalanmaktadır (Hammes *et al.* 2003; Reddy 2013). Meydana gelen CO_2 , ortamda bulunan su ile birlikte kolay çözünen karbonik asit (H_2CO_3) oluşmaktadır. Amonyak ise amonyuma (NH_4^+) dönüşmektedir (Achal *et al.* 2011). Amonyuma dönüşmesi sonucunda pH artarken ortamda bulunan Ca^{2+} iyonları, bakterilerin de sürece dahil olması ile karbonatlar ile birleşerek çökelme meydana gelmektedir (Hall-Stoodley *et al.* 2004; Patro *et al.* 2015).

Farklı bakteriler ile yapılan biyolojik zemin iyileştirme çalışmaları bulunmak ile birlikte literatürde oldukça yoğun olarak *Bacillus pasteurii* (*Sporasarcinia pasteurii*) bakterisi kullanılmıştır (Lin *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2015; Maleki *et al.* 2016; Rowshanbakht *et al.* 2016; Sharma and Ramkrishnan 2016; Choi *et al.* 2017a; Cui *et al.* 2017; Dadda *et al.* 2017; Sharaky *et al.* 2018).

Biyolojik zemin iyileştirme çalışmalarında kullanılan bakterilerin zemine uyumu oldukça önemlidir. Bakterinin kristal oluşturma yeteneği, morfolojik özellikleri, sıvı ve katı kültür içindeki davranışı, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri zemin iyileştirme için uygun olup olmadığı konusunda araştırmacılara önemli bilgiler oluşturmaktadır. Bakteri boyutu, endospor oluşturabilmesi ve üreaz pozitif olması uygulanan zeminlerde başarı şansını arttırarak çalışmanın kalitesini de etkilemektedir (De Muynck, 2010; Achal *et al.* 2013; DeJong *et al.* 2014; Achal and Mukherjee 2015). Uygulamalarda kullanılacak bakterinin patojenitesi de kullanılabilirliği etkileyen önemli bir parametredir (Achal and Mukherjee 2015).

Biyolojik zemin iyileştirme çalışmalarında zemin taneciklerini birbirine bağlamak ve belirli bir mukavemet oluşturmak için hedeflenen yapı kalsiyum karbonat ve onun doğru kristal modelleridir. Kalsiyum karbonat (CaCO_3), yer kabuğunun yapısını yaklaşık %4'lük bir dilimi oluşturan, kabuklu deniz canlılarında ve kayaçlarda bulunan ve kalsiyumun karbonik asitli tuz kristalidir (Chaurasia and Verma 2014). Doğada oldukça farklı formlarda karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; mermer, traverten, kireç taşı, tebeşir ve bazı kabuklu deniz canlıların yapısında CaCO_3 bulunmaktadır (Sinha and Rez 2015). Normal şartlarda kayaçlarda bulunan formu heksagonal β - CaCO_3 veya tetragonal yapıdadır (Ropp 2012).

CaCO_3 amorf olmasından kaynaklı diğer formlarına rahatlıkla dönüşebilmektedir. Örneğin; sıcaklığın etkisiyle bu form ortorombik λ - CaCO_3 yapısındaki aragonit haline veya μ - CaCO_3 yapısındaki vaterit şekline dönüşebilmektedir (Nan *et al.* 2008, Wang and Becker 2009). CaCO_3 'in bu şekilleri suya bağımlı olmayanlardır; suya bağlı formları ise amorf CaCO_3 , ikait ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve monohidro kalsit ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) şekilde literatürde karşımıza çıkmaktadır (Gopi *et al.* 2013). Mikrobiyal CaCO_3 oluşumunda karşımıza vaterit ve kalsit formlarının olduğu literatürde bildirilmektedir (Rodriguez-Navarro *et al.* 2012). Kalsit ve vaterit formlarının oluşmasında üreaz aktivitesine sahip *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların olduğu bilinmektedir (Ivanov *et al.* 2015).

Suya bağımlı olmayan en kararsız formu vaterit ve en kararlı formu ise kalsittir. Vaterit; polikristalli ve karmaşık sferulit yapısındadır. Aragonit ise iğne benzeri yapıları olan bir CaCO_3 yapısıdır. Vaterit kararsız bir yapıda olduğu için, sıcaklık değişimiyle formu da değişmektedir. Sıcaklığın 30°C 'nin altında olmasıyla kalsit formuna, 40°C üstünde olması durumundaysa aragonit formuna dönüşebilmektedir (Singh *et al.* 2016). Doğada kendiliğinden hem biyokimyasal hem de kimyasal yollara oluşabilmektedir (Morse *et al.* 2007). Kimyasal yolla pozitif yüklü bir Ca^{2+} iyonlarının, negatif yüke sahip olan HCO_3^- iyonlarının tepkimeye girmesiyle oluşmaktadır. CaCO_3 'ü yapay olarak elde etmek için endüstriyel anlamda mermer üreten taş ocaklarında kaynak olarak toz halindeki CaCO_3 oluşumu elde edilebilmektedir. Kireç taşını ayrıştırarak kalsiyum hidroksite ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) dönüştürülebilir ve tekrar karbonatlaştırılmasıyla CaCO_3 çöktürülebilmektedir (EPA 1974).

Her coğrafi bölgenin toprağının yapısı, kimyasal ve fiziksel özellikleri kendine özgüdür. Toprağın tanecik boyutu da CaCO_3 çökmesi için önemli bir etmendir. Bu sebeple toprağın çapı, kil, toz ve kum olarak 3 farklı şekildedir (Çepel 1988). Kum yapısı itibariyle iri taneye sahip olduğu için su ve mineralleri tutma kapasitesi düşüktür. Kil ise yapısı itibariyle ince taneli olduğundan ve negatif iyonları olduğundan suyu ve mineralleri tutma kapasitesi fazladır (Velde and Meunier 2008).

Zeminlerin kil yapısı özellikle suyu tutma özelliğine göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, kaolinin suyu tutma kapasitesi az iken, bentonit suyu tutmada çok iyi olduğu için zeminlerde yüksek miktarda şişme özelliğiyle öne çıkmaktadır (Sridharan and Gürtuğ 2004). Bu yüzden araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Toprak yapısı itibariyle bentonit miktarı fazla olan yerlerde su tutma kapasitesine bağlı olarak şişme fazla olacağından inşaat mühendisleri tarafından bu bölgeler problemlili bölge olarak kabul edilmiştir. Zemin iyileştirmede de problemlili bölgeleri iyileştirmeye yönelik çalışmalar yapıldığından, zemindeki şişmeyi en aza indirmek için yeni yöntemler geliştirilmiştir (Prakash and Shridharan 2004).

MICP, amonyaklaşma, metan oksidasyonu, sülfat indirgeme, üreaz, fotosentez ve denitrifikasyon birçok farklı yol ve bu yolda kullanılan mikroorganizmalar kalsiyum karbonat oluşumda rol almaktadır (Anbu *et al.* 2016).

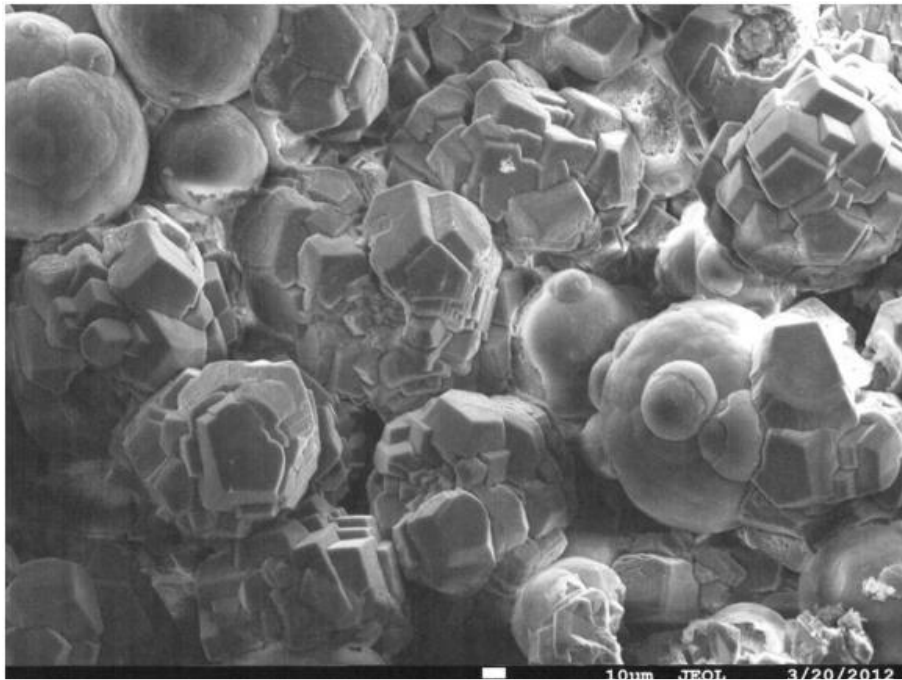
MICP oluşumunda üreoliz için birçok mikroorganizma keşfedilmiştir. Örneğin, *Shewanella* türlerinde harç örneklerine eklenmesiyle basınç dayanımını arttırdığı ve olumlu bir etkiye sahip olduğu literatürde karşımıza çıkmaktadır (Ghosh *et al.* 2005).

Ürolitik bakteriler çoğunlukla toprakta yaşadığı, endospor oluşturma yeteneklerinin olması ve aerobik solunum yapmalarından dolayı bu bakterilerle ilgili yolaklar araştırmalarda yer almasını sağlamıştır (Belie *et al.* 2010).

Ürolitik bir bakteri olan *Pararhodobacter* sp. mercan kumunu iyileştirmek için kullanılmıştır (Khan *et al.* 2015).

MICP'de kullanılan ve mineralleşme yeteneği fazla olan *Sporocarcina pasteurii* kullanılmıştır (Mountassir *et al.* 2013; Balam *et al.* 2017; Williams *et al.* 2017). Optimum şartlar hazırlandığında *S. pasteurii* kendi ürettiği üreazı kullanarak amonyak ve karbonat oluşturmuştur. Karbonat ise ortamdaki Ca^{2+} iyonlarıyla birleşerek $CaCO_3$ çökmesini oluşturur (Gorospa *et al.* 2013, Lauchnor *et al.* 2015).

Biyokapsüllenme tekniğini kullanarak deniz kilini iyileştirmeyi amaçlamışlardır. Mikroorganizma olarak *Bacillus* sp. VS1, zemin olarak 2,70 özgül ağırlığında olan yumuşak deniz kili kullanılmıştır. Şekil 1'de biyokapsüllenmiş deniz kilinin yüzeyindeki kalsit kristalleri gösterilmiştir (Ivanov *et al.* 2015).



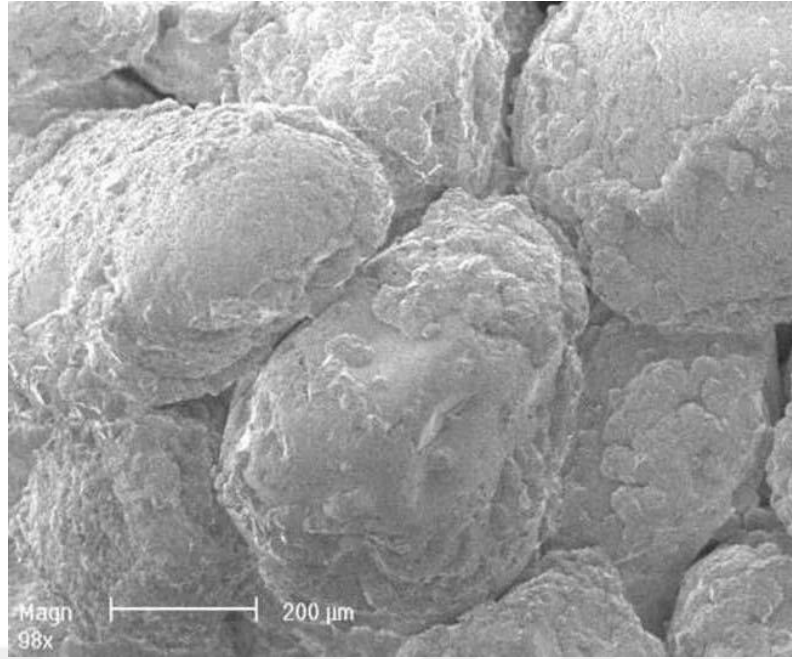
Şekil 1. Biyoçimentolama sonrasında kil kümesinin kalsit kristal kabuğu (Ivanov *et al.* 2015)

Üre, tarımda gübre olarak kullanılır ve doğada iyi bir azot taşıyıcısıdır (Saggar *et al.* 2013). Tablo 1’de mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltmesinde yer alan mikroorganizmalar gösterilmiştir (Gupta *et al.* 2013).

Tablo 1. Farklı bakteriler ve biyolojik mineralizasyon potansiyelleri (Gupta *et al.* 2013)

	Mikroorganizmanın Adı	Önerilen Mekanizma	Önemli bulgular	Referans
1	<i>Bacillus pasteurii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Üreaz metabolizması	- Dolgu macunu olarak kullanılır - artan Basınç - Yüksek alkali ortamlarda büyüme engeller - Sığ çatlaklarda yüksek verim sağlar <i>P. aeruginosa</i>'nın katkıları önemsizdir.	Ramachandran <i>et al.</i> 2001
2	<i>Bacillus pasteurii</i>	Sabitlenmiş poliüretan (PU), Üreaz metabolizması	- Hücreler yüksek metabolizma hızını korudu. - Olumsuz ortamlardan korunmalıdır. - İmmobilizasyona bağlı metabolizma hızında değişiklik olmaz. - Daha derin çatlaklarda kalsit birikimi.	Bang <i>et al.</i> 2001
3	-	Poli Üretan hareketsizleştirilmiş üreaz enzimi	Serbest enzimden daha düşük yağış oranı	Bachmeier <i>et al.</i> 2002
4	<i>Bacillus sphaericus</i>	Silika dahil Üreaz metabolizması	- Kalsiyum kaynağı ile birleşim. 0.01mm-0.6mm çatlakların sızdırmazlığında etkilidir. - Azaltılmış beton geçirgenliği	De Belie and De Muynck 2008
5	<i>Bacillus cohnii</i> , <i>Bacillus halodurans</i> , <i>Bacillus pseudofirmus</i>	İki bileşenli kendi kendini iyileştirme sistemi	- Betona substrat ve mikroplar eklenir. - Büyük çatlakları doldurmada üstün, 100µm boyutlu kalsit parçacıklarının oluşumu.	Jonkers and Schlangen 2008
6	<i>Bacillus sphaericus</i>	Cam çubukta bakteri, besin ve PU kapsüllenmesi	- Mikrop konsantrasyonu arttıkça çökeltme daha fazlaydı. - PU gücün artmasına katkıda bulundu.	Wang <i>et al.</i> 2010
7	<i>Bacillus pseudofirmus</i> and <i>B.cohnii</i>	İki bileşenli iyileştirme sistemi; Bakteri ve kalsiyum laktat	- Çatlak yüzeyinde 20-80µm boyutlu mineral benzeri çökelti. - İşlevsellik genç çimento ile sınırlıdır. - Ortamda azot yüklemesinde azalma olmuştur.	Jonkers <i>et al.</i> 2010
8	Microalgae (<i>Chlorella</i>)	Fotosentetik Yol	- Yenilenebilir kaynak - Kolay ekilebilir - Henüz bir optimizasyon yapılmadı	Ariyanti <i>et al.</i> 2011

MICP, üre hidroliziyle zeminlerin fiziksel özellikleri araştırılmıştır. Filtrelenmiş üre, kalsiyum kaynağı ve ürolitik bakteri süspansiyonu zeminlere enjekte edilmiş ve kalsiyum karbonat çökeltisi gözlenmiştir (Şekil 2) (Whiffin 2004) .



Şekil 2. Yüzeyde ve partiküller arası temaslarda CaCO₃ kaplamalı <600µm silis kumu tarama elektron mikroskobu görüntüsü (Whiffin 2004).

Bakterinin zemine nasıl uygulanacağı da iyileştirmeyi etkileyen başka bir faktördür. Bakterinin ve kültür solüsyonunun nasıl uygulanacağı iyileştirme için optimum koşullar daha önceki çalışmalarda (Akoğuz 2019; Akoguz *et al.* 2019) belirlenmiş ve elde edilen sonuçlara göre uygulamalar yapılmıştır.

Bu çalışma ile zemin iyileştirme çalışmalarında kullanıldığı bilinen bakterilere alternatif olarak *Viridibacillus arenosi* (K64) bakterisi ile uygulamalar yapılmıştır. Kullanılan izolatın zemin uygulamalarından önce, zemin içinde ve zemine uygulama sonrasında canlılığı ayrı ayrı gözlemlenmiştir. Zemin iyileştirme çalışmalarında kullanılan kültürün ve zeminden geçen kültür süzüntüsünün üreaz aktivitesi, uygulama kolonu içerisinde farklı alanlarda kalsiyum karbonat oluşturma değeri, zeminlere verilen besiyerin ve zeminlerden geçen kültür süzüntüsünün zamana bağlı pH değişimi, zeminler kurutulduktan sonra yüzeye tutunan bakteri miktarı ve zeminden aylık periyotlar halinde inokülasyonların tekrarlanmasıyla birlikte zeminde tutunan bakterilerin zamana bağlı canlılığının kontrolü, oluşan zeminlerin mukaveti ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler bütün olarak değerlendirilerek *Viridibacillus arenosi* (K64) bakterisinin zemin içindeki karakteristiklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Mikrobiyal CaCO_3 Oluşumunun Kullanım Alanları

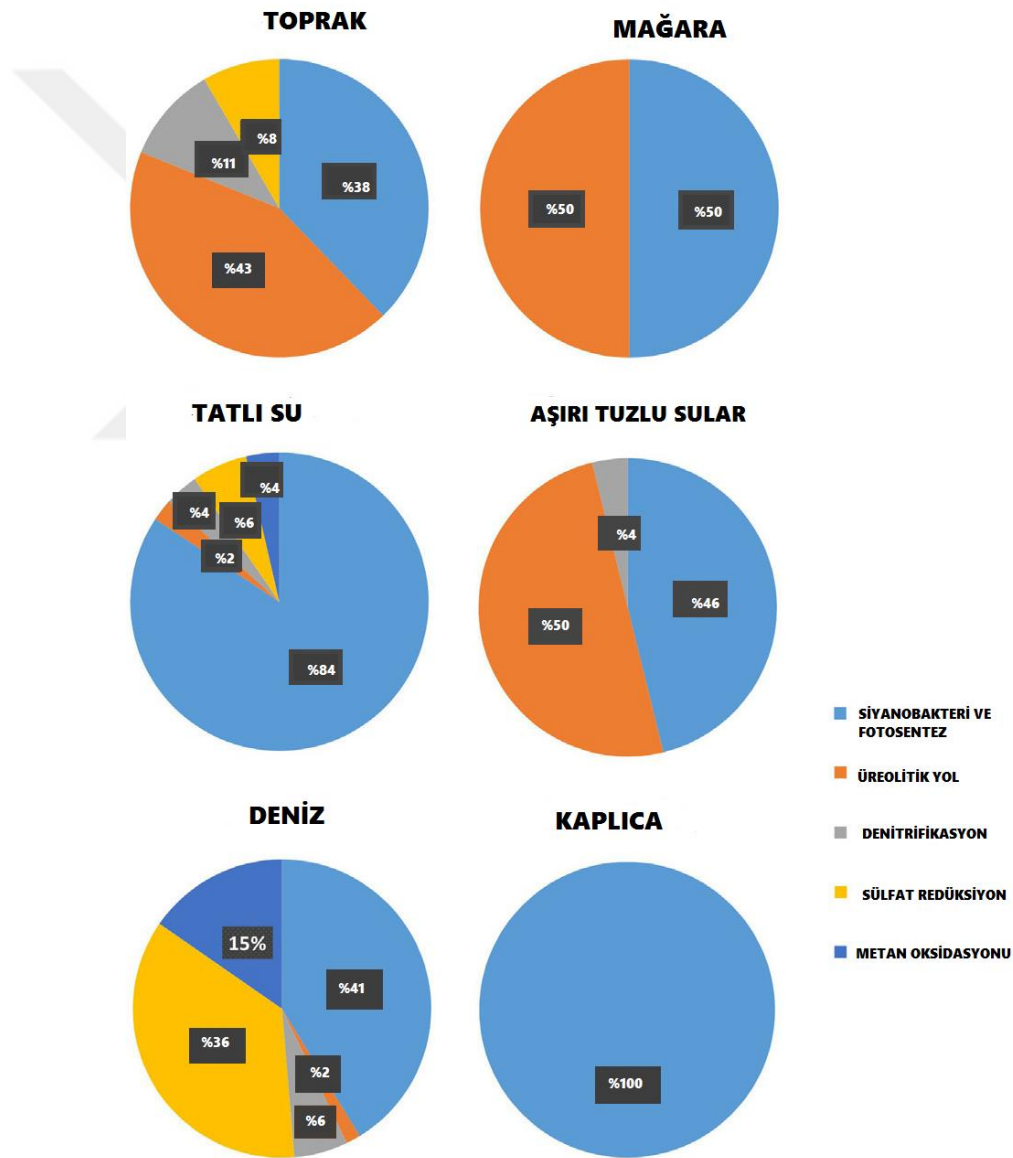
MICP (Mikrobiyal Kaynaklı Kalsit Çökmesi)

Mikrobiyolojik kalsiyum karbonat çökmesi, kalsiyum açısından zengin çevrede karbonatın üretilmesi ile mikrobiyolojik aktivite sonucu çeşitli proseslerden oluşmaktadır (Castanier *et al.* 1999).

Zemin iyileştirme çalışmaları için birçok yöntem kullanılabilmektedir. Zeminlerin iyileştirilmesinde her yöntem zemine ait farklı parametreleri iyileştirmeye yöneliktir. Ön yükleme, kompaksiyon, zemin kazıkları, mevcut zeminin değiştirilmesi, katkı malzemeleri kullanarak iyileştirme, ısıtma işlemleri gibi birçok uygulama zeminin özelliklerinin iyileştirilmesi için kullanılmaktadır. Portland çimentosu, kireç, asfalt, sodyum silikat ve diğer tekniklerin zemin iyileştirilmesinde başarılı oldukları kanıtlanmıştır (Reuben 2003; Basha *et al.* 2005). Bu yöntemler içerisinde özellikle son yıllarda çevre dostu ve doğa ile uyumluluğu nedeniyle biyolojik zemin iyileştirme teknikleri dikkat çekmektedir. Biyolojik toprak ıslahı genellikle, silikatlar, karbonatlar, fosfatlar, demir hidroksitler ve sülfürler olarak toprak partikülleri arasında çökelen kalsiyum, demir, magnezyum, manganez ve alüminyum tuzlarına dayanır (Ivanov and Chu 2008). Ancak bu metotların kullanımı ile çoğu zaman zeminin pH seviyesi değişmekte, içerisindeki zehirli ve tehlikeli maddeler ile zemini ve yeraltı suyunu kirletmektedir (Reuben 2003; DeJong *et al.* 2006). Son yıllarda bunlara ek olarak bakteriler kullanılarak mikrobiyolojik kalsiyum karbonat çökmesi ile zeminlerin iyileştirme tekniği ortaya çıkmıştır.

Birçok araştırma yapılan biyolojik zemin iyileştirme yöntemleri özellikle mikrobiyal olarak üretilen kalsiyum çöktürmesi (MICP) üzerine odaklanmıştır. Mikrobiyolojik olarak üretilen kalsiyum karbonat çökeltme yöntemi, zemin özelliklerinin iyileştirilmesi için bakteriler kullanılarak zemini oluşturan tanecikler arasında kalsiyum karbonat kristalinin oluştuğu yeni zemin iyileştirme yöntemlerinden biridir. Bu prosedür, zemin veya diğer küçük partikülleri (gözenekli materyal) başlangıç yapısını bozmadan dengeleyebilir. Bu yöntemde geçirgenlik azaltılır ve uygulama maliyeti düşüktür. Dahası, çevreye uyumludur ve bu yöntemde zararlı çevresel sonuçlara yol açmadan çok çeşitli malzeme ve mikroorganizmalar kullanılabılır (Kahani *et al.* 2013).

Mikrobiyal CaCO_3 oluşumu, yaygın olarak toprak, su ve deniz çökeltilerinde görülen bir oluşumdur (Rubio *et al.* 2001). Çeşitli mikrobiyal CaCO_3 oluşumları Şekil 3'te gösterilmiştir (Zhu and Dittrich 2016). MICP, betondaki çatlak onarımı gibi mühendislik problemlerini hafifletmek için kullanılmıştır (Ramachandran *et al.* 2001; De Belie and De Muynck 2009). Betonun iyileştirmek, betonun basınç dayanımını arttırmak, kalker anıtların onarımı için kullanılmıştır (Ramachandran *et al.* 2001; Dick *et al.* 2006; Jimenez-Lopez *et al.* 2007; Jonkers *et al.* 2010). Ayrıca zemin iyileştirilmesi (Whiffin *et al.* 2007; Ivanov and Chu 2008; DeJong *et al.* 2010) ve tuğlaların dayanıklılığını arttırmak (Sarda *et al.* 2009). MICP, kalsiyum karbonatı çökelten doğal mikrobiyolojik bir süreçten faydalanarak kesme sertliğini ve hidrolik iletkenliği azaltma potansiyeline sahiptir (Martinez *et al.* 2013).



Şekil 3. Her ortamda mikrobiyal karbonat çökeltmesine neden olan metabolizmalar oranı (Zhu and Dittrich 2016)

Betonda kendi kendini iyileştirme teknikleri arasında, mikrobiyal olarak uyarılan CaCO_3 çökeltmesi (MICP), klasik beton ve çevre dostu beton uygulamaları ile karşılaştırıldığında benzer termal genleşme katsayısı da dahil olmak üzere avantajlı yönlerinden dolayı en çekici yöntemlerden biri olarak kabul edilmiştir. Bakteri (endospor formda), besin maddeleri ve mineralizasyon prekürsörleri ile birlikte, döküm sırasında beton karışımlarına dahil edilir. Bakteri endosporları çatlama gerçekleşene kadar aktif olmayacaktır. Aktivatör ve CaCO_3 gibi nem ve / veya oksijen etkisi, çatlakları kapatmak için bakteriyel metabolik süreç tarafından çöktürülecektir (Achal and Mukherjee 2015; Tziviloglou *et al.* 2016). Kendiliğinden iyileşme için çeşitli tiplerde bakteriyel metabolik yollar önceden araştırıldı. Bakterilerin aerobik solunumu, çatlağın kendiliğinden iyileşmesinde ilk uygulananlar arasındadır. Basitçe, betona spor ve besin ekleyerek, organik maddelerin bakteriyel oksidasyonu ile çökeltme meydana gelebilir (Jonkers *et al.* 2010; Wiktor and Jonkers 2011; Xu and Yao 2014).

Kalsit (CaCO_3) yeryüzünde bulunan en yaygın ve en önemli minerallerden biridir. Yerkabuğu ağırlığının yaklaşık %4 ünün kalsit olduğu bilinmektedir. Kalsit, tatlı suda, karada ve denizde kireçtaşı, mermer ve kalkerli kumtaşı oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır (Hammes *et al.* 2003).

Minerallerin çökmesi doğada alışlagelmiş bir biyolojik süreçtir ve doğal ortamda gerçekleşen mikrobiyolojik süreç ile zemin çimentolanması belgelenmiştir (Douglas and Beveridge 1998). Bu doğal süreçlerden olan kalsiyum karbonat çökmesi dört parametre tarafından kontrol edilir;

- karbonat konsantrasyonu
- kalsiyum konsantrasyonu
- ortam pH'sı ve

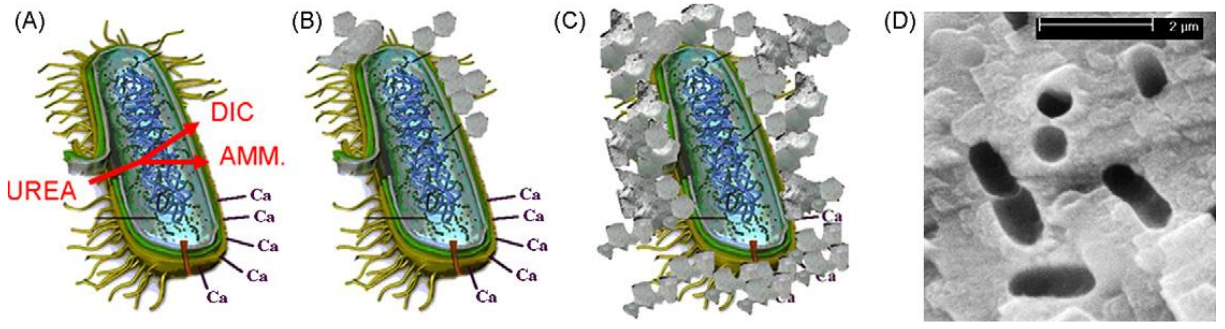
çekirdeklenme bölgesinin oluşmasıdır (Hammes *et al.* 2003).

Mikrobiyal kaynaklı kalsit çökmesi birbirine bağlı reaksiyonlardan oluşmaktadır. Sıvı besiyerine inoküle edilen bakteriler vasıtasıyla gerçekleşen reaksiyon sonunda karbonat ve amonyum oluşturmuşlardır (1) (Şekil 4)(Hammes and Verstraete 2002).



Kalsiyum kaynağı olarak genellikle CaCl_2 kullanılması sonucunda ise CaCO_3 oluşmuştur (2).

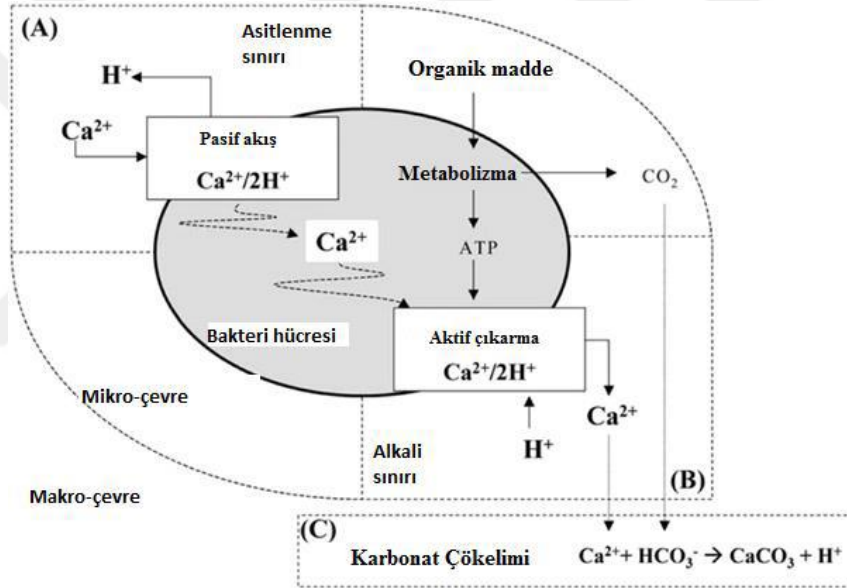




Şekil 4. Mikroorganizmada oluşan üre enzim aktivitesi tarafından başlatılan kalsiyum karbonat çökeltisi mekanizması (Hammes and Verstraete 2002).

*(A) Ürenin biyolojik yolla parçalanması. (B) Kalsiyum karbonat oluşumunun başlaması. (C) Kalsiyum karbonat çökeltmesinin sonlanması.(D) Karbonat çökeltmesinde rol alan bakteriler.

Kalsiyum karbonat, mikrobiyal aktivite ile hem doğal hem de yapay yolla üretilen başlıca katılaştırma (çimentolaşma) maddesidir (Whiffin 2004). Önerilen bakteriyel kalsiyum metabolizması şeması ve sonrasındaki CaCO_3 çökeltmesi Şekil 5’te gösterilmiştir.



Şekil 5. Bakteriyel kalsiyum karbonat çökeltimi (Hammes and Verstraete, 2002)

Zemin iyileştirme için geleneksel bir teknik olan kireç suyu tekniğini kullanmışlardır ve CaCO_3 oluşumunun çok az olduğunu belirtmişlerdir (Clifton and Frohndorff 1982).

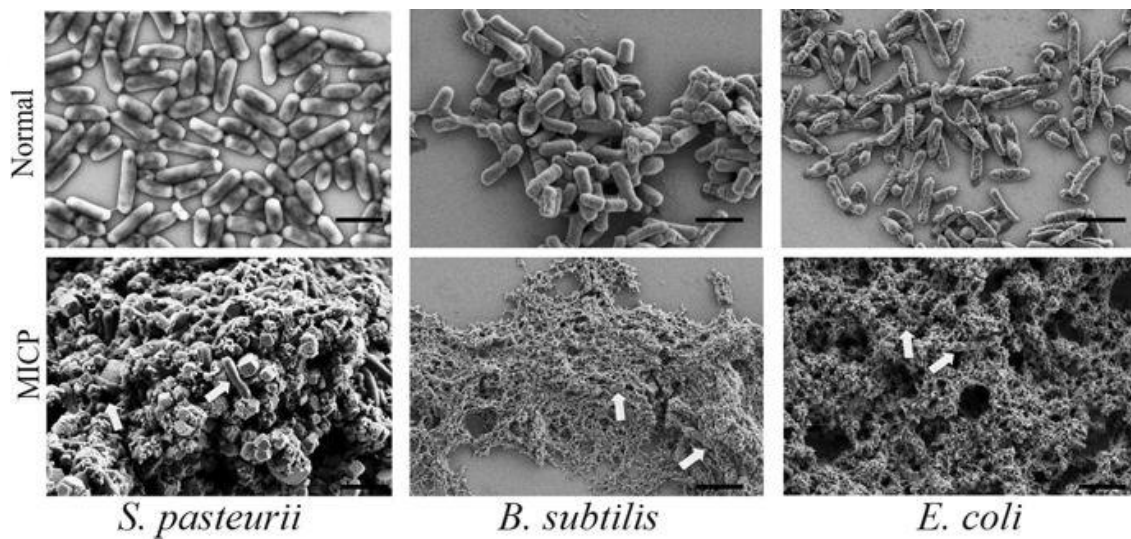
Mikroorganizmaların boyutlarından dolayı zemin içinde kolay hareket ettiğini ve buna bağlı CaCO_3 oluşturdukları bölgelerin daha fazla olduğunu söylemişlerdir (Mitchell and Santamarina 2005). Bu bağlamda zeminde oluşan çatlakların CaCO_3 oluşumuyla onarabildiğini tespit etmişlerdir (Jyothsna *et al.* 2015).

Hazırlamış oldukları beton harçlara, farklı boyutlarda çatlaklar oluşturmuşlardır. Bu çatlaklara bakteri süspansiyonunu inokülasyona bırakmışlar ve CaCO_3 oluştuğunu gözlemlemişlerdir. SEM ve XRD analizlerini yapmış ve çatlakların belirli bir derecede

kapandığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca betonlardaki mukavemetinin azaldığını tespit etmişlerdir (Qian *et al.* 2015).

Bacillus subtilis türünü kullanarak hafif derecede agregat içeren betonlarda basınca olan dayanıklılığın arttığını gözlemlemişlerdir. Oluşan mineral formlarını SEM görüntüleriyle de belirtmişlerdir (Khaliq and Ehsan 2016).

Sporocarcina pasteuuri CaCO_3 oluşturmak için çekirdeklenme bölgeleri bulundurmaktadır. Bunu açıklamak için MICP'den sonra, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Sporocarcina pasteuuri*'nin SEM görüntülerini çekmişlerdir. Bakteriler TSB besiyeriyle muamele edilmiş ve kültürle daha sonra CaCl_2 ve üre eklenmiştir ve CaCO_3 oluşumu gözlenmiştir (Şekil 6) (Ma *et al.* 2020).



Şekil 6. SEM görüntüleri, *S. pasteurii*, *B. subtilis* ve *E. coli* 20 g/L üre (Normal) ile TSB içinde yetiştirilmiş ve 1 mol/L CaCl_2 ve 1 mol/L üre ilave edilmiş (MICP). Şekillerdeki beyaz oklar bakteri hücrelerini göstermektedir. Tüm ölçek çubukları 2 μm 'dir (Ma *et al.* 2020)

Mikrobiyolojik olarak uyarılan kalsiyum karbonat çökeltme yöntemini, toprak özelliklerinin iyileştirilmesi için bakteriler kullanılarak toprak partikülü arasında kalsiyum karbonat kristalinin olduğu en yeni zemin iyileştirme yöntemlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Bu prosedürün, toprağı veya diğer küçük partikülleri (gözenekli materyal) başlangıç yapısını bozmadan dengelediğini ve bu yöntemde geçirgenlik azaltma ve uygulama maliyetinin düşük olduğunu belirtmiştir. Bununla beraber, çevreye uyumlu ve zararlı sonuçlara yol açmadan çok çeşitli malzeme üretilebileceği bulunmuştur (Kalandary and Kahani 2015).

Beton çatlaklarına enjekte edilen *B. sphaericus* sporlarının çatlakları onardığı SEM görüntüleriyle desteklenmiştir. Zaman arttıkça CaCO_3 miktarında artış ve geçirimsizliğini arttırdığını gözlemlemişlerdir (Wang *et al.* 2014). Başka bir çalışmadaysa *B. sphaericus* bakterisinin çatlaklarda onarıma yardımcı olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada, onarım olan

çatlakların ultrases iletim ölçümü, su mukavemeti ve çatlakları inceleme mikroskopisi testleri yapılmıştır. Sonuç olarak CaCO_3 kristalleri görülmüş, ultrases iletim hızında gözle görülür bir düşme olduğu ve geçirimsizliğinin arttığını görmüşlerdir (De Belie and De Muynck 2008).

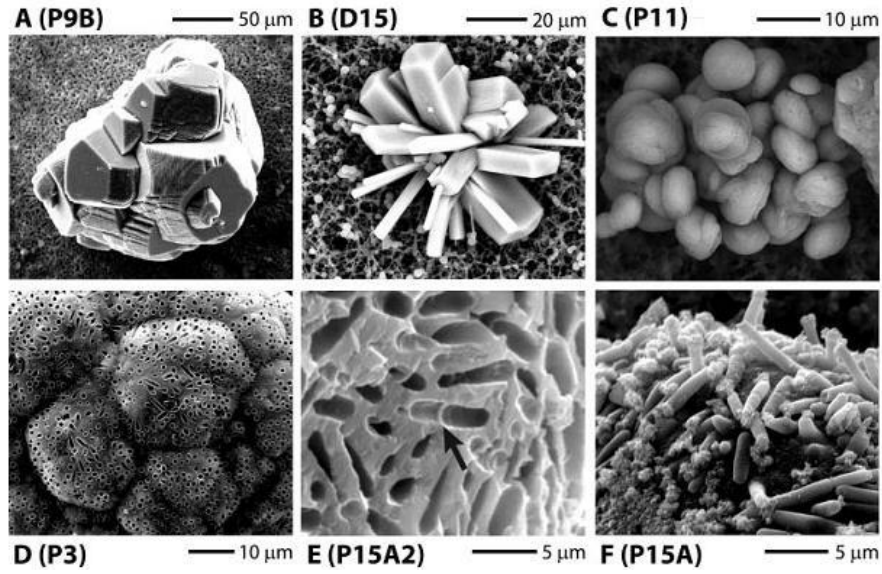
Başka bir çalışmada bakteri inokülasyonu yapılan kum ve betonlarda 25,4 mm derinliğindeki çatlaklar ve kontrol grubu karşılaştırılmış ve bakteri aşılana numunenin mukavemetinin % 61 oranında attığını kaydetmişlerdir (Ramachandran *et al.* 2001).

Mikrobiyolojik olarak uyarılan karbonat çökeltme işleminin zemin iyileştirme işlemi hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Daha önce bahsedilen hemen hemen tüm çalışmalarda CaCl_2 'nin aşırı miktarda bulunması zararlı olabilir. Kalsiyum kaynağı olarak CaCl_2 'nin kullanılması maliyeti oldukça yükseltecektir. Öte yandan, kalsiyum, yumurta kabuğu, deniz kabuğu veya istiridye kabuğu gibi atık maddelerden ekstrakte edilebilir. MICP'te kalsiyum kaynağı olarak yumurta kabuğu ve istiridyeleri kullanmış ve bitki özleriyle birlikte kalsiti üretmiştir (Choi *et al.* 2016a).

Mevcut literatürler değerlendirildiğinde MICP için en etkili bakteri olarak *B. pasteurii* belirtilmiş ve çok sayıda çalışmada kullanılmıştır (Stocks-Fischer *et al.* 1999; Bang *et al.* 2001; Ramachandran *et al.* 2001; Whiffin 2004; DeJong *et al.* 2006; Whiffin *et al.* 2007; Okwadha and Li 2010; Li 2013).

B. pasteurii, yüksek düzeyde üreaz oluşumunu yapısal olarak ifade etme kabiliyeti ile tanımlanmıştır (Morsdorf and Kaltwasser 1989). *B. pasteurii*, azot asimilasyonu dışında üreaz için farklı bir kullanımı olan uzman bir mikroorganizmadır. *B. pasteurii*, pH 9.25'te gelişmesi optimum olan, orta derecede alkalifilik bir organizmadır. Alkalifiller, ters kemiosmotik proton gradyanına bağlı ATP oluşumu için metabolik özelliklere sahiptirler. Nötrofilik organizmalarda, ATP, protonları elektron taşıma zincirinden hücre dışına pompalayarak üretilen proton kuvvetten üretilir. Bu bir proton konsantrasyonu gradyanı üretir (içte yüksek / düşük) ve ATP-sentaz yoluyla protonun tekrar hücrelere geri dönmesine neden olur ve bu da ATP oluşumuna neden olmaktadır (Prescott *et al.* 2002). *B. pasteurii* için ATP sentezini tahrik etmek için yüksek bir membran potansiyeli yaratmak için kullanılan akışlı katyon, amonyum olarak doğrudan veya üre olarak dolaylı olarak temin edilebilen amonyumdur (Jahns 1996).

CaCO_3 oluşumu sonucunda kalsitin başka bir formunu tespit etmek için XRD ve SEM analizleri yapılmıştır. SEM analizlerinin sonucunda (Şekil 7) vaterit, kalsit, ve aragonit olduğu tespit edilmiştir (Lippmann 1973).



Şekil 7. (A) kalsit, (B) aragonit, (C) vaterit. Mikrobiyal oluşumların ve minarellerin yakın ilişkisi ayrıca hücre şekilli çukurlar (D) ve septa (E) görülebilir. Bakteri ve kristallerin birbirine olan tutunması da görülmektedir (F) (Lipmann 1973)

Biyoçimentolama

Biyoçimentolama, toprakta yaşayan alkalofilik bakterilerin salgıladığı üreaz enziminin, üreyi parçalaması ve ortamdaki Ca^{2+} iyonu ile birleşerek CaCO_3 oluşturulması olayıdır. Biyoçimentolamada en önemli olgu CaCO_3 oluşum mekanizmasıdır. Doğada CaCO_3 oluşumuna biyokimyasal reaksiyonların katkı sağladığı bilinmektedir. Genellikle biyokimyasal süreçlerin sonunda oluşan minerallerin, asit veya suyla çözünmelerinin zor olduğu belirtilmektedir (González -Munoz *et al.* 2000).

Bacillus sphaericus bakterisini kullanarak kireç taşları üzerinde, farklı CaCl_2 ve üre konsantrasyonlarının etkisini belirlemek için uygulamalar yapılmış ve mikrobiyal CaCO_3 çökmesinin en fazla olduğu konsantrasyonların 50 g/l CaCl_2 (kalsiyum klorür) ve 20 g/l üre içeren solüsyon olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra zamana bağlı mikrobiyal aktiviteyi incelenmiş ve zamanla ortamdaki azotlu bileşiklerin miktarının arttığı ve Ca^{2+} iyonlarının ise azalttığı belirlenmiştir (De Belie and De Muynck 2008).

Çeşitli konsantrasyonlardaki *Bacillus pasteurii* kullanarak, beton harçlara 28 gün boyunca muamale etmiş ve hiçbir işlem görmeyen örneklerle karşılaştırarak mukavemetin %33 oranında arttığını gözlemlemişlerdir (Abdel-Gawwad 2012). Ayrıca *Bacillus megaterium* bakterisi ile çalışılmış biyolojik zemin iyileştirmeyi amaçlamışlardır (Lee *et al.* 2013).

Harçlara ve betonlara ürolitik bakterileri inoküle etmişler ve üreaz aktivitesine bağlı oluşan CaCO_3 'ün mukavemeti arttırdığını belirtmişler, oluşan kalsiyum karbonat kristallerinin SEM görüntülerini değerlendirilerek sunulmuştur (Achal *et al.* 2011).

Kalsiyum kaynağı ve üre olan bakteri süspansiyonunu farklı ortamlardan yerlerden aldıkları topraklara inoküle etmiş ve oluşan kalsitten dolayı su geçirimsizliğinin azaldığı tespit edilmiştir (DeJong *et al.* 2010).

Mikrobiyal CaCO₃ Oluşum Mekanizmaları ve Biyomineralizasyon

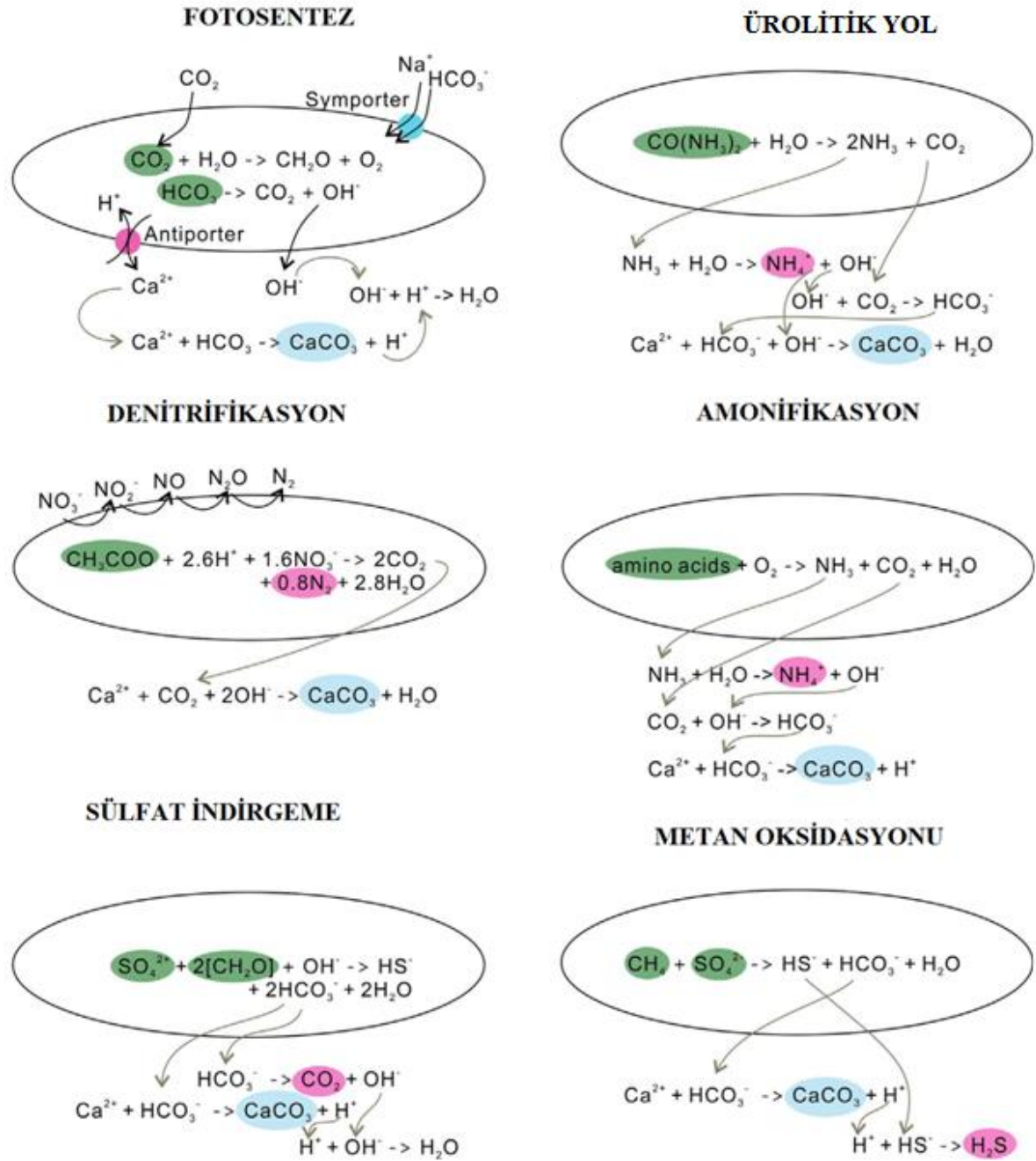
Organik maddelerin yapıtaşları olan inorganik maddelere dönüşebilmesi olayı mineralizasyon olarak adlandırılmaktadır (Ståhlberg *et al.* 2006). Mineralizasyon, hem kimyasal yolla hem de biyolojik yolla doğada hiçbir müdahale olmaksızın gerçekleşmektedir. Biyomineralizasyon ise mikroorganizmalar tarafından özellikle de prokaryotların oluşturduğu bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. Bu süreçte oluşan biyopolimerler (Ca²⁺) iyonu ile oluşturulan CaCO₃, CaSO₄ (kalsiyum sülfat) ve Ca₃(PO₄)₂ (kalsiyum fosfat) olan mineralli bileşiklerdir (Knoll 2003).

Mikrobiyal CaCO₃ çökmesi sularda, deniz çökeltilerinde ve toprakta kendiliğinden gerçekleşen bir olaydır (Cañveras *et al.* 2001). CaCO₃ çökmesi yer kürenin hemen her yerinde karşımıza çıkmaktadır (Şekil 8) (González-Muñoz *et al.*, 2010). Literatürde bu çökmenin oluşumuyla alakalı farklı yollar verilmiştir (Şekil 9), (Yıldırım vb 2016). (Dhami *et al.* 2013; Achal *et al.* 2015, Bu yollar:

- Sülfat indirgeyen bakterilerle yapılan sülfat indirgenmesi
- Nitrat redüksiyonuyla yapılan denitrifikasyon
- Fotosentez yapabilen Mikroorganizmalarla yapılan siyanobakteriyel fotosentez
- Amonifikasyon
- Ürolitik bakterilerle gerçekleşen üre hidrolizi

Son çalışmalarla beraber birçok bakteri türünün biyolojik çimentolamada yer aldığı görülmüştür (Li 2015). Bunlar, demir redüksiyon bakterisi (IRB), üreaz pozitif bakterisi (UPB) nitrifiyeni bakterisi, sülfat redüksiyon bakterisi (SRB) , oligotrofik bakterisi ve kalsiyum fosfat çökmesi ile dimorf fitaz-aktif maya üretilmesidir (DeJong *et al.* 2006; Ivanov and Chu 2008; Chu *et al.* 2009; Roeselers and Van Loosdrecht 2010)

Çalışma alanının ve uygulamaları çeşitlendirebilmek için alternatif bakterilerin çalışılması ve değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır.



Şekil 8. Farklı metabolizmalar tarafından indüklenen mikrobiyal karbonat çökmesi (González-Muñoz *et al.*, 2010)

B. pasteurii dışında farklı mikroorganizmalar kullanılarak yapılan çalışmalar da mevcuttur (Le Metayer-Levrel *et al.*, 1999; Tiano *et al.* 1999; Rodriguez-Navarro *et al.* 2003; Rodriguez-Navarro *et al.* 2007; Jonkers and Schlangen 2008; De Muynck *et al.* 2008). Bir toprak bakterisi olan *Myxococcus xanthus*, salkım vaterit oluşumunda aktif rol oynamaktadır. CO₂ ve NH₃'ün bakteriyel üretimi ve NH₃'ün NH₄ ve OH⁻'ye dönüşümü, böylece pH ve karbonat alkalinitesinin artırılması, hücreler etrafındaki mikroçevredeki çökmeyi ve bakteriyel yüzey üzerine doğrudan akan fizikokimyasal koşulları (yüksek süperdoyma) belirlemektedir (Rodriguez-Navarro *et al.* 2003). *Proteus vulgaris* biyokütle büyümesi için gerekli olan amonyum seviyesi sağlamak için üreaz kullandığı bilinmektedir (Whiffin 2004).

Bakteri Grubu	Bakteri Çeşitleri	Metabolizma	Reaksiyon	Yan Ürün
Siyanobakter ve Alg	<i>Nostoc calcicola</i>	Fotosentez	$2\text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{CaCO}_3 + \text{O}_2$	$\text{O}_2, \text{CH}_2\text{O}$
	<i>Oscillatoria willei</i> <i>Anabaena cycadae</i>			
Ürolitik Bakteriler	<i>Bacillus pasteurii</i>	Üre hidrolizi	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}^{2+} + \text{Cell} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{Cell-CaCO}_3$	NH_4^+
	<i>Bacillus sphaericus</i>			
	<i>Bacillus megaterium</i>			
Nitrat İndirgeyen Bakteriler	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	Denitrifikasyon	$\text{CH}_2\text{COO}^- + 2,6\text{H}^+ + 1,6\text{NO}_3^- \rightarrow 2\text{CO}_2 + 0,8\text{N}_2 + 2,8\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2(\text{aq}) + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{CaCO}_3(\text{s}) + \text{H}_2\text{O}$	$\text{CO}_2 + \text{N}_2$ $\text{NO} + \text{N}_2\text{O}$
	<i>Nitrosomonas</i> türleri			
	<i>Nitrobakter</i> türleri			
Miksobakteriler	<i>Myxococcus xanthus</i>	Amonifikasyon	$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$	NH_3
Sülfat İndirgeyen Bakteriler	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Sülfat İndirgenmesi	$\text{SO}_4^{2-} + 2[\text{CH}_2\text{O}] + \text{OH}^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{HS}^-$	CO_2 HS^-
	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>			

Şekil 9. Mikroorganizmaların CaCO_3 oluşum mekanizmaları (Yıldırım vd 2016)

Biyoçimentolama (biocementation) amaçları için, en önemli üç kriter;

- (i) ekonomik üretimi
- (ii) yüksek düzeyde üreaz aktivitesi
- (iii) steril olmayan bir ortamda üretilebilir.

B. pasteurii, bu kriterleri *P. vulgaris*'ten daha uygun olmuş ve bu nedenle biyomineralizasyon için tercih edilen üreaz üretici bakteriyel kaynağı oluşturmuştur. Mevcut araştırmalar değerlendirildiğinde *B. pasteurii* üreazın yüksek amonyum konsantrasyonlarda da aktif olduğu saptanmıştır (Wiley and Stokes 1962, Wiley and Stokes 1963).

Mevcut kaynaklar detaylı bir şekilde değerlendirildiğinde MICP için en etkili bakteri olarak *B. pasteurii* oldukça fazla çalışılmıştır (Stocks-Fischer *et al.* 1999; Bang *et al.* 2001; Ramachandran *et al.* 2001; Whiffin 2004; DeJong *et al.* 2006; Whiffin *et al.* 2007; Okwadha and Li 2010; Li 2013).

B. pasteurii, üreaz pozitif bir bakteri olarak tanımlanmıştır (Morsdorf and Kaltwasser 1989). *B. pasteurii*, üreaz aktivitesinin dışında aynı zamanda azot asimilasyonunda da kullanılan bir bakteridir. *B. pasteurii*, alkalafilik bir bakteri olup optimum çalışma pH'sı 9.25 olarak belirlenmiştir.

Sülfat indirgeyen bakterilerle yapılan sülfat indirgenmesi

Genellikle sular ve toprakta yaşamlarını sürdüren sülfat indirgeyen bakteriler, ortamdaki organik karbonlu bileşikler ve sülfatı SO_3^{2-} 'e (sülfid) ve HCO_3^- 'e indirgemektedir. Karasız bir bileşik olan HCO_3^- , OH^- iyonlarına ve CO_2 gazına dönüşerek ortamın asitliğini düşürerek pH'ı arttırmaktadır. Ortamda bulunan Ca^{2+} iyonları bikarbonat iyonlarıyla birleşerek CaCO_3 şeklinde çökelmektedir (Zhu and Dittrich 2016).

Sülfat indirgeyen bakteriler (SRB=Sulfate Reducing Bacteria), organik karbonu bikarbonata okside ederken sülfatın sülfüre indirgenmesini sağlar, bu sırada pH ve doygunluk durumu artar (Baumgartner *et al.* 2006) Öte yandan SRB, siyanobakteriyel çamurların EPS (Extracellular polymeric substances)'sini parçalayarak veya hücrelerden Ca^{2+} atarak yerel Ca^{2+} konsantrasyonunu artırabilir (Visscher *et al.* 2000; Plée *et al.* 2010). HCO_3^- konsantrasyonunun artması ve Ca^{2+} salınımı ile CaCO_3 çökmesini destekler. Ek olarak, metabolik olarak inaktif SRB hücreleri, örneğin *Desulfovibrio desulfuricans* suşu G20, heterojen çekirdeklenme yerleri sağlayarak kalsiyum karbonat çökmesine neden olabilir (Bosak and Newman 2003). Hem hücre yüzeyleri hem de EPS kalsiyum karbonat çökmesini etkiler (Braissant *et al.* 2007). Birçok saha çalışmasında, siyanobakterilerin aktif olduğu yüzey tabakalarının altındaki mikrobiyal matlarda SRB ile karbonat çökmesi gözlenmiştir (Baumgartner *et al.* 2006).

Sülfat indirgeme yeteneği bulunan *Desulfovibrio desulfuricans* bakterisini kullanarak karbon çelik boru hattında bulunan korozyon, CaCO_3 halinde çökeltilmiş ve korozyon değerlerinde ciddi bir düşüş elde etmişlerdir (Almahamedh 2013).

Nitrat redüksiyonuyla yapılan denitrifikasyon

Toprakta bulunan NO_2^- (nitrit) ve NO_3^- (nitrat) bileşiklerinin, mikroorganizmalar yardımıyla aneorobik bir ortamda indirgenmesi sonucu elementer azota dönüşmesi ve NH_3 (amonyak) açığa çıkması olayına denitrifikasyon denilmektedir. Reaksiyonda önce NH_3 *Nitrosococcus* ve *Nitrosomonas* bakterileriyle NO_3^- 'e, *Nitrobacter* ise NO_3^- 'i NO_2^- 'e dönüştürmektedir. Ortamdaki H^+ iyonları azalırken, OH^- iyonları üretildiği için artmaktadır. Oluşan CO_2 , ortamdaki OH^- ve Ca^{2+} iyonlarıyla reaksiyona girip CaCO_3 şeklinde çökelmiştir (Ivanov and Chu 2008; Del Rio *et al.* 2015).

Anaerobik koşullar altında nitrat; mikroorganizmalar tarafından enerji ve hücre büyümesi için organik bileşikler oksitlemek için kullanılır (Martin *et al.* 2013). Nitratları azaltabilen bir dizi bakteri, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Denitrobacillus*, *Thiobacillus*, *Spirillum*,

Micrococcus, *Pseudomonas* ve *Achromobacter*'i içerir (Karataş 2008). Denitrifiyerler genellikle büyüme stratejilerinde esneklik sağlayan fakültatif anaeroblardır (Karataş 2008).

Siyanobakteriyel fotosentez

Fotosentetik mikropların, özellikle siyanobakterilerin, büyük karbonat çökeltilerinden sorumlu oldukları kabul edilmektedir. Siyanobakterilerin Dünya tarihinin neredeyse % 70'inde karbonat kayalarının üretimine katkıda bulunan başlıca faktör olduğu tahmin edilmektedir (Altermann *et al.* 2006).

Yeryüzünde karasal ortamlarda, tatlı sularda ve denizlerde bulunan ve fotosentez yeteneğine sahip olan mikroorganizmalar siyanobakterilerdir. Kalsiyum karbonat çökmesine katkı sağladıkları bilinmektedir (Mavromatis *et al.* 2012; Rahman and Halfar 2014).

Siyanobakterilerin gerçekleştirdiği fotosentez esnasında, OH^- iyonları ve HCO_3^- (bikarbonat) arasında değişim gerçekleşerek, bikarbonat iyonları, OH^- iyonlarına ve CO_2 'e ayrışır ve ortamın bazikliğini artırır. Ortamda Ca^{2+} iyonları ile oluşan HCO_3^- bileşik oluşturur ve CaCO_3 çökmesini oluşturur (Kamenneya *et al.* 2012).

Amonifikasyon

Farklı organik atıkların, ölü hayvan ve bitki kalıntılarının yapısındaki proteinlerin parçalanması sonucunda NH_3 'ün ortama salınması olayına amonifikasyon denilmektedir (Al-Thawadi 2011). Bu süreçte NH_3 ortamın pH'sını arttırarak Ca^{2+} iyonları ile CO_3^{2-} iyonları birleşerek CaCO_3 oluşturmaktadır.

Literatürde bu mekanizmayla ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. CaCO_3 oluşturduğu bilinen *Myxococcus xanthus*, ortamdaki aminoasitleri parçalayarak NH_3 ve CO_3^{2-} iyonlarını oluşturmuştur ve ortamın bazikliğinin arttığını gözlemlemişlerdir (Rodriguez-Navarro *et al.* 2003; González-Muñoz *et al.* 2010). Mikrobakterileri temsil eden bazı türler, örneğin *Myxococcus xanthus*, karbonat çökmesi için bir çekirdeklenme şablonu olarak işlev görür (Chekroun *et al.* 2004). Ana özellikleri, Gram-negatif, aerobik, patojenik olmayan, heterotrofik ve çubuk şekilli olmasının yanı sıra, amino asitleri tek enerji kaynakları olarak kullanabilmeleridir (Dworkin 1993; Gerth *et al.* 2003). Bu toprak bakterileri hemen hemen tüm ortamlarda bol miktarda bulunur ve organik materyalin bozulmasında önemli bir rol oynarlar (Omar *et al.* 1995).

Ürolotik bakterilerle gerçekleşen üre hidrolizi

Üre aktivitesi toprak bakterileri arasında yaygındır ve bu, kalsit üretimi için uygulanan MICP de en çok kullanılan yaklaşım olmuştur (Mobley and Hausinger 1989; Stocks-Fischer *et al.* 1999; Fujita *et al.* 2000).

Biyolojik tıkanma ve biyolojik çimentolanma için en etkili olan yöntemin MICP olduğunu söylemişlerdir. Bu süreçte en çok kullanılan türlerin ise üreaz pozitif bakteriler (UPB) olduğunu belirtmişlerdir (Li 2015).

Üreaz enzimi ürenin hidroliz edilmesinde kullanılan ve nitrojen kaynağı elde etmek için önemli bir yeri olan fosfotriesteraz ve amidohidrolaz grubunda bulunan enzimdir. Enzimin aktif bölgesinde kofaktör olarak genellikle nikel iyonu (Ni^{2+}) kullanılır (Ciurli *et al.* 1999).

Sertleştikten sonra, çökelmiş $CaCO_3$, onları bağlayan kum parçacıkları arasında köprüler görevi görür ve toprağın mekanik özelliklerini iyileştirmeye yardımcı olur (Harkes *et al.* 2010).

Karbonat reaksiyonunda üre aktivitesi oluşacak kütlenin miktarında önemli bir etkindir. Üre aktivitesi aynı ortam şartlarında farklı bakterilerde değişiklik gösterebilmektedir (Whiffin 2004). Üre aktivitesi sonucunda oluşan kütle, ortam şartlarından da etkilenmektedir. Kütle oluşumunda ortamda kirlilik oranı arttıkça kütle oluşumu olumsuz etkilenebilmektedir. Zeminin steril olarak kullanılması farklı bakteri türlerinin karşılaştırılması açısından önemlidir (Whiffin 2004; DeJong *et al.* 2006).

Üre, omurgalıların ürettiği başlıca azotlu atıktır. Su ve toprak ekosistemlerinde önemli bir azot kaynağıdır. Ortamda üre yaygın kullanılabilirliği ve azot için evrensel gereksinimine yanıt olarak, biyotanın çeşitli bir bölümü ürenin aktivasyonu yoluyla üre hidroliz yeteneği ile evrimleşmiştir. Pek çok bakteri, birkaç maya türü ve Jack fasulyesi (*Canvalia ensiformis*) (Dixon *et al.* 1980), domuz otu (*Xanthium spp.*) da dahil olmak üzere bir dizi yüksek bitkide çoğalma meydana gelmektedir. Örneğin; kazayağı (*Chenopodium album*) (El-Shora 2001) ve dut yaprağı (*Morus alba*) gibi (Hirayama *et al.* 2000).

Üre, mantarlar (*Aspergillus sp.*, *Coprinus sp.*, *Neurospora sp.*, *Penicillium sp.* ve *Ustilago sp.*), *Bacillus* (*Bacillus lentus*, *B. pasteurii*) dahil olmak üzere farklı cinse veya türe ait çeşitli mikroorganizmalar için bir azot kaynağıdır. *Bacillus* (*B. sphaericus* ve *B. subtilis*), *Lactobacillus* (*Lactobacillus reuteri*, *L. animalis*, *L. fermentum*), *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus thermophilus* ve *Staphylococcus epidermidis*), *Nitrosomonas* ve *Nitrosospira* türleri, mor sülfür ve sülfür olmayan bakteriler (*Rhodobacter*

capsulatus), siyanobakteriler (*Anabaena cycadae*, *A. cylindrica*, *A. doliolum*, *A. variabilis*, *Anacystis nidulans*, *Spirulina maxima*, *Nostoc calcicola*, *N. muscorum* ve *Brevibacterium ammoniagenes*) ve Actinomycetes (*Streptomyces aureofaciens*) (Hasan 2000). Mikrobiyal üreaz aktivitesi sıcaklık, pH (asit-üreaz aktivitesi hariç 7 - 8.7 optimal), üre konsantrasyonu ve son ürün amonyak, karbon kaynağı ve inkübasyon süresinden büyük ölçüde etkilenir (Hasan 2000).

Oluşacak kütle ortamda bulunan karbonat ile kalsiyumun reaksiyonu sonucunda oluştuğundan kalsiyumun artması ile oluşacak kütle miktarı da artacaktır (Okwadha and Li 2010). Bir diğer etkende sıvı besiyeri ve ortam pH değeridir. pH değeri de üre aktivitesi üzerinde etkili olmuştur (Whiffin 2004). Birçok bakteri kendi mikrobiyal aktivitesi ile üreaz enzimi üretebilecek kapasitededir (Mobley *et al.* 1995). Besinler bakterilerin enerji kaynaklarıdır ve dolayısıyla besinler kalsit üreten bakteriler için önemli bir yere sahiptir. Zemine uygulama ve kültür aşaması süresince bakteri için besin sağlanmalıdır (Ng *et al.* 2012). Bakteri için gerekli besinler genel olarak CO₂, N, P, K, Mg, Ca, Fe vd. içermektedir (Mitchell and Santamarina 2005).

Uygulamanın nasıl yapılacağı zeminde homojen bir yapının elde edilmesi açısından önemlidir. Zeminlere üstten süzülerek yapılan uygulamalarda kütle oluşumu zemin içerisinde homojen bir yapıya sahip olmamıştır (Whiffin *et al.* 2007; Cheng and Cord-Ruwisch 2012).

Zemine daldırılarak uygulama yapılmasında ise daha iyi sonuçlar alınmıştır ve bunun sebebinin de kalsiyum karbonat reaksiyonunun zemin içerisinde devam etmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Cheng and Cord-Ruwisch 2012). Süzülerek yapılan uygulamada homojen bir yapı elde edilemediğinden derinlik arttıkça porozite değişkenlik göstermiştir (Whiffin *et al.* 2007).

Zemin uygulamasında üreaz üreten bakterinin geometrik uyumu zemin uygulamasında bakterinin transferi için önemlidir. Zemin karışımı ve bakterinin boyutlarına bağlı olarak küçük boşluklardan rahat geçiş sınırlanabilir (Ng *et al.* 2012). Üre aktivitesi bakteriler arasında yaygındır ve bu, kalsit üretimi için uygulanan MICP için en çok kullanılan yaklaşım olmuştur (Mobley and Hausinger 1989; Stocks-Fischer *et al.* 1999; Fujita *et al.* 2000).

Üre hidrolizi, üre ile suyun reaksiyona girdiği ve iyonik ürün ürettiği kimyasal bir reaksiyondur. Bu reaksiyon kalsiyum iyonu (Ca⁺²) varlığında yapıldığı zaman, kalsiyum karbonat tortusu oluşmaktadır. (Kalantary and Kahani 2015).

Mikrobiyal üreaz, eriyik amonyum ve inorganik karbon ve CO₂ üretmek için üreyi hidrolize eder. Çevreleyen malzemeye salınan amonyak, pH'ı arttırır ve kalsiyum açısından

zengin bir ortamda çözünmeyerek CaCO₃ birikmesine yol açmaktadır. Kantitatif olarak, 1 mol üre hücre içi 2 mol amonyuma hidrolize olmaktadır (Hall–Stoodley *et al.* 2004; Patro *et al.* 2015).



Bu reaksiyonlar, üreazın aktivitesini kontrol eden doğal çevresel faktörlerin etkisi altında meydana gelmektedir. Subsurfacebacterial popülasyonlar enjeksiyon ile yerine konabilir (DeJong *et al.* 2006) veya besin maddelerinin enjeksiyonu ile uyarılabilir (Fujita *et al.* 2000).

Üreaz enzimi, bazı mantarlar, bakterilerde, bitkilerde ve alglerde bulunmaktadır (Berns 1966; Mobley and Jones 1989; Olszewsk *et al.* 2004; Abe and Kawashima 2015) ve genellikle toprak enzimi olarak da bilinmektedir. Bakterilerin rolü üreaz enzimini sağlamak olduğundan, üreaz enzim aktivitesi bakteri aktivitesi olarak kabul edilmektedir ve üre hidrolizi oranıyla ölçülebilmektedir ve üre hidrolizinin, suyun varlığında üre ile amonyum ve karbonat iyonlarına dönüştürülmesini içermektedir. Üreaz enzim aktivitesini ölçmek için zamanla elektriksel iletkenlikteki değişim hızının oranı ölçülmüştür (Kalantary and Kahani 2015). CaCO₃ çöktürme tekniğinde bakteriyel hücreleri kullanılmaktadır. Bakteriler ya yüksek oranda üreaz enzimi üretmektedir ya da saflaştırılmış enzimi doğrudan üretmektedir (Harkes *et al.* 2010).

Azot asimilasyonu dışındaki amaçlar için üreaz kullanan organizmalar, genellikle, enzim üretiminin enerji verimli hale getirilmesi için yüksek seviyelere üreaz üretme ve / veya değişken olarak üretme kabiliyetine sahiptir. Örneğin, *Yersina enterocolitica* ve *Morgenella morganii* normal olarak düşük seviyelerde üreaz gösterirler, fakat düşük pH'lı koşullar altında üreaz, düşük pH mide suları boyunca bağırsakları kolonize etmek üzere geçiş sırasında hayatta kalmaya yardımcı olmak için yüksek seviyelerde indüklenir (Bibi 2018).

Mide içinde düşük pH mide sularının bir sakinleri olan *Helicobacter pylori*, hücre yüzeyinde sadece hücre içi değil aynı zamanda hücre dışı üreaz içerir. Hücre dışı üreaz, midenin düşük pH ortamından, hücre yüzeyine yakın amonyum üretiminden üretilen daha nötral pH'lı bir mikro ortam sağlayarak koruyucu bir rol oynar (Marshall *et al.* 1990; Dunn and Grütter 2001). Fakat *Helicobacter pylori* patojinitesi yüksek bir bakteri olduğu için kullanılması risklidir. *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Diaphorobacter nitroreducens* türleri de üre hidrolizi yapan bakterilerdendir (Dhami *et al.* 2013; Achal and Mukherjee 2015).

Zemin içerisinde gerçekleşen reaksiyonu ve oluşan CaCO_3 miktarının belirlenmesi zeminlerin iyileştirme için kritik değer taşımalıdır. Bu nedenle ilgili reaksiyonların kantitatif değerlendirmelerinin yapılabilmesi için çeşitli analizler yapılabilir. Örneğin reaz aktivitesini amonyum konsantrasyonuna bağlı olarak ölçebilen Nessler yöntemi kullanılmaktadır. Zamanla lm kolaylaştırmak için ilk metotta çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. (Rowshanbakht *et al.* 2016). Üreaz aktivitesi dışında zeminde kütle değişimi ve oluşan CaCO_3 miktarı da ölçülebilir. Bu işlem için etüvde kurutulmuş zemin güçlü asitler ile muamele edilerek oluşan kütle farkları ölçülebilmektedir (Lee *et al.* 2013).



MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullandığım cihaz ve aletler:

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)

Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)

Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

Derin Dondurucu (Nuair -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)

Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Santrifüj (Hettich Mikro 22R, GERMANY)

Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)

Peristaltik pompa (SEKO PPR0004A1235 A, TÜRKİYE)

Uygulamada Kullanılan Bakteri İzolatı

Kalsiyum karbonat reaksiyonunun gerçekleşmesinde üreaz aktivitesinin yüksek olduğu ve çökelmede rol aldığı bilinen *in vitro* ortamda kalsiyum karbonat çöktürebilen *Viridibacillus arenosi* K64 (GenBank ID:KR873397) bakterisi kullanılmıştır. Bu izolat mağaralardan izole edilmiş ve kalsiyum karbonat çökeltisi oluşturduğu bilinen bir bakteridir. Bakteri hareketli, Gram pozitif, üreaz pozitif ve aerob bir bakteridir. Bakterinin boyutu 1 ile 2,5 µm arasında değişmektedir. Bakterinin tanısı 16S rDNA dizi analizleri kullanılarak yapılmıştır. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde bulunan Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Bakterinin yoğunluğu TSB besi ortamında spektrofotometre analizi ile $1-2 \times 10^9$ cfu/ml olarak bulunmuştur (Barış 2009) .

Uygulamada kullanılan kültür ortamı ve çözeltilerin hazırlanışı

Trypticase Soy Agar (TSA): 40 g trypticase soy agar karışımı 1 L saf su içerisinde konulup, besiyeri steril etmek için otoklava atılmıştır. 45- 50°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra steril edilmiş petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Stok kültürden steril bir ortamda özeyle alınan bakteri petrilere çizgi ekim yapılarak 30°C etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Tripticase Soy Broth with Urea (TSB+U): Trypticase Soy Broth, 30 g/L; üre, 20 g/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 12 mg/L; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 24 mg/L içeriği bulunan sıvı besiyeri kullanılmıştır. Üre hariç diğer bütün kimyasallar steril olması için otoklava atılmıştır. Üre elde ve steril bir ortamda 0,45µm filtreden geçirilerek oda ısısındaki sıvı besiyerine eklenmiştir. Steril bir ortamda stok kültürden özeyle alınan bakteri besiyerine ekilerek 48 saat boyunca 100 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır (Akoğuz 2019).

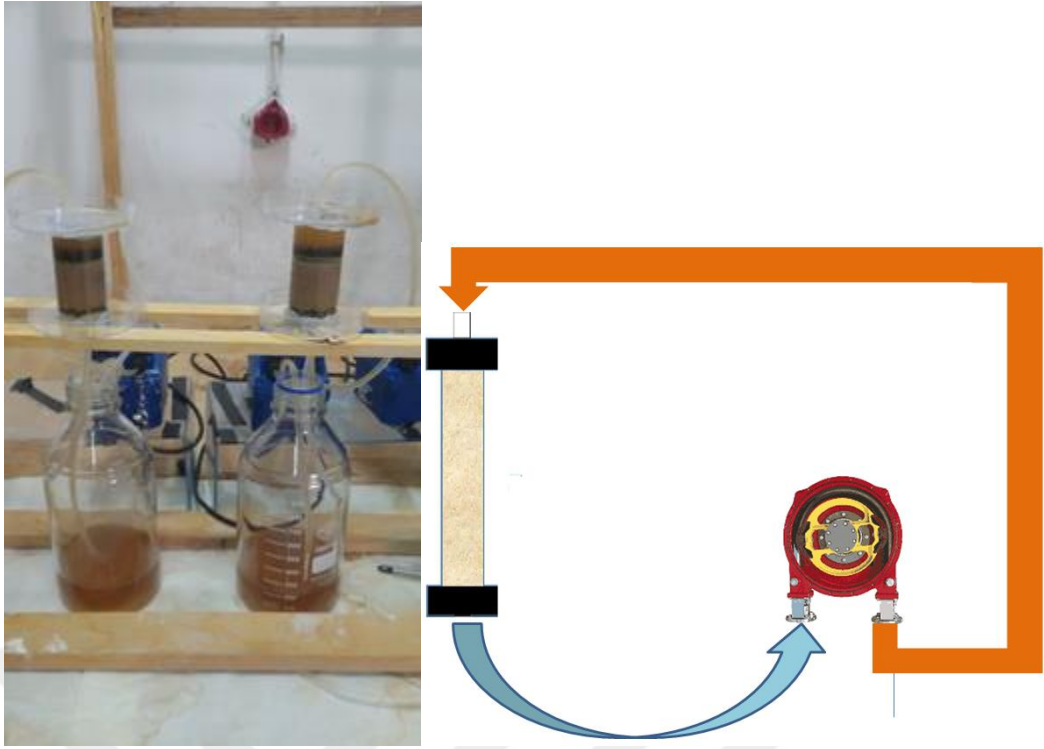
HCl Asit Çözeltisi: 405 ml %37'lik ticari HCl (Hidro klorik asit) dikkatli bir şekilde 595 ml saf su üzerine dikkatli bir şekilde dökülerek hazırlanmıştır.

İzotonik Çözelti: 8,5 g NaCl (Sodyum klorür tuzu) hassas terazide tartılıp saf suyla 1 L ye tamamlanıp daha sonra tüplere eşit bir şekilde konulup steril etmek için otoklava atılmıştır.

Nessler Çözeltisi: 100 gr HgI_2 ve 70 gr KI saf suda çözündürüldü, 160 gr NaOH ihtiva eden 500 mL saf suya dikkatli bir şekilde ilave edilmiş (oda sıcaklığında olacak şekilde) ve 1000 mL' ye tamamlanmıştır. Kapaklı cam kap (pyrex) içerisinde güneş ışığına maruz kalmaması için buzdolabında + 4°C'de 1 yıl saklanabilir.

Kalıpların ve Deney Ortamının Hazırlanması

Zeminler 38 mm çapında 150 mm yüksekliğindeki kalıplara %35 sıklıkla yerleştirilmiştir. Zeminlerin alt ve üst kısımlarında homojen bir dağılım göstermesi için çakıl (10 mm yüksekliğinde) ve sünger kullanılmıştır. Üç tane kalıp hazırlanmıştır. Deney anında stok solüsyon ve /veya kültür ortamı 1. Seviyedeki peristaltik pompalara silikon hortumlar yardımıyla üstten verilmiştir. Permabilite azalmaya başladığında üstten taşan sıvı tekrar hortumların yardımıyla alttaki kaba iletilmiştir. Bu çevrim 10 ve 12 gün boyunca devam etmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Deney düzeneği

Zemin

Yapılan çalışmalarda genellikle ticari silis kumu kullanılmıştır. Çalışmamızda ASTM E 11 standardına göre ticari silis kumu kullanılmıştır (Şekil 11). 0,1 – 0,5 mm tane boyutlu silis kumu zemin kullanılmıştır ve Tablo 2’de verilmiştir(Akoğuz 2019). Zeminler için kullanılan kum otoklavda steril edilerek kullanılmıştır



Şekil 11. İyileştirmede kullanılan silis kumu (Akoğuz 2019)

Tablo 2. Kullanılan zemine ait analiz sonuçları (Akoğuz 2019)

Özgöl ağırlık ^a	2,65
e max	0,86
e min	0,61
Rölatif Sıklık (%)	35
D ₁₀ ^b	0,18
D ₃₀ ^b	0,2
D ₆₀ ^b	0,22
Uniformluluk katsayısı, Cu ^b	1,22
Derecelenme katsayısı, Cc ^b	1,01
Zemin Sınıflandırması (USCS)	SP

^aASTM D854-14, ^bASTM D2487-11, SP(Kötü derecelendirilmiş kum)

Yöntem

Üreaz aktivitesi için standart grafik oluşturulması

Üreli besiyerine inokülasyonu yapılan bakteriler ve 48 saat 120 rpm hızında 25 °C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra standart çözeltiler için 6 adet tüpe 1 ml’si 1,0 mg amonyak azotuna karşılık gelen stok amonyum çözeltisinden (3.82 g/L NH₄Cl) 0;3; 0,7; 1,0; 2,0; 3,5; 5,0 ml eklenerek 50 ml’ye tamamlanmıştır. Üzerine 1’er ml Nessler reaktifi (1 g HgCl₂; 2,5 g KI; 6 g KOH; 30 mL saf suda çözöldü ve filtre ile steril edildi) eklenmiştir. Örnek çözeltiye (kültür, süzöüntü sıvısı, uygulama sonrası oluşun zemin) de aynı işlem uygulandı. Örnek çözeltide oluşun renk 450 nm’de spektrofotometrede ölçöldü ve oluşturulan standart grafiğne karşı okunurak eşdeğner amonyak oluşumu sayısal olarak belirlenmiştir. Zemin uygulamaları bittikten sonra elde edilen zeminlere de aynı işlem uygulanmış ve bakterinin kültüründe ve zemindeki üreaz aktivitesi karşılaştırılmıştır (Prescott *et al.* 2002).

Üreaz aktivitesinin belirlenmesi

Üreaz aktivitesi: $\frac{\text{numune konsantrasyonu} \times \text{çözelti hacmi}}{\text{enzim hacmi} \times \text{test hacmi} \times \text{inkübasyon süresi}} \text{ mM/dk}$ (Zusfahair *et al.*

2018) formölüyle hesaplanmıştır.

Numune konsantrasyonu: 425 nm’de okunan absorbans değneri mL/dk

Çözelti hacmi: Santrifüj edilen numune

Enzim hacmi: Santrifüj edildikten sonra kalan kısım(süpernatant)

Test hacmi: Nessler ayıracı

İnkübasyon süresi: Nessler ayıracı konulduktan sonra beklenen süre

a) Zeminlere verilen kültürlerin 48 saatlik üreaz aktivitesi

Üreaz aktivitesi için; TSB (üresiz), TSB+U (ürel), TSB + CaCl₂ besiyerlerine bakteri ekimi yapıldıktan sonra 120 rpm'de 35 C 'de inkübasyona bırakıldı. Her besiyerden 5 ml alınarak 6000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir ve oluşan süpernatant kuvars küvetlere konulmuş ve üzerine 0,1 ml Nessler ayırıcı dökülerek 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve buna bağlı üreaz aktiviteleri hesaplanmıştır. Bu işlem her saat başı (12. saate kadar) tekrarlanmıştır. 24. ve 48. saatin sonunda da ölçüm yapılarak kaydedilmiştir (Zusfahair *et al.* 2018).

b) Zeminlere verilen kültürlerin üreaz aktivitesi

TSB besiyerine ekilen *V. arenosi* bakterisi 48 saat 100 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda sıvı kültürüne 1,5 M üre (filtre ile steril edilmiştir) + 0,75 M CaCl₂ eklenerek 24 saat daha aynı şartlar altında inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen bakteri süspansiyonundan 10 gün boyunca her gün aynı saatte; steril mikropipetle 4,5 ml örnek alınıp santrifüj tüplerine konuldu. Tüpler 6000 rpm' de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Sürenin sonunda tüplerden süpernatant kısmı alınarak 4 ml'lik küvetlere konulmuş ve üzerine 0,06 ml Nessler ayırıcı konulduktan sonra 450 nm'de anlık ve 1 dk sonundaki absorbans değerleri belirlenmiştir (Rowshanbankht *et al.* 2016; Zusfahair *et al.* 2018).

Zeminlere verilen TSB ve TSB + CaCl₂ kültüründen 5 ml alınarak eppendorflara konuldu 6000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Sürenin sonunda elde edilen süpernatant küvetlere konularak üzerine 0,6 ml Nessler ayırıcı konuldu ve numunelerin 425 nm'de anında ve 1 dk'nın sonunda absorbans değerleri ölçülmüştür ve buna bağlı üreaz aktiviteleri ölçülmüştür.

c) Zeminlerden geçen kültür süzöntüsünün üreaz aktivitesi

Bir numaralı numuneden geçen kültür süzöntüsü 10 gün boyunca her 24 saatte 5g alınarak 6000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı alınarak Nessler ayırıcı ile muamele edilmiştir. 450 nm'de anlık ve 1 dk sonunda oluşan absorbans değerleri ölçülmüştür.

Başka bir zemin (2 numaralı zemin) için uygulama 12 gün boyunca sürmüştür. Zemine 48 saat boyunca; bakteri aşılannmış TSB kültürü verilmiştir. 48. saatten itibaren kültürlerle TSB + TSB + CaCl₂ verilmiştir ve çevirim 10 gün boyunca sürmüştür. Zeminlerden geçen kültürlerden altta biriken süzöntüden her 24 saatte 5 g alınmıştır ve 6000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta 0,06 ml Nessler ayırıcı konularak 450 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

Uygulama yapılan zeminlerden her 24 saatlik dilimlerde 10-12 gün boyunca zeminden geçen kültür süzöntüsünden 5 ml alındı ve numuneler eppendorflara alınarak 6000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernant küvete alındıktan sonra üzerine 0,1 ml Nessler ayırıcı konulmuş ve 450 nm'de anlık ve 1 dk'nın sonundaki absorban değerleri ölçülmüştür (Rowshbank *et al.* 2016; Zufahair *et al.* 2018) .

Zeminlere uygulanan kültürlerin pH değişimlerinin izlenmesi

a) Zeminlere verilen kültürlerin 48 saatlik pH değişimi

Zeminleri iyileştirmede kullanılan kültürlerden her saat başı (12. saate kadar) , 24. saat ve 48. saat sonunda 5 mL alınarak pH değerleri ölçülmüştür.

b) Zeminlere verilen kültürlerin pH değişimi

Zeminlere verilmek için hazırlanan kültür ortamları bakteri ekimi yapıldıktan sonra 120 rpm'de 12 saat inkübasyona bırakılmış ve her gün aynı saatte pH değerleri ölçülmüştür ve kaydedilmiştir.

c) Zeminlerden geçen kültür süzöntüsünün pH değişimi

İyileştirme yapılan zeminlerden geçen kültür ortamı her gün aynı saatte alınmış ve pH değerleri ölçülerek kaydedilmiştir.

Kalsiyum karbonat oluşumunun ölçülmesi

Kalsiyum karbonat miktarının belirlenmesinde asitle muamele edilmesi sonucunda oluşan ağırlık miktarı baz alınmıştır. Kalsiyum karbonat yüzdesini belirlemede birçok teknik bulunmaktadır. Bu tekniğin kullanılmasının sebebi gerekli materyallerin bulunması ve uygulamanın kolay olmasıdır (Lee *et al.* 2013).

Hazırlanan numunelere 12 gün boyunca TSB ve TSB + CaCl₂ ile muamele edildikten sonra numuneler etüvde 35°C 15 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır. Zeminler kuruduktan sonra eşit miktarda üçe bölünmüştür ve numunelerin üst, orta ve alt kısımdan 5 g alınarak (A) HCl asit ile muamele edilmiş ve oluşan CaCl₂'nin çözünmesi sağlanmıştır. Zeminler, asitten uzaklaştırılmak için saf suyla defalarca yıkanmıştır. Böylelikle çözülebilen bütün kalsiyum kaynakları zeminlerden uzaklaştırılmış oldu. Zeminler 35°C'de kurumaya bırakıldı. Kuruyan zeminler (B) tartılmış ve son ağırlık ilk ağırlıklarından çıkarılarak elde edilen sonuç aşağıdaki formülle hesaplanarak; oluşan CaCl₂ belirlenmiştir (Choi *et al.* 2017a).

$$\text{Kalsiyum karbonat yüzdesi (\%)} = 100 - (B/A) \times 100$$

CaCO₃ çökmesi sonucu oluşan zeminlerdeki canlılık aktivitesinin belirlenmesi.

12 gün boyunca TSB ve TSB+CaCl₂ kültürleriyle muamele edilen zeminler, 35°C deki etüvde 15 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulan bu zeminlerden 1 g alınarak steril ortamda dilüsyon yapıldı. 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 'lik bakteri süspansiyonlarından mikropipetle 1 ml çekilerek, drigalski spatula ile TSA besiyerine ekim yapıldı. Petriler 35°C inkübasyona bırakıldı. 16 saatin sonunda kültür ortamında sonunda hem canlılık hem de gram zemindeki bakteri sayısı belirlenmiştir (Prescott *et al.* 2002).

Bakteri Yoğunluğunun Belirlenmesi

Kullandığımız TSB, TSB +Üre, TSB + Üre +CaCl₂ besiyerlerine steril ortamda bakteri ekimi yapıldı ve 100 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve her saat başı 5 g alınarak eppendorflara konulup ve 6000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Oluşan süpertanant kuvars küvetlere alınarak spektrometrede 600 nm dalga boyunda ölçüldü ve bakteri yoğunlukları tespit edilmiştir. Bu işlem 12. saat (her saat başı) , 24. saat ve 48. saatin sonunda tekrarlanmıştır (Prescott *et al.* 2002).

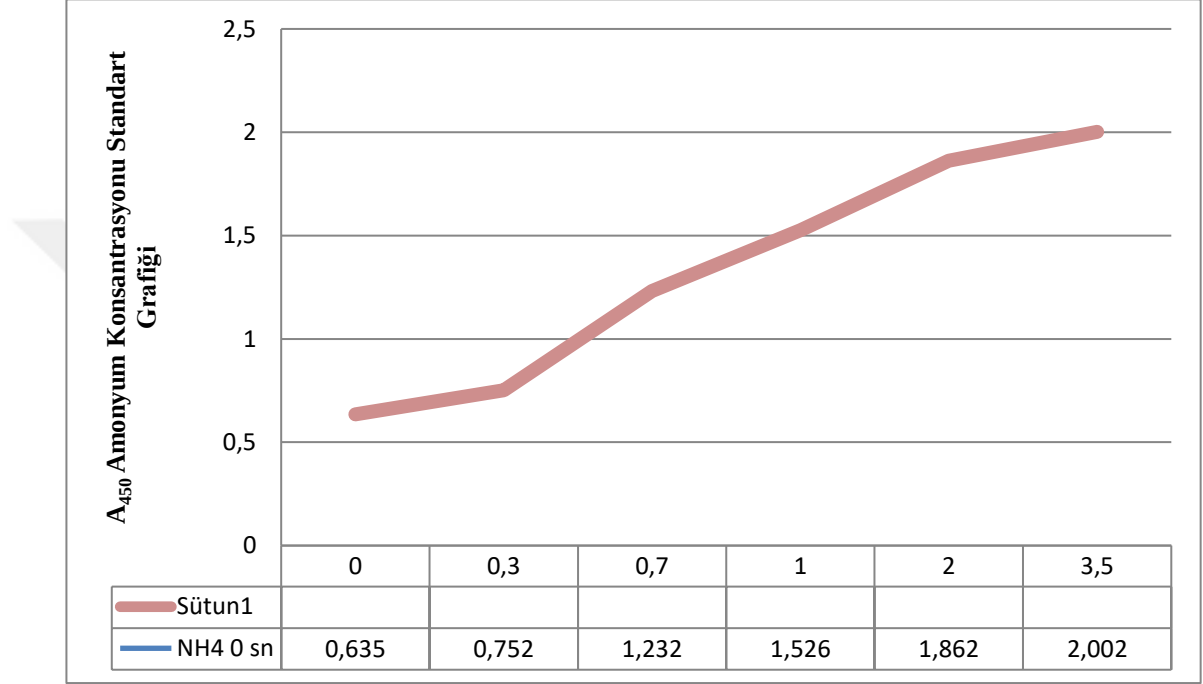
İyileştirme yapılan zeminlerin mukavemet testi

Uygulama sonrası kalıplardan dikkatli bir şekilde çıkarılan kurumuş zeminlerin mukavemeti serbest basınç deneyiyle ASTM D2166 baz alınarak Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi İnşaat Mühendisliği Geoteknik Laboratuvarlarında yaptırılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Üreaz Aktivitesi İçin Standart Grafik Oluşturulması

Stok amonyum çözeltisinin Nessler reaktifiyle etkileşimi sonucundaki değerler 425 nm’de spektrofotometrede okunmuştur (Şekil 12).



Şekil 12. Amonyum konsantrasyonu standart grafiği

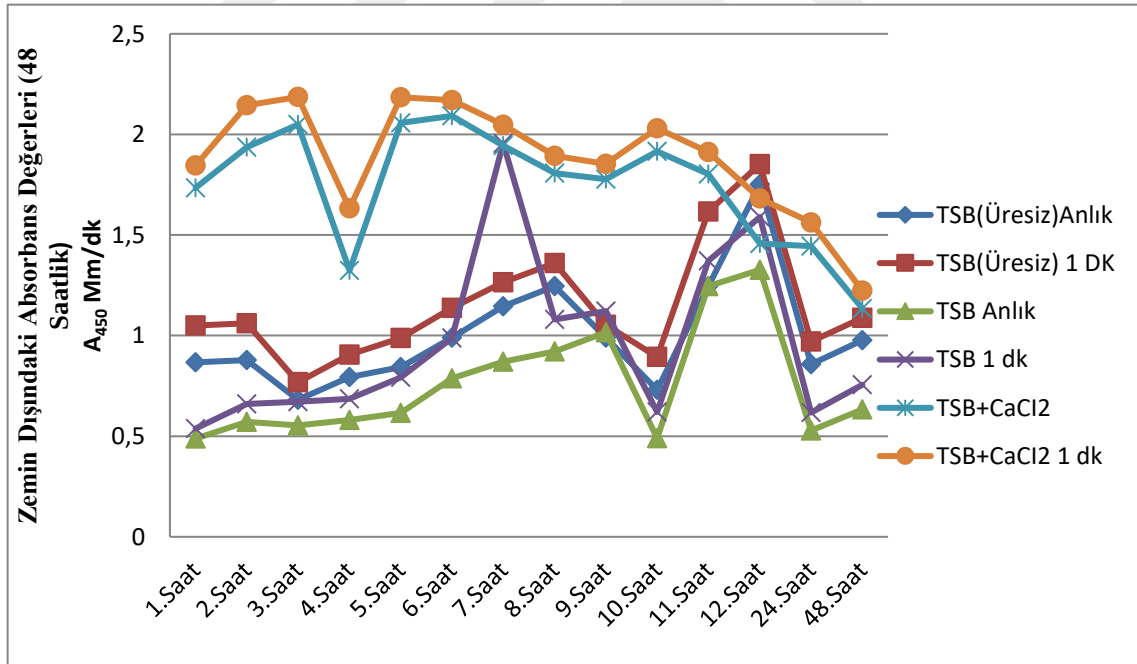
Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi

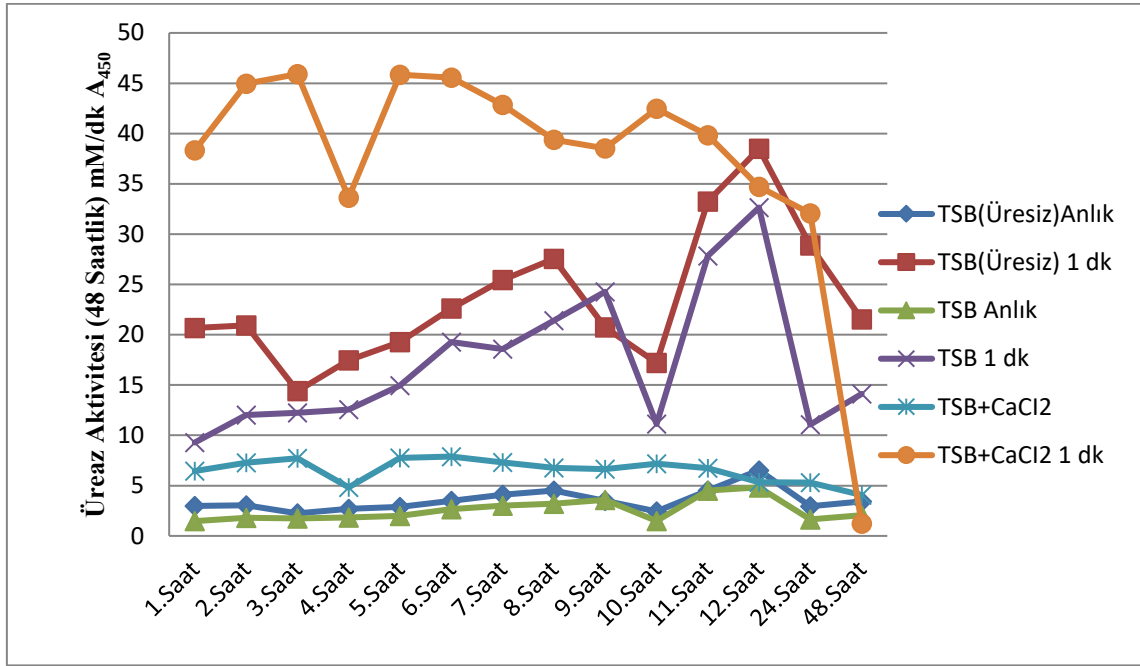
a) 48 saatlik üreaz aktivitesi

Zeminlere uygulanan besiyerlere bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra her saat başı (12 saat), 24. saat ve 48. saate 450 nm’de absorbans değerleri ölçülmüş ve buna bağlı üreaz aktivitesi hesaplanmıştır. Üreaz aktivitesi için 450 nm’de ölçülmüş ve buna karşılık gelen değerler Tablo 3’te verilmiştir. Absorbans değerleri ise Şekil 13’te verilmiştir. Üreaz aktivitesi hesaplanmış ve Şekil 14’te verilmiştir.

Tablo 3. Zeminlere verilen kültürlerin A_{450} nm'deki absorbans değerleri (48 saatlik)

Saat	TSB - A_{450} Anında	TSB- A_{450} 1 dk Sonra	TSB+Üre- A_{450} Anında	TSB+Üre- A_{450} 1 dk Sonra	TSB+Üre+ CaCl ₂ - A_{450} Anında	TSB+Üre+C aCl ₂ - A_{450}
1.Saat	0,867	1,050	0,488	0,538	1,734	1,845
2.Saat	0,878	1,062	0,571	0,661	1,937	2,144
3.Saat	0,681	0,768	0,554	0,671	2,049	2,186
4.Saat	0,794	0,905	0,580	0,686	1,324	1,633
5.Saat	0,844	0,988	0,616	0,792	2,057	2,184
6.Saat	0,990	1,137	0,787	0,988	2,092	2,171
7.Saat	1,145	1,265	0,870	1,956	1,945	2,048
8.Saat	1,246	1,360	0,921	1,080	1,808	1,893
9.Saat	0,990	1,054	1,017	1,121	1,777	1,854
10.Saat	0,731	0,894	0,490	0,621	1,915	2,031
11.Saat	1,246	1,616	1,246	1,372	1,803	1,912
12.Saat	1,752	1,852	1,327	1,589	1,457	1,682
24.Saat	0,857	0,970	0,528	0,618	1,444	1,563
48.Saat	0,977	1,089	0,633	0,755	1,135	1,223

**Şekil 13.** Zeminlerde kullanılan kültürlerin A_{450} nm'deki absorbans değerleri (48 saatlik)



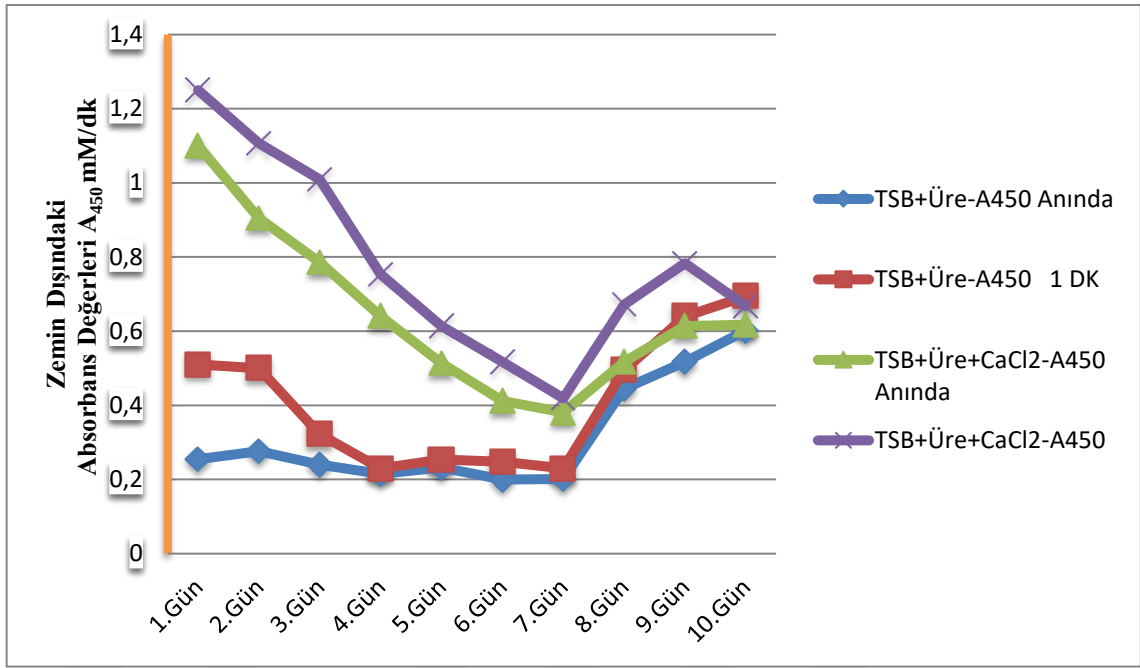
Şekil 14. Zeminlerde kullanılan kültürlerin üreaz aktiviteleri (48 saatlik)

b) Zeminlere uygulanan kültürlerin üreaz aktivitesi

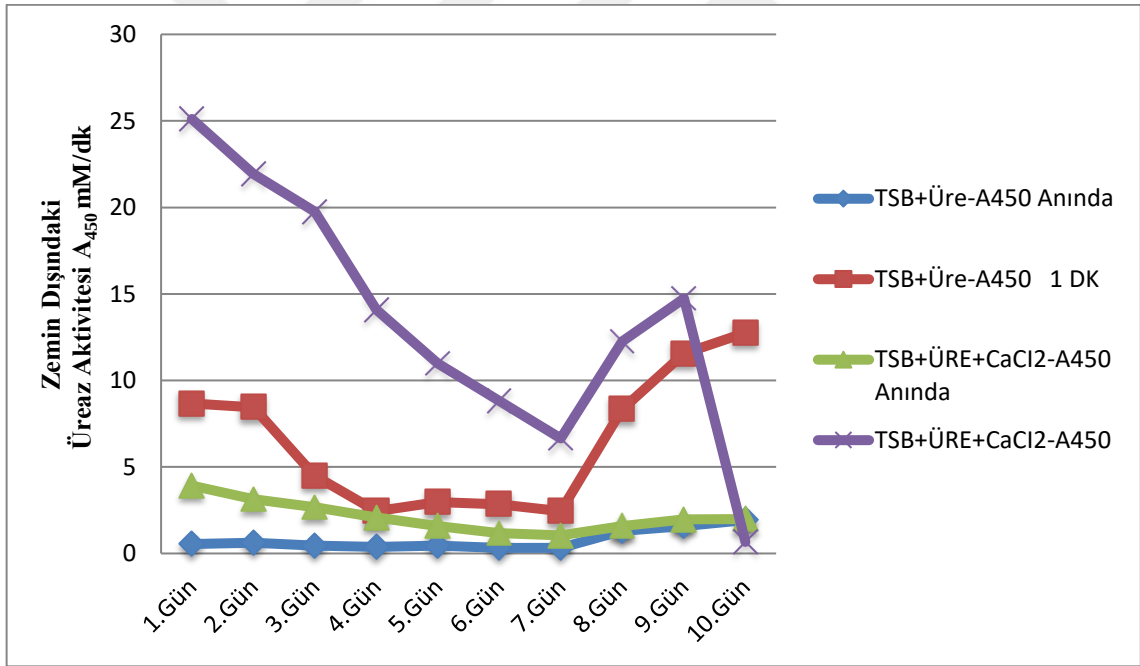
Çalışma için üç kalıp hazırlanmış ve düzenekler tamamlanarak kültür içeren solüsyon döngüleri başlatılmıştır. Ancak hazırlanan zeminlerden bir tanesi peristaltik pompanın tıkanması sonucu başarılı bir şekilde tamamlanamamıştır. Elde ettiğimiz bütün sonuçlar iki numunenin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir. Bakterinin zemin dışındaki 450 nm'deki absorbans değerleri Şekil 15'te verilmiştir. Değerlere bağlı olarak üreaz aktivitesi hesaplanmış sonuçlar Şekil 16'da verilmiştir.

Tablo 4. Zeminde kullanılan kültürlerin zemin dışında A_{450} nm'deki absorbans değerleri

Gün	TSB+Üre- A_{450} Anında	TSB+Üre- A_{450} 1 dk sonra	TSB+Üre+CaCl ₂ - A_{450} Anında	TSB+ÜRE+CaCl ₂ - A_{450}
1.Gün	0,255	0,510	1,100	1,250
2.Gün	0,276	0,500	0,905	1,107
3.Gün	0,240	0,322	0,786	1,009
4.Gün	0,215	0,230	0,641	0,754
5.Gün	0,232	0,254	0,514	0,614
6.Gün	0,200	0,248	0,412	0,517
7.Gün	0,201	0,230	0,381	0,419
8.Gün	0,445	0,495	0,517	0,672
9.Gün	0,517	0,640	0,614	0,783
10.Gün	0,602	0,694	0,617	0,668



Şekil 15. Zeminde kullanılan kültürlerin A_{450} nm'deki absorbans değerleri



Şekil 16. Zeminde kullanılan kültürlerin üreaz aktivitesi

c) Zeminlerden geçen kültür süzöntüsünün üreaz aktivitesi

1 numaralı zeminden geçen TSB kültürlerin 450 nm'de ölçülen değerleri Tablo 5'te, TSB+CaCl₂ kültürünün değerleri ise Tablo 6'da verilmiştir. 1 numaralı numuneden geçen TSB+CaCl₂ kültürünün 450 nm'deki absorbans değerleri Şekil 17'de, TSB ise Şekil 18'te verilmiştir. Üreaz aktivitesi ise Zulfahair *et al.* 2018 formülüyle hesaplanmıştır. 1 numaralı numuneden geçen TSB+CaCl₂ kültürünün üreaz aktivitesi Şekil 19'da, TSB ise Şekil 20'de verilmiştir.

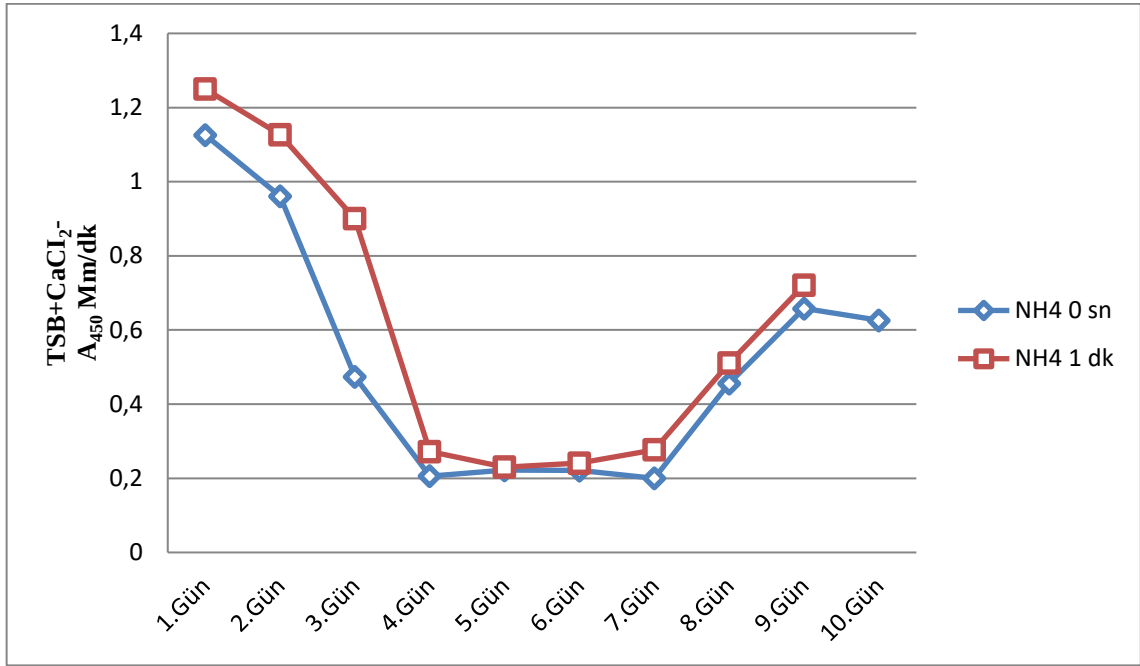
Başka bir zemin (2 numaralı zemin) için uygulama 12 gün boyunca sürmüştür. 450 nm'deki değerleri ölçülmüştür (Tablo 7).

Tablo 5. Zeminlerden geçen TSB kültürünün A₄₅₀ nm'deki absorbans değerleri

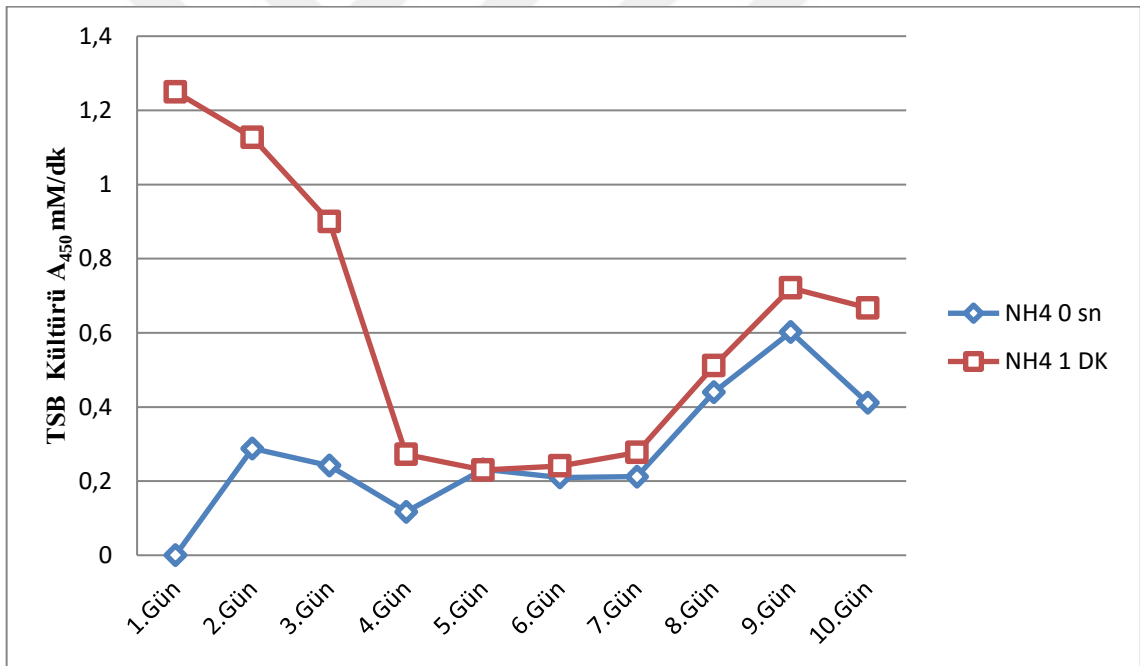
Gün	NH ₄ Anında	1 dk Sonundaki Değer
1.Gün	0,274	1,250
2.Gün	0,288	1,127
3.Gün	0,242	0,900
4.Gün	0,117	0,272
5.Gün	0,232	0,230
6.Gün	0,21	0,241
7.Gün	0,212	0,277
8.Gün	0,44	0,511
9.Gün	0,602	0,721
10.Gün	0,411	0,667

Tablo 6. Zeminlerden geçen TSB+CaCl₂ kültürünün A₄₅₀ nm'deki absorbans değerleri

Gün	Anındaki Değer	1 dk Sonundaki Değer
1.Gün	1,126	1,250
2.Gün	0,961	1,127
3.Gün	0,474	0,900
4.Gün	0,206	0,272
5.Gün	0,222	0,230
6.Gün	0,221	0,241
7.Gün	0,200	0,277
8.Gün	0,456	0,511
9.Gün	0,658	0,721
10.Gün	0,626	0,667

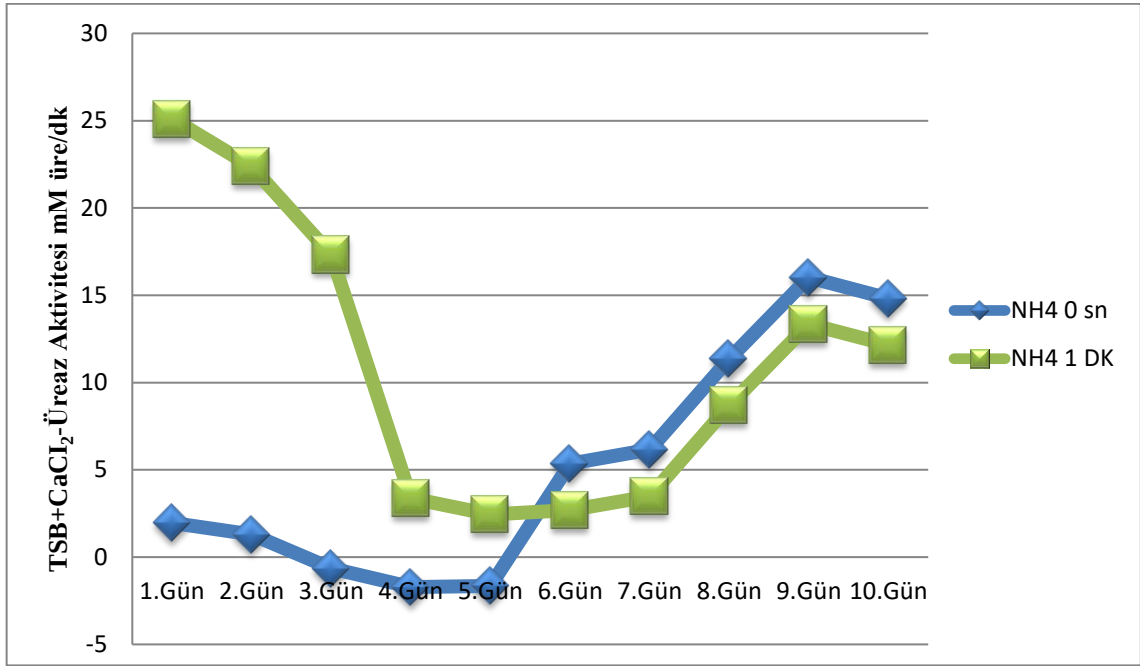


Şekil 17. Zeminlerden geçen TSB+CaCl₂ kültürünün A₄₅₀ nm'deki absorbens değerleri

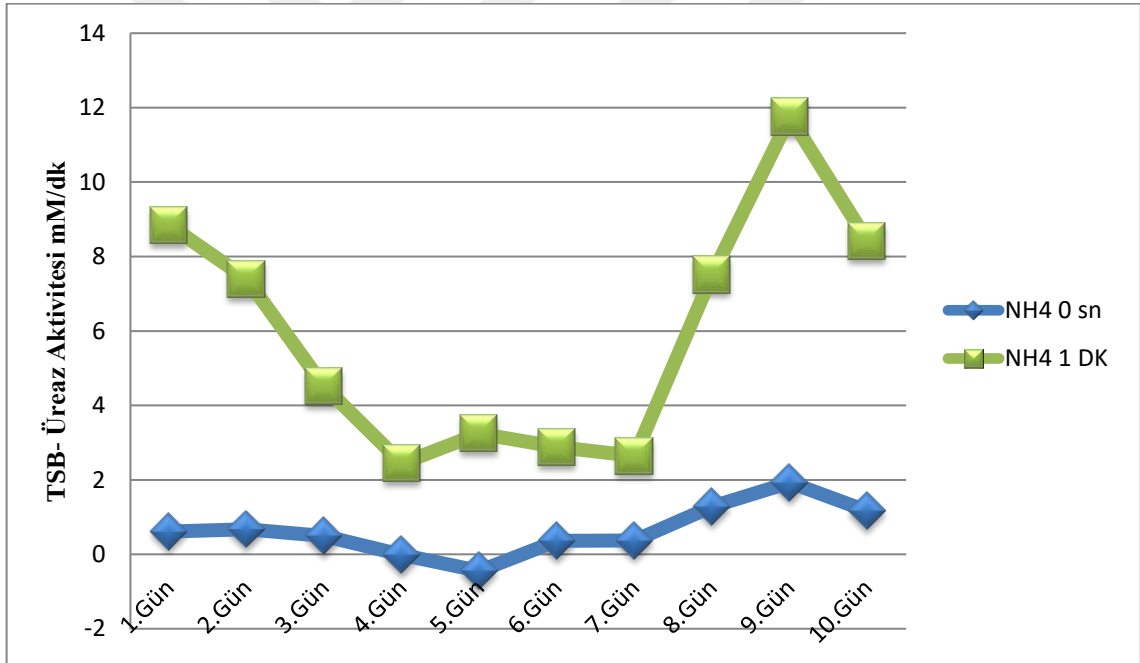


Şekil 18. Zeminlerden geçen TSB kültürünün A₄₅₀ nm'deki absorbens değerleri

2 numaralı numunenin A₄₅₀ nm'deki absorbens değerleri ölçülmüş (Şekil 21) ve buna bağlı üreaz aktiviteleri materyal metod kısmında belirtilen formülle hesaplanmıştır (Şekil 22).



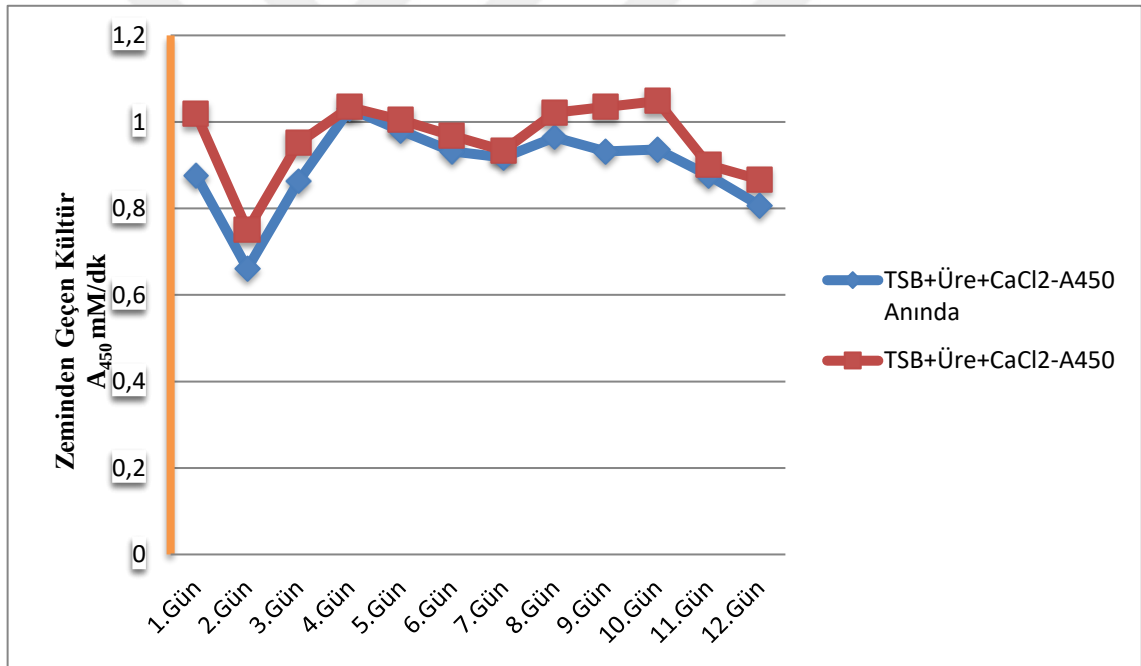
Şekil 19. Zeminlerden geçen TSB+CaCl₂ kültürünün üreaz aktivitesi (1 numaralı numune)



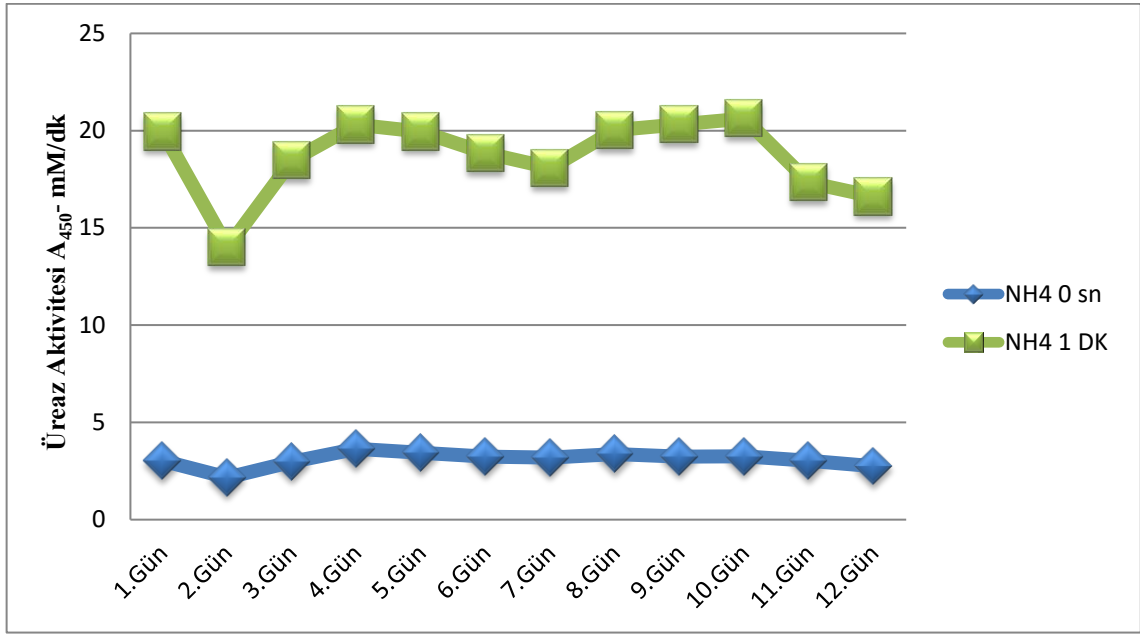
Şekil 20. Zeminlerden geçen TSB kültürünün üreaz aktivitesi (1 numaralı numune)

Tablo 7. Zeminden geçen kültürünün 450 nm'deki absorbans değerleri (2 numaralı numune)

Gün	Anındaki Değer	1 dk Sonundaki Değer
1.Gün	0,876	1,018
2.Gün	0,661	0,750
3.Gün	0,863	0,952
4.Gün	1,030	1,034
5.Gün	0,980	1,004
6.Gün	0,932	0,968
7.Gün	0,918	0,934
8.Gün	0,964	1,021
9.Gün	0,932	1,035
10.Gün	0,936	1,048
11.Gün	0,876	0,900
12.Gün	0,807	0,867



Şekil 21. Zeminlerden geçen kültürün absorbans değerleri (2 numaralı numune)

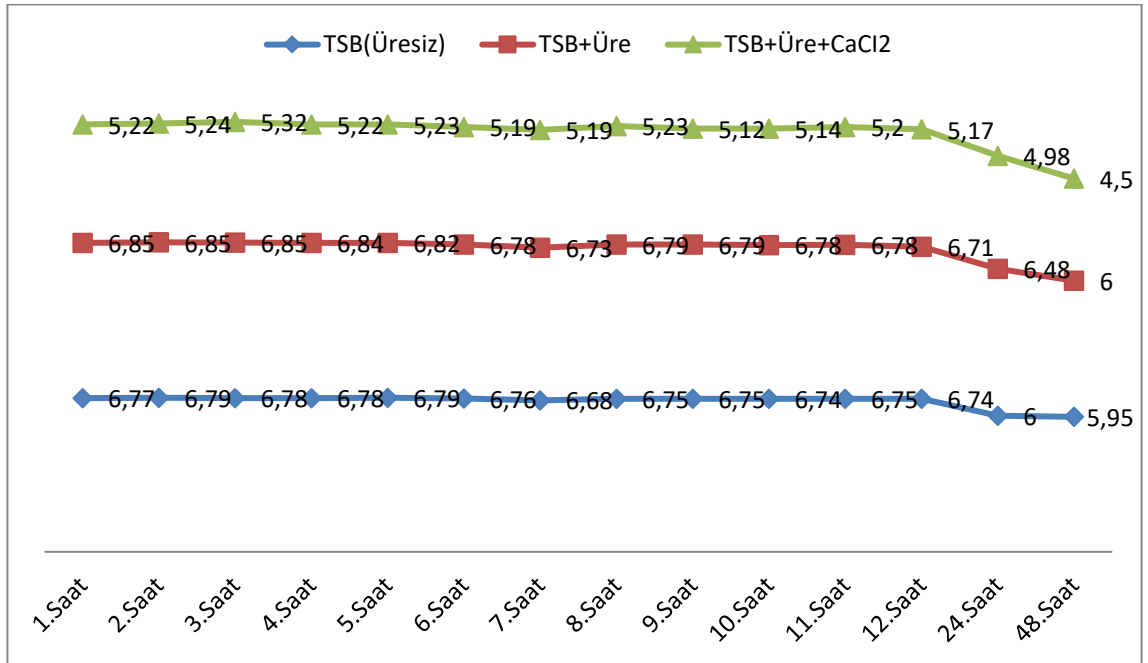


Şekil 22. Zeminlerden geçen kültürlerin üreaz aktivitesi (2 numaralı numune)

pH Değişimi

a) 48 saatlik pH ölçümü

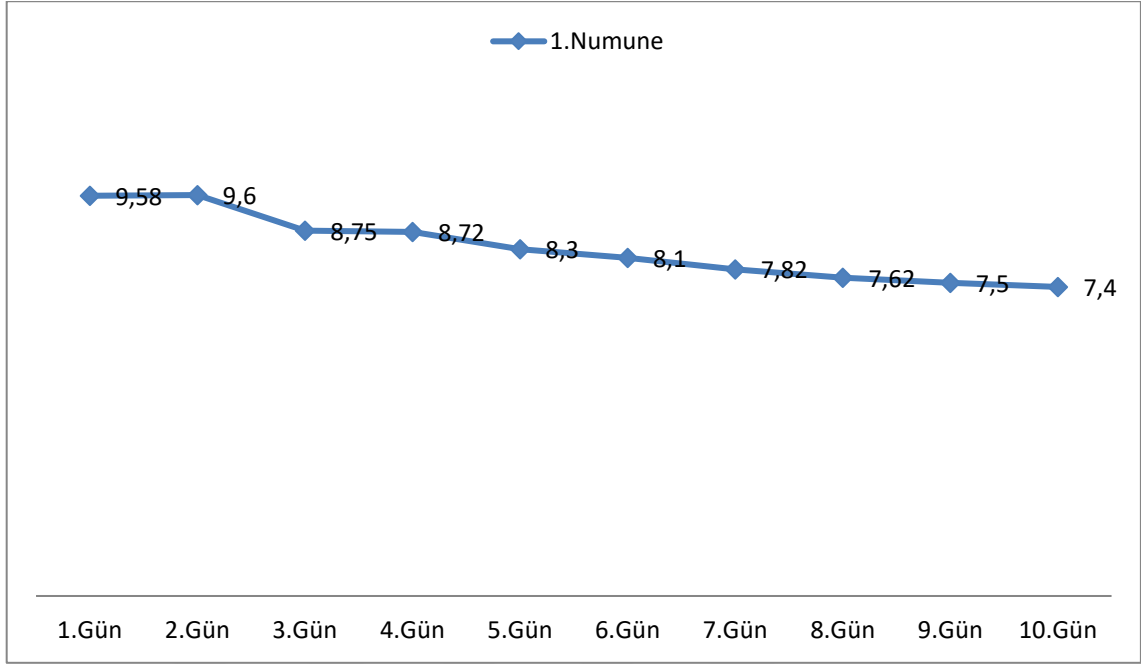
Ph ölçümü uygulama süresinde her saat başı(12 saat), 24.saat ve 48.saatte yapılmıştır. Ölçümlerde ph değerlerinin genel olarak uygulama süresince düştüğü kaydedilmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. 48 saat boyunca oluşan pH değerleri

b) Kùltùrlerin zemin dışındaki pH değişimi

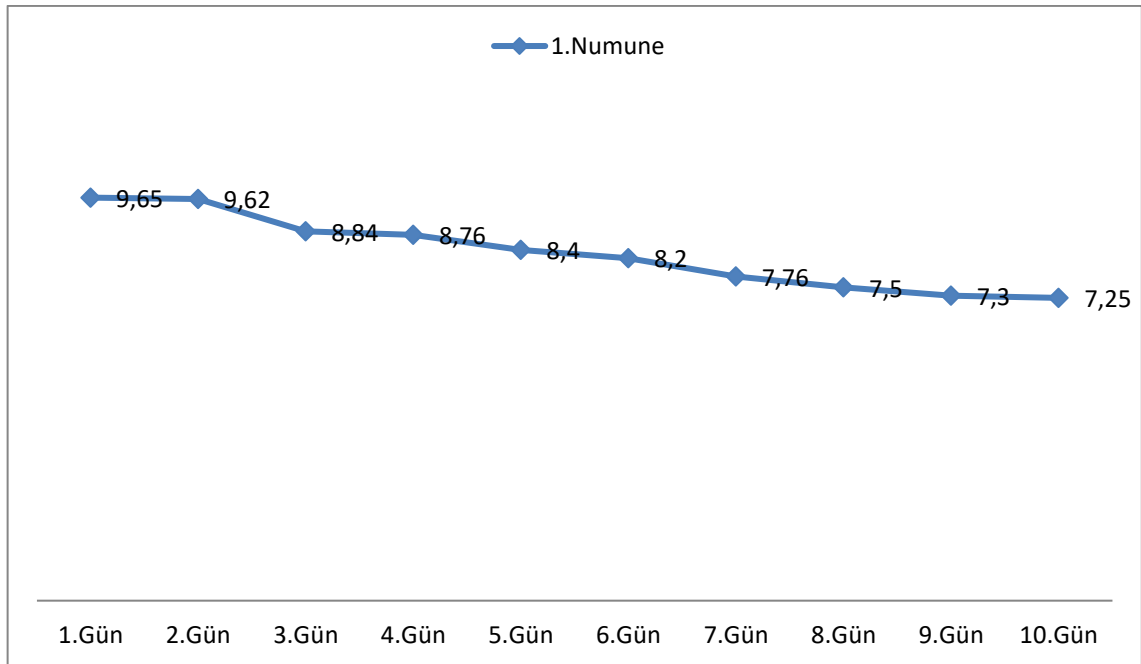
Her 24 saatte zemin dışındaki pH değişimi kaydedilmiştir (şekil 24).



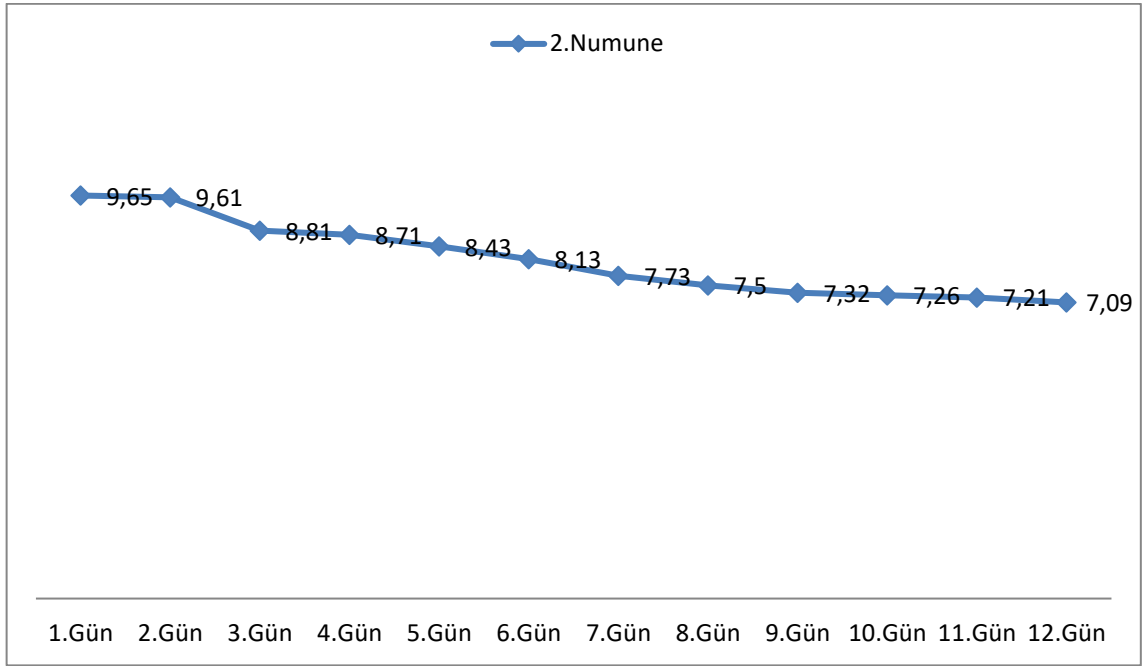
şekil 24. Kùltùrlerin zemin dışındaki pH değişimi

c) Zeminlerden geçen kùltùr sùzùntüsünün pH değişimi

evirim boyunca her 24 saatte pH değerleri òlùlmüřtür (şekil 25). Uygulama sùresince 1 numaralı zeminden geçen kùltùr sùzùntüsünün pH sonuçları şekil 26’da verilmiştir.



şekil 25. Bir numaralı numunenin 10 gùnlük pH değişimi



Şekil 26. İki numaralı numunenin uygulama süresince pH değişimi (2 numaralı numune)

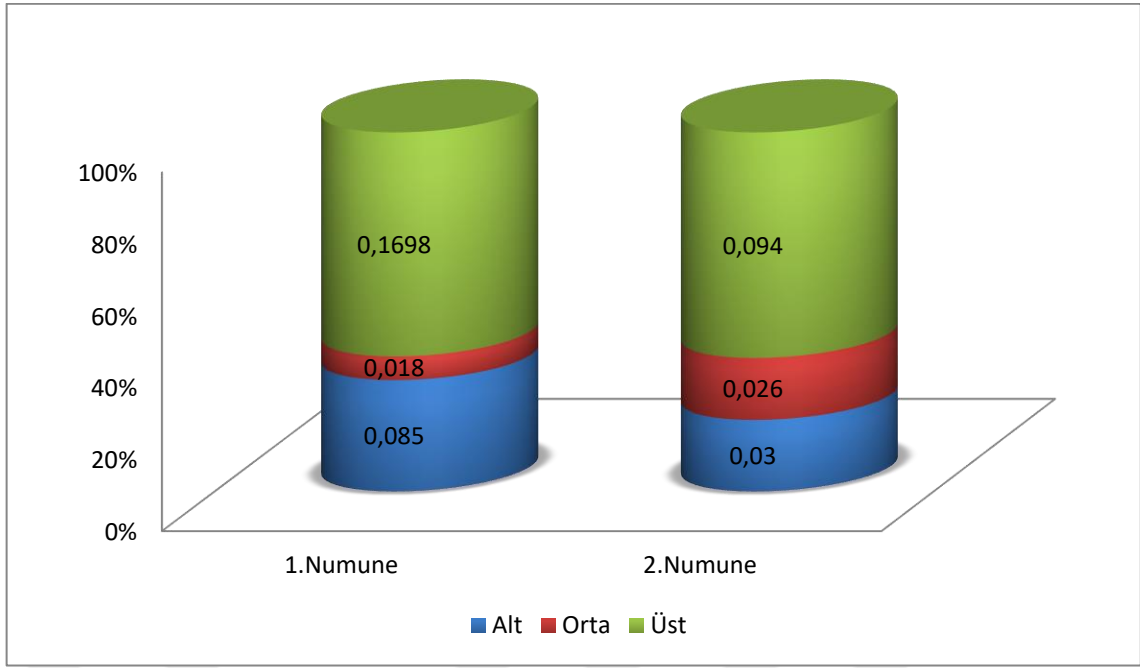
Kalsiyum Karbonat Oluşumu

Zemin iyileştirmesi yapılan numunelerin alt, orta ve üst kısımlarından alınan zeminlerin kalsit miktarları belirlenmiştir. Buna bağlı olarak zemin uygulaması sonucunda zeminde meydana gelen kalsit miktarlarının dağılımı bulunmuştur ve sonuçlar Şekil 27’de gösterilmiştir. Kalsiyum karbonat miktarları numunenin yerine göre farklılık gösterdi. Kalsiyum karbonat miktarının farklı olmasının sebebi akış hızı; yüzey alanı, sıcaklık vb. değişkenlerin olmasından kaynaklanmıştır (Choi *et al* 2017b).

Numunelerin alt, orta ve üst kısımlarından 5 g alınmış (A) ve HCl ile muamale edilmiştir. Burada amaç; oluşan kalsit miktarını asitle eriterek oluşan kalsit miktarını öğrenmektir. Daha sonra numuneler defalarca saf suyla yıkanarak temizlenmiştir. Zeminler etüvde kurutulmuş(B) ve kuru ağırlıkları hassas terazide tartılmıştır.

Oluşan kalsit miktarı;

$$\text{Kalsiyum karbonat miktarı} = B - A$$



Şekil 27. Numunelerin kalsit miktarları

Canlılık Aktivitesi

Uygulama yapılan zeminlerin alt, orta ve üst kısımlarından alınan örneklerden TSA besiyerine ekim yapılmıştır. 16 saat boyunca 35 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda çıkan bakteri kolonileri büyüklüklerine göre tasnif edilmiştir. 1 numaralı zeminin sonuçları Tablo 8’de, 2 numaralı zeminin sonuçları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 8. Bir numaralı zemindeki bakterinin koloni sayıları ve büyüklükleri

Zemin Kısımları	Dilüsyon	Büyük Koloni	Orta Koloni	Küçük Koloni
Üst	10 ⁻³ cfu/ml	12	5	2
Üst	10 ⁻⁴ cfu/ml	4	1	1
Üst	10 ⁻⁵ cfu/ml	2	1	1
Orta	10 ⁻³ cfu/ml	26	12	32
Orta	10 ⁻⁴ cfu/ml	1	1	0
Orta	10 ⁻⁵ cfu/ml	0	0	0
Alt	10 ⁻³ cfu/ml	3	1	1
Alt	10 ⁻⁴ cfu/ml	1	1	1
Alt	10 ⁻⁵ cfu/ml	1	1	1

Tablo 9. İki numaralı zemindeki bakterinin koloni sayıları ve büyüklükleri

Zemin kısımları	Dilüsyon	Büyük koloni	Orta koloni	Küçük koloni
Üst	10 ⁻¹ cfu/ml	0	12	25
Üst	10 ⁻² cfu/ml	0	4	6
Üst	10 ⁻³ cfu/ml	0	0	1
Orta	10 ⁻¹ cfu/ml	1	4	14
Orta	10 ⁻² cfu/ml	0	1	1
Orta	10 ⁻³ cfu/ml	0	0	7
Alt	10 ⁻¹ cfu/ml	1	5	103
Alt	10 ⁻² cfu/ml	0	0	20
Alt	10 ⁻³ cfu/ml	0	0	7

Bakteri Yoğunluğu

Zeminlerdeki bakteri yoğunluğu; kültürler santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alınarak 600 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür ve değerler Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Zeminlere verilen kültürlerin A₆₀₀ nm’deki bakteri yoğunlukları

Saat	TSB -A ₆₀₀	TSB+Üre-A ₆₀₀	TSB+Üre+CaCl ₂ -A ₆₀₀
1.Saat	0,011	0,014	0,041
2.Saat	0,011	0,006	0,052
3.Saat	0,015	0,005	0,036
4.Saat	0,007	0,005	0,035
5.Saat	0,013	0,002	0,003
6.Saat	0,023	0,011	0,053
7.Saat	0,030	0,009	0,029
8.Saat	0,027	0,032	0,022
9.Saat	0,029	0,041	0,047
10.Saat	0,043	0,052	0,052
11.Saat	0,046	0,035	0,046
12.Saat	0,043	0,012	0,082
24.Saat	0,274	0,083	0,065
48.Saat	0,397	0,066	0,202

Serbest Basınç Deneyi

Serbest basınç deneyi mukavemet sonuçları 1.numaralı numuneler için sonuç 1200 kPa iken 2 numaralı numuneler için ise 1210 kPa olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışma ile kalsiyum karbonatın kararlı ve suya direnç gösteren çökeltileri oluşturulmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak uygulamalarda çökeltilerin oluştuğu sadece zemin kalıpları değil düzeneğin tamamında gözlemlenebilmektedir. Bu mineraller akışın gerçekleştiği hortumlarda da meydana gelebildiği için pompalar düzenli olarak kontrol edilmelidir. Tüm bu olgular dikkate alınarak çalışan pompa sayımız olan üç ayrı düzeneğe ile çalışmaya başlanmış ancak pompalardan birisi işlem esnasında sorun oluşturmuş ve hortumlar tıkanarak örneklerden birisi başarılı olarak tamamlanamamıştır. Kalan iki numune ile çalışma devam ettirilmiş ve veriler elde edilmiştir. Kontrollü şartlar altında eşdeğer kalıp ve benzer relatif sıklığa sahip örnekler ile çalışmaya gayret edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda işlemler en iyi performansa uygun olarak hazırlanmıştır. Kullanılan bakteri izolatının araştırılan özellikleri öncelikle ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Üreaz aktivitesi için Nessler ayıracı kullanılarak öncelikle standart grafik oluşturulmuştur. Literatür verilerine uygun olarak yapılan ölçümler sonunda standart grafik yardımıyla aktivite hesaplanmıştır. Literatürde bazı çalışmalarda bakterilerinin rolü üreaz enzimi sağlamak olduğundan üreaz aktivitesi bakteri aktivitesi kabul edilmiş ve üre hidrolizi oranıyla ölçülmüştür (Kahani *et al.* 2013).

Hesaplamalar sonunda kullanılan bakterinin uygulama öncesi kültür koşullarında aktivitenin öncelikle saatlik olarak ölçülmüş, daha sonraki aşamada ise günlük olarak değerlendirmeleri yapılmıştır. 12. saate kadar yapılan ölçümlerde kültürde aktivitenin genel olarak yükseldiği gözlemlenebilmektedir (Tablo 3, Şekil 13 -14). 12. saatten sonra 24. saatte ölçüm, konsatrasyon ve sonuç olarak aktivitenin azaldığı ve 48. saatte dengelendiği görülmektedir. Genel olarak bu veriler değerlendirildiğinde bakterinin gelişim eğrisine uygun olduğu gözlemlenmektedir (Prescott *et al.* 2002). Genç kültürde aktivite artarken olgunlaşan kültürde biraz düşüş ve dengelenme beklenmektedir.

Günlük ölçümlerde ise gelişim eğrisinden bağımsız değildir ancak 1. günden 7. güne kadar aktivitede oldukça zayıf bir gerileme gözlemlenmektedir. 8. günde yapılan ölçümlerde ise aktivitenin hızlı bir artış gösterdiği bu artışın 9. ve 10. günde de devam ettiği gözlemlenmektedir. Aktiviteyi zamana bağlı takip eden literatür eksikliği nedeniyle değerlendirmeler genel bilgiler ışığında yapılmıştır. Endospor oluşturan bakteri izolatında 1.

günden sonra aktivitenin düşmesi oluşan bakterilerin önemli oranda endospora dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 7. günden sonra endosporların çimlenmesi ile aktivitenin artabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Üreaz aktivitesiyle ilgili bu çalışmadan farklı parametreler yönünden değerlendirildiğinde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin ortam sıcaklığında yapılan çalışmalar üreaz aktivitesini etkilediği bilinmektedir. Bu çalışma, zemin uygulamalarının yapılacağı ortamlar dikkate alınarak oda sıcaklığında (24 – 26 °C’de) yürütülmüştür. Bununla beraber Whiffin (2004), yapmış olduğu çalışmada sıcaklığın üreaz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemiş ve 25-60 °C arasında yükseldiğini, 70 °C üstünde ise aktivitenin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Veriler bu referans göre değerlendirildiğinde en ideal ve uygulanabilir değer olarak oda sıcaklığı belirlenmiştir.

Zamana bağlı aktivite çalışmaları dikkate alındığında De Muynck *et al.* (2010) üreaz aktivitesinin değişimini incelemiş ve kültürdeki Ca^{+2} iyonlarında düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise üreaz aktivitesi hem saatlik hem de günlük olarak ölçülmüştür ve aktivite sonucu oluşan CaCO_3 miktarının artışıyla beraber ortamdaki Ca^{+2} iyonlarının azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz üreaz aktivitesinin başlangıçta ortamdaki besin miktarının fazla olmasından dolayı yüksek olduğunu ve zamana bağlı olarak ortamdaki besin miktarı azalışı ve sekonder metabolit miktarının artmasıyla aktivitenin düştüğünü görülmüştür. Aktivite başlangıçta logaritmik bir şekilde artmış ve bakterinin optimum şartlarında gelişimi en üst seviyeye gelmiştir. Yaptığımız bütün aktivite çalışmalarında – zeminlere verilen kültürün, zeminlerden geçen kültürün, zemin dışındaki kültürün üreaz aktivitesi birbiriyle paralel bir şekilde sonuçlanmıştır. Ayrıca kültürlerle CaCl_2 kullanıldığında üreaz aktivitesi artmıştır. Bu bulguda literatür bulgularıyla örtüşmektedir (DeJong *et al.* 2006; Burbank *et al.* 2011).

Logaritmik artışın sebebi bakterinin genç olması ve buna bağlı üreaz oluşturma kabiliyetinin yüksek olması etkili bir faktör olmuştur. Literatürde zemin iyileştirme çalışmalarında çoğunlukla üreaz pozitif bakterilerin genç kültürlerinin kullanıldığını görülmektedir (Stocks-Fisher *et al.* 1999; Whiffin 2004; DeJong *et al.* 2006; Whiffin *et al.* 2007).

Üreaz aktivitesi artışıyla biyoçimentolama da artmaktadır. Son zamanlarda birçok çalışmada deniz kumu vb. kullanılarak mikrobiyal yolla güçlendirme çalışmaları yapılmıştır. Mühendisler ve mikrobiyologlar toprak karakterini değiştirmek için birlikte çalışmalar yapmıştır. Özellikle CaCO_3 ’ün biyolojik olarak işlenmesiyle daha güçlü yapılar oluşturulmaya

çalışılmaktadır (Burbank *et al.* 2011, Kalantary and Kahani 2015, Lin *et al.* 2015). Bu çalışmalarda özellikle mekanizması iyi bilindiği için üreaz pozitif mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Neupana *et al.* 2013, Neupana *et al.* 2015, Rowshanbakht *et al.* 2016, Yasuhara *et al.* 2012). Bu zemin iyileştirme uygulamalarında mekanizma olarak toprağın por yapısının üreaz aktivitesi sonucu kalsit ile doldurulması amaçlanmaktadır. Biyolojik iyileştirmeyi kullanan mikroorganizmalar etkilerken aynı zamanda abiyotik faktörler (pH, osmotik basınç, sıcaklık ve kullanılan besiyerleri) de etkilemektedir. Biyoçimentolamada uygulama mekanizmalarına göre kullanılan mikroorganizmalar aerop, mikroaerofilik ve anaerop olarak tercih edilebilmektedir (Chen *et al.* 2016, Cheng *et al.* 2016, Choi *et al.* 2016b, Dhami *et al.* 2016, Li *et al.* 2015, Saffari *et al.* 2017, Whiffin 2004).

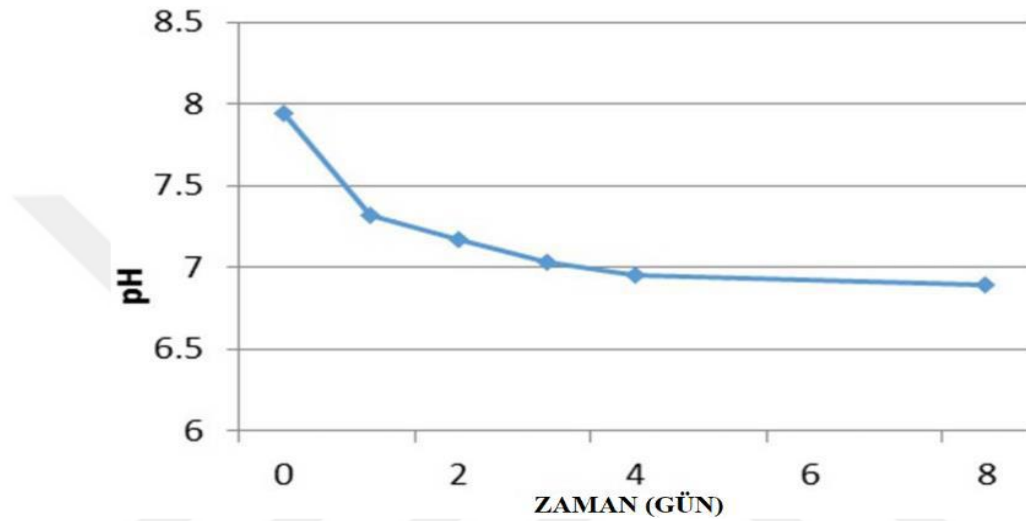
Ürenin rolü mikroorganizmaların azot metabolizması parçalanması sonucu ortaya çıkan karboksil grubunun ortamda var olan kalsiyum iyonlarıyla reaksiyona girerek kalsit oluşturmasıdır (Bremner and Mulvaney 1978, Rowshanbakht *et al.* 2016, Whiffin 2004, Whiffin *et al.* 2007). Literatür değerlendirmesi yapıldığında ve daha önce grubumuz tarafından yapılan ön çalışmalar dikkate alınarak en verimli üre ve CaCl_2 uygulama oranları ile uygulamalar yapılmıştır. Uygulamalar sonucunda zeminlere verilen kültürlerin 48 saatlik ölçümleri ile kültürlerin üreaz aktivitesi 38-42 mM/dk olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarda farklı bakterilere karşı elde edilen Tablo 11 'de verilen değerler dikkate alındığında bu çalışmada kullanılan *V. arenosi* bakterisine ait üreaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Burbank *et al.* (2011) ve Zamarreno *et al.* (2009) yapmış olduğu çalışmada kullanmış olduğu besiyerine CaCl_2 eklenmesi sonucu üreaz aktivitesinin arttığını kaydetmiştir. Sonuç olarak belirlenen oranların seçilen izolat ile oldukça yüksek serbest basınç mukavemet oluşturduğu gözlemlenmiştir (Cheng *et al.* 2016; Dhami *et al.* 2016; Maleki *et al.* 2016; Kalantary and Kahani 2015; Li *et al.* 2015; Lin *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2015)

Viridibacillus arenosi bakteri kültürünün uygulama başlangıç pH'sı 9.5 iken çalışmanın sonunda pH 7.5 olarak ölçülmüştür. Bu başlangıç ve bitiş pH genel anlamda literatürle uyumlu olduğu görülmektedir (Burbank *et al.* (2011), Cheng *et al.* (2016), Helmi *et al.* 2016)

Tablo 11. Mikrobiyal olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökmesi için reaksiyon şartları (Umar *et al.* 2016)

Uygulama	Üre (mM)	Ca ²⁺ (mM)	Üre aktivitesi (mM üre/dk)	Mikroorganizma	Zemin tipi	Referanslar
Biyoçimentolanma	1500	1500	4-18	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Kum	Whiffin (2004)
Biyoçimentolanma	500	500	n/s	<i>Bacillus megaterium</i>	Kum/silt	Soon <i>et al.</i> (2014)
Biyoçimentolanma	500	500	5-20	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Silika kum	Al Qabany <i>et al.</i> (2012)
Biyoçimentolanma	1000	1000	10	<i>Bacillus sphaericus</i>	Silika kum	Cheng <i>et al.</i> (2013)
Biyoçökelim	330	25	0,65	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Kum	Achal <i>et al.</i> (2009a)
Biyoçimentolanma	500	500	0,67-1,33	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Kum	van Paassen (2009)
CO ₂ sekestrasyonu	670	250	n/s	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	-	Okwadha and Li (2010)
Biyoçökelim	25	25	n/s	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Kum	Achal <i>et al.</i> (2009b)
Biyotıkanma	1500	750	6,2	<i>Bacillus sp.</i>	Kum	Chu <i>et al.</i> (2012)
Atık sudan Ca ²⁺ uzaklaştırma	16	14	0,293	<i>Isolates closed to Bacillus sphaericus</i>	-	Hammes <i>et al.</i> (2003)
Biyoçimentolama	1500	750	5-28	<i>Viridibacillus arenosi</i>	-	Akoğuz (2019)

Yaptığımız çalışmada kültürlerin zemin dışında, zemine verildikten sonra ve zeminden geçtikten sonraki pH değerlerinin düştüğünü ve buna bağlı olarak kalsit oluşumunun uygulama boyunca devam ettiğini anlamaktayız. Ürenin parçalanmasıyla birlikte devamındaki reaksiyonlar ile ortaya çıkan organik asitler pH'yı düşürmektedir. Moravej *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada mikrobiyal kalsit çökeltisinin uygulama süresince pH değerinin giderek düştüğünü gözlemlemişlerdir. pH düşüşünün, kalsit oluşumundan dolayı uygulamanın başlangıcında hızlı olduğunu ve uygulamanın sonlarına doğru azaldığını belirtmişlerdir (Şekil 28).



Şekil 28. Uygulama boyunca zemindeki pH değişimi (Morajev *et al.* 2018)

Zeminlerdeki kalsit miktarı zeminlerin üst, orta ve alt kısımlarından alınan sonuçlara göre değerlendirilmiştir. Bu şekilde zeminlerde meydana gelen kalsiyum karbonat miktarlarının dağılımı ölçülmüştür. Zeminlere kültür süzöntüsünün üstten verilmesi ile birlikte kalsit miktarının üst kısımda ve orta kısımda daha fazla olduğu ve tıkanmaya bağlı olarak alt kısımda ise daha az olduğu sonucu elde edilmiştir. Zeminlerin tanecikli yapısından dolayı; kalsiyum karbonat oluşumu için çekirdeklenme bölgeleri oluşmuş ve bunlar bakterinin faaliyeti sonucu kalsiyum karbonat ile dolmuştur. Zemin içindeki boşlukların dolmasına bağlı olarak bu sonuç elde edilmiştir.

Bu çalışmada oluşan kalsit miktarı % 3.2 olarak belirlenmiştir. İyileştirilen zeminlerin üst, orta ve alt kısımlarının kalsit miktarları da belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan bakteri literatürde kullanılan mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında kalsit oluşturma yeteneğinin yüksek olduğunu ve biyolojik zemin iyileştirme potansiyelinin yüksek olduğunu göstermiştir.

Zeminlerde kalsiyum karbonat miktarı kültürün verilme hızına, süresine, ortam sıcaklığına ve pH'a bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Daha önceki çalışmalarda farklı akış hızında ve farklı zeminlerde çalışmalar yapılmış ve zeminlerdeki kalsit miktarları

belirlenmiştir. Çalışmamızdaki kum zeminle aynı tanecikli yapıya sahip kum ile çalışılmış ve orda da kalsit miktarları kullanılan kültürün içindeki diğer maddelerden dolayı farklılık göstermiştir. Çalışmada kalsiyum klorür dışında kalsiyum asetat, kalsiyum nitrat ve magnezyum klorür kullanılmış ve bunlara göre oluşan kalsit miktarları da farklılık göstermiştir (Akoğuz 2019).

Literatürdeki çalışmalarda zeminlerdeki kalsit miktarının en fazla üstte daha sonra ortada ve en az alt kısımda olduğunu saptamışlardır (Dhami *et al.* 2016). Başka bir çalışmada ise zeminlerdeki kalsiyum karbonat yüzdesi %2,8-4,3 olarak kaydedilmiştir (Kavazanjan and Hamdan 2015). Yapılan başka bir çalışmada oluşan kalsit miktarı %2.4 olarak belirlenmiştir (Burbank *et al.* 2011).

Daha önceki çalışmalarımıza bakarak peristaltik pompa hızının en düşük seviyede çalıştırmanın kalsiyum karbonat oluşturmada daha etkili olduğu sonucuna varılmış ve kendi çalışmamızda da bu seviyeyi kullanmanın çalışmanın seyri açısından daha güvenilir ve desteklenebilir olmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Çünkü yüksek hızda çalışan ve bunun sonucunda oluşan kalsit bağlarının düşük seviyede çalışanlara göre daha zayıf olduğu belirlenmiştir (Lee *et al.* 2013).

Bakteri canlılığını kontrol etmek için zeminler kurutulduktan sonra da ölçüm yapılmış ve bakterinin hem canlılığı hem de gram zemindeki sayısı belirlenmiştir. Besiyerlere verilmeden önceki bakteri sayısı $\sim 10^9$ olduğu önceki çalışmalarımızda belirlenmiş olup zeminler kurutulduktan sonra tekrar TSA besiyerine ekim yapılmış ve bakteri sayısının düştüğü ve bunun normal olduğu belirlenmiştir. Bakterinin canlı kalması endospor oluşturma yeteneğine bağlıdır. Bu da zemin içinde kullanımının uygun olduğunu ve zeminlere sızan su miktarıyla birlikte bakterinin faaliyete geçerek orada kalsit oluşturma yeteneğinin zemin iyileştirmede kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Bakteri konsantrasyonunun artması ise optimum şartlarda çoğalma düzeyiyle paralel olduğu belirlenmiştir. Bakteri konsantrasyonu besiyerlere bakteri ekimi yapıldıktan sonra ortamdaki besin miktarına bağlı olarak artmıştır. Bakteri yoğunluğu logaritmik bir artış göstermiş ve durağan faza geçtikten sonra ölüm fazı dediğimiz fazla birlikte zamanla konsantrasyonda düşmüştür. Bunun sebebi bakterilerin çoğalması ve buna bağlı ortamdaki besinlerin azalıp toksisitenin artmasıdır.

Çalışmalarımızda 10 günlük ve 12 günlük periyotlarda çevrim yapılmış ve serbest mukavemet testleri değerlendirilmiştir. Serbest basınç deneyi sonucu mukavemet sonuçları 1.numaralı numuneler için 1200 kPa 2.numaralı numuneler için ise 1210 kPa olarak belirlenmiştir. Literatürde aynı kum zeminlerle çalışılmış ve serbest basınç deneyi mukavemet

sonucu 1245 kPa olarak bulunmuştur (Akoğuz 2019). İyileştirme yapılan zeminlerde oluşan kalsit miktarıyla birlikte mukavemet artmıştır. Literatürde uygulama süresinin de muakeveti etkilediği belirtilmiştir (Choi *et al.* 2017b). Başka bir çalışmada muakvemet testi sonucu 100-400 kPa olarak ölçülmüştür (Kalantary and Kahani 2015). Bizim çalışmamız bu sonucun yaklaşık 3 katıdır. Bu da kullanmış olduğumuz bakterinin kalsit oluşturma yeteneğinin oldukça iyi olduğunu kanıtlamıştır. Literatürdeki çalışmalarda mukavemet teslerinin değerlerine göre daha yüksek serbest basınç mukavemet değerleri elde edilmiştir (Achal *et al.* 2009a, Achal *et al.* 2009b, DeJong *et al.* 2010, DeJong *et al.* 2014, Dhami *et al.* 2016).

Viridibacillus arenosi bakterisi kullanarak yapmış olduğumuz bu çalışmada zeminlere verilen besiyerlerin üreaz aktivitesinin bakterinin gelişimiyle paralel bir şekilde devam ettiğini, bakteri yoğunluğunun kalsiyum karbonat oluşturmada etkili olduğunu ve buna bağlı olarak pH düşüşünün olduğunu kaydedilmiştir. Oluşan zeminlerin uygulanabilirliğini teyit etmek için zeminlerin mukavemeti serbest basınç deneyiyle ölçülmüş ve sağlamlığı test edilmiştir.

Elde edilentüm bulguların literatür ile birlikte kıyaslamalı bir değerlendirmesi ile aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- 1- Bir mağara izolatu olan *Viridibacillus arenosi* K64 bakterisi zemin iyileştirmeleri için oldukça uygun ve kullanılabilir özelliklere sahiptir.
- 2- Kullanılan besiyeri ve üre konsantrasyonları sonuçları etkilemektedir.
- 3- Uygulama sıcaklığı oluşan kalsit miktarı üzerine etkilidir.
- 4- Zemin kültürün enjeksiyon şekli kalsit oluşum alanlarını veya zemin içinde tıkanmayı etkilemektedir.
- 5- Uygulama yapılan zeminlerde bakteri canlı kalabilmektedir.
- 6- Üreaz aktivitesi gibi iyi bilinen mekanizmalar dışında faktörlerde sonucu etkileyebileceği için daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- 7- Arazi ölçeğinde çalışmalar ile kullanılabilir izolatların belirlenmesi önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abdel- Gawwad, H. A. Abo-El-Enein, S. A., Ali, A.H., Talkhan, F.N., 2012. Utilization of Microbial Induced Calcite Precipitation for Sand Consalidation and Mortar Crack Remediation, HBRC Jornal 8, 185-192.
- Abe, K. ve Kawashima, K., 2015. Method for producing soybeans having reduced urease content. U.S. Patent No. 8,993,036.
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., Sudhakara Reddy, M., 2009a. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology;36(3):433-438.
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., Sudhakara Reddy, M., 2009b. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology; 36(7):981-988.
- Achal, V., Pan, X., Özyurt, N., 2011. Improved strength and durability of fly ash- amended concrete by microbial calcite precipitation. Ecological Engineering. 37, 554–559.
- Achal, V., Mukerjee, A., & Reddy, M. S. 2013. Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. Construction and Building Materials, 48, 1-5.
- Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., Zhang, Q. 2015. Biomineralization for sustainable construction—A review of processes and applications. Earth-Science Reviews, 148, 1-17.
- Akoğuz H., Çelik S., Barış Ö., 2019. The Effects Of Different Sources Of Calcium In Improvoment Of Soils By Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP). Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, 3, 953-965
- Akoğuz, H., 2014. Kum Zeminlerin Biyolojik İyileştirilmesinde *Bacillus Arenosi* Bakterisinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı, Geoteknik Bilim Dalı Atatürk Üniversitesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Akoğuz, H., 2019. Mikrobiyal Aracılı Kalsit Çökmesi ile Zeminlerin Biyolojik İyileştirilmesinde Bazı Değişkenlerin Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı, Geoteknik Bilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE
- Al Qabany, A., Soga, K., Santamarina, C., 2012. Factors affecting efficiency of microbially Induced calcite precipitation. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering,138(8):992-1001.
- Almahamedh, H. H. 2013. Sulfate reducing bacteria influenced calcium carbonate precipitation. In CORROSION NACE International.
- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., and Wright, D. T., 2006. Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of earth history. *Geobiology* 4, 147–166.
- Al-Thawadi, S. M., 2011. Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. Journal Advanced Science Engineering and Research, 1(1), 98-114.
- Anbu, P., Kang, C-H., Shin, Y-J., So, J-S., 2016. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. SpringerPlus 5, 250.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Ariyanti, D., Handayani N. A. and Hadiyanto, 2011. An overview of Biocement production from microalgae. International Journal of Engineering Science, 2(2): 30-33. (18).
- Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R. and Bang, S. S., 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. Journal of Biotechnology. 93(2): 171–181.

- Balam, N. H., Mostofinejad, D., Eftekhari, M., 2017. Use of carbonate precipitating bacteria to reduce water absorption of aggregates,. *Construction and Building Materials*, 141:565–77.
- Bang, S. S., Galinat, J. K., Ramakrishnan, V., 2001. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme Microbial Technology*, 28:404–409.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatış Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Barton, H.A. and Jurado, V., 2007. What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves. *Microbe*, 2(3), 132-138.
- Basha, E. A., R. Hashim, H. B. Mahmud and Muntohar, A. S., 2005. Stabilization of Residual Soil with Rice Husk Ash and Cement. *Construction and Building Materials*, 19(6), 448–53.
- Baumgartner, L. K., Reid R. P., Dupraz C., Decho A. W., Buckley D. H., Spear J. R. and Visscher P. T., 2006. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*, 185(3), 131-145.
- Belie, N., Muynk, W., Verbeken, K., Verstraete, W., 2010. Influence of Urea and Calcium Dosage on the Effectiveness of Bacterially Induced Carbonate Precipitation on Limestone, *Ecological Engineering*, 36, 99-111.
- Berns D.S., Holohan P., and Scott E., 1966. Urease activity in blue-green algae. *Science*, 152 (3725): 1077-1078.
- Bibi, S., Oualha, M., Ashfaq M. Y., Suleiman, M. T. and Zouari, N., 2018. Isolation, differentiation and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *Royal Society Of Chemistry*, 8, 5854.
- Bosak, T., and Newman, D. K., 2003. Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology* 31, 577–580.
- Braissant, O., Decho, A. W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K. M., and Visscher, P. T., 2007. Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5, 401–
- Brandon, A. D. and Goles, G. G., 1995. Assessing subcontinental lithospheric mantle sources for basalts: Neogene volcanism in the Pacific Northwest, USA as a test case. 121(4), 364-379.
- Bremner, J. M., Mulvaney, R. L., 1978. Urease activity in soils. In: Burns RG, editor. *Soil Enzymes*. New York: Academic Press. P 149–196.
- Burbank, M. B., Weaver T. J, Green T. L., Williams B. C. and Crawford, R. L., 2011. Precipitation of Calcite by Indigenous Microorganisms to Strengthen Liquefiable Soils, *Geomicrobiology Journal*, 28:4, 301-312.
- Cañveras J. C., Sanchez-Moral S., Sloer V., Saiz-Jimenez C., 2001. Microorganisms and Microbially Induced Fabrics in Cave Walls, *Geomicrobiology Journal* Volume 18, Issue 3, pages 223-240.
- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G., Perthuisot, J. P., 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126:9–23.
- Chaurasia, R. K., Verma, V. V., 2014. Microbial carbonate precipitation by urease producing bacteria in cementitious materials. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 15, 671-679.
- Chekroun, K. B., Rodríguez-Navarro, C., González-Muñoz, M. T., Arias, J. M., Cultrone, G., and Rodríguez-Gallego, M., 2004. Precipitation and growth morphology of calcium

- carbonate induced by *Myxococcus xanthus*: implications for recognition of bacterial carbonates. *Journal of Sedimentary Research*, 74, 868–876.
- Chen, F., Deng, C., Song, W., Zhang, D., Al-Misned, F. A., Mortuza, M. G., Pan, X., 2016. Biostabilization of desert sands using bacterially induced calcite precipitation. *Geomicrobiology Journal*, 33(3-4), 243-249.
- Cheng, L., & Cord-Ruwisch, R., 2012. In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation. *Ecological Engineering*, 42, 64-72.
- Cheng, L., Cord-Ruwisch, R., Shahin, M. A., 2013. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation. *Canadian Geotechnical Journal*, 50(1):81-90.
- Cheng, L., Shahin, M. A., & Mujah, D., 2016. Influence of key environmental conditions on microbially induced cementation for soil stabilization. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 143(1), 04016083.
- Choi, S. G., Wang, K., & Chu, J., 2016a. Biocementation for Sand Using an Eggshell as Calcium Source. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 06016010.
- Choi, S. G., Wang, K., & Chu, J., 2016b. Properties of biocemented, fiber reinforced sand. *Construction and building materials*, 120, 623-629.
- Choi, S. G., Park, S. S., Wu, S., & Chu, J., 2017a. Methods for calcium carbonate content measurement of biocemented soils. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 29(11), 06017015.
- Choi, S. G., Chu, J., Brown, R. C., Wang, K., Wen, Z., 2017b. Sustainable biocement production via microbially induced calcium carbonate precipitation: use of limestone and acetic acid derived from pyrolysis of lignocellulosic biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(6), 5183-5190.
- Chu, J., Ivanov, V., Lee, M. F., Oh, X. M., & He, J., 2009. Soil and waste treatment using biocement. In *Proceedings of the international symposium on ground improvement technologies and case histories*, ISGI (Vol. 9, pp. 165-170).
- Chu, J., Stabnikov, V., Ivanov, V., 2012. Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil. *Geomicrobiology Journal*, 29(6):544-549.
- Ciurli S., Mangani S., Benini S., Rypniewski W. R., Wilson K. S., Miletto S., 1999. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, vol. 7:205–216.
- Clifton J. R., Frohnsdorff G. J. C., 1982. Stone consolidating materials: a status report. In: *Conservation of Historic Stone Buildings and Monuments*, National Academy Press, Washington, DC, pp. 287–311.
- Cui, M. J., Zheng, J. J., Zhang, R. J., Lai, H. J., & Zhang, J., 2017. Influence of cementation level on the strength behaviour of bio-cemented sand. *Acta Geotechnica*, 12(5), 971-986.
- Çepel, N., 1988. Toprak İlmi. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, İstanbul.
- D'Aquino Henriques, R. A., 2011. Estudio Relativo al Hormigón Bacteriano: Fabricación y Potenciales Campos de Aplicación. Tesis de Master. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Dadda, A., Geindreau, C., Emeriault, F., Du Roscoat, S. R., Garandet, A., Sapin, L., & Filet, A. E., 2017. Characterization of microstructural and physical properties changes in biocemented sand using 3D X-ray microtomography. *Acta Geotechnica*, 12(5), 955-970.
- Dapples, E. C., 1942. The effect of macro-organisms upon near-shore marine sediments. *Journal of Sedimentary Research*, 12(3), 118-126.

- De Belie, N., & De Muynck, W., 2008. Crack repair in concrete using biodeposition. In Proceedings of the International Conference on Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting (ICCRRR), Cape Town, South Africa (pp. 291-292).
- De Belie, N., De Muynck, W., 2009. Crack repair in concrete using biodeposition. In: Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting II., pp. 777–781.
- De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N., & Verstraete, W., 2008. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, 22(5), 875-885.
- De Muynck, W., De Belie, N., & Verstraete, W., 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering*, 36(2), 118-136.
- DeJong, J. T., Fritzges, M. B., & Nüsslein, K., 2006. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 132(11), 1381-1392
- DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C., & Nelson, D. C., 2010. Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*, 36(2), 197-210.
- DeJong, J., Proto, C., Kuo, M., & Gomez, M., 2014. Bacteria, biofilms, and invertebrates: the next generation of geotechnical engineers?. In *Geo-Congress 2014: Geo-characterization and Modeling for Sustainability* (pp. 3959-3968).
- Del Río, A. V., Buys, B., Campos, J. L., Méndez, R. and Mosquera-Corral, A., 2015. Optimizing upflow velocity and calcium precipitation in denitrifying granular systems. *Process Biochemistry*, 50(10), 1656-1661.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., Mukherjee, A., 2013. *Bacillus megaterium* mediated mineralization of calcium carbonate as biogenic surface treatment of green building materials. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(12), 2397-2406.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A., 2016. Significant indicators for biomineralisation in sand of varying grain sizes. *Construction and Building Materials*, 104, 198-207.
- Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N., & Verstraete, W., 2006. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, 17(4), 357-367.
- Dixon, N. E., P. W. Riddles, C. Gazzold, R. L. Blakeley and B. Zerner. 1980. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Canadian Journal of Biochemistry* 58:1335-1344, Erratum (1981): 59, 564.
- Douglas, S. and Beveridge, T. J., 1998. Mineral formation by bacteria in naturel communities FEMS. *Microbiology Ecology* 26, 79-88.
- Dunn, B.E., Grütter, M.G., 2001. *Helicobacter pylori* springs another surprise. *Nature Structural Biology* 8, 480-482.
- Dworkin, M., 1993. *Myxobacteria*. Minneapolis: University of Minnesota.
- El-Shora, H.M., 2001. Properties and immobilization of urease from leaves of *Chenopodium album* (C₃). Botany Department, Faculty of Science, Mansoura University, Mansoura, Egypt. 42:251-258.
- EPA, 1974. Screening Study For Emissions Characterization From Lime Manufacture, Contract No. 68-02-0299, Vulcan-Cincinnati, Inc., Cincinnati, OH, August.
- Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F.S., Smith, R.W., 2000. Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria, *Geomicrobiol Journal*, 17(4):305–318.
- Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S., and Müller, R., 2003. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities – past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium* *Journal Biotechnology*,. 106, 233–253.
- Ghosh, P., Mandal S., Chattopadhyay, B. D., Pal, S., 2005. Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cem Concr Res*. 35:1980–3.

- González-Muñoz, M. T., Chekroun, K. B., Aboud, A. B., Arias, J. M., & Rodríguez-Gallego, M. 2000. Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg^{2+} in development of crystal morphology. *Journal of Sedimentary Research*, 70(3).
- González-Muñoz, M. T., Rodríguez-Navarro, C., Martínez-Ruiz, F., Arias, J. M., Merroun, M. L., and Rodríguez-Gallego, M., 2010. Bacterial biomineralization: new insights from *Myxococcus*-induced mineral precipitation. *Geological Society London Special Publications*. 336, 31–50.
- Gopi, S., Subramanian, V. K., & Palanisamy, K., 2013. Aragonite–calcite–vaterite: a temperature influenced sequential polymorphic transformation of $CaCO_3$ in the presence of DTPA. *Materials Research Bulletin*, 48(5), 1906-1912.
- Gorospe, C. M., Han, S. H., Kim, S. G., Park, J.Y., Kang, C. H., Jeong, J. H., So, J. S., 2013. Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18:903–8.
- Gupta, S., Rathi, C., Kapur, S., 2013. Biologically Induced Self Healing Concrete: A Futuristic Solution for Crack Repair. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 1(3), 85-89.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2):95-108.
- Hammes, F., Verstraete, W., 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in 470 microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1:3–7.
- Hammes, F., Boon, N., De Villiers, J., Verstraete, W., & Siciliano, S. D., 2003. Strain specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4901-4909.
- Harkes, M. P., Van Paassen, L. A., Booster, J. L., Whiffin, V. S., and Van Loosdrecht, M. C. M., 2010. Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, 36, 112–117.
- Hasan, H., 2000. Ureolytic microorganisms and soil fertility: a review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31, 2565–2589.
- Hiramaya C., Sugimura M., Saito H., Nakamura M., 2000. Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry*, 53(2), 325-380.
- Ivanov, V., & Chu, J., 2008. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 139-153.
- Ivanov, V., Chu, J., Stabnikov, V., & Li, B., 2015. Strengthening of soft marine clay using bioencapsulation. *Marine Georesources & Geotechnology*, 33(4), 320-324.
- Jahns T., 1996. Ammonium/urea-dependent generation of a proton electrochemical potential and synthesis of ATP in *Bacillus pasteurii*. *Journal of Bacteriology* 178:403-409.
- Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, C., Piñar, G., Carrillo-Rosúa, F. J., Rodríguez-Gallego, M., & Gonzalez-Muñoz, M. T., 2007. Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*, 68(10), 1929-1936.
- Jonkers, H. M. and Schlangen, E., 2008. Development of a bacteria-based self healing concrete. *Tailor Made Concrete Structures – Walraven & Stoelhorst (eds) Taylor & Francis Group, London, ISBN 978-0-415-47535-8*.
- Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., Schlangen, E., 2010. Application of bacteria as self -healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecology Engineering* ., 36, 230–235.
- Jyothsna, P., Usha, J., Pallavi, P., 2015. Calcium Carbonate precipitation based improvement of concrete through microbiologically induced precipitation. *GJTE-Vol(2)-Issue(2)*.

- Kahani, M., Kalanatory, F., Bazzazzade, R., Mirzaie, B., 2013. Biological Calcium Carbonate precipitation in Sandy Soils and its Effect on Soil Stabilization. *Environment Science and Engineering Journal* 52: 11-19. (In Persian)
- Kalanatory, F., & Kahani, M., 2015. Evaluation of the ability to control biological precipitation to improve sandy soils. *Procedia Earth and Planetary Science*, 15, 278-284.
- Kamennaya, N. A., 2012. Ajo-Franklin, C. M., Northen, T. Ve Jansson, C. Cyanobacteria as biocatalysts for carbonate mineralization. *Minerals*, 2(4), 338-364.
- Karataş, I., 2008. *Microbiological Improvement of the Physical Properties of Soils*. Arizona: ProQuest.
- Kavazanjian, E., & Hamdan, N., 2015. Enzyme induced carbonate precipitation (EICP) columns for ground improvement. In *IFCEE 2015* (pp. 2252-2261).
- Khaliq, W. and Ehsan, M. B., 2016. Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. *Construction and Building Materials*, 102, 349-357.
- Khan, M. N. H., Amarakoon, G. G. N. N., Shimazaki, S., Kawasaki, S., 2015. Coral sand solidification test based on microbially induced carbonate precipitation using ureolytic bacteria. *Mater Trans.* 56:1725–32.
- Knoll, A. H., 2003. Biomineralization and evolutionary history. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 54, 329–356.
- Lauchnor, E. G., Topp, D. M., Parker, A. E., Gerlach R., 2015. Whole cell kinetics of urealysis by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Applied Microbiology*, 118:1321–32.
- Le Metayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubiere, J. F., & Perthuisot, J. P., 1999. Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology*, 126(1-4), 25-34.
- Lee, M. L., Ng, W. S., & Tanaka, Y., 2013. Stress-deformation and compressibility responses of bio-mediated residual soils. *Ecological engineering*, 60, 142-149.
- Li, Bing., 2015. *Geotechnical Properties of Biocement Treated Sand and Clay*. Doctoral Thesis, School of Civil and Environmental Engineering, Nanyang Technological University.
- Li, M., Li, L., Ogbonnaya, U., Wen, K., Tian, A., & Amini, F., 2015. Influence of fiber addition on mechanical properties of MICP-treated sand. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 28(4), 04015166.
- Li, S., 2013. *A laboratory study of the effects of bio-stabilization on geomaterials*. M.S. Thesis, Iowa State University, Ames, Iowa.
- Lin, H., Suleiman, M. T., Brown, D. G., & Kavazanjian Jr, E., 2015. Mechanical behavior of sands treated by microbially induced carbonate precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 142(2), 04015066.
- Lippmann, F., 1973. *Sedimentary carbonate minerals*, New York: Springer Verlag, 228 p.
- Ma, L., Pang, A.P., Luo, Y., Lu, X. and Lin, F., 2020. Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii*. State Key Laboratory of Bioelectronics, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, Jiangsu, People's Republic of China.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M., 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc., NJ. USA, p1088.
- Maleki, M., Ebrahimi, S., Asadzadeh, F., & Tabrizi, M. E., 2016. Performance of microbial-induced carbonate precipitation on wind erosion control of sandy soil. *International journal of environmental science and technology*, 13(3), 937-944.
- Marshall, B. J., L. J. Barrett, C. Prakash, R. W. McCallun and Guerrant, R.L., 1990. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bacterial effect of acid. *Gastroenterology* 99:697-702.

- Martin, D., Dodds, K., Butler, I. B., and Ngwenya, B. T. 2013. Carbonate precipitation under pressure for bioengineering in the anaerobic subsurface via denitrification. *Environmental Science & Technology*, 47, 8692–8699.
- Martinez, B., DeJong, J., Ginn, T., Montoya, B., Barkouki, T., Hunt, C., 2013. Experimental optimization of microbial-induced carbonate precipitation for soil improvement. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*. 139, 587–598.
- Mavromatis V., Pearce, C. R., Shirokova L. S., Bundeleva I. A., Pokrovsky O. S., Benezeth P., Oelkers E. H., 2012. Magnesium isotope fractionation during hydrous magnesium carbonate precipitation with and without cyanobacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 76, 161-174.
- Mccall, P.L. & Tevesz, M. J. S. (Ed.), 1982 *Animal Sediment Relations. The Biogenic Alteration of Sediments*. Plenum Press, New York.
- Meadows, P. S., & Hariri, M. S. B., 1991. Effects of two infaunal polychaetes on sediment shear strength and permeability: an experimental approach. *The Environmental Impact of Burrowing Animals and Animal Burrows*, 63, 319-321.
- Mitchell, J. K., & Santamarina, J. C., 2005. Biological considerations in geotechnical engineering. *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering*, 131(10), 1222-1233.
- Mobley, H. L. and R. P. Hausinger. 1989. Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews* 53:85-108.
- Mobley, H. L. T., Island, M.D. and Hausinger, R.P., 1995. Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews* 59:451-480.
- Montoya, B.M., Barkouki, T.H., Hunt, C., Tanyu, B., Major, D., 2013. Experimental optimization of microbial-induced carbonate precipitation for soil improvement. *Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* 139 (4), 587–598.
- Moravej, S., Habibagahi, G., Nikooee, E., & Niazi, A., 2018. Stabilization of dispersive soils by means of biological calcite precipitation. *Geoderma*, 315, 130-137.
- Morsdorf, G., and Kaltwasser H., 1989. Ammonium assimilation in *Proteus vulgaris*, *Bacillus pasteurii*, and *Sporosarcina ureae*. *Archives of Microbiology* 152:125-131.
- Morse, J.W., Arvidson, R.S., Lüttge A., 2007. Calcium Carbonate Formation and Dissolution.. *Chemical Reviews*, 107, 342–381.
- Mountassir, G. E., Lunn, R. J., Moir, H, MacLachlan, E., 2013. Hydrodynamic coupling in microbially mediated fracture mineralization: formation of self-organized groundwater flow channels. *Water Resources Research*; 50:1–16.
- Muthukkumaran, K., & Shashank, B. S., 2016. Durability of microbially induced calcite precipitation (MICP) treated cohesionless soils. *Japanese Geotechnical Society Special Publication*, 2(56), 1946-1949.
- Nan, Z., Chen, X., Yang, Q., Wang, X., Shi, Z., & Hou, W., 2008. Structure transition from aragonite to vaterite and calcite by the assistance of SDBS. *Journal of colloid and interface science*, 325(2), 331-336.
- Nemati, M. and Voordouw, G., 2005. Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: comparison with enzymic option. *Process Biochemistry* 40:925–933.
- Neupane, D., A.M.ASCE; Yasuhara, H., Kinoshita N. and Unno T., 2013. Applicability of Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation as a Soil-Strengthening Technique. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, Vol. 139, No. 12.
- Neupane, D., Yasuhara H. and Kinoshita N., 2015. Evaluation of enzyme mediated calcite grouting as a possible soil improvement technique. *Department of Civil and Environmental Engineering, Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan*, 1169-1172.
- Ng, W. S., Lee, M. L., & Hii, S. L., 2012. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 62, 723-729.

- Northup, D. E. and Lavoie, K. H., 2001. Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiology Journal*, 18, 199-222.
- Okwadha, G. D., & Li, J., 2010. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, 81(9), 1143-1148.
- Olszewski M. A., Noverr M.C., Chen G.-H., Toews G.B, Cox G. M., Perfect J. R., Huffnagle G.B., 2004. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American Journal of Pathology* Volume 164, Issue 5, Pages 1761–1771.
- Omar, N. B., Martínez-Cañamero, M., González-Muñoz, M. T., Arias, J. M., and Huertas, F., 1995. *Myxococcus xanthus* killed cells as inducers of struvite crys-tallization. Its possible role in the biomineralization processes. *Chemosphere* 30, 2387–2396.
- Patro Sanjaya, K., Chandra, K. S, Sugandha, S., Chand, S., Sahu, S. K., Manimaran, S., 2015. Effect of bacteria on the properties of concrete using Portland slag cement, *Proceedings of the National Conference on Recent Advances and Future Prospects in Civil Engineering (RAFPCE-15)*, 89-98.
- Plée, K., Pacton, M., and Ariztegui, D., 2010. Discriminating the role of photo-synthetic and heterotrophic microbes triggering low-Mg calcite precipitation in freshwater biofilms (Lake Geneva, Switzerland). *Geomicrobiology Journal* 27, 391–399.
- Prakash, K., & Sridharan, A., 2004. Free Swell Ratio and Clay Mineralogy of Fine-Grained Soils. *Geotechnical Testing Journal*, 27(2).
- Prescott L. M., Harley J. P. and Klein D. A., 2002. *Microbiology* , 5th Edition. The McGraw–Hill Companies. USA.
- Qian, C., Luo, M., LI R., Rong, H., 2015. Efficiency of concrete crack-healing based on biological carbonate precipitation. *Journal of Wuhan University of Technology - Materials Science Edition*, 30(6), 1255-1259.
- Rahman, M. A. and Halfar, J., 2014. First evidence of chitin in calcified coralline algae: new insights into the calcification process of *Clathromorphum compactum*. *Scientific reports*, 4.
- Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V., & Bang, S. S., 2001. Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Materials Journal-American Concrete Institute*, 98(1), 3-9.
- Reddy, M. S., 2013. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in microbiology*, 4, 314.
- Reuben, H. K., 2003. *Chemical Grouting and Soil Stabilization*. New Jersey, USA: Rutgem University.
- Rhoads, D. C., 1974. Organism-sediment relations on the muddy sea floor. *Oceanography and Marine Biology*, 12, 263-300.
- Riding, R., 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology*, 47, 179-214.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K. B., & Gonzalez-Munoz, M. T., 2003. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2182-2193.
- Rodriguez-Navarro, A., Gonzalez-Munoz, M. T., Rodriguez-Gallego M., 2007. Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 1197–1213.
- Rodriguez-Navarro, C., Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E., & González-Munoz, M. T. 2012. Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: implications for stone conservation. *Applied and environmental microbiology*, 78(11), 4017-4029.
- Roeselers, G., & Van Loosdrecht, M. C. M., 2010. Microbial phytase-induced calcium-phosphate precipitation—a potential soil stabilization method. *Folia microbiologica*, 55(6), 621-624.
- Ropp, R. C., 2012. *Encyclopedia of the alkaline earth compounds*. Newnes.

- Rowshanbakht, K., Khamsehchiyan, M., Sajedi, R. H., & Nikudel, M. R., 2016. Effect of injected bacterial suspension volume and relative density on carbonate precipitation resulting from microbial treatment. *Ecological engineering*, 89, 49-55.
- Rubio, E. S., Moral, S., Canaveras, J. C., Calvo, J. P., Rouchy, J. M., 2001. Calcitization of Mg–Ca carbonate and Ca sulphate deposits in a continental Tertiary basin (Calatayud Basin, NE Spain). *Sedimentary Geology*, 140 (1-2), 123-142.
- Saffari, R., Habibagahi, G., Nikoosaei, E., & Niazi, A., 2017. Biological stabilization of a swelling fine-grained soil: The role of microstructural changes in the shear behavior. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions of Civil Engineering*, 41(4), 405-414.
- Saggar, S., Singh, J., Giltrap, D. L., Zaman, M., Luo, J., Rollo, M., Kim, D. -G., Rys, G., van der Weerden, T.J., 2013. Quantification of reductions in ammonia emissions from fertiliser urea and animal urine in grazed pastures with urease inhibitors for agriculture inventory: New Zealand as a case study. *Science of the Total Environment* 465,136–146.
- Sarda, D., Choonia, H. S., Sarode, D. D., Lele, S. S., 2009. Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(8): 1111-1115.
- Sharaky, A. M., Mohamed, N. S., Elmashad, M. E., & Shredah, N. M., 2018. Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of sandy soil. *Construction and Building Materials*, 190, 861-869.
- Sharma, A., & Ramkrishnan, R., 2016. Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine grained soils. *Perspectives in Science*, 8, 198-202.
- Singh, M., Kumar, S. V., Waghmare, S. A., & Sabale, P. D., 2016. Aragonite–vaterite–calcite: Polymorphs of CaCO₃ in 7th century CE lime plasters of Alampur group of temples, India. *Construction and Building Materials*, 112, 386-397.
- Sinha, S., Rez, P., 2015. Distortions of the calcite and aragonite atomic structures from interstitial water. *Materials Chemistry and Physics*, 157, 56-62.
- Soon, N. W., Lee, L. M., Khun, T. C., Ling, H. S., 2014. Factors affecting improvement in engineering properties of residual soil through microbial-induced calcite precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*;140(5).
- Sridharan, A. ve Gurtug, Y., 2004. Swelling behaviour of compacted fine-grained soils. *Engineering Geology*, 72(1), 9-18.
- Ståhlberg, C., Bastviken, D., Svensson, B. H. ve Rahm, L., 2006. Mineralisation of organic matter in coastal sediments at different frequency and duration of resuspension. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70(1), 317-325.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., & Bang, S. S., 1999. Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563-1571.
- Thieman, W. J. and Palladino M. A., 2013. *Biyoteknolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, 340, Ankara.
- Tiano, P., Biagiotti, L., & Mastromei, G., 1999. Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of microbiological methods*, 36(1-2), 139-145.
- Tziviloglou, E., Van Tittelboom, K., Palin, D., Wang, J., Sierra-Beltran, M. G., Ersan, Y. C., Mors, R., Wiktor V., Jonkers, H. M., Schlangen, E., 2016. Biobased self-healing concrete: from research to field application. *Self healing Materials* 273:345–386.
- Umar, M., Kassim, K. A., & Chiet, K. T. P., 2016. Biological process of soil improvement in civil engineering: A review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, 8(5), 767-774.
- van Paassen, L. A., 2009. Biogrout, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation. PhD Thesis. Delft, Netherlands: Delft University of Technology.

- Velde, B. ve Meunier, A., 2008. The Origin of Clay Minerals in Soils and Weathered Rocks, Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Visser, P. T., Reid, R. P., and Bebout, B. M., 2000. Microscale observations of sulfate reduction: correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites. *Geology* 28, 919–922.
- Wang, J., & Becker, U., 2009. Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO₃). *American Mineralogist*, 94(2-3), 380-386.
- Wang, J.Y., Tittelboom, K.T., Belie N. D. and Verstraete, W., 2010. Potential of Applying Bacteria to heal cracks in concrete. 2nd international Conference on sustainable construction material and technologies. Universita Politecnica delle Marche, Ancona, Italy.
- Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W. and De Belie, N., 2014. Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cement and Concrete Research*, 56, 139-152.
- Whiffin, V. S., 2004. Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement. Doctoral dissertation, Murdoch University.
- Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A., & Harkes, M. P., 2007. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417-423.
- Wiktor, V., Jonkers, H. M., 2011. Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, 33(7): 763–770.
- Wiley, W. R., and J. L. Stokes. 1962. Requirement of an alkaline pH and ammonia for substrate oxidation by *Bacillus pasteurii*. *Journal of Bacteriology*, 84:730-734.
- Wiley, W. R. and J. L. Stokes. 1963. Effect of pH and ammonium ions on the permeability of *Bacillus pasteurii*. *Journal of Bacteriology*, 86:1152-1156
- Williams, S. L., Kirisits, M. J., Ferron, R. D., 2017. Influence of concrete-related environmental stressors on biomineralizing bacteria used in self-healing concrete, *Construction and Building Materials*, 139:611–8.
- Xu, J., Yao, W., 2014. Multiscale mechanical quantification of self-healing concrete incorporating non-ureolytic bacteria-based healing agent. *Cement and Concrete Research*, 64(1):1–11
- Yasuhara, H., Neupane, D., Hayashi, K. and Okamura, M., 2012. Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, 52(3), 539–549.
- Yıldırım, N., Gürtuğ, Y., & Sesal, C. 2016. Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşum mekanizmaları ve uygulama alanları. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, (2), 70-80.
- Zhang, Y., Guo, H. X., & Cheng, X. H., 2015. Role of calcium sources in the strength and microstructure of microbial mortar. *Construction and Building Materials*, 77, 160-167.
- Zhu, T., & Dittrich, M., 2016. Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 4.
- Zusfahair, D., Ningsih, R., Fatoni, A. and Pertiwi D. S., 2018. Determination of Urease Biochemical Properties of Asparagus Bean (*Vigna unguiculata* ssp *sesquipedalis* L.). *Materials Science and Engineering*, 349, 1.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Merve DURMAZ
Doğum tarihi:	10 Kasım 1991
Doğum Yeri:	Tortum/Erzurum
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
E-mail:	bylgmrvdrnz@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Şükrüpaşa Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2020)