

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

BAKTERİYEL KALSİYUM KARBONAT
MİNERALİZASYONUNDA ÜREOLİTİK BAKTERİ-KİL
ETKİLEŞİMİ: *PAENIBACILLUS FAVISPORUS* U3

DOKTORA TEZİ

NAİME NUR BOZBEYOĞLU KART

DENİZLİ, TEMMUZ 2021

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



**BAKTERİYEL KALSİYUM KARBONAT
MİNERALİZASYONUNDA ÜREOLİTİK BAKTERİ-KİL
ETKİLEŞİMİ: *PAENIBACILLUS FAVISPORUS* U3**

DOKTORA TEZİ

NAİME NUR BOZBEYOĞLU KART

DENİZLİ, TEMMUZ 2021



Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2016FEBE053 nolu proje ile desteklenmiştir.

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

NAİME NUR BOZBEYOĞLU KART

ÖZET

BAKTERİYEL KALSİYUM KARBONAT MİNERALİZASYONUNDA ÜREOLİTİK BAKTERİ-KİL ETKİLEŞİMİ: *PAENIBACILLUS*

FAVISPORUS U3

DOKTORA TEZİ

NAİME NUR BOZBEYOĞLU KART

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

DENİZLİ, TEMMUZ-2021

Bu çalışmada yerel izolat *Paenibacillus favisporus* U3 ile kontrol suşu *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterilerinin CaCO_3 çökelimini en iyi yaptıkları ortam şartları belirlenmiş ve mineralojik analizlerle (XRD, PED-XRF, CRS, SEM-EDX) bakteriyel kalsiyum karbonatın yapısı aydınlatılmıştır. Üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri ve üreaz protein seviyesi belirlenerek bakteriyel CaCO_3 çökelim sürecindeki rolleri araştırılmıştır. Ayrıca, kil-bakteri arasındaki etkileşim de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, yerel izolat U3 en yüksek CaCO_3 çökelinin pH 6,5, 100 mM üre, 37°C, 1000 mM CaCl_2 , %10 inokülasyon ve 14. günde (24,02 g/L) gerçekleştirmiştir. ATCC 6453 suşu ise pH 6,5, 333 mM üre, 30°C, 1000 mM CaCl_2 , %20 inokülasyon ve 14. günde (37,19 g/L) maksimum CaCO_3 miktarına ulaşmıştır. Mineralojik analizlerle yerel izolatin kalsiyum karbonatın hem kalsit hem de vaterit formlarını ürettiği, *S. pasteurii* ATCC 6453'ün ise sadece kalsit ürettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte yüksek tuz konsantrasyonunu U3 izolatinin hem tolere ettiği hem de CaCO_3 çökeliyi yaptığı mineralojik ve enzim çalışmalarıyla da doğrulanmıştır. Enzim çalışmalarına göre, *P. favisporus* U3, yüksek üreaz aktivitesi gösterirken (KMO 0,95 $\mu\text{mol/dk/mg}$; KMO opt. 77,47 $\mu\text{mol/dk/mg}$; LB-üre 0,25 $\mu\text{mol/dk/mg}$; LB-üre opt. 20,70 $\mu\text{mol/dk/mg}$), *S. pasteurii* ATCC 6453 karbonik anhidraz (LB-üre 61,90 nmol/dk/mg ; KMO 112,90 nmol/dk/mg) yönünde yüksek enzim aktivitesine sahiptir ve her iki türde de üreaz enzim varlığı Western blot çalışmaları ile ilk kez gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, CaCO_3 çökeliminde farklı rolleri olan üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitelerinin türe spesifik olduğu düşünülmüş olup en iyi CaCO_3 çökelim şartları türe göre değişkenlik göstereceğinden her iki enzimin aktivite şartlarının daha detaylı incelenmesi gerektiğine karar verilmiştir. Diğer yandan, *P. favisporus* U3'ün bakteri-kil etkileşimi tespit edilememiştir. Sonuç olarak, yüksek tuz konsantrasyonlarında CaCO_3 çökeliyi yeteneğine sahip olan U3'ün farklı topraklarda iyileştirme çalışmalarının yapılarak, dışa bağımlılığının azaltılması için mühendisliğin farklı alanlarında kullanım potansiyelinin aydınlatılması gerektiği düşünülmüştür.

ANAHTAR KELİMELEER: *Paenibacillus favisporus* U3, *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453, Kalsiyum karbonat çökeliimi, Üreaz, Karbonik anhidraz, Western blot.



ABSTRACT

UREAOLITIC BACTERIUM-CLAY INTERACTION ON BACTERIAL CALCIUM CARBONATE MINERALIZATION: *PAENIBACILLUS*

FAVISPORUS U3

PH. D THESIS

NAIME NUR BOZBEYOGLU KART

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZIME MERCAN DOGAN)

DENIZLI, JULY 2021

In this study, it was determined the conditions in which the best calcium carbonate precipitation was done by the local isolate *Paenibacillus favisporus* U3 and the control strain *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 were performed, and the structure of bacterial CaCO₃ was elucidated by mineralogical analysis (XRD, PED-XRF, CRS, SEM-EDX). Urease and carbonic anhydrase enzyme activities and urease protein levels were determined and their roles in the bacterial CaCO₃ mineralization process were investigated. In addition, the interaction between clay-bacteria have also been investigated. According to the obtained results, the local isolate U3 achieved the highest CaCO₃ mineralization at pH 6.5, 100 mM urea, 37°C, 1000 mM CaCl₂, 10% inoculation, and on the 14th day (24.02 g/L). ATCC 6453 strain reached maximum CaCO₃ amount pH 6.5, 333 mM urea, 30°C, 1000 mM CaCl₂, 20% inoculation and on day 14 (37.19 g/L). Mineralogical analysis revealed that the local isolate produced both calcite and vaterite forms of CaCO₃, whereas *S. pasteurii* ATCC 6453 only produced calcite. Moreover, it has been confirmed by mineralogical and enzyme studies that U3 isolate both tolerates high salt concentration and precipitates CaCO₃. According to enzyme studies, *P. favisporus* U3 shows high urease activity (KMO 0.95 µmol/min/mg; KMO opt.77.47 µmol/min/mg; LB-urea 0.25 µmol/min/mg; LB urea opt. 20.70 µmol/min/mg), *S. pasteurii* ATCC 6453 carbonic anhydrase has high enzyme activity towards (LB-urea 61.90 nmol/min/mg; KMO 112.90 nmol/min/mg), and the presence of urease enzyme in both species has been demonstrated for the first time by Western blot studies. According to these data, it was thought that urease and carbonic anhydrase enzyme activities, which have different roles in CaCO₃ precipitation, were species-specific, and it was decided that the activity conditions of both enzymes should be examined in more detail since the best calcium carbonate precipitation conditions will vary according to the species. *P. favisporus* U3 -clay interaction could not be detected. As a result, U3, which can precipitate CaCO₃ at high salt concentrations, should be improved in different soils. It is thought that the potential of use in different fields of engineering should be clarified to reduce foreign dependency.

KEYWORDS: *Paenibacillus favisporus* U3, *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453, Calcium carbonate precipitation, Urease, Carbonic anhydrase, Western blot.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖN SÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kalsiyum Karbonat.....	4
2.2 Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Çökelimi.....	5
2.3 Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Çökelimini Etkileyen Faktörler.....	9
2.3.1 Bakteri Türü.....	10
2.3.2 Sıcaklık.....	10
2.3.3 pH.....	11
2.3.4 İnokülasyon oranı.....	12
2.3.5 Kalsiyum Kaynağının Türü ve Konsantrasyonu.....	12
2.3.6 Üre konsantrasyonu.....	13
2.4 Üreaz Enzimi.....	14
2.5 Karbonik Anhidraz Enzimi.....	17
2.6 Bakteri-Kil Etkileşimi.....	20
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1 Kullanılan Organizmalar.....	22
3.2 Kalsiyum Karbonat Çökelimi.....	23
3.3 Kalsiyum Karbonat Çökeliminin Optimal Şartlarının Belirlenmesi.....	23
3.4 Bakteriyal Kalsiyum Karbonatın Kurutulması ve Saklanması.....	24
3.5 Amonyak Miktarının Belirlenmesi.....	24
3.6 Enzim Analizleri.....	25
3.6.1 Üreaz ve Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Varlığının Belirlenmesi.....	25
3.6.2 Bakteriyal Enzim Karışımlarının Hazırlanması.....	25
3.6.3 Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi.....	26
3.6.4 Üreaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	26
3.6.5 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
3.6.6 Üreaz Protein Seviyesinin Belirlenmesi.....	27
3.7 Mineralojik Analizleri.....	29
3.7.1 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	29
3.7.2 X-Işınları Kırınımı (XRD) ve Floresansı (XRF) Analizleri.....	29
3.7.3 Konfokal Raman Spektrometresi.....	30
3.8 Kil-Bakteri Etkileşimi.....	30
3.9 İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	31
4.1 Bakteriyal Kalsiyum Karbonat Çökelimi.....	31
4.1.1 Bakteri türünün etkisi.....	31
4.1.2 Sıcaklığın Etkisi.....	32

4.1.3	Üre Konsantrasyonunun Etkisi	35
4.1.4	pH Etkisi	38
4.1.5	Kalsiyum Kaynaklarının Etkisi.....	40
4.1.6	İnokülasyon Oranının Etkisi	46
4.2	Amonyak Miktarının Belirlenmesi	49
4.3	Enzim Analizleri	50
4.3.1	Üreaz ve Karbonik Anhidraz Enzim Aktiviteleri	50
4.3.2	Western Blot Analizi	52
4.4	Mineralojik Analizler.....	54
4.5	Kıl-Bakteri Etkileşimi.....	64
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	65
6.	KAYNAKLAR.....	67
7.	EKLER.....	86



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Mikroorganizmalarda gerçekleşen farklı CaCO ₃ çökeltim reaksiyonları	6
Şekil 2.2: Üreaz enzimi ile üre hidroliz reaksiyonu	15
Şekil 2.3: CO ₂ 'nin geri dönüşümlü hidrasyon reaksiyonu (CA: karbonik anhidraz)	17
Şekil 2.4: Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltimi ve etkili olan faktörler	19
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan üreolitik organizmaların kültür ortamındaki görüntüleri (A: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453, B: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3)	22
Şekil 4.1: Yerel izolat <i>Paenibacillus favisporus</i> U3 genom sekansı	32
Şekil 4.2: Üreaz protein profili.	53
Şekil 4.3: Üreaz protein profili (UreB)	53
Şekil 4.4: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün SEM-EPMA analizi	55
Şekil 4.5: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3 tarafından üretilen CaCO ₃ 'ün SEM-EDX analizi	56
Şekil 4.6: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 tarafından üretilen CaCO ₃ 'ün FESEM-EDX analizi	56
Şekil 4.7: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün SEM görüntüsü	57
Şekil 4.8: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün Ca-laktat içeren ortamda SEM görüntüsü	58
Şekil 4.9: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün Ca-laktat içeren ortamda SEM-EDX analizi	59
Şekil 4.10: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün Ca-nitrat içeren ortamda SEM-EDX analizi	59
Şekil 4.11: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3 tarafından üretilen CaCO ₃ 'ün XRD profili	60
Şekil 4.12: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 tarafından üretilen CaCO ₃ 'ün XRD profili	61
Şekil 4.13: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3 tarafından üretilen CaCO ₃ 'ün Konfokal Raman Spektroskopi (CRS) analizi	63

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Kalsiyum karbonat çökeliminde kullanılan parametreler	24
Tablo 3.2: SDS-PAGE Ayrıştırma ve yükleme jeli	28
Tablo 4.1: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelim aktivitesine sıcaklığın etkisi	33
Tablo 4.2: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün kalsiyum karbonat çökelimi üzerine ürenin etkisi	36
Tablo 4.3: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelimi üzerine ürenin etkisi	37
Tablo 4.4: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelimi üzerine pH'in etkisi	39
Tablo 4.5: Bakteriye kalsiyum karbonat çökelimi sırasında pH değerindeki değişim	40
Tablo 4.6: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün kalsiyum karbonat çökelimine CaCl ₂ 'in etkisi	42
Tablo 4.7: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelim aktivitesine CaCl ₂ 'in etkisi	42
Tablo 4.8: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün kalsiyum karbonat çökelimine Ca-laktatın etkisi	43
Tablo 4.9: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelim aktivitesine Ca laktat'ın etkisi	44
Tablo 4.10: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün kalsiyum karbonat çökelimine Ca-nitratın etkisi	45
Tablo 4.11: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelimine Ca-nitratın etkisi	46
Tablo 4.12: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün kalsiyum karbonat çökelimine inokulasyon oranının etkisi	47
Tablo 4.13: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 kalsiyum karbonat çökelimine inokulasyon oranının etkisi	47
Tablo 4.14: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3 ve <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453'ün en iyi CaCO ₃ çökelimi yaptığı parametreler	48
Tablo 4.15: Farklı besiyerlerinde <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün kalsiyum karbonat çökelimi sırasında açığa çıkan amonyum miktarı (mg/L)	49
Tablo 4.16: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3 ve <i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453 bakterilerinin üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri	51
Tablo 4.17: <i>Paenibacillus favisporus</i> U3'ün ürettiği CaCO ₃ 'ün element analizi	62

SEMBOL LİSTESİ

- ⁰C:** Celcius derecesi
M: Molaritre
ppm: Milyonda bir birim
mg: Miligram
ml: Mililitre
mm: Milimetre
mM: Milimolar
mA: Miliamper
nm: Nanometre
nmol: Nanomol
µg: Mikrogram
µm: Mikrometre
µl: Mikrolitre
µmol: Mikromol
dk: Dakika
V: Volt
kDa: Kilodalton
OD: Optik dansite
dH₂O: Distile su
rpm: Dakikadaki devir sayısı
KMO: Kalsiyum mineralizasyon ortamı
LB: Luria-Bertani
TSB: Triptik soya broth
SDS: Sodyum dodesil sülfat
BSA: Bovine serum albumin
BCIP: 5-bromo-4-kloro-indol-fosfat
ATCC: Amerika tipi kültür koleksiyonu
PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi
ALP: Alkalen Fosfataz

TEMED: Tetrametilendiamin

UV: Ultraviole

SDB: Sample dilution buffer

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

SEM: Taramalı electron mikroskopu

XRD: X-Işınları kırınımı

XRF: X-Işınları fluoresansı

CRS: Konfokal raman spektroskopisi

EDX: Enerji Dispersiyon X-ışınları

EPMA: Elektron Probu Mikro Analizörü



ÖN SÖZ

‘Bakteriyel Kalsiyum Karbonat Mineralizasyonunda Üreolitik Bakteri-Kil Etkileşimi: *Paenibacillus Favisporus* U3’ çalışması Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Ana Bilim Dalında, Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN’ın danışmanlığı altında doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Akademik hayata birlikte başladığım, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca yetişmemde çok büyük emeği olan, meslek etiği ve ahlakını kendisinden öğrendiğim, maddi ve manevi destek ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, kendisiyle çalıştığım için her zaman şanslı hissettiğim, tecrübe ve eşsiz bilgilerini her zaman benimle paylaşan, titiz ve disiplinli çalışmasını örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN’a,

Çalışmalarım süresince bana yol gösterip yardımcı olan, sahip olduğu imkanlarını ve bilgisini her zaman benimle paylaşan, desteğini hiçbir zaman esirgenmeyen, Tez İzleme Komitesi üyesi olan değerli hocam Prof. Dr. Şevki ARSLAN’a;

Yüksek lisans eğitimimden bu yana birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her ihtiyaç duyduğumda desteğini ve imkanlarını benimle paylaşan, Tez İzleme Komitesi üyesi olan saygı değer hocam Doç. Dr. Seher ARSLAN’a;

Doktora savunma sınavı jürisinde bulunan hocalarım Prof. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU ve Doç. Dr. Ebru Şebnem YILMAZ’a;

Laboratuvara ayak bastığım ilk günden itibaren her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarında bugüne kadar çalıştığım tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma;

İyi günümde, kötü günümde hep yanımda olan, en büyük destekçim, varlığıyla huzur bulduğum eşim Salih KART’a;

Ayrıca hayatımın her anında maddi ve manevi yardımlarını eksik etmeyerek beni bugünlere özenle getiren, beni her zaman destekleyen canım aileme, annem Mine BOZBEYOĞLU ve babam Murat BOZBEYOĞLU’na sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi, çeşitli biyokimyasal aktiviteleri içeren ve kalsiyum karbonatın çökmesiyle sonuçlanan biyolojik bir süreçtir. Üreolitik mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen bu süreçte üre ($\text{CO}[\text{NH}_2]_2$) üreaz enzimi etkisiyle ortam pH'ını arttıran amonyum (NH_4^+) ile karbonat (CO_3^{2-}) iyonlarına ayrışır. Oluşan karbonat iyonları, bakteri hücre duvarının negatif yükü nedeniyle hücre duvar yüzeyinde bulunan kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) ile reaksiyona girerek CaCO_3 oluştururlar (Omereg ve diğ., 2019).

Son yıllarda biyoteknoloji ve mühendislik alanlarında yapılan çalışmalarda mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökelişinin çeşitli uygulamalarda artan bir ilgi ile kullanıldığı görülmektedir. Bu kullanım alanlarından bazıları toprak güçlendirilmesi ve stabilizasyonu, beton çatlaklarının düzeltilmesi, kireçtaşı yüzeylerinin restorasyonu, toprak erozyonunun azaltılması, endüstriyel atık suların arıtılması ve ağır metallerin uzaklaştırılmasıdır. Bu alanlara ek olarak üreolitik aktivitesi sayesinde bu tür bakteriler tarım ve sağlık uygulamalarında biyosensör olarak da kullanılabilir. Bununla birlikte, toprakların jeoteknik özelliklerini iyileştirmek için inşaat ve yapı malzemesi olan biyokalsifikasyon ajanını (CaCO_3) üretmek için sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Phang ve diğ., 2018; Jiang ve diğ., 2019; Omereg ve diğ., 2019).

Topraklar uygunsuz mekanik özellikleri nedeniyle birçok bölgede ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bu bölgelere bakıldığında problemin ana nedenlerinden biri zeminlerin şişme göstermesidir. Toprağın içeriğinde bulunan kil, zeminlerdeki şişme probleminin ana nedenidir. Ayrıca bu ince kolloidal parçacıkların mikroorganizmalar için çok yüksek yüzey alanı/hacim oranına ve yüksek afiniteye sahip oldukları bilinmektedir (Demir ve Kılıç, 2010). Mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökelişi yoluyla oluşan CaCO_3 , kil tabakaları arasına giren, topraktaki gözenekleri dolduran ve toprak parçacıklarını bir arada toparlayan mükemmel bir çimento malzemesi niteliğindedir. Bu sayede toprağın geçirgenliğini ve gözenekliliğini azaltarak toprağın kuvvetini artırır (Montoya ve diğ., 2015; Peng ve Liu, 2019). Başta karayolları ve demiryolları gibi çeşitli mühendislik yapılarının

yapılacağı arazide toprağın kohezyon, sürtünme, sertlik ve geçirgenlik gibi mekanik özelliklerini iyileştirir (Harkes ve diğ., 2010; Zhu ve Dittrich, 2016). Sahip olduğu bu özellikler ile gevşek kumu katı kum taşına dönüştürebilmektedir (Chen ve diğ., 2019).

Literatürde pek çok toprak güçlendirme tekniği yer almaktadır ki kimyasal enjeksiyon bunlardan biridir. Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltimi yöntemi bu metodlarla kıyaslandığında pek çok avantaja sahiptir. Bu yöntemde kullanılan bakteriler patojenik değildir ve yeraltı ortamına özgüdür. İşlemin gerçekleşmesi için basit ortam şartlarının (besin ve kalsiyum kaynakları v.b.) sağlanması yeterlidir. Geleneksel mekanik metodlar ve kimyasal yöntemlere göre daha ekonomiktir ve çevre dostu bir teknolojidir. Farklı uygulamalar için de pek çok potansiyel barındırır (Van Paassen ve diğ., 2010; Chen ve diğ., 2019; Peng ve Liu, 2019).

Çok sayıda üreolitik bakteri kalsiyum karbonat çökeltmesini indüklemeye kabiliyetine sahiptir. *Bacillus aerius*, *B. amyloliquefaciens*, *Synechococcus leopoliensis*, *Kocuria flava*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus stabekisii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Myxococcus xanthus*, *Staphylococcus aureus* ve bazı fungus türleri ile halotolerant bakteriler üreaz kapasitesine sahip olup kalsiyum karbonat çökeltmesi yapabildikleri rapor edilen türlere örnek olarak verilebilir (Stocks-Fischer ve diğ., 1999; Hammes ve diğ., 2003; Chen ve diğ., 2009; Achal ve diğ., 2011; Dhami ve diğ., 2013; Gorospe ve diğ., 2013; Li ve diğ., 2013; Achal ve Pan, 2014; Erşan ve diğ., 2015; Bai ve diğ., 2017; Omoregie ve diğ., 2017; Mudgil ve diğ., 2018; Tepe ve diğ., 2019). Her ne kadar mikrobiyolojik karbonat çökeltmesi gerek doğal ortamlarda gerekse laboratuvar koşullarında yoğun bir şekilde araştırılsa da kalsiyum karbonat çökeltimini yapan mikroorganizmanın mikrobiyal ekolojideki presipitasyon mekanizması ve çökeltim işlemi hala anlaşılammıştır. Kültür ortamının bileşimi kristal morfolojisini etkilediği gibi farklı bakteri türlerinin aynı sentetik ortamda karbonat kristallerini farklı miktarlarda, boyutlarda ve tiplerde çökeltme kabiliyeti, karbonat çökeltmesinin türe özgü olduğunu da göstermektedir (Hammes ve diğ., 2003). Bu işlemde bakterilerin gerçek rolleri ve karbonat çökeltimindeki aktiviteleri tam olarak anlaşılammış olsa da bakteri hücre tipinin kalsiyum karbonat çökeltiminde sanıldığından daha büyük bir önemi olduğu düşünülmektedir. Özellikle yerinde iyileştirme çalışmalarında pratik

uygulama potansiyeline sahip çevre dostu ve enerji tasarruflu bir teknik olması, bakteriyel biyoçökeline ilgiyi arttırmaktadır. Kalsiyum karbonat çökeliminde ya *Sporosarcina pasteurii* gibi üreaz enzimi üreten bakteriler ya da *Canavalia ensiformis*'ten saflaştırılan saf üreaz enzimi kullanılır (Fujita ve diğ., 2000; Bachmeier ve diğ., 2002; Ferris ve diğ., 2003; Whiffin ve diğ., 2007; Dupraz ve diğ., 2009; Harkes ve diğ., 2010; Mitchell ve diğ., 2010; Okwadha ve Li, 2010; van Paassen ve diğ., 2010; Lauchnor ve diğ., 2015). Çökelim işleminin hangi yolla yapılacağına karar vermek oldukça zordur. Saf üreaz enzimi ve bakteri arasındaki seçim, aktivite açısından önemlidir. Yüksek üre veya kalsiyum klorür konsantrasyonlarında, bakteriyel çökeline kıyasla enzimatik çökelinin daha fazla miktarda CaCO₃ çökeline neden olduğu görülmekle birlikte (Nemati ve diğ., 2003) çökelim sırasında saf enzimin etkinliği de inhibitörler tarafından engellenebilir (Bachmeier ve diğ., 2002).

Yerel izolatların bu alanda kullanım potansiyellerinin araştırılarak dışa bağımlılığın azaltılması önemlidir. Kalsiyum karbonat çökelim yeteneğine sahip bakterilerin, farklı alanlarda kullanılabilmesi, konuyla ilgili yoğun araştırmalardan da anlaşılmaktadır. Bu çalışmanın da başlıca amacı daha önceki çalışmalarımızdan izole ettiğimiz yerel izolat *Paenibacillus favisporus* U3 ile kontrol suşu *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterilerinin kalsiyum karbonat çökelimini en iyi yaptıkları ortam şartlarını belirlemek, mineralojik analizlerle oluşacak kalsiyum karbonatın yapısını aydınlatmak ve bakteri türü farklılığının etkisi ile yerel suşun sahip olduğu avantajları ortaya koymaktır. Ayrıca üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri ile üreaz protein seviyesini belirleyerek bakteriyel kalsiyum karbonat çökeliimi arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Sunulan çalışmada, yerel izolatımızın ilerde endüstriyel uygulamaların hangi alanı için potansiyele sahip olduğunun ortaya konması amacıyla, kil-bakteri arasındaki etkileşimin de araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kalsiyum Karbonat

Kalsiyum karbonat (CaCO_3), yeryüzündeki en yaygın minerallerden biridir. Aynı zamanda doğada en bol bulunan biyominerallerdir. Prokaryotlar gibi tek hücreli organizmalardan bitkiler veya kabuklular gibi çok hücreli organizmalara kadar değişen canlı organizmalar yoluyla çökelerek doğal taşlar gibi çeşitli maddelerden bazı deniz hayvanlarının kabuklarına kadar çeşitli yapıları oluşturabilir.

Kalsiyum karbonatın farklı formları bulunmaktadır. Bunlar, hekzagonal kristaller olan kalsit, ortorombik kristaller olan aragonit ve rhombohedral kristaller olan vaterittir. Kalsit, aragonit ve vaterit saf kalsiyum karbonat mineralleridir. Her polimorfun oluşumu pH, sıcaklık, konsantrasyon, karbonat ve kalsiyum iyonlarının oranı, katkı maddeleri, karıştırma, reaksiyon süresi vb. sentez faktörlerinden etkilenir (Chang ve diğ., 2017). Ağırlıklı olarak kalsiyum karbonat olan endüstriyel açıdan önemli kaynak kayalar; kireçtaşı, tebeşir, mermer ve travertendir.

Kalsiyum karbonat (CaCO_3), çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılan bir maddedir. Yalnızca kâğıt, plastik, kauçuk, boya ve mürekkeplerde değil, aynı zamanda farmasötik, kozmetik, inşaat malzemeleri ve asfaltilarda dolgu ve pigment malzemesi olarak, hayvansal gıdalarda da besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Tarımda ise asidik toprakların nötrale edilmesinde kullanılan ucuz yöntemlerden biri kalsiyum karbonatın toz halde kullanımınıdır (Mattila ve Zevenhoven, 2014).

Oluşumları birçok organizmanın hayatta kalması için hayati öneme sahiptir ve biyojeokimyasal karbon döngüsü, atmosferik CO_2 azalması ve iklim düzenlemesi dahil olmak üzere bir dizi süreç üzerinde etkisi vardır (Rodriguez-Navarro ve diğ., 2019).

2.2 Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Çökelimi

Mineral çökelimi, biyolojik ya da kimyasal olarak doğada kendi kendine gerçekleşen organik bileşenlerin kendilerini meydana getiren inorganik bileşenlere dönüşmesidir (Yıldırım ve diğ., 2016). Biyoçökelim ise mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen çökelim olayıdır. Biyominerallerin üretiminde üç farklı mekanizma söz konusudur: (1) Biyolojik olarak kontrol edilen mineral çökelimi, özellikle mineral oluşumunu yönlendiren hücrel faaliyetlerden oluşur. Bu süreçte organizmalar, hücre içinde veya dışında belirli bir yerde yalnızca belirli koşullar altında minerallerin çekirdeklenmesini ve büyümesini kontrol eder. (2) Biyolojik olarak etkilenen mineral çökelimi, biyofilmlerle ilişkili hücre dışı polimerik maddeler gibi hücre yüzeyi organik maddelerin varlığında pasif mineral çökmesinin kaynaklandığı bir süreçtir. (3) Biyolojik olarak indüklenen mineral çökelimi, aşırı doygunlukla birlikte minerallerin çökmesiyle sonuçlanan organizmaların metabolik aktiviteleri ile bir ortamın regülasyonunu sağlayan kimyasal bir modifikasyondur ve üreolitik bakteriler tarafından gerçekleştirilir (Anbu ve diğ., 2016; Anitha ve diğ., 2018).

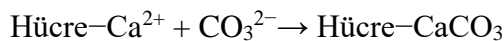
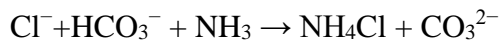
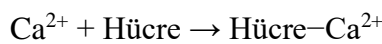
Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelimi çeşitli mikroorganizmalar tarafından toprak, su ve denizel ortamlarda gerçekleşmektedir. Mikrobiyal aktiviteye bağlı olarak 'biyoçimento' da denilen kalsiyum karbonat çökeltileri oluşur. Bu olay mikroorganizmanın türüne bağlı olmak üzere birden çok çeşit yol izleriyle meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Fotosentetik organizmalar olan siyanobakteriler ve alglerde (Örn; *Nostoc calcicola*, *Oscillatoria willei*, *Anabaena cycadae*) fotosentez metabolizması sırasında, sülfat indirgeyen bakterilerin (Örn; *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfobacterium autotrophicum*) sülfat indirgeme metabolizmasında, nitrat indirgeyen bakterilerin (Örn; *Nitromonos spp.*, *Nitrobacter spp.*) denitrifikasyon reaksiyonları sırasında, Miksobakterilerin (Örn; *Myxococcus xanthus*) amonifikasyon reaksiyonları sırasında ve üreolitik bakterilerin (Örn; *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Sporosarcina pasteurii*) üre hidroliz reaksiyonları sırasında gerçekleşmektedir (Dhami ve diğ., 2013; Achal, 2015; Yıldırım ve diğ., 2016; Anitha ve diğ., 2018).

Ekosistemdeki azot döngüsünün en önemli elemanlarından olan nitrat indirgeyen bakteriler biyopresipitasyonda da görev almaktadır. Denitrifikasyon tepkimeleri sırasında oluşan CO₂ ve OH⁻ aşağıdaki tepkimede görüldüğü gibi ortamda bulunan Ca²⁺ iyonlarıyla etkileşerek kalsiyum karbonat mineralinin oluşumuna yol açar (Şekil 2.1C) (Del Rio ve diğ., 2015).



Miksobakteriler ise amonifikasyon yani organik atıkların doğaya geri dönüşümünü gerçekleştiren organizmalardandır. Ekosistem için oldukça önemli olan bu döngü sırasında ortam pH'sını yükselten amonyak oluşmaktadır. Miksobakteriler ürettikleri amonyak ile ortam pH'sının yükseltmesi yönüyle biyoçökelim aktivitesi gösteren diğer bakterilerden ayrılmaktadır. Bu konuda üzerinde en çok çalışma yapılmış miksobakteri türü ise *Myxococcus xanthus*'dur (Al-Thawadi, 2011).

Üreolitik bakteriler ise sahip olduğu üreaz enzimi sayesinde üreyi hidrolize eden organizmalardır. Üre hidrolizi, amonyak ve karbamat (NH₂COOH) oluşumuna neden olur. Karbamat, başka bir amonyak ve karbonik asit molekülü üretmek için kendiliğinden ayrışır. İki amonyak molekülü ve karbonik asit daha sonra protondan arındırılmış ve protonlanmış formlarıyla suda dengelenir, bu da kalsiyumun kristaller şeklinde çökmesine neden olan pH'da bir artışa neden olur. Hücre dışında ise kalsiyum iyon konsantrasyonu yükselirken proton konsantrasyonu düşer. Aynı zamanda yüksek pH HCO₃⁻ ün CO₃²⁻ e dönüşmesini sağlar. Sonuçta oluşan karbonat iyonları hücre dışındaki yüksek konsantrasyondaki Ca²⁺ iyonları ile tepkimeye girerek CaCO₃ çökmesine sebep olur. Hücre yüzeyinde CaCO₃ çökmesi için üre-CaCl₂ ortamındaki biyokimyasal reaksiyonlar şu şekildedir (Hammes ve Vestrate, 2002; Anitha ve diğ., 2018):



Kalsiyum karbonat çökmesinde esas olarak şu faktörler etkindir: (1) kalsiyum konsantrasyonu, (2) çözülmüş inorganik karbon konsantrasyonu, (3) pH ve (4) çekirdeklenme alanlarının varlığı. Bu faktörlere ek olarak, bakteri türü, bakteri hücre konsantrasyonu, sıcaklık, kalsiyum kaynağının türü ve üre konsantrasyonu gibi faktörlerin de etkilediği bildirilmiştir (Anitha ve diğ., 2018).

Biyoçimento oluşumu için üreaz enzimi üreten farklı bakteri türleri bulunmaktadır. Bunlar *Sporosarcina pasteurii* (eski adıyla *Bacillus pasteurii*), *Bacillus sphaericus*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. CR2, *Bacillus thuringiensis*, *Deleya halophila*, *Halmonas eurihalina*, *Kocuria flava* CR1, *Lysinibacillus sphaericus* CH5, *Methylocystis parvum*, *Myxococcus xanthus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas denitrificans*, *Sporolactobacillus* sp., *Sporosarcina ginsengisoli*, *Bacillus pseudifirmus*, *Bacillus copnii*, *Bacillus cereus*, *Shewanella* ve *Microbacterium* sp.. Üreaz enzim aktivitesine sahip olan *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı patojenik bakteriler de klinik olarak “idrar taşları” olarak bilinen kalsiyum karbonat kristallerinin oluşumunda rol oynarlar (Graham, 2000; Altındış ve Özdemir, 2003; Dhama ve diğ., 2013; Sujoy ve Aparna, 2013; Anbu ve diğ., 2016; Xu ve diğ., 2017; Anitha ve diğ., 2018; Chaparro-Acuna ve diğ., 2018; Tepe ve diğ., 2019).

Tüm kalsiyum karbonat çökelim yol izleri kıyaslandığında en yüksek kalsiyum karbonat oluşumunun üre hidrolizi yoluyla üreolitik bakteriler tarafından gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (Van Paassen ve diğ., 2010; Gat ve diğ., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, biyoçimentonun üretiminin daha az enerji gerektirdiği, daha düşük sıcaklık istediği ve daha az sera gazı açığa çıkardığı ortaya konmuştur. Bu avantajlar nedeniyle geniş ilgi görmüş ve geniş bir uygulama alanı meydana gelmiştir. Sahip olduğu uygulama alanlarından bazıları şunlardır; çatlaklarının onarımı, zemin iyileştirme, beton ve tuğlaların dayanıklılığının iyileştirilmesi, ağır metallerin biyoremediyasyonu, tarihi eserlerin ve kalkerli taşların restorasyonudur (Dhama ve diğ., 2013; Kang ve diğ., 2014; Anbu ve diğ., 2016; Sharma ve diğ., 2016; Arias ve diğ., 2017).

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeli üzerine yapılmış literatürde pek çok bilimsel çalışma bulunmaktadır. Bunlardan biri olan Anitha ve ark. (2018) tarafından

yapılan çalışmada üre bakımından zengin çeltik tarlasından izole edilmiş *Bacillus cereus* KLUVAA'un biyoçimento üretimi araştırılmıştır. Biyoçimento üretimi için %10 üre ve kalsiyum kaynağı olarak sertlik derecesi 431,7 mg/L olan musluk suyu içeren ortam kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen biyoçimento miktarının önemsenecek miktarda olduğu araştırmacılarca bildirilmiştir. *Bacillus sphaericus*'un kireç taşları üzerinde, farklı üre ve CaCl₂ konsantrasyonlarındaki etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada ise, yüksek konsantrasyonda üre (20 g/l) ve CaCl₂ (50 g/l) içeren besi ortamında maksimum miktarda kalsiyum karbonat çökeli mi araştırmacılarca gözlenmiştir (Belie ve diğ., 2010). Kalsiyum karbonat çökeli mi üzerinde yapılan literatür taramasında *Sporosarcina pasteurii* üzerine çalışmaların yoğunlaştığı dikkati çekmektedir. Bunun sebebi, *Sporosarcina pasteurii*'nin sahip olduğu yüksek hücre dışı enzim salgılama özelliğidir. *Sporosarcina pasteurii* kullanılarak yapılan çalışmalardan olan Günsür (2018) tarafından yapılmış yüksek lisans tezinde mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeli m yönteminin doğal taş atıklarının geri dönüşümü ya da canlandırılmasında kullanılabileceği ve doğal taşların sahip olduğu dayanıklılık, gözeneklilik gibi özelliklerin bu yöntemle iyileştirilebileceği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 ile *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 bakterilerinin kalsiyum karbonat çökeltme yetenekleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak *S. pasteurii*'nin *B. licheniformis*'den daha başarılı olduğu rapor edilmiştir (Sarıççek, 2016).

2.3 Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Çökeli mini Etkileyen Faktörler

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeli mi biyolojik bir süreç olduğu için pek çok faktörden etkilenmektedir. Bu süreci en fazla etkileyen faktörler çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmal arla belirlenmiştir. Bunların başlıcaları bakteri türü, sıcaklık, pH, inokülasyon oranı, kalsiyum kaynağının türü ve konsantrasyonu, üre yoğunluğudur (De Muynck ve diğ., 2010; Okwadha ve Li, 2010).

2.3.1 Bakteri Türü

Siyanobakterilerden üreolitik bakterilere kadar çok değişik proseslerde görev alan, çok farklı aktiviteler gösteren farklı türlerden organizmalar kalsiyum karbonat üretim kabiliyetine sahiptir. Bu organizmalar sahip oldukları metabolizma, yaşadıkları ekosistem gibi faktörlerden dolayı kalsiyum karbonat üretimleri çeşitlilik göstermektedir. Bu organizmalar içinde en çok verime sahip olanlar üreolitik bakterilerdir. Üreolitik bakteriler üzerine yapılmış araştırmalar incelendiğinde kalsiyum karbonat çökelim aktivitelerinde değişiklikler göze çarpmaktadır. Örneğin; Ryparova ve diğerleri tarafından 2021 yılında gerçekleştirilen çalışmada *Sporosarcina pasteurii*, *Bacillus cohnii* ve *Bacillus pseudofirmus* üreolitik bakterilerinin kalsit presipitasyonları kıyaslanmıştır. Kalsit üretiminde verimli, optimal olmayan şartlarda bile aktivite göstermesi, canlılığının mükemmel düzeyde olması ve yeterli kalsit üretim kapasitesi sayesinde *B. pseudofirmus* en uygun bakteri olarak bulunmuştur. Diğer taraftan bakteriyal kalsiyum karbonat presipitasyonu kullanılarak betonlardaki çatlakların restorasyonu çalışmasında 150 bakteri suşu taranmış ve içlerinden 22 suş presipitasyon göstermiştir. Presipitasyon gösteren bu suşlardan 11 tanesi *Bacillus* sp., 6 tanesi *Pseudomonas* sp. olup diğerleri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Serratia*, *Klebsiella* türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu suşlar arasında en iyi kalsiyum karbonat çökelimi gösteren suşun *B. subtilis* RSE 165 olduğu rapor edilmiştir (Mitra ve diğ., 2021).

2.3.2 Sıcaklık

Sıcaklık tüm kimyasal reaksiyonları etkileyen en önemli parametredir. Özellikle canlı sistemlerde enzimlerin bozunmasına yol açarak yaşamı dahi etkilemektedir. Bu nedenle mikroorganizmalar tarafından yürütülen biyolojik süreç olan kalsiyum karbonatın çökeliminde de çok etkilidir.

Bu süreçte bakteriyal aktivite, bakteriyal gelişim, presipitasyon modeli ve içeriği, çekirdeklenme hızı üzerinde sıcaklığın etkili olduğu belirlenmiştir (Cheng ve diğ., 2014; Cheng ve diğ., 2016; Khodadadi ve Birsal, 2017; Omoregie ve diğ., 2017; Kim ve diğ., 2018; Sun ve diğ., 2018; Sun ve diğ., 2019).

Kim ve diğ. (2018) tarafından üre-CaCl₂ içeren ortamda farklı sıcaklık değerlerinin bakteri gelişimi ve biyoçökelim üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar optimum gelişme ve biyoçökelim etkisinin 30 °C'de gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Sıcaklığın üreaz aktivitesi, bakteri büyümesi, çökeltme hızı üzerindeki etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise *Sporosarcina pasteurii* için 30 °C'ye kadar olan sıcaklık artışıyla doğru orantılı olarak bakteriyel büyüme, üreaz aktivitesi, çökeltme hızı artmıştır (Sun ve diğ., 2018). *S. pasteurii* bakterisi kullanılarak kurumuş nehir yataklarında bulunan killi bir çamur olan lösün mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat presipitasyonu ile katılaştırılması çalışmasında, diğer çalışmalara benzer şekilde 30 °C'de bakteri hücre konsantrasyonunun ve üreaz enzim aktivitesinin 25 ile 35 °C'ye göre önemli düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2021).

Ryparova ve diğ. (2021) yaptığı çalışmada literatürde rastlanan çoğu çalışmadan farklı olarak üreolitik *Bacillus pseudofirmus* bakterisinin 10 °C'de bile kalsiyum karbonat çökeltimi aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir.

2.3.3 pH

Ortamın pH değeri mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltimi için oldukça önemlidir. Çünkü bu süreç yüksek pH gerektirmektedir. Ayrıca gelişme ortamının pH değeri bakterilerin üreaz enzim aktivitesini etkileyebilir. Örneğin, Omoregie ve diğ. (2017) *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 suşunun pH 6,5 değerinde maksimum kalsiyum karbonat çökeltimi aktivitesi gösterdiğini ifade etmişlerdir. Kim ve diğ. (2018) ise yaptıkları çalışmada pH 6,0-10,0 aralığındaki değerleri denemişler ve çökelen kalsiyum karbonat kütlesini göz önünde bulundurarak optimum pH'ı 7,0 olarak keşfetmişlerdir. Ayrıca *Curvibacter lanceolatus* HJ-1 suşu üzerinde yapılmış bir çalışmada ortam pH'ı başlangıçta 7,6 olarak ayarlanmasına rağmen presipitasyon gerçekleşikten sonra yapılan ölçümde pH 9,1 olarak tespit edilmiştir (Yang ve diğ., 2021). *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 ile yapılan bir çalışmada 7 farklı pH değeri (pH 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75 ve 8,0) çalışılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre pH arttıkça bakteriyel hücre konsantrasyonu ile üre hidroliz hızında artış gözlenmiştir (Zehner ve diğ., 2021). *Sporosarcina pasteurii* üzerine yapılmış bir diğer çalışmada, organizmanın hücre yoğunluğu ve üreaz enzim aktivitesindeki

değişimleri belirlemek için ortam pH'sı 7-10 aralığında ayarlanmıştır. Araştırmacıların elde ettikleri verilere göre hücre yoğunluğu ve enzim aktivitesi en yüksek pH 9'da tespit edilmiştir (Liu ve diğ., 2021).

2.3.4 İnokülasyon oranı

Biyoçimento oluşumu ortamdaki üreaz enzim aktivitesine sahip bakteri hücrelerinin oranından etkilenmektedir. Çünkü hücre sayısı ortamdaki enzim miktarı ile direkt orantılıdır.

Al Imran ve diğ. (2018), farklı *Pararhodobacter* sp konsantrasyonları barındıran ortamlardaki çökelen kalsiyum karbonatı dijital bir mikroskop kullanarak incelemiştir. Ortalama kristal partikül hacminin ve zamanın oranı olarak adlandırılan birikme hızının, bakteri konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Martinez ve diğ. (2013) kalsit çökeliminin optimizasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, 7×10^5 hücre/mL bakteri konsantrasyonunun optimum inokülasyon oranı olduğunu bildirmişlerdir. Kantzas ve diğ. (1992) tarafından yapılan bir çalışmada ise içinde kum bulunan kolonlardan farklı hacimlerde üreolitik bakteri eklemişlerdir. Çalışma sonucunda kolondan geçen bakteri oranı arttıkça bakteriyal kalsiyum karbonat çökeliminin artışına bağlı olarak kolonlarda gözenekliliğin ve geçirgenliğin azaldığını tespit etmişlerdir. 2021 yılında yapılan bir çalışmada 1×10^7 ve 1×10^4 (kob/ml) oranında *Bacillus sonorensis* C11 bakterisini içeren ortamların kalsiyum karbonat üretimleri kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgulara göre inokülasyon oranı daha yüksek olan ortamda verimin de daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ali ve Karkush, 2021).

2.3.5 Kalsiyum Kaynağının Türü ve Konsantrasyonu

Üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin aktiviteleri sonucunda hücre dışında CaCO_3 çökeliminin gerçekleşmesi için ortamda kalsiyum iyonlarının belirli konsantrasyonlarda bulunması gerekmektedir. Kalsiyum içeren maddelerde organik ve inorganik olarak ayrılmaktadır. Kalsiyum karbonat çökelişi süreci sonunda açığa

çıkan CaCO_3 miktarı hem kalsiyum kaynağının türüne hem de ortamdaki yoğunluğuna bağlıdır.

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, Achal ve Pan tarafından 2014'te yayımlanan *Bacillus* sp. CR2 bakterisinin mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökelimine kalsiyum kaynaklarının etkisi adlı çalışmada deney ortamına dört farklı kalsiyum kaynağı (kalsiyum klorit, kalsiyum oksit, kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat) eklenmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar en yüksek üreaz aktivitesinin görüldüğü kalsiyum klorit içeren ortamda mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeliminin de maksimum olduğunu bildirmişlerdir. Xu ve diğ. (2014) tarafından yayımlanan çalışmada ise kalsiyum kaynağı türünün biyokimyasal süreç ve CaCO_3 'ün bakteriyel aracılı kalsiyum karbonat çökeliminin kristal formu, boyutu ve morfolojisi üzerinde derin bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, organik bir kalsiyum kaynağı olan kalsiyum glutamat'ın, CaCO_3 çökeltmesi verimini arttırdığını belirtmişlerdir.

2.3.6 Üre konsantrasyonu

Üre, yapısında azot barındıran organik bir bileşiktir. Aynı zamanda üreaz enziminin substratıdır. Bu nedenle ortamdaki miktarı mikrobiyal kalsiyum karbonat presipitasyonunu etkilemektedir.

De Muynck ve diğ. (2010) tarafından yapılan bakteriyel indüklü kalsiyum karbonat çökelimine üre ve kalsiyum dozlarının etkisi adlı çalışmada elde edilen bulgular göstermektedir ki ortamda üre konsantrasyonu arttıkça bakteriyel kalsiyum karbonat çökeli de artmaktadır. Sert su ve üre kullanılarak *Bacillus cereus* KLUVAA biyoçimento üretiminin araştırıldığı çalışmada ise besi ortamına 50 ila 250 ml aralığında değişen farklı hacimlerde üre ilave edilmiş ve en fazla üre içeren ortamda bakterinin biyoçimento üretiminin daha verimli olduğu rapor edilmiştir (Anithe ve diğ., 2018). Naaveed ve diğ. (2020) yaptığı çalışmada da üre konsantrasyonu arttıkça kalsiyum karbonat çökelim aktivitesinin arttığını ortaya konmaktadır. *Bacillus aerius* U2 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterileriyle yaptığımız çalışmada da ortama farklı konsantrasyonlarda üre ilave edilmiş olup bakterilerin 333 mM üre içeren ortamda en yüksek kalsiyum karbonat çökeli gösterdiği tespit edilmiştir (Bozbeyoglu ve diğ., 2020). 2021 yılında Ali ve

Karkush tarafından yapılan ‘Mikrobiyal kalsit çökeltiiler kullanılarak yumuşak killerin çözünmemiş basınç dayanımının iyileştirilmesi’ isimli çalışmada ise *Bacillus sorensina* C11 bakterisinin bulunduğu ortama 0,25, 0,5 ve 1 M üre eklenmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek basınç dayanımının 0,5 M üre içeren ortamda görüldüğü belirtilmiştir.

2.4 Üreaz Enzimi

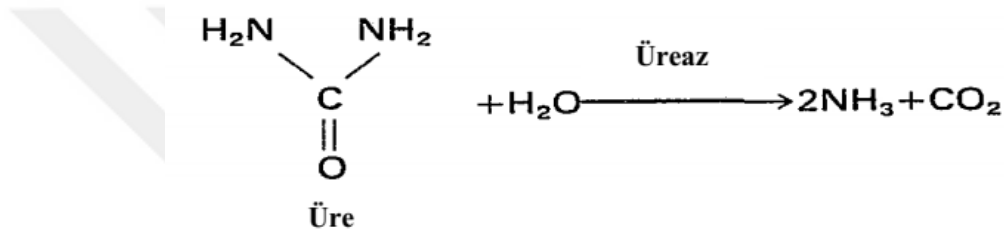
Üreaz enzimi (Üre aminohidrolaz E.C. 3.5.1.5), üreyi hidroliz ederek amonyak ve karbonik asit oluşturan, nikel bağlı, hidrolaz sınıfı bir metaloenzimdir (Türksever Tetiker, 2016).

1926 yılında Sumner tarafından *Canavalia ensiformis* (fasulye) tohumundan kristalize halde saflaştırılmıştır. Böylece ilk kez bir enzim saflaştırılmış ve enzimlerin protein yapıya sahip olduğu kanıtlanmıştır. 1935 yılında ise toprakta da üreaz enziminin bulunduğu tespit edilmiştir (Bakırhan, 2020). Daha sonra yapılan üreaz enziminin yapısını belirleme çalışmaları sayesinde, ilk kez bir enzimin yapısında nikel iyonlarının varlığı saptanmıştır. Aynı zamanda bitkilerde yapısında Ni iyonu bulunan tek enzim üreazdır (Güleşçi,, 2013). Diğer canlılar üzerindeki enzim araştırmaları sonucunda üreaz enziminin başlıca bitkiler, algler, funguslar ve bakteriler tarafından sentezlendiği belirlenmiştir (Moblely ve Hausinger, 1989; Fellbauma ve diğ., 2012; Dev ve diğ., 2015; Chaparro-Acuna ve diğ., 2018).

Üreaz enziminin 3 boyutlu yapısı ilk kez X-ışını kristallografisi yöntemi ile 1930’larda belirlenmiştir (Bakırhan, 2020). Buldukları canlı türüne göre üreaz enzimleri farklı kuarterner yapı gösterirler. Fungus ve bitkilerde bulunan üreaz enzimi 90 kDa büyüklüğünde altüniteli olup homo oligomerik yapıdadırlar. Bakteriyal üreaz enzimleri ise α , β ve γ olmak üzere 2 veya 3 alt ünitelerden oluşan multimerik yapıdadır (Moblely ve diğ., 1995). Bu alt üniteler arasından α alt ünitesinde iki nikel iyonu bulunduran aktif merkezler yer almaktadır. Bu Ni iyonları reaksiyon sırasında farklı görevler üstlenerek enzim aktivasyonunda etkindir. Bu nikel iyonlarından birincisi (Ni1) üreyi bağlayarak (karbonildeki oksijen ile bağlanır) aktifleştirirken, diğeri (Ni2) nükleofilik H₂O molekülünü bağlayarak aktifleştirir (Ciurli ve diğ., 1999; Türksever Tetiker, 2016; Akkaş, 2016).

Ürenin hidrolizi normal şartlarda oldukça yavaş gerçekleşir. Katalizör bulunmayan tepkimeler sonucunda amonyak ve siyanürik asit oluşurken katalizörlü tepkimeler sonucunda amonyak ve karbonik asit açığa çıkar. Katalizör varlığında gerçekleşen reaksiyonların son basamağında karbonik asit kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyağa dönüşür (Blakeley ve Zerner, 1984; Bakırhan, 2020).

Üreazın asıl görevi, üreyi hidroliz etmektir (Şekil 2.2). Ürenin hidrolizi sonucunda amonyak ve karbondioksit açığa çıkar ve böylece canlılar tarafından azot kaynağı olarak kullanılır.



Şekil 2.2: Üreaz enzimi ile üre hidroliz reaksiyonu

Literatürde bitkilerde üreaz enzimine en çok baklagillerde rastlanmaktadır. Bunlar arasında üreaz enzimi en çok çalışılan tür *Canavalia ensiformis* (jack fasulyesi) dir. Bu bitki topraktaki azotun yetersiz olduğu zamanlarda arjinin aminoasidinden oluşan üreyi sahip olduğu üreaz sayesinde amonyağa dönüştürerek azot ihtiyacını karşılar (Follmer ve diğ., 2004; Türksever Tetiker 2016). Bitkilerin azot ihtiyacını karşılamalarını sağlamak dışında yapılan çalışmalarla bitkisel üreazların insektisidal ve antifungal etkileri de saptanmıştır (Follmer ve diğ., 2004; Becker-Ritt ve diğ., 2007; Türksever Tetiker 2016).

Funguslarda da üreaz enzimine sahip pek çok cins vardır. Bunların başlıcaları; *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*'dur. Bunlardan *Cryptococcus* cinsine ait *C.neoformans* ve *C. imitidis* sahip olduğu üreaz enzimi sayesinde patojenite gösterir. Bu organizmalar kolonize oldukları konak dokusunda üreaz enzimleri sayesinde kendileri için alkali bir ortam oluştururlar. Bunun sonucunda konakta apse oluşumu gözlenir (Cox ve diğ., 2000; Mirbod ve diğ., 2002). *Aspergillus* sp. gibi diğer fungus cinsleri ise üreaz aktiviteleri

ile ekosistemdeki azot döngüsüne katkı sağlamaktadırlar (Mackay ve diğ., 1982; Fellbauma ve diğ., 2012).

Bakteriyal üreazlar kompleks subünitelerin trimer/hekzamerlerinden oluşur. Üreolitik organizmaların çoğu insan ve hayvan patojeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Üreaz pozitif patojenlerin en önemlileri *Helicobacter pylori*, bazı enterik bakteriler (Örn; *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morgani*), *Corynebacterium urelyticum*, *Yersinia enterocolitica*'dir (Altındış ve Özdemir, 2003; Olivera ve diğ., 2006). Bu organizmalardan *Proteus mirabilis* sahip olduğu yüksek üreaz aktivitesi sayesinde konukçudaki üreyi hidrolize ederek sağlamış olduğu alkali ortamda yaşamını sürdürür ve idrar yolu enfeksiyonları, hastane enfeksiyonları, apseler ve kan dolaşımı enfeksiyonuna sebep olur (Salih ve diğ., 2014). *Helicobacter pylori* ise düşük pH'ya sahip mide öz suyunu geçerek mide mukus tabakasına yerleşebilmek için sahip olduğu üreaz ile pH artışına yol açar. Değişen pH gastrin hormonunun salgılanmasını uyarak asit salınımında artış gerçekleşir. Bir süre sonra ortamdaki bu asitlik gastrit ve ülser oluşumunu tetikler (Graham, 2000).

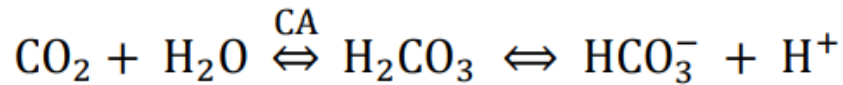
Mikroorganizmalarda gerçekleşen ürenin üreaz enzimi ile hidrolizinde ise öncelikle karbamat (NH_2COOH) ve amonyak (NH_3) molekülleri oluşur. Daha sonra karbamat molekülü ayrışarak amonyak ve karbonik asit (H_2CO_3) meydana gelir. Sonuçta ortamda var olan iki amonyak ve karbonik asit molekülleri suda H^+ giderilmiş (HCO_3^-) ve H^+ lanmış (NH_4^+) formlarıyla dengelenerek hücrenin pH'ında artış gerçekleştirir (Hammes ve Vestrate, 2002; Anitha ve diğ., 2018).

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi üzerinde üreaz enziminin etkisinin araştırıldığı çalışmalar zamanla artmaktadır. Bu alanda son yıllarda yapılmış çalışmalardan biri Dhami ve diğ. (2014) tarafından gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma türü olarak *Bacillus megaterium*'un kullanıldığı bu çalışmada kalsiyum karbonat çökelişinin bakteri kültüründe ham enzim solüsyonlarına göre daha hızlı gerçekleştiği ve üreaz enziminin çökelim sürecini destekleyen alkali pH'nın korunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir. Azarno (2013) tarafından mikrobiyal biyoçimento üretimine yönelik üreaz enziminin optimizasyonu isimli çalışmada ise *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. ve *Klebsiella oxytoca* türleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, *Streptomyces* izolatlarından üçünün yüksek üreaz

aktivitesiyle tanınan *Bacillus* sp. ve *K. oxytoca* bakterilerinden daha fazla üreaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir. *Bacillus* ve *K. oxytoca* bakterilerinde gözlenen bu düşük üreaz aktivitesinin sebebi olarak örneklerin toplandığı yerlerin farklılığı olabileceği söylenmiştir.

2.5 Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (KA, Karbonat dehidrataz ya da Karbonat hidrolizaz, EC 4.2.1.1), Zn^{2+} iyonu içeren bir metaloenzimdir. Saf olarak eldesi ilk kez memeli eritrositlerinden gerçekleştirilmiştir. Hayvanlarda, alglerde, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. Genellikle canlı hücrelerde sitoplazmada çözülmüş olarak ya da hücre membranına bağlı olarak yer alır. Yapılan çalışmalarla 16 farklı izoenzimi olduğu tespit edilmiştir. CO_2 'nin geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eder (Şekil 2.3). Bütün KA izoenzimleri dört basamaklı bir mekanizma ile bu reaksiyonu gerçekleştirmektedir. Birinci basamakta su molekülündeki oksijen Zn^{2+} 'ya bağlanır. İkinci basamakta H^+ iyonu ayrılarak CO_2 'e bağlanır. Üçüncü basamakta ise CO_2 'deki bir oksijen atomu Zn^{2+} 'ya zayıf olarak bağlanır ve son olarak oluşan yapıdan bikarbonat ayrılır. Böylece aktif bölge tekrar oluşur (Fersht, 1985).



Şekil 2.3: CO_2 'nin geri dönüşümlü hidrasyon reaksiyonu (CA: karbonik anhidraz)

KA enzimi genetik olarak yedi gruba ayrılır. Bunlar; α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η - ve θ -karbonik anhidraz olarak isimlendirilir. Bunlar farklı katlanmalara ve yapıya sahip olmalarına rağmen aynı CO_2 hidrataz aktivitesi gösterirler (Capasso ve diğ., 2015; Supuran ve Capasso, 2017).

KA enziminin canlılarda pek çok görevi bulunmaktadır. Bunlar; asit-baz dengesi, sindirim, iyon değişimi, glukoneogenez, kemik gelişimi, vücut sıvısı stabilizasyonu, kalsiyum karbonat oluşumu, lipid sentezi, üre döngüsü, bikarbonat

oluşumu gibi pek çok fizyolojik olaydır. Asit baz dengesini sağlamak için solunum atığı olan CO₂'yi önce karbonik aside, sonra bikarbonata çevirir. Midede, bağırsakta ve böbreklerde bikarbonat oluşumunu sağlayarak pH dengesinin sürmesini sağlamaktadır. Bitkilerde ise fotosentezde kullanılması için CO₂ gazının bikarbonata dönüşümünü sağlar.

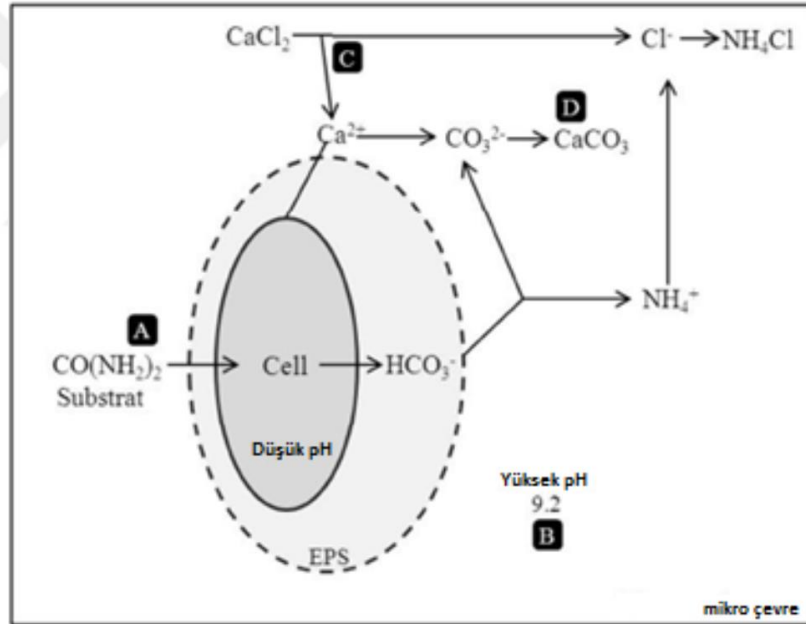
Bitkisel KA 1939 yılında ilk kez tespit edilmiştir. Bütün yeşil bitkilerde bulunmaktadır. Monokotillerde tek polipeptid zincirliken, dikotillerde oligomerik yapıya sahiptir. C3 bitkilerinde kloroplastlarda bulunan KA enzimi, C4 bitkilerinde mesofillerin sitosolünde bulunmaktadır (Yeşilyaprak, 2004).

KA enzimi çeşitli bakteri türlerinde yaygındır. Bakteriyel KA enzimi ilk kez 1963 yılında *Neisseria* ve *Streptococcus* türlerinde tespit edilmiştir (Veitch ve Blankenship, 1963; Supuran ve Capasso, 2017). Bu enzim, bulunduğu bakterinin gelişimini etkiler ve onları enfekte ettiği konakçının savunma sistemine karşı savunmasız kılar (Ozensoy Guler ve diğ., 2016; Supuran ve Capasso, 2017). Aynı zamanda diğer canlı türlerinde olduğu gibi bakterilerde de pH homeostasi, elektrolitlerin salınımı, biyosentez süreçleri ve fotosentezde görevlidir. Ayrıca KA enzimi, sülfonamidler gibi antibakteriyel ajanların hedef molekülü olarak enfeksiyonla mücadelede karşımıza çıkmaktadır (Nishimori ve diğ., 2008; Morishita ve diğ., 2008).

Bakteriyel KA, genetik olarak α -, β - ve γ - KA'ları sınıfındadır (Capasso ve diğ., 2015; Supuran ve Capasso, 2017). Bunlardan α -, β -KA'lar katalitik metal olarak Zn(II) iyonunu kullanırken, γ - KA'lar Fe(II) kullanılır. γ - KA'lar aynı zamanda bağlı Zn(II) ya da Co(II) iyonlarıyla da aktiftir. Bazı türler sadece bir KA sınıfını kodlarken bazılarında 2-3 farklı genetik aileden KA kodlanmaktadır (Supuran, 2008; Supuran ve Capasso, 2017).

KA, CaCO₃ çökeliminde önemli rol oynamaktadır. Katalizlediği reaksiyon (CO₂ + H₂O ↔ HCO₃⁻ + H⁺) kalsiyum karbonat çökelimi ve çözünmesi için hız belirleyicidir. Orta/yüksek derecede alkali pH'ta, ortaya çıkan bikarbonat iyonları kolayca karbonat iyonları oluşturacak şekilde protonlaşır. Bu, kalsiyum iyonlarının varlığında, yeterince yüksek bir süper doyum oluşumuna ve buna bağlı olarak hızlı kalsiyum karbonat çökmesine sebep olur (Müller ve diğ., 2013;

Rodriguez-Navarro ve diğ., 2019). Bu alanda yapılmış histokimyasal boyama ve KA aktivite analizleri, hem hücrel hem de hücre dışı α -KA'ların CaCO_3 çökeliminde rol oynadığını göstermiştir (Bertucci ve diğ., 2013; Karakostis ve diğ., 2016). Ayrıca α -KA'lar üzerinde yapılan proteomik analizlerle, KA sınıfının çeşitli organizmaların (Örn; ekinodermiler, mercanlar, kalkerli süngerler, kuş yumurta kabukları v.b.) biyominerallerle ilgili matris proteinleri arasında olduğu kanıtlanmıştır (Mann ve diğ., 2006; Rahman ve diğ., 2008; Perfetto ve diğ., 2017). Bunların dışında α -KA sınıfından özellikle α -KA(II) ailesi kalsiyum karbonat çökeliminde karbon sekestrasyonu sırasında CO_2 yakalama ve depolama kinetiğinin hızlanmasını sağlamaktadır (Rodriguez-Navarro ve diğ., 2019). Ancak bunca araştırmaya ve ipucuna rağmen KA'nın kalsiyum karbonat çökelimindeki kesin rolü bilinmemekle birlikte bu süreçte üreaz enzimiyle birlikte görev aldığı ifade edilmektedir (Şekil 2.4) (Gonsalves, 2011; Bertucci ve diğ., 2013; Rodriguez-Navarro ve diğ., 2019).



Şekil 2.4: Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelimi ve etkili olan faktörler (A: Üreazın katalizlediği üre hidrolizi, B: Ortam pH'nın artması, C: Hücre yüzeyine Ca^{2+} iyonlarının absorpsiyonu, D: Kalsiyum karbonat oluşumu ve çekirdekleşme) (Gonsalves, 2011)

Literatürde karbonik anhidraz enziminin biyoçimento oluşumu üzerinde etkisinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan biri *Bacillus megaterium* üzerine yapılmış olan çalışmadır. Bu çalışmada kalsiyum karbonat presipitasyonunun bakteri içeren ortamda bakterinin bulunmadığı ham enzim bulunan ortamlara göre

daha hızlı gerçekleştiği ve karbonik anhidraz enziminin bu süreçte karbondioksiti bikarbonata hidratlanmasıyla rol aldığı belirtilmiştir (Dhami ve diğ., 2014). Rodriguez-Navarro ve diğ. (2019) ise kalsiyum karbonat çökeliminde karbonik anhidrazın çoklu rollerini araştırmış ve karbonik anhidrazın kalsiyum karbonat çökeli için gerekli olan reaktif öncülerin (yani, HCO_3^- ve CO_3^{2-} iyonları) oluşumunu katalize ettiği, yarı kararlı amorf kalsiyum karbonatların çökmesini ve bunların çözelti aracılı kristalin kalsite dönüşümünü hızlandırdığını ifade etmişlerdir.

2.6 Bakteri-Kil Etkileşimi

Kil, uygun su içeriği nedeniyle elastik olan ve pişirilerek ya da kurutularak sertleşen öncelikle ince tane boyutlu ($<2 \mu\text{m}$ ya da $<4 \mu\text{m}$) minerallerden oluşan doğal bir malzemedir. Bu ince kolloidal parçacıklar mikroorganizmalar için çok yüksek yüzey alanı/hacim oranına ve yüksek afiniteye sahiptirler. Bu nedenle mikroorganizmalar, su ve iyonlarca zengin kil yüzeyinin yakınında veya birlikte durma eğilimindedirler. Bakteriler ve killer arasındaki bu etkileşimlerin bakterilerin ekolojik yayılımı, biyofilm oluşumu, biyoçökelim, mineral aşınma ve kirleticilerin biyodegradasyonu üzerinde etkileri vardır (Bergaya ve diğ., 2006; Tazaki, 2006).

Killer ve bakteriler arasındaki ilişkiyi açıklamak üzere çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen çok azı zemin iyileştirme ile ilişkisini de açıklamaktadır. Bu doğrultudaki çalışmalardan ilki Müller ve Defago (2006) tarafından aerobik bir bakteri olan *Pseudomonas fluorescens* sıvı kültürü ile vermikülit çamuru üzerinde yaptıkları çalışmadır. Araştırmacılar karışımın kimyasal, mineralojik ve mekanik özelliklerinde olumlu değişimler olduğunu rapor etmişlerdir. Sadjadi ve diğ. (2014) tarafından gerçekleştirilmiş çalışmada ise mikrobiyal kalsit oluşumunun şişen zeminler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar belirli oranlarda karıştırdıkları ince kum, kaolin ve bentonit içeren karışımı farklı sürelerde *B. sphaericus* ve kalsiyum klorid içeren sıvı içinde bekleterek şişme potansiyellerini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak bakteri oranı ve uygulama süresinin artmasıyla zeminin şişme potansiyelinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Literatürde yukarıda bahsedildiği gibi bakteri-kil arasında pozitif ilişki varken aynı zamanda killerin bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitelerinin de olduğu

görülmektedir. Örneğin; Williams ve Haydel tarafından 2010 yılında yapılan araştırmada smektit (Na-montmorillonit) içeren Fransız yeşil kili gibi geleneksel olarak da kullanılan killerin antibakteriyal etki gösterdikleri belirtilmiştir. Literatürde bu konuda yapılmış diğer çalışmalarda da killerin antibakteriyal etkisi olduğu tekrarlanmış olup antibiyotik dirençliliği yüksek olan patojen bakterilerde dahi etkili olduğu vurgulanmıştır (Haydel ve diğ., 2008; Zarate-Reyes ve diğ., 2017).

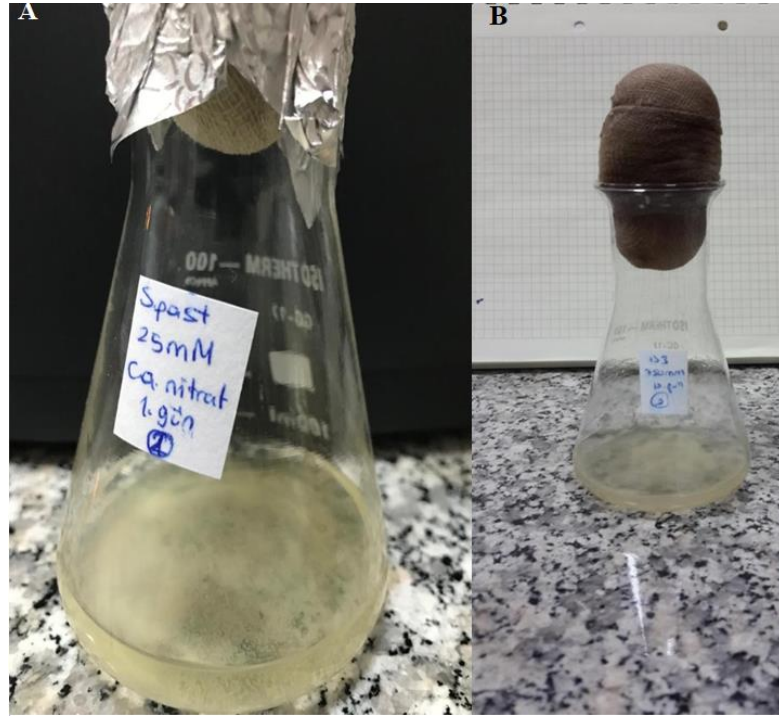


3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Organizmalar

Çalışmamızda TÜBİTAK 113Y568 nolu proje kapsamında kalsiyum karbonat bakımından zengin topraklar içeren Denizli-İsrafil deresi bölgesinden izole edilmiş *Paenibacillus favisporus* U3 ile Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan temin edilen *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 suşları kullanılmıştır. Her iki bakteri suşu da Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı bakteri stoklarından temin edilmiştir.

Gr (+) olan her iki bakteri türü de çubuk formunda ve endospor oluşturabilen üreaz pozitif toprak bakterileridir. Organizmalar sahip oldukları üreaz enzim aktivitesi sayesinde kalsiyum karbonat çökelişi gerçekleştirmektedirler. *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 kalsiyum karbonat çökelişi için model organizma olarak gösterilebilirken, *Paenibacillus favisporus* U3 yerel izolattır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan üreolitik organizmaların kültür ortamındaki görüntüleri (A: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453, B: *Paenibacillus favisporus* U3)

3.2 Kalsiyum Karbonat Çökeli mi

Paenibacillus favisporus U3 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 suşları tarafından üretilen kalsiyum karbonat miktarı APHA (1989) tarafından bildirilen EDTA titrimetrik yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu yönteme göre, farklı sürelerde (5, 7, 10, 14 gün) geliştirilen bakteri kültürlerinden 25 ml alınmış ve pH metre (WTW marka, İmolab pH 720) kullanılarak tampon çözelti ile pH 10,00'a ayarlanmıştır. pH'sı 10,00 olan ortamın rengini pembeye döndürecek olan indikatör madde Mordant Black 11 Triturate (VWR Chemicals) eklenmiştir. Daha sonra ortam rengi pembeden maviye dönünceye kadar standart EDTA çözeltisi ile titrasyon yapılmıştır (çözeltiler için; bkz. Ekler). Harcanan EDTA miktarı kullanılarak kalsiyum karbonat miktarı şu formülle hesaplanmıştır:

$$\text{mg CaCO}_3 = (V1.M.1000)/V2$$

V1: Harcanan EDTA

M: 1 ml EDTA= 0,96 mg CaCO₃

V2: Alınan numune miktarı (ml)

3.3 Kalsiyum Karbonat Çökeli minin Optimal Şartlarının Belirlenmesi

Başlangıç pH, üre konsantrasyonu, sıcaklık ve farklı kalsiyum kaynaklarının (CaCl₂ (Isolab, 909.023), Ca-laktat (Merck, 1021030250), Ca-nitrat (Merck, 1021210500)) kalsiyum karbonat üretimine etkisi araştırılmıştır (Tablo 3.1). Kalsiyum karbonat çökeli mi için Ferris ve diğ. (1996) tarafından geliştirilen Kalsiyum Mineralizasyon Ortamı (KMO) (içeriği için; bkz. EKLER) kullanılmıştır. Yüksek sıcaklıkta bozulmasını önlenmek amacıyla üre, 0,22 µm por çaplı disposable filtre (ISOLAB, 094.07.002) ile sterilize edilerek çözeltili ye eklenmiştir. Bütün şartlar inkübasyonun 5., 7., 10. ve 14. günleri için iki tekrarlı deney setleri şeklinde hazırlanmıştır. Hücre gelişimi cfu/ml olarak takip edilmiştir.

Tablo 3.1: Kalsiyum karbonat çökeliminde kullanılan parametreler

Parametre Adı	Koşullar
pH	6,5
Üre Konsantrasyonu (mM)	25, 50, 100
Sıcaklık (t°C)	37
CaCl₂ Konsantrasyonu (mM)	25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000
Ca-laktat Konsantrasyonu (mM)	25, 50, 75, 100, 250
Ca-nitrat Konsantrasyonu (mM)	25, 50, 100
İnkübasyon Süresi (gün)	5, 7, 10, 14
İnokülasyon Oranı (%)	5, 7,5, 10, 15, 20

3.4 Bakteriyal Kalsiyum Karbonatın Kurutulması ve Saklanması

Farklı ortamlarda inkübasyon sonucunda elde edilen bakteriyal kalsiyum karbonat çökeltisi, Telstar marka LyoQuest Freeze-Dryer model liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Kurutulan çökelti daha sonra analizlerde kullanılmak üzere -80 °C’de derin donduruda (Nüve marka DF 490) saklanmıştır.

3.5 Amonyak Miktarının Belirlenmesi

Bakteriyal kalsiyum karbonat çökeliminin ilk reaksiyonlarından biri de amonyak oluşumudur. Ortamda oluşan amonyak azotu miktarını belirlemek için Nesslerizasyon yöntemi ile amonyak tayini yapılmıştır (Standard Methods, 2017). Bu yöntemde besiyerinde geliştirilen bakteri kültürleri 6000 rpm 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan supernatanttan 25 ml alınarak pH 7,0’e ayarlanmıştır. Daha sonra Hach-Nessler kiti (Hach, 2458200) ile amonyum tayini yapılmıştır. Sonuçlar Hach-Lange marka DR 500 model UV-spektrofotometrede 380 N programında okunmuştur. Amonyak azotu miktarı mg/L cinsinden kaydedilmiştir.

3.6 Enzim Analizleri

3.6.1 Üreaz ve Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Varlığının Belirlenmesi

P. favisporus U3'ün üreaz enzim aktivitesine sahip olup olmadığını belirlemek için, Christensen (1946) tarafından geliştirilen üre agar besiyeri (içerik için; bkz. Ekler) kullanılmıştır. Bakteri üre agara inoküle edildikten sonra plakalar 24-48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Besiyerinde turuncudan pembeye doğru gerçekleşen renk değişimi üreolitik aktivitenin varlığını göstermektedir.

U3'ün karbonik anhidraz enzim aktivitesinin tespiti ise Ramanan ve diğ. (2009) tarafından geliştirilen metotla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta; Triptik soy agara (TSA) (içerik için; bkz. Ekler) bakteriler ekilmiştir (24-48 saat, 37 °C). İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerin üzerlerine 10 mM *p*-nitrofenil asetat (*p*-NPA) (Sigma, N8130) çözeltisi spreyleneştir. *p*-NPA'nın *p*-nitrofenol ve asetata ayrışması ve dolayısıyla karbonik anhidraz enzim aktivitesinin varlığı, şeffaf *p*-NPA'nın sarı renge dönmesi ile gözlenmiştir.

3.6.2 Bakteriyal Enzim Karışımlarının Hazırlanması

P. favisporus U3 ve *S. pasteurii* ATCC 6453, KMO ve Luria-Bertani+üre (LB+üre) besiyerinde (içerik için; bkz. Ekler) 37 ve 30 °C'de 12-18 saat çalkalamalı inkübatörde (Zhicheng Marka ZHWY-111B model) geliştirilmiştir. Süre sonunda santrifüj ile (6000 rpm, 20 dk) toplanan pelet, 2 mL liziz tamponu (1 mM Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF proteaz inhibitörü) (Sigma, P7626), 1 mM ϵ -Aminokaproik asit (ϵ -ACA-Sigma, A2504) içeren potasyum fosfat tampon) içinde buz üzerinde Bandelin marka UW 2070 model ultra sonikatör ile sonike edilmiştir (120 saniye-5 tekrar). Elde edilen enzimler ependorf içerisinde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.3 Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Enzim ekstraktının toplam protein konsantrasyonu Lowry ve diğ. (1951) tarafından geliştirilen metot ile belirlenmiştir. Sığır Serum Albümini (BSA-Sigma, A9647) standart protein olarak kullanılmıştır. Bu metotta alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu^{+1} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein aminoasitleri Folin-Ciocalteu fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu çalışmada 2,5 kat yarılanmış Lowry metodu (25 kat orijinal seyreltme faktörü, 1, 2 ve 4 kat tüp içi seyreltme) 0,02-0,20 mg/L BSA standartları kullanılarak uygulanmıştır. 0,2 ml protein örneklerine 1 ml bazik bakır çözeltisi ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 0,1 ml Lowry reaktifi eklenerek 10 dk 50°C'de etüvde bekletilmiştir. Toplam protein miktarı 660 nm'de spektrofotometrik ölçümün ardından BSA standart kalibrasyon eğrisi yardımı ile hesaplanmıştır (çözeltiler için; bkz. Ekler).

3.6.4 Üreaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Üreaz aktivitesini belirlemek için Weatherburn (1967) tarafından bildirilmiş ve Smith ve diğ. (1993) tarafından modifiye edilmiş fenol-hipoklorit yöntemi kullanılmıştır. Bu yönteme göre; 500 µl potasyum fosfat tamponu (100 mM, pH 8,0), 500 µl üre çözeltisi (50 mM) ve 100 µl sonike edilmiş bakteri hücresi içeren örnek karıştırılarak son hacmi 1100 µl olan reaksiyon karışımı elde edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı 37°C'de 30 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda reaksiyon karışımından 50 µl alınarak 500 µl fenol-sodyum nitroprussit çözeltisi içeren tüpe eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen çözeltiliye 500 µl alkali hipoklorit çözeltisi (Sigma, A1727) eklenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen reaksiyon karışımı 630 nm'de spektrofotometrede (Hach-Lange, DR500) köre (içeriği; 500 µl fenol-sodyum nitroprussit çözeltisi, 500 µl sodyum hipoklorit çözeltisi, 50 µl potasyum fosfat

tamponu) karşı okunmuştur. Enzim aktivitesi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, 1.01211) ile oluşturulan standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar 1 dakikada üreden açığa çıkan 1 mg NH_3 oluşturan enzim miktarı ölçülerek üreaz enzim aktivitesi tanımlanmıştır (çözeltiler için; bkz. Ekler).

3.6.5 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz enzim aktivitesini belirlemek için Armstrong ve diğ. (1966) tarafından belirlenmiş metod laboratuvarımızda modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemde ilk olarak 100 µl bakteriyal enzim, 800 µl Tris tamponu ve 100 µl 4-nitrofenil asetat (p-NPA) (Sigma, N8130) içeren reaksiyon karışımı buz üzerine oturtulmuş quartz spektrofotometre küveti içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı 412 nm’de 5 dk boyunca 30 sn aralıklarla UV-spektrofotometrede (Hach-Lange, DR500) kinetik olarak okunmuştur. Elde edilen absorbanslardan enzim aktivitesini hesaplamak için 4-nitrofenol (p-NP) ile hazırlanmış standart eğri kullanılmıştır (çözeltiler için; bkz. Ekler).

3.6.6 Üreaz Protein Seviyesinin Belirlenmesi

Üreaz enziminin protein seviyesi western blot tekniği ile saptanmıştır. Öncelikle ultrasonikatör ile parçalanarak elde edilmiş bakteri homojenatından alınmış ve 4X SDB (sample dilution buffer) ile hazırlanmış proteinler SDS-Poliakrilamit Jel Elektforez (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrıştırılmış ve protein profilleri elde edilmiştir (Laemmli, 1970). Poliakrilamit jel elektforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma L3711) içeren kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır (Tablo 3.2). Poliakrilamit tabaka jellerinin hazırlanması omniPAGE mini vertical electrophoresis&High intensity blotting (BCVS10CBS-HI) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektforetik ayrıştırma 1X Koşurma Tamponu içinde Major Science marka MP-300V model güç kaynağına bağlanılarak ayırma jelinde 10 mA’de 100 V ve sıkıştırma jelinde 20 mA’de 200 V akımla yapılmıştır. Yol gösterici boya (Thermo Scientific, PageRuler Prestained Protein Ladder-26616), jel tabanına

ulaştığında güç kaynağı kapatılmış ve jel bloğu aparattan alınarak jel sandviçten ayrılmıştır. Elektroforez sonrasında jel, transfer tamponu içerisinde 10 dakika boyunca sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır (Khyse-Anderson, 1984; Tovey ve Baldo, 1987).

Tablo 3.2: SDS-PAGE Ayrıştırma ve yükleme jeli

Ayrırma Jeli (%8,5)		Sıkıştırma Jeli (%4)	
dH₂O	4,5 ml	dH₂O	2,5 ml
Jel çözeltisi	2,85 ml	Jel çözeltisi	750 µl
Ayrıştırma tamponu	2,5 ml	Yükleme tamponu	1,25 ml
%10 SDS	150 µl	%10 SDS	100 µl
APS	50 µl	APS	25 µl
TEMED	6,5 µl	TEMED	5 µl
Toplam hacim 10 ml		Toplam hacim 5 ml	

Elektroforetik transfer BIO-RAD Trans Blot kullanılarak ıslak transfer yöntemi ile yapılmıştır. BIO-RAD Trans Blot'ın kasetinin katot kısmı alta gelecek şekilde sırasıyla soğuk transfer tamponu ile ıslatılmış sünger, kaba filtre kağıdı ve Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirilip kalabilecek hava kabarcıkları giderilmiştir. Whatman # 1 üzerine yerleştirilen jelin üzerine nitroselüloz membran dikkatlice yerleştirilmiştir. Membran üzerine tekrar transfer tamponu ıslatılmış Whatman # 1 kağıdı, kaba filtre kağıdı ve sünger konularak sistem kapatılmış ve sandviç hazırlanmıştır. Major Science MP-300V model güç kaynağına bağlanıp voltaj 90 V'a ve maksimum akım limiti 400 mA'e ayarlanarak +4 °C'de buzdolabında 90 dakika süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edilmiştir. Süre sonunda transfer edilmiş proteinleri barındıran membran 'Blot' elde edilmiştir. Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirilip nonspesifik bağlanmaları önlemek için 45 dakika süreyle +4 °C'de bloke çözeltisi ile çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Süre sonunda blot önce %5'lik süt tozu içeren Tris Buffer Saline (TBS) çözeltisinde hazırlanan primer antikorda (Rb pAb to *Helicobacter pylori* urease B- ab127916) 1 gece boyunca +4 °C'de orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 15 dakika boyunca Tris Buffer Saline Tween 20 (TBST) çözeltisinde 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra işaretleyici

enzim alkali fosfataz (ALP) ile bağlı olan ikincil antikorla (anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) 1 saat boyunca +4 °C'de inkübe edildikten sonra blot, TBST solüsyonunda her biri 15 dakika olmak üzere 3 defa yıkanmıştır. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinleri belirlemek için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan ALP substrat çözeltisi ile karanlıkta inkübe edilmiştir. Görüntü elde edildikten sonra blot havada kurutulup alüminyum folyo ile kaplanarak saklanmıştır (çözeltiler için; bkz. Ekler).

3.7 Mineralojik Analizleri

3.7.1 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Bakteriyel kalsiyum karbonatların yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ile kimyasal özellikleri ise Enerji Dispersiyon X-ışınları Analizi (SEM-EDX) ile incelenmiştir. FESEM-EDX analizi ZEISS marka Supra 40 VP model taramalı elektron mikroskobu ile PAÜ-İLTAM Elektron Mikroskobu Biriminde hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Yine SEM ile entegre halde olan Elektron Probu Mikro Analizörü (EPMA) ile mineral tipi analiz edilmiştir. Bu analiz için YEBİM'de (Ankara Üniversitesi Yerbilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi) tüm örnekler Quorum marka Q150T ES model kaplama cihazı ile karbon kaplanmış ve JEOL JXA-8230 SuperProbe ile analiz edilmiştir.

3.7.2 X-Işınları Kırınımı (XRD) ve Fluoresansı (XRF) Analizleri

XRD yardımıyla bakteriler tarafından üretilen kristalin CaCO₃ (örneğin: kalsit, aragonit, vaterit) oluşumları ve XRF ile elemental yapısı belirlenmiştir. XRD analizleri için Inel Equinox 1000 difraktometre ve XRF analizleri için de Spectro XLAB2000 spektrometre kullanılmıştır. Analizler Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Yer Bilimleri Araştırma Merkezi'nde (YEBİM) ve PAÜ-İLTAM'da yapılmıştır.

3.7.3 Konfokal Raman Spektrometresi

Raman saçılması kristal halindeki bir yapının karakterizasyonu için kullanılabilir. Bu cihaz ile prensip olarak sulu çözeltiler, tek kristaller ve/veya polimerler incelenebilir. Konfokal RAMAN Spektrofotometresi analizleri Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Yer Bilimleri Araştırma Merkezi'nde (YEBİM) Thermo-Fisher marka DXR model Raman spektrometre kullanılmıştır. Bu spektrometrede hava soğutmalı Argon lazeri 780 nm eksitasyona sahiptir. Raman spektrumları 100-1200 cm^{-1} aralığında kaydedilmiştir

3.8 Kil-Bakteri Etkileşimi

Kil ile bakteriler arasındaki etkileşimi belirleyebilmek için öncelikle kilin (montmorillonit) Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir. Bunun için ortama 0,25, 0,5, 1,0, ve 2,0 g/L oranında bentonit kili (montmorillonit) eklenmiş ve koloni sayımı yapılarak gelişim takip edilmiştir

3.9 İstatistiksel Analiz

Kalsiyum karbonat çökelimi, amonyum miktarı ve enzim aktivitesi analizlerinin sonuçları SPSS paket istatistik programı (TEAM EQX SPSS Statistics Version 16.0, 2007) kullanılarak varyans analizi yapılmıştır. Değişen ortam şartları ve inkübasyon zamanları arasındaki farkın önemli olduğu durumlarda farklı ortam şartları ve inkübasyon zamanları arasındaki ve birbirleri arasındaki farkı göstermek amacıyla Duncan testi uygulanmıştır. Oluşturulan tablolarda değerlerin standart sapmaları verilmiştir. İstatistiksel olarak farklılıkların önemli olması durumu $p < 0,05$ iken önemsiz olması durumu $p > 0,05$ düzeyinde tespit edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Bakteriyal Kalsiyum Karbonat Çökelimi

Özellikle üreolitik bakteriler tarafından gerçekleştirilen kalsiyum karbonat çökelimi iç ve dış faktörden etkilenmektedir. Çevre dostu olan ve pek çok alanda kullanımı olan bu süreci etkileyen faktörlerin araştırılması sürecin anlaşılması için büyük önem arz etmektedir. Günümüze kadar bu alanda yapılmış çalışmalarda bakteriyolojik biyoçimento üretimini en çok etkileyen faktörlerin başında sıcaklık, pH, üre, ortamdaki kalsiyum kaynağı, bakteri oranı, bakteri türü v.b. gelmektedir.

4.1.1 Bakteri türünün etkisi

Kalsiyum karbonat çökeliminde en etkili organizmalar üreolitik bakterilerdir. Üreolitik bakteriler arasında da Bacillus cinsine ait birçok toprak bakterileri sahip olduğu yüksek enzim aktivitesi sayesinde oldukça popülerdir. Literatüre bakıldığında yerel izolatlar üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Yerel izolatların kullanıldığı çalışmalardan bazılarında Tsinghua Üniversitesi topraklarında, Çin-maden ocağı toprağında ve Malezya'da limestone mağaralarından kalsiyum karbonat çökelim yeteneğine sahip bakteriler izole edilmiştir (Li ve diğ., 2013; Achal ve Pan, 2014; Omeregic ve diğ., 2017). Hindistan'da yoğun kireç içeren topraklarda yapılmış çalışmada da kalsiyum karbonat çökelim aktivitesine sahip çok sayıda Bacillus cinsine ait bakteriler (*B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *L. fusiformis*) izole edilmiştir (Dhami ve diğ. 2013b). Benzer şekilde Arjantin'deki kireç bakımından zengin bir bölgeden ısıyı tolere edebilen ve kalsiyum karbonat çökelim aktivitesine sahip *B. licheniformis* S-86 tanımlanmıştır (Tourney ve Ngwenya 2009).

Yerel suşlarımızın da enzim aktiviteleri ve kalsiyum karbonat üretim yeteneklerinin tespit edilmesi ilerde dışa bağımlılığın azaltılması için önemlidir. Bu nedenle yerel bir izolat olan *Paenibacillus favisporus* U3 suşunun kalsiyum karbonat çökelim potansiyeline farklı şartların etkisi araştırılmıştır. Çalışmada yerel izolatin

özellikleri ile üreaz pozitif olan *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökeli mi de birbiri ile kıyaslanmıştır.

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında yer alan yerel izolatımız *Paenibacillus favisporus* U3 ve kontrol suş *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterilerinin kalsiyum karbonat çökeli mi aktivite leri üzerine farklı sıcaklık, üre konsantrasyonu, pH, kalsiyum kaynakları ve inokülasyon oranlarının etkisi araştırılmıştır. *P. favisporus* U3'ün sekans dizisi Şekil 4.1'de verilmiştir.

```
1 agcttgctct cctgatggtt agcggcggac gggtagtaac cacgtaggca acctgcctgc
61 aagaccggga taaccacgg aaacgtgagc taataccgga tatctcattt cctctcctga
121 ggggatgatg aaagacggag caatctgtca cttgcggatg ggccctcggc gcattagcta
181 gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac gatgctgagc cgacctgaga gggtagaacgg
241 ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
301 gcaatgggag aaagcctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggttt tcggatcgta
361 aagctctggt gccaggggaa aacgtccgat agagtaactg ctatcggagt gacggtacct
421 gagaagaaag ccccggctaa ctacgtgcca gcagcccgcg taatacgtag ggggcaagcg
481 ttgtccgaa ttattgggag taaagcgcgc gcagcgggac atttaagtct ggtgtttaag
541 gccaaaggctc aaccttggtt cgcactggaa actgggtgac ttgagtgcag aagaggagag
601 tggaaattcca cgtgtagcgg tgaatgcgt agatatgtgg aggaacacca gggcgaagg
661 cgactctctg ggctgtaact gacgctgagg cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag
721 ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatgctaggt gttagggggtt tcgataacct
781 tgggtccgaa gttaacacat taagcattcc gcctggggag tacggtcgca agactgaaac
841 tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc agtggagtat ggggtttaat tcgaagcaac
901 gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatccc tctgaccggt agagatagac ctttctctcg
961 ggacagagga gacaggtggt gcactggttg cgtcagctcg gtctctgaga tgggtgggta
1021 agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgatttt agttgccagc acttcgggtg ggcactctag
1081 aatgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg cggggatgac gtcaaatcat catgccctt
1141 atgacctggg ctacacacgt actacaatgg ccagtacaac gggaaagcga gcccggaggt
1201 ggagccaatc ctatcaaagc tggctcagt tcggattgca ggtgcaact cgctgcagt
1261 aagtcggaat tgctagtaat cgcggatcag catgcccgcg tgaatacgtt cccgggtctt
1321 gtacacaccg ccctcacac cacgagagtt tacaacaccg gaagtcgg
```

Şekil 4.1: Yerel izolat *Paenibacillus favisporus* U3 genom sekansı (GenBank: MW767154.1).

4.1.2 Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık, mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökeli mine etki eden önemli bir çevresel faktördür. Düşük sıcaklıklarda enzim aktivitesinde azalma meydana geldiğinden, yüksek sıcaklıklarda ise enzimin protein yapısındaki bozulmalar sebebiyle kalsiyum karbonat çökeli mi olumsuz yönde etkilenmektedir (Sun ve diğ., 2019). Ancak, belirli bir aralıktaki sıcaklık artışı bakteriyal büyümede ve aktivitede olumlu etkiye sebep olmaktadır (Ferris ve diğ., 2003; Nematı ve Voordouw, 2003; Mitchell ve Ferris, 2005; Peng ve Liu, 2019).

Çalışmada yerel izolat (*Paenibacillus favisporus* U3) ve standart suş (*Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453) bakterileri kullanılmıştır. Kalsiyum karbonat

çökeli mi üzerine sıcaklık etkisi 20-42 °C aralıklarında test edilmiştir. Literatür bilgisine göre *Paenibacillus favisporus* U3'ün kalsiyum karbonat çökeli m sıcaklığı 37 °C'dir (Akyol ve ark., 2017). Çalışmamızda *P. favisporus* U3 ile ilgili kontrol amaçlı yapılan ön deneylerimizden elde edilen veriler, U3 izolatının kalsiyum karbonat çökeli mi sıcaklığının 37 °C'de sabit olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle tüm çalışmalarımızda 37 °C'de sıcaklık kullanılmasına karar verilmiştir. Farklı yıllarda yapılan bu çalışma sonucu bakterimizin CaCO₃ çökeli m sıcaklığının stabil olduğunu göstermektedir ki bu da yerel izolatımızın bir üstünlüğü olarak kabul edilmiştir. Tüm çalışmalarımızda *P. favisporus* U3 için optimum sıcaklık 37 °C olarak devam edilmiştir.

Çalışmada kontrol amaçlı kullanılan *S. pasteurii* ATCC 6453 bakterisi standart KMO besi ortamında farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 37 ve 42 °C) inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen verilere göre maksimum çökeli m miktarları 20 °C'de 5. günde 1,74±0,01 g/L, 25 °C'de 7. günde 1,71±0,08 g/L, 30 °C'de 7. günde 2,55±0,04 g/L, 37 °C'de 7. günde 1,66±0,04 g/L ve 42 °C'de 14. günde 1,60±0,13 g/L olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Buna göre en yüksek kalsiyum karbonat miktarına (2,55±0,04 g/L) 30 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda ulaşılmıştır. Bakterinin 30 °C'de çökeli m yaptığı en yüksek ve en düşük kalsiyum karbonat miktarı 2,18-2,55 g/L'dir. 30 °C'ye kadar çökeli m miktarında lineer bir artış gözlenirken, 30 °C'den sonraki sıcaklık artışlarında ortamda çökelen kalsiyum karbonat miktarının gittikçe azaldığı görülmektedir. Yapılan istatistik analizlerine göre ise sıcaklık ve zaman açısından fark istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

Tablo 4.1: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökeli m aktivitesine sıcaklığın etkisi (CaCO₃; g/L; 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, inokulasyon: % 10 (3,75x10⁸ cfu/ml)).

Sıcaklık	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
20 °C	1,74±0,01 ^{Cc}	1,56±0,08 ^{Bb}	1,37±0,03 ^{Aa}	1,60±0,05 ^{ABb}
25 °C	1,67±0,00 ^{Cab}	1,71±0,08 ^{Cb}	1,57±0,06 ^{Ca}	1,64±0,01 ^{Aab}
30 °C	2,49±0,01 ^{Db}	2,55±0,04 ^{Db}	2,32±0,01 ^{Db}	2,18±0,11 ^{Ba}
37 °C	1,43±0,03 ^{Ba}	1,66±0,04 ^{BCc}	1,50±0,03 ^{BCab}	1,57±0,05 ^{ABc}
42 °C	1,26±0,05 ^{Aa}	1,42±0,04 ^{Aab}	1,41±0,08 ^{ABab}	1,60±0,13 ^{Ab}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir sıcaklıkta farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Literatürde sıcaklığın mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökeli mi üzerindeki etkisini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan büyük çoğunluğu bizim elde ettiğimiz bulgularla paralellik göstermektedir. Örneğin, pBU11 ve pBR322 plazmitlerini içeren rekombinant *Escherichia coli* HB101 ve *Bacillus pasteurii* ATCC 11859 suşlarının kalsit presipitasyonunda üreaz enziminin rolünün araştırıldığı bir çalışmada; 4, 30 ve 60 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta üreaz aktivitesi ile kalsiyum karbonat çökeli mi incelenmiş ve en yüksek aktivite 30 °C’de elde edilmiştir (Bachmeier ve diğ., 2002). Bir diğ er çalışmada kireç taşı mağarasından ve tınlı topraktan izole edilmiş 31 adet kalsit üreten bakteri kullanılmıştır. %64’ü *Bacillus* sp. olarak belirlenmiş bakterilerin kalsiyum karbonat üretim aktivitelerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 4, 22 ve 32 °C inkübasyon sıcaklıkları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 4 °C’de inkübasyonun 25. gününde, 22 °C’de inkübasyonun 15. gününde, 32 °C’de inkübasyonun 7. gününde kalsiyum karbonat kristalleri gözlenmiştir. En yüksek kalsiyum karbonat kristali oluşumunun 32 °C’de olduğu rapor edilmiştir (Cacchio ve diğ., 2003). Omeregıe ve diğ. (2017) tarafından *S. pasteurii* ile yapılmış çalışmada da maksimum üreaz aktivitesinin 25 ve 30 °C’de gerçekleştiği bildirilmiştir. *S. pasteurii* ATCC 11859 ve *B. megaterium* ATCC 14581 bakterileri tarafından gerçekleştirilen kalsiyum karbonat çökeli mine 15-30 °C aralığında ki sıcaklık derecelerinin etkisini belirlenmeye çalışılmıştır. Her iki mikroorganizmada da 30 °C’de en yüksek gelişim, enzim aktivitesi ve kalsiyum karbonat çökeli mini göstermişlerdir. İki organizma kıyaslandığında ise *S. pasteurii* ATCC 11859’nin daha yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Sun ve diğ., 2019).

Peng ve Liu tarafından 2019 yılında *S. pasteurii* ATCC 11859 bakterisi kullanılarak yapılan çalışmada 10, 15, 20, 25 ve 30 °C’lerde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ilk 20 saatinde 25 ve 30 °C’lerde bizim çalışmamızda olduğu gibi üreaz enzim aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. Ancak bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, artan inkübasyon süresinde sıcaklık düştükçe üreaz aktivitesinin daha uzun süre korunduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada çökelen kalsiyum karbonat miktarı ölçülmüş ve mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökeli m işle mi düşük sıcaklıklarda daha uzun süre etkili olduğu araştırmacılar tarafından söylenmektedir. Bunun aksine, Keykha ve diğ. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ise 30, 40 ve 50 °C’lerde *S. pasteurii* ATCC

11859'nin mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökeli mi çalışılmış ve 40 °C sıcaklıkta en yüksek aktivite belirlenmiştir.

Bacillus cinsi suşlar yüksek enzim aktivitesi nedeniyle kalsiyum karbonat çökeli minde yoğun olarak araştırılmaktadır. Dene ylerimizde kullanılan iki suşun kalsiyum karbonat çökeli m sıcaklığı literatürde belirtilen sıcaklık aralıklarında olmakla birlikte, makalelerde bildirilen farklı sıcaklıklar hiç kuşkusuz bu bakterilerin hem tür hem de suş farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Buna ilaveten CaCO₃ çökeli mi ile ilgili kurgulanan optimizasyon şartları ve laboratuvar koşullarından kaynaklanan farklılıklar da sıcaklık derecelerindeki çeşitliliğin oluşmasının nedenleri arasında sayılabilir. Çalışmamız sonuçları ile literatür bilgileri kıyaslandığında, *Bacillus* cinsi üreolitik toprak bakterilerinin CaCO₃ çökeli m sıcaklığı 37 °C ve 30 °C'de yoğunlaşmaktadır.

4.1.3 Üre Konsantrasyonunun Etkisi

Üre, mikroorganizmalar tarafından çoğunlukla azot ve enerji kaynağı olarak kullanılan organik bir bileşiktir. Aynı zamanda üreolitik bakteriler tarafından hidrolize uğrayarak ortam pH'sının artışına da sebep olur (Moble y ve Hausinger 1989). pH artışı ile birlikte amonyak üretilir ve hücre dışında biriken aşırı Ca²⁺'un toksik etkisinden kurtulmak için bakteriler ortamdaki kalsiyumun fazlasını CaCO₃ olarak çökeltir (Silver ve diğ., 1975). Dolayısıyla kalsiyum karbonat çökeli minde üre konsantrasyonunun bilinmesi hem bakterinin en iyi geliştiği üre miktarının bilinmesi hem de farklı kalsiyum konsantrasyonlarında çökeli minin nasıl değiştiğinin anlaşılması açısından önemlidir.

Bu sebeple biz de çalışmamızda yerel izolatomuz *Paenibacillus favisporus* U3 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterilerinin kalsiyum karbonat çökeli m aktivitelere farklı üre konsantrasyonlarının etkisini araştırdık. Daha önceki *P. favisporus* U3'ün kumlu zeminlerdeki etkisinin araştırıldığı çalışmaya göre U3 bakterisi 100 mM üre içeren KMO besiyerinde pH:6,5'ta ve 37 °C'de geliştirildiğinde 2,81 g/L kalsiyum karbonat çökeltmektedir (Akyol ve diğ., 2017). Ayrıca daha önce yürütülen proje kapsamında (TÜBİTAK 113Y568) 100-350 mM üre aralığında CaCO₃ çökeli m yeteneği incelenmiş ve yüksek üre ilavesi ile birlikte

kalsiyum karbonat çökelim veriminin azaldığı tespit edilmiştir. Üre ilavesi bir taraftan pH aralığını arttırırken bir diğer taraftan suş farklılığı nedeniyle gelişimi etkilemiş bu da enzim miktarında azalmaya neden olmuş olabilir. Bu durumun anlaşılması için 100 mM üreden daha az konsantrasyonun CaCO₃ çökelim verimine etkisinin tespit edilmesi için 25 ve 50 mM üre konsantrasyonu denenmiştir (Tablo 4.2). Genel olarak 25 ve 50 mM üre konsantrasyonunda CaCO₃ çökeli mi verimi benzer eğilim göstermiştir. En yüksek çökeli me 14. günde 50 mM üre ortamında (1,98±0,26 g/L) ulaşılmıştır. Sonuçlar istatistiki açıdan zamana ve üre konsantrasyonuna bağlı çökelen kalsiyum karbonat miktarı önemsiz (p>0,05) bulunmuştur. TÜBİTAK 113Y568 nolu proje kapsamına göre 100 mM ürenin (2,81±0,00 g/L) etkili bir şekilde CaCO₃ çökeli mi çalışmalarında kullanılabileceğine karar verilmiştir.

Tablo 4.2: *Paenibacillus favisporus* U3'ün kalsiyum karbonat çökeli mi üzerine ürenin etkisi (CaCO₃; g/L; 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, sıcaklık: 37 °C, inokulasyon: %10 (3,75x10⁸ cfu/ml)).

Üre miktarı	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25 mM	1,54±0,00	1,03±0,09	1,17±0,21	1,55±0,27
50 mM	1,43±0,11	0,93±0,23	1,46±0,05	1,98±0,26

Kontrol organizma olan *S. pasteurii* ATCC 6453'ün CaCO₃ çökeli mi yeteneğine farklı üre konsantrasyonlarının etkisini belirlemek için literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak 100-350 mM aralığında üre KMO besiyerine eklenmiştir. Elde edilen verilere göre en yüksek CaCO₃ çökeli mi 7. günde 333 mM üre içeren ortamda 2,60±0,04 g/L olarak belirlenmiştir. 100-333 mM üre içeren ortamlarda görülen CaCO₃ çökeli mi aktiviteleri birbirine yakın değerler göstermektedir. 350 mM üre içeren ortamda 7. ve 10. günlerde diğer günlere benzer sonuçlar alınırken 5. ve 14. günlerde aktivitede belirgin bir azalma tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Yapılan istatistik analizlerine göre ise üre konsantrasyonu ve zaman açısından çökelen CaCO₃ miktarı farkının istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

Tablo 4.3: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelimi üzerine ürenin etkisi (CaCO₃; g/L; 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, sıcaklık: 30 °C, inokulasyon: %10 (3,75x10⁸ cfu/ml)).

Üre miktarı	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
100 mM	2,32±0,01 ^{BCa}	2,56±0,03 ^{Bb}	2,35±0,02 ^{Ca}	2,32±0,08 ^{Ca}
200 mM	2,25±0,06 ^{Bb}	2,32±0,09 ^{Ab}	2,20±0,04 ^{Aab}	2,09±0,02 ^{Ba}
250 mM	2,34±0,01 ^{CDb}	2,34±0,04 ^{Ab}	2,27±0,05 ^{ABb}	2,15±0,00 ^{Ba}
300 mM	2,40±0,04 ^{Dc}	2,55±0,00 ^{Bd}	2,32±0,02 ^{BCb}	2,18±0,00 ^{BCa}
333 mM	2,49±0,00 ^{Eb}	2,60±0,04 ^{Bb}	2,43±0,01 ^{Db}	2,13±0,11 ^{Ba}
350 mM	0,08±0,02 ^{Aa}	2,27±0,00 ^{Ac}	2,20±0,01 ^{Ab}	0,07±0,02 ^{Aa}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir üre konsantrasyonunda farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c,d,e}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre yerel izolat *P. favisporus* U3 ile kontrol organizması *S. pasteurii* ATCC 6453 kıyaslandığında daha düşük üre konsantrasyonunda bile yerel izolatımızın daha yüksek kalsiyum karbonat presipitasyonu gösterdiği görülmektedir.

Literatür taramalarımıza göre farklı araştırmacılardan *P. favisporus* türü ile ilgili rapor edilmiş bilimsel çalışmalara rastlanmazken *S. pasteurii* türünün en iyi aktivite gösterdiği üre konsantrasyonunun 333 mM olduğu belirtilmiştir (Ferris ve Stehmeier 1992; Ferris ve diğ., 1996; Fujita ve diğ., 2000). Bu sonuç *S. pasteurii* ATCC 6453 ile yaptığımız çalışmalar ile korelasyon göstermektedir. Nitekim De Muynck ve diğ. (2010) kalsit çökeltmesi için en iyi üre konsantrasyonunu 0,5 M olarak ifade etmiştir.

Ayrıca *P. favisporus* U3 100 mM gibi düşük konsantrasyonda en yüksek kalsiyum karbonat çökelimi gösterirken, artan üre konsantrasyonunda çökelim aktivitesinin düşmesinin sebebi olarak yüksek konsantrasyondaki ürenin bakteriye karşı gösterdiği toksik etki olduğu düşünülmüştür. Okwadha ve Li (2010) tarafından yapılmış çalışmada da yüksek konsantrasyonlarda ürenin *S. pasteurii* ATCC 11859 üzerinde toksik etkisi rapor edilmiştir.

Diğer taraftan pek çok çalışma bakteriyel kalsiyum karbonat presipitasyonunda üre konsantrasyonunda tek başına yeterli olmadığını ve Ca²⁺ ile kombine şekilde etkili olduğunu belirtmektedir. Çünkü bakterinin bulunduğu ortamdaki Ca²⁺, üreaz aktivitesini arttırmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökeliminde en etkili üre-Ca²⁺

kombinasyonunun belirlemek için 0,5-3,0 M konsantrasyon aralığı denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 1,5 M'a kadar artan konsantrasyonla birlikte çökelen kalsiyum karbonat miktarı da artarken, 1,5 M'ın üzerindeki konsantrasyonlarda azalmakta olduğu bildirilmiştir (Whiffin, 2004). Al-Thawadi (2008) tarafından yapılan çalışmada ise, 0,125-2,0 M aralığındaki konsantrasyonlarda üre-Ca²⁺ çözeltiye eklenmiş ve en yüksek miktarda kalsit çökeliminin 0,5 M üre-Ca²⁺ kombinasyonunu içeren ortamda gerçekleştiği rapor edilmiştir. Okwadha ve Li (2010); test ettikleri 0,33 ve 0,67 M üre ile 0,0025, 0,025 ve 0,25 M CaCl₂ kombinasyonu arasından en yüksek üre ve Ca²⁺ (0,67 M ve 0,25 M) içeren ortamda maksimum kalsiyum karbonat çökeli mi rapor etmişlerdir.

4.1.4 pH Etkisi

pH, kalsiyum karbonat presipitasyonu başta olmak üzere tüm kimyasal reaksiyonların başlaması için önemli bir çevresel faktördür. Kalsiyum karbonat çökeliminin etkin bir şekilde gerçekleşmesi için ortam pH'ının alkali olması gerekmektedir (Stoks-Fischer ve diğ., 1999).

Bu sebeple bu çalışmada bakteriyal kalsiyum karbonat çökeliminin gerçekleştiği ortamlarda başlangıç pH değerleri 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ve 7,5 ayarlanmış ve kalsiyum karbonat çökeline etkisi incelenmiştir. *P. faavisporus* U3 için kalsiyum karbonat çökeliminin optimum olduğu pH değeri 6,5'tur (10.gün, 2,81±0,00 g/L) (Akyol ve diğ., 2017). *S. pasteurii* ATCC 6453 ise pH 6,5'te 7. günde en iyi aktiviteyi göstermiştir (2,60±0,04 g/L) (Tablo 4.4). İstatistik analizlerine göre ise farklı pH değerleri ve zaman açısından çökelen CaCO₃ miktarı farkının istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

Farklı pH ların üreaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemeyi de içeren *Proteus mirabilis* ile yapılan bir çalışmada ortam pH'sı 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ve 10,0'a ayarlanmıştır. Çalışma sonucunda optimum pH değeri 7,0 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda üreaz enziminin pH 7,0 ve 8,0 arasında kararlılığını koruduğu belirtilmiştir (Türksever Tetiker, 2016). *S. pasteurii* ile yapılan bir çalışmada ortamlar pH 5,0, 6,0, 8,0 ve 9,0 ayarlanmış ve bakteriyal CaCO₃ presipitasyonu için optimum pH 9,0 olarak tespit edilmiştir (Keykha ve diğ., 2017).

Omoregie ve diğ. (2017)'nin *S. pasteurii* DSM 33 ile yaptıkları çalışmada maksimum çökelinin gerçekleştiği pH 6,5 olup, çalışmamızda kullandığımız *S. pasteurii* ATCC 6453 ile uyumludur.

Tablo 4.4: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökeli üzerine pH'ın etkisi (CaCO₃; g/L; 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 333 mM üre, sıcaklık: 30 °C, inokulasyon: %10 (3,75x10⁸ cfu/ml)).

pH	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
5,0	2,37±0,02 ^{Cb}	2,58±0,01 ^{Bc}	2,24±0,04 ^{Da}	2,27±0,03 ^{Ca}
5,5	1,86±0,22 ^{Ba}	2,31±0,39 ^{Ba}	2,10±0,04 ^{Ca}	2,24±0,01 ^{Ca}
6,0	2,40±0,02 ^{Ca}	2,29±0,42 ^{Ba}	2,08±0,06 ^{Ca}	2,20±0,01 ^{Ca}
6,5	2,49±0,01 ^{Cb}	2,60±0,04 ^{Bb}	2,43±0,01 ^{Eb}	2,13±0,11 ^{Ca}
7,0	1,97±0,01 ^{Bb}	2,01±0,01 ^{Bb}	1,61±0,01 ^{Bab}	1,67±0,06 ^{Ba}
7,5	0,78±0,10 ^{Ab}	0,43±0,23 ^{Ab}	0,07±0,01 ^{Aa}	0,03±0,01 ^{Aa}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D,E}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir pH değerinde farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Kim ve diğ. (2018), pH 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ve 10,0 değerlerini içeren ortamlarda *Staphylococcus saprophyticus* ve *Sporosarcina pasteurii* suşlarının gelişim ortamlarında çökelttiği kütleyi göz önünde bulundurmışlardır. Sonuç olarak en yüksek kalsiyum karbonat çökelinin pH 7,0'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. *Sporosarcina pasteurii* ile yapılan başka bir çalışmada da çalışılan diğer pH derecelerine göre pH 9,0'da bakterinin yoğunluğu, üreaz ve kalsiyum karbonat çökelim aktivitesinin önemli ölçüde yüksek olduğu belirtilmiştir (Liu ve diğ., 2021). Stocks-Fischer ve diğ. (1999)'nın yaptığı çalışmada mikrobiyolojik olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökeline pH 8,3±1,0'da başlanmış ve pH 9,0'da tamamlandığını bulmuşlardır.

Deneşlerimizde besi ortamlarındaki pH değışiklikleri de takip edilmiş ve her iki bakteride de son pH değerlerinin birbirine benzer sınırlarda olduğu görülmüştür. Son ortam pH'sı 8,0 civarında olup bakteriyal kalsiyum karbonat çökelinin alkali şartlarda gerçekleştiğini desteklemektedir (Tablo 4.5). İstatistikî analizle her iki bakteri içinde zamana bağılı ortamdaki pH değışim farkı önemsiz (p>0,05) bulunmuştur. Kim ve diğ. (2018) göre pH'daki bu artış, üreoliz sırasında oluşan hidroksit iyonlarından (OH⁻) kaynaklanmakta ve ortam pH'sı alkaliye dönmektedir.

Literatür bilgilerinden de anlaşılacağı üzere optimal pH değerleri türe özgüdür. Bakterinin geliştiği ortam pH'sının hücre gelişimini teşvik edici ya da önleyici etkisi nedeniyle farklı türlerin en iyi CaCO₃ çökelişi gerçekleştirdiği pH dereceleri de farklılık göstermektedir. İnkübasyon süresine bağlı olarak pH'daki artış, beklediğimiz bir sonuçtur ve literatür bilgileriyle uyumludur.

Tablo 4.5: Bakteriyel kalsiyum karbonat çökelişi sırasında pH değerindeki değişim (*Paenibacillus favisporus* U3 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453)

Bakteriler	Başlangıç pH	Son pH			
		5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
<i>Paenibacillus favisporus</i> U3	6,5	8,05±0,00	7,93±0,09	8,05±0,17	8,36±0,76
<i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453	6,5	8,17±0,00	7,91±0,05	8,01±0,04	8,17±0,35

4.1.5 Kalsiyum Kaynaklarının Etkisi

Bilindiği gibi, mikrobiyal kalsit çökelişi Ca²⁺ iyonlarınca zengin alkali ortamlarda gerçekleşir. Örneğin, *Bacillus megaterium* bakterisinde kalsit çökelişinin, pozitif yüklü Ca²⁺ iyonları ile negatif yüklü bakteriyel hücre duvarı arasındaki sitokiyometrik etkileşimin bir sonucu olduğu rapor edilmiştir (Achal ve Pan, 2014). Kalsiyum iyonu bilindiği üzere mikrobiyal metabolizmada kullanılmaz. Bu nedenle de bakteri, mikroçevresindeki aşırı kalsiyumu, hücre dışı polimerik maddelerle (EPS) sürekli yakalar. Bu yüzden kalsiyum karbonat çökelişi bakterinin dış yüzeyinde gerçekleşir ve dolayısıyla kalsiyum mikrokristalleri hücre dışı ortamda birikir (Beveridge ve Fyfe, 1985; Achal ve Pan, 2014). Üstelik farklı kalsiyum tuzları varlığında kristal morfolojisinde de farklılıklar olur (Gorospe ve diğ., 2013). Okwadha ve Li, 250 mM kalsiyum klorit ve 666 mM üre konsantrasyonunda *Proteus vulgaris* ile karbonat çökelişini %100 arttırmışlardır (Okwadha ve Li 2010). Diğer taraftan yüksek konsantrasyonlarda üre (20 ve 50 g/L) ve kalsiyum klorür (30 ve 75 g/L) enzimatik aktiviteyi ve bakterilerde üretimi de inhibe edebilmektedir (Nemati ve diğ., 2005).

Çalışmamızda kalsiyum kaynaklarının çökelişe etkisinin belirlenmesi amacıyla inorganik kalsiyum kaynağı olarak CaCl₂ (25-1000 mM) ve kalsiyum nitrat

(25-100 mM) organik kalsiyum kaynağı olarak da kalsiyum laktat (25-250 mM) kullanılmıştır (Tablo 4.7-4.12).

CaCl₂ konsantrasyon artışına bağlı olarak bakteriyel çökelti miktarındaki anlamlı artış dikkat çekmiştir. Elde edilen verilere göre kalsiyum karbonat çökelim aralığı 750 mM için 3,08-17,15 g/L ve 1000 mM için 5,15-24,02 g/L'dır (Tablo 4.6). U3 türünün 25-500 mM kalsiyum klorit konsantrasyon aralığında CaCO₃ çökelim miktarının optimum şartlarda ürettiği miktarlara yakın olması önemlidir. *S. pasteurii* ATCC 6453'ün maksimum aktivite gösterdiği CaCl₂ konsantrasyonu U3 ile benzerdir (1000 mM CaCl₂, 14. gün, 17,07±0,35 g/ml) (Tablo 4.7). Her iki bakteri türünde de 1000 mM CaCl₂ varlığı aktivitede yaklaşık 10 kat artışa neden olmuştur. Ayrıca her iki bakteri suşu için istatistiki olarak farklı kalsiyum klorit konsantrasyonları ve zaman açısından çökelen CaCO₃ miktarı farkının da önemli olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

CaCl₂, hücreler tarafından parçalanamayan inorganik bir bileşiktir. Bakterilerin aşırı kalsiyumu hücre dışında toksik etkisinden korunmak için presipite ettiği bilinmektedir. Kimyasal bir reaksiyonun da olması ihtimaline karşılık elektron mikroskop analizleri ile çökelti incelenmiştir. SEM analizlerinde yüzeyde kalsiyum klorite rastlanmış olmakla birlikte vaterit ve kalsit minerallerinin varlığı 1000 mM gibi yüksek konsantrasyonda bakteriyel çökelim gerçekleştiğini doğrulamıştır. Bu alanda yapılmış çalışmalara bakıldığında 1000 mM gibi yüksek konsantrasyonda bakteriyel çökelim ilk kez gösterilmiştir. Bu sonuç da yerel izolatımızın üstünlüğünü göstermektedir (Tablo 4.6). Ayrıca, literatürde bu alandaki çalışmaların tamamında artan CaCl₂ ile CaCO₃ çökeliminin doğru orantılı olarak arttığı belirtilmektedir. Bu çalışmalardan biri olan De Muynck ve diğ. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ortama eklenen kalsiyum klorit oranı arttıkça kalsiyum karbonat presipitasyon aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde Rebata-Landa (2007)'nin sedimentlerdeki mikrobiyal aktiviteyi belirleme çalışmalarında ortama farklı kütlelerde CaCl₂ eklenmiş ve en yüksek miktarda CaCO₃ çökeliminin en yüksek CaCl₂ içeren ortamda gerçekleştiği rapor edilmiştir.

Tablo 4.6: *Paenibacillus favisporus* U3'ün kalsiyum karbonat çökelimine CaCl₂'in etkisi (CaCO₃; g/L cinsinden; 100 mM üre, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, sıcaklık: 37 °C, inokulasyon: %10(3,75x10⁸ cfu/ml)).

CaCl ₂ mM	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	2,54±0,00 ^{Aa}	2,63±0,00 ^{BCa}	2,81±0,00 ^{Ab}	2,79±0,00 ^{Ab}
50	0,76±0,09 ^{Aa}	1,83±0,17 ^{Abc}	1,98±0,07 ^{Ac}	1,11±0,56 ^{Aab}
100	1,03±0,05 ^{Aa}	1,94±0,09 ^{Ab}	2,27±0,15 ^{Ac}	0,94±0,08 ^{Aa}
250	1,82±0,57 ^{Aab}	2,28±0,26 ^{ABab}	2,81±0,33 ^{Ab}	1,51±0,06 ^{Aa}
500	2,52±0,01 ^{Aa}	2,32±0,16 ^{ABa}	3,81±0,56 ^{Bb}	3,20±0,32 ^{Aab}
750	4,21±0,06 ^{Aa}	3,08±0,00 ^{Ca}	6,56±0,79 ^{Ca}	17,15±4,87 ^{Bb}
1000	12,15±4,38 ^{Bb}	5,15±0,42 ^{Da}	7,35±0,16 ^{Cab}	24,02±0,00 ^{Cc}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir kalsiyum klorit konsantrasyonunda farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Tablo 4.7: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelim aktivitesine CaCl₂'in etkisi (CaCO₃; g/L cinsinden; 333 mM üre, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, sıcaklık: 30 °C, inokulasyon: %10(3,75x10⁸ cfu/ml)).

CaCl ₂ mM	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	2,49±0,00 ^{Cb}	2,60±0,04 ^{Db}	2,43±0,01 ^{ABb}	2,13±0,11 ^{Aa}
50	1,12±0,18 ^{Aa}	0,83±0,10 ^{Aa}	1,05±0,06 ^{Aa}	1,63±0,03 ^{Ab}
100	1,55±0,17 ^{ABb}	1,32±0,02 ^{Bab}	1,13±0,06 ^{Aa}	2,19±0,09 ^{Ac}
250	1,98±0,04 ^{BCa}	1,72±0,09 ^{Ca}	1,93±0,02 ^{ABa}	3,69±0,43 ^{Ab}
500	2,49±0,26 ^{Ca}	2,46±0,02 ^{Da}	3,50±0,74 ^{Ba}	5,75±0,98 ^{Bb}
750	4,39±0,42 ^{Da}	4,29±0,14 ^{Ea}	5,95±1,93 ^{Cab}	9,44±1,97 ^{Cb}
1000	9,35±0,69 ^{Ec}	4,78±0,11 ^{Fa}	8,00±0,56 ^{Db}	17,07±0,35 ^{Dd}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D,E,F}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir kalsiyum klorit konsantrasyonunda farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c,d}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Kalsiyum laktat ve kalsiyum nitrat Ca⁺² kaynaklarındandır. Kalsiyum laktat (C₆H₁₀CaO₆) karbon içerikli iken kalsiyum nitratta (Ca (NO₃)₂) azot bulunur. Karbon ve azot da bakterilerin metabolik faaliyetlerinde gelişim için kullandıkları temel bileşiklerdir. Tablo 4.8-4.11'a bakıldığında her iki kalsiyum kaynağının da bakteriyel kalsiyum karbonat çökelimine katkı sağladıkları görülmektedir.

Farklı kalsiyum laktat konsantrasyonlarının bakteriyal kalsiyum karbonat çökelimine etkisini belirlemede *Paenibacillus favisporus* U3 bakterisi için 25, 50, 75, 100, 250 mM kalsiyum laktat ortama ilave edilmiştir. Bakteri en yüksek kalsiyum karbonat çökelimini 100 mM kalsiyum laktat içeren ortamda 5. günde göstermiştir ($5,40\pm 0,00$ g/L). Ayrıca, tüm inkübasyon zamanlarına bakıldığında birbirine çok yakın CaCO_3 çökeli mi gösterdiği, 100 mM kalsiyum laktat içeren ortamlarda ise ilerleyen inkübasyon zamanlarında önce aktivitede azalma daha sonrasında artış görüldüğü dikkati çekmiştir. (Tablo 4.8). *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterisi için de 25, 50, 75, 100, 250 mM kalsiyum laktat konsantrasyonları çalışılmıştır. En yüksek kalsiyum karbonat çökeli mi 250 mM kalsiyum laktat içeren ortamda 10. günde gözlenmiştir ($6,69\pm 0,00$ g/L). 25 ve 50 mM kalsiyum laktat içeren ortamlarda oldukça düşük CaCO_3 çökeli m aktivitesi görülürken 75, 100 ve 250 mM kalsiyum laktat içeren ortamlarda aktivite dikkate değer şekilde artmıştır. 75 mM kalsiyum laktatın olduğu ortamda ilk üç ölçüm gününde yüksek ve birbirine yakın değerler gözlemlenirken 14. günde aktivitede ani bir düşüş tespit edilmiştir. 100 ve 250 mM kalsiyum laktat içeren ortamlarda ise inokülasyon zamanlarında aktivitede dalgalanma görülmüştür. Her iki konsantrasyon değerine sahip ortamlarda 14. günde elde edilen sonuçlar bir önceki ölçüm zamanında kaydedilen değer in yaklaşık yarısıdır (Tablo 4.9). Ayrıca hem U3 hem de ATCC 6453 için istatistiki olarak farklı kalsiyum laktat konsantrasyonları ve zaman açısından çökelen CaCO_3 miktarı farkının da önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.8: *Paenibacillus favisporus* U3'ün kalsiyum karbonat çökelimine Ca-laktatın etkisi (CaCO_3 ; g/L cinsinden; 100 mM üre, 25 mM NaHCO_3 , pH:6,5, sıcaklık: 37 °C, inokülasyon: $\%10(3,75\times 10^8$ cfu/ml)).

Ca laktat mM	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	$2,45\pm 0,21^{\text{Bb}}$	$1,46\pm 0,06^{\text{Aa}}$	$2,24\pm 0,04^{\text{Ab}}$	$2,10\pm 0,17^{\text{Ab}}$
50	$2,45\pm 0,10^{\text{Bb}}$	$1,59\pm 0,21^{\text{Aa}}$	$2,30\pm 0,22^{\text{Aab}}$	$2,37\pm 0,40^{\text{Ab}}$
75	$2,57\pm 0,00^{\text{Bc}}$	$1,45\pm 0,00^{\text{Aa}}$	$2,00\pm 0,00^{\text{Ab}}$	$2,22\pm 0,29^{\text{Abc}}$
100	$5,40\pm 0,00^{\text{Cc}}$	$1,44\pm 0,26^{\text{Aa}}$	$2,29\pm 0,35^{\text{Ab}}$	$4,97\pm 0,00^{\text{Bc}}$
250	$1,08\pm 0,18^{\text{Aa}}$	$2,19\pm 0,56^{\text{Ab}}$	$2,00\pm 0,29^{\text{Aab}}$	$1,86\pm 0,15^{\text{Aab}}$

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C}) CaCO_3 miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir kalsiyum laktat konsantrasyonunda farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c}) CaCO_3 miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Tablo 4.9: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökelim aktivitesine Ca laktat'ın etkisi (CaCO₃; g/L cinsinden; 333 mM üre, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, sıcaklık: 30 °C, inokulasyon: % 10(3,75x10⁸ cfu/ml)).

Ca laktat mM	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	0,05±0,01 ^{Aa}	0,05±0,03 ^{Aa}	0,31±0,10 ^{Ba}	0,51±0,20 ^{Ab}
50	0,04±0,01 ^{Aa}	0,04±0,00 ^{Aa}	0,12±0,01 ^{Aa}	0,54±0,52 ^{Aa}
75	4,71±0,35 ^{Bb}	6,02±0,48 ^{Bc}	5,76±0,00 ^{Cc}	0,66±0,27 ^{Aa}
100	5,26±0,23 ^{Ba}	6,26±0,65 ^{Bb}	6,34±0,00 ^{Db}	4,59±0,00 ^{Ba}
250	6,13±1,41 ^{Ba}	5,67±1,17 ^{Ba}	6,69±0,00 ^{Ea}	3,59±2,35 ^{Ba}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D,E}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir kalsiyum laktat konsantrasyonunda farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Çalışılan iki suş kıyaslandığında ortama ilave edilen kalsiyum laktatın *P. favisporus* U3 yerel izolatu için aktivitede yaklaşık 2 kat, *S. pasteurii* ATCC 6453 bakterisi içinse 3 kat artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kalsiyum laktat içeren şartlarda *S. pasteurii* ATCC 6453'nin *P. favisporus* U3'e göre ortamda yaklaşık 1 g/L daha fazla kalsiyum karbonat birikimine sebep olduğu görülmüştür.

Literatürde Jonkers ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışmada beton iyileştirmek için kullanılan bakterilerin bulunduğu ortama çimento ağırlığın %0,5 i kadar kalsiyum laktat ilave edilmiş ve 7 ila 28 gün boyunca hasarlı çimentolar bu ortamda bekletilmiştir. 28 günlük muamele sonucunda çimentonun dayanımının arttığı belirlenmiştir. Çimentonun dayanımının artması bakterinin ürettiği kalsiyum karbonat miktarına bağlıdır.

Çalışmamızda kalsiyum nitratın CaCO₃ çökeli üzerine etkisini belirlemek için 25, 50 ve 100 mM konsantrasyonlarında gelişim ortamlarına eklenmiştir. Her iki bakteri için de elde edilen veriler Tablo 4.10 ve 4.11'de verilmiştir. Veriler incelendiğinde iki organizmanın da 100 mM içeren ortamda diğer Ca-nitrat içeren ortamlara göre daha yüksek CaCO₃ çökeliğine neden olduğu görülmektedir. Ayrıca iki organizmanın çökelttiği kalsiyum karbonat miktarı kıyaslandığında aralarında göz ardı edilebilecek kadar az bir fark olduğu tespit edilmiştir (*P. favisporus* U3 için 6,79±0,01 g/L; *S. pasteurii* ATCC 6453 için 7,09±0,02 g/L). İstatistiksel analizlere göre *P. favisporus* U3 için farklı kalsiyum nitrat konsantrasyonları ve inkübasyon

zamanı açısından çökelen CaCO₃ miktarı farkı önemli (p<0,05) iken *S. pasteurii* ATCC 6453 için kalsiyum nitrat konsantrasyonları farkı önemli (p<0,05) ve inkübasyon zamanı farkı önemsiz (p>0,05) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.10 ve 4.11).

P. faavisporus U3 için her iki kalsiyum kaynaklarının ortamını kıyasladığımızda kalsiyum nitratlı ortamdaki hem gelişimin hem de çökelim miktarının (100 mM Ca-nitrat, 6,80 g/L) kalsiyum laktatlı ortama (100 mM Ca-laktat, 5,40 g/L) kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı kıyaslama *S. pasteurii* ATCC 6453 için yapıldığında U3'e benzer şekilde kalsiyum nitratlı ortamda kalsiyum laktatlı ortama göre CaCO₃ çökelim aktivitesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kalsiyum nitrat ilavesi ile iki bakteri de 1.günden itibaren kalsiyum karbonat biriktirmeye başlamıştır. Bizim çalışmamızın aksine, Xu ve diğerleri (2015) *S. pasteurii* ATCC 11859'nin bakteriyel CaCO₃ çökeliği üzerine kalsiyum laktatın kalsiyum nitrate kıyasla 2 kat daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Şüphesiz ki çalışmamızla aralarındaki bu fark kullanılan bakteri türü ve suş farklılığından kaynaklanmaktadır. Xu ve diğ. (2014) de iki organik kalsiyum kaynağını kıyaslamışlar ve Ca-glutamatlı ortamdaki çökelinin Ca-laktat içeren ortama göre daha yüksek olmasının Ca-glutamatın hem karbon hem de azot içermesinden dolayı bakteri gelişiminin daha iyi olmasıyla açıklamışlardır. Achal ve Pan (2014) tarafından yapılan çalışmada ise *Bacillus* sp. CR2'nin kalsiyum karbonat presipitasyonu üzerine CaCl₂ ile kalsiyum nitratın etkileri karşılaştırılmış ve CaCl₂'in daha etkili olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuç, literatür bilgisini doğrular niteliktedir.

Tablo 4.10: *Paenibacillus faavisporus* U3'ün kalsiyum karbonat çökeline Ca-nitratın etkisi (CaCO₃; g/L cinsinden; 100 mM üre, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, sıcaklık: 37 °C, inokulasyon: %10(3,75x10⁸ cfu/ml)).

Ca nitrat mM	1.gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	1,49±0,07 ^{Aa}	1,46±0,05 ^{Aa}	1,16±0,55 ^{Aa}	1,49±0,04 ^{Aa}	1,45±0,02 ^{Aa}
50	3,01±0,35 ^{Bab}	3,22±0,04 ^{Bab}	3,19±0,06 ^{Bab}	3,33±0,19 ^{Bb}	2,83±0,05 ^{Ba}
100	6,47±0,47 ^{Cb}	6,28±0,26 ^{Cb}	4,99±0,55 ^{Ca}	6,63±0,25 ^{Cb}	6,79±0,01 ^{Cb}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir kalsiyum nitrat konsantrasyonunda farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Tablo 4.11: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün kalsiyum karbonat çökeline Ca-nitratın etkisi (CaCO₃; g/L cinsinden; 333 mM üre, 25 mM NaHCO₃, pH:6,5, sıcaklık: 30 °C, inokulasyon: %10 (3,75x10⁸ cfu/ml)).

Ca nitrat mM	1.gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
25	0,05±0,01 ^{Ab}	0,03±0,01 ^{Aab}	0,02±0,00 ^{Aa}	0,19±0,02 ^{Ac}	0,04±0,01 ^{Aab}
50	3,34±0,02 ^{Bab}	3,30±0,03 ^{Bab}	3,26±0,03 ^{Bab}	3,40±0,11 ^{Bb}	3,24±0,04 ^{Ba}
100	6,42±0,93 ^{Ca}	7,09±0,02 ^{Ca}	6,80±0,11 ^{Ca}	6,78±0,09 ^{Ca}	6,74±0,15 ^{Ca}

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir kalsiyum nitrat konsantrasyonunda farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

4.1.6 İnokülasyon Oranının Etkisi

Çalışmamızın bu aşamasında da inokülasyon oranının kalsiyum çökeli üzerine etkisi araştırılmıştır. Önceki tüm deney setlerimizde inokülasyon oranımız %10 (3,75x10⁸ cfu/ml) olarak belirlenmiştir. Ancak kalsiyum karbonat çökeli hücre sayısının da önemi vardır. Hücreden açığa çıkan enzim miktarı, kalsiyum karbonat çökeli etkileyecektir. Bu amaçla %5 (1,88x10⁸ cfu/ml), %7,5 (2,81x10⁸ cfu/ml), %15 (5,63x10⁸ cfu/ml) ve %20 (7,50x10⁸ cfu/ml) inokülasyon oranında kalsiyum karbonat miktarlarının da test edilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.12'te verildiği üzere *Paenibacillus favisporus* U3 için maksimum çökeli %10 inokülasyon oranında olup (24,02±0,00 g/L), bu orandan daha yüksek inokülasyon miktarlarında dikkat çekici bir artış olmamıştır. %5 ve %7,5 inokülasyon oranlarında çökeli miktarının daha az olması, hücre sayısına bağlı olarak hücreden açığa çıkan enzim miktarıyla ilişkili olduğu söylenebilir. Ancak %15 ve %20 gibi daha yüksek hücre oranında kalsiyum karbonat miktarında bir artış beklenirken tam tersi bir durumun ortaya çıkması şaşırtıcı olmuştur. *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 suşunda en yüksek kalsiyum karbonat çökeli görüldüğü inokülasyon oranı %20 (37,19±1,99 g/L) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13). Sonuçlara bakıldığında, %10 inokülasyon oranına kadar inokülasyon oranı arttıkça çökeli aktivitesinde arttığı dikkati çekmektedir. Ancak, inokülasyon oranı %10'a ulaştığında ise CaCO₃ çökeli aktivitesinde tüm inkübasyon zamanlarında dramatik bir düşüş görülmektedir. İnokülasyon oranı %15 ve %20'ye çıktığında ise aralarında

dikkate değer bir fark olmamakla birlikte, bakterilerin %20 inoküle edildiği ortamda maksimum çökeltim meydana geldiği gözle çarpılmaktadır.

Tablo 4.12: *Paenibacillus faavisporus* U3'ün kalsiyum karbonat çökeltimine inokulasyon oranının etkisi (CaCO₃; g/L cinsinden; 100 mM üre, 25 mM NaHCO₃, 1000 mM CaCl₂, pH:6,5, sıcaklık: 37 °C).

İnokülasyon yüzdesi	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
%5*	2,27±0,32 ^{Aa}	2,34±0,21 ^{Aa}	1,57±0,52 ^{Aa}	3,98±0,84 ^{Ab}
%7,5*	2,14±0,06 ^{Ab}	2,95±0,49 ^{Abc}	1,07±0,24 ^{Aa}	3,15±0,40 ^{Ac}
%10*	12,16±4,38 ^{Bb}	5,15±0,42 ^{Ba}	7,34±0,16 ^{Bab}	24,02±0,00 ^{Dc}
%15*	1,93±0,14 ^{Ab}	2,19±0,01 ^{Ac}	1,52±0,06 ^{Aa}	18,42±0,00 ^{Cd}
%20*	2,47±0,00 ^{Ab}	2,62±0,38 ^{Ab}	1,27±0,00 ^{Aa}	11,42±0,00 ^{Bc}

* %5= 1,88x10⁸ cfu/ml, %7,5=2,81x10⁸ cfu/ml, %10=3,75x10⁸ cfu/ml, %15=5,63x10⁸ cfu/ml, %20=7,50x10⁸ cfu/ml)

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir inokülasyon oranında farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c,d}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Tablo 4.13: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 kalsiyum karbonat çökeltimine inokulasyon oranının etkisi (CaCO₃; g/L cinsinden; 333 mM üre, 25 mM NaHCO₃, 1000 mM CaCl₂, pH:6,5, sıcaklık: 30 °C).

İnokülasyon yüzdesi	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
%5*	17,01±0,16 ^{Ba}	21,68±0,11 ^{Ba}	24,70±7,20 ^{Ca}	24,18±2,51 ^{Ba}
%7,5*	25,15±1,70 ^{Ca}	28,10±0,9 ^{Ca}	25,54±3,69 ^{Ca}	27,18±1,31 ^{Ba}
%10*	9,35±0,69 ^{Ac}	4,78±0,10 ^{Aa}	7,99±0,56 ^{Ab}	17,07±0,35 ^{Ad}
%15*	30,18±1,39 ^{Da}	34,80±1,77 ^{Da}	30,70±5,18 ^{Da}	35,27±2,38 ^{Ca}
%20*	33,41±0,91 ^{Eb}	33,10±2,94 ^{Db}	14,85±0,21 ^{Ba}	37,19±1,99 ^{Cb}

* %5= 1,88x10⁸ cfu/ml, %7,5=2,81x10⁸ cfu/ml, %10=3,75x10⁸ cfu/ml, %15=5,63x10⁸ cfu/ml, %20=7,50x10⁸ cfu/ml)

Her bir inkübasyon zamanında farklı büyük harflerle gösterilenlerin (^{A,B,C,D,E}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir. Her bir inokülasyon oranında farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c}) CaCO₃ miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Hiç kuşkusuz CaCO₃ çökeltiminde farklı mekanizmalar etkilidir. İleriki çalışmalarla yerel izolatomuzun üreaz ve karbonik anhidraz enzimleri saflaştırılarak enzim aktivitesinin detaylı olarak incelenmesi, aktiviteyi etkileyen faktörlerin ve buna bağlı mekanizmaların aydınlatılması için gerekmektedir.

Üre hidrolizinin hücre sayısı ve hücreden açığa çıkan enzim aktivitesiyle ilişkili olması nedeniyle yüksek hücre konsantrasyonlarında kalsiyum karbonat miktarında artış olması beklenen bir durumdur. Nitekim literatürde benzer sonuçlar araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir. Örneğin, Okwadha ve Li (2010), hücre

konsantrasyonu 10^6 ile 10^8 arasında yüksek kalsiyum karbonat çökelimini rapor etmişlerdir. *S. pasteurii* DSM 33'ün en yüksek hücre konsantrasyonunda üre hidrolizine bağlı olarak ortam pH'sındaki artış bakteriyel çökeli mi de olumlu yönde etkilemektedir (Zehner ve diğ., 2021). *Sporosarcina pasteurii* ile yapılan benzer bir diğ er çalışmada ise OD_{600} 'e göre ayarlanmış üç farklı hücre konsantrasyonunun bakteriyel $CaCO_3$ çökeli mine etkisi araştırılmış ve hücre konsantrasyonu arttıkça daha yüksek aktivitenin daha kısa sürede gözlendiği bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2021). Kantzas ve diğ. (1992) ise içinde kum bulunan kolonlara farklı hacimlerde üreolitik bakteri eklemi ş ve kolondan geçen bakteri oranı arttıkça bakteriyel kalsiyum karbonat çökeli minin artışına bağlı olarak kolonlarda gözenekliliğ in ve geçirgenliğ in azaldığını tespit etmişlerdir. Ng ve diğ. (2012) da çalışmalarında ortamda artan bakteri konsantrasyonunun üre hidrolizini başlatan üreaz enzimi miktarını arttırdığı için bakteriyel kalsiyum karbonat çökeli minin maksimum düzeye ulaştığını belirtmişlerdir.

Tüm yapılan çalışmalar sonunda *P. favisporus* U3 bakterisi en iyi $CaCO_3$ üretimini 100 mM üre, 1000 mM $CaCl_2$, %10 inokulasyon, pH: 6,5 ve 37 °C'de 14 günlük inkübasyon sonunda gerçekleştirmiştir. Çalışmamızda *S. pasteurii* ATCC 6453'ün iyi bir üreaz ve karbonik anhidraz aktivitesi olduğu bilindiği için kontrol olarak ön optimizasyon ile kıyaslamak amaçlı yaptığımız denemelerde elde edilen deneysel parametrelerimiz Tablo 4.14'te toplu olarak verilmiştir.

Tablo 4.14: *Paenibacillus favisporus* U3 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün en iyi $CaCO_3$ çökeli mi yaptığı parametreler

	<i>P. favisporus</i> U3	<i>S. pasteurii</i> ATCC 6453
pH_{başlangıç}	6,5	6,5
pH_{son}	8,65	8,20
Nutrient broth (g/L)	3	3
NaHCO₃ (mM)	25	25
Urea (mM)	100	333
Sıcaklık (°C)	37	30
CaCl₂ (mM)	1000	1000
İnokulasyon oranı (%)	%10 ($3,75 \times 10^8$ cfu/ml)	%20 ($7,50 \times 10^8$ cfu/ml)
Gün	14	14
CaCO₃ Miktarı (g/L)	24,02	37,19

4.2 Amonyak Miktarının Belirlenmesi

Amonyak, üre hidrolizinin ilk basamağında açığa çıkmaktadır. Yani ortamda bulunan amonyak üreaz enzim aktivitesi hakkında ortam renginde meydana gelen değişimle bilgi vermektedir. Bu amaçla çalışmamızda ortamdaki amonyak azotunu belirlenmesi için uygulanan kolorimetrik ve spektroskopik bir yöntem olan Nesslerizasyon yöntemi kullanılmıştır (Standard methods, 2017).

Farklı besiyerlerinde *Paenibacillus favisporus* U3'ün CaCO₃ çökelişi sırasında açığa çıkan amonyak azotunun mg/L cinsinden değerleri Tablo 4.15'te verilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, ortamdaki üreaz enziminin varlığını kanıtlar niteliktedir. Ancak EDTA titrimetrik yöntemi ile belirlenen ortamdaki çökelen kalsiyum karbonat miktarı ile aralarında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Ayrıca elde edilen istatistikî sonuçlara göre inkübasyon zamanlarında amonyum miktarındaki fark önemli ($p < 0,05$) ve farklı besiyerlerindeki amonyum miktarındaki fark önemsiz ($p > 0,05$) olarak bulunmuştur (Tablo 4.15). Literatürde doğal taş atıklarının mikrobiyal indüklü kalsit üretimi üzerine yapılmış bir çalışmada *S. pasteurii* bakterisinin üreaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde nesslerizasyon metodu kullanıldığı görülmektedir. Araştırmacılar çalışma sonucunu üreaz aktivitesini ile meydana gelen turuncu renk ile belirtmişlerdir (Günsür, 2018).

Tablo 4.15: Farklı besiyerlerinde *Paenibacillus favisporus* U3'ün kalsiyum karbonat çökelişi sırasında açığa çıkan amonyum miktarı (mg/L)

	Kalsiyum mineralizasyon ortamı	Luria Bertani+100 mM üre
6.saat	5,29±0,07 ^{cd}	5,63±0,11 ^{cd}
12.saat	5,34±0,11 ^c	5,60±0,39 ^c
24.saat	5,38±0,06 ^d	5,62±0,20 ^d
2.gün	5,26±0,23 ^{cd}	5,51±0,05 ^{cd}
3.gün	5,30±0,18 ^d	5,64±0,16 ^d
4.gün	5,52±0,06 ^{cd}	5,49±0,11 ^{cd}
5.gün	5,31±0,15 ^{cd}	5,52±0,18 ^{cd}
7.gün	5,49±0,34 ^b	.*
10.gün	5,04±0,13 ^{cd}	5,52±0,07 ^{cd}
14.gün	4,41±0,09 ^a	.*

*: Veri alınmamıştır

Her bir inokülasyon zamanında farklı küçük harflerle gösterilenlerin (^{a,b,c,d}) amonyum miktarları arasındaki farklar önemlidir.

Lauchnor ve diğ. (2013) tarafından yapılan çalışmada *S. pasteurii* ATCC 11859 suşunun gerçekleştirdiği CaCO₃ çökeli mi sırasında açığa çıkan amonyak azotu miktarının artan pH ile doğru orantılı şekilde gerçekleşen artışı nessler metodu ile kanıtlanmıştır.

4.3 Enzim Analizleri

Bakteriyel kalsiyum karbonat çökeli mine üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin katıldığı bilinmektedir. Ancak enzimlerin bu süreçte üstlendiği görevler oldukça farklıdır. Üreaz enzimi, alkali ortamda üreyi amonyak ve karbonata hidroliz ederken, karbonik anhidraz enzimi ise CO₂'in geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizler (bknz Şekil 2. 4). CaCO₃ çökeli m sürecine katılan çok sayıda parametre olsa da bu enzimlerin aktivitesi ve hızının anlaşılması belli bir seviyede presipitasyonla ilgili bizlere bazı bilgiler verecektir.

4.3.1 Üreaz ve Karbonik Anhidraz Enzim Aktiviteleri

Çalışmamızda yerel izolatımız *Paenibacillus favisporus* U3 ve kontrol olarak kullanılan *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün farklı besiyerlerinde (LB-üre, LB-üre-opt, standart KMO ve KMO-opt.) enzim aktiviteleri incelenmiştir. U3'ün üreaz enzim aktivitesi, standart KMO ortamında 0,95±0,14 µmol/dk/mg protein ve optimizasyon çalışmalarımız sonunda optimize parametrelerin olduğu KMO-opt.'da ise 77,47± 0,0 µmol/dk/mg protein olarak hesaplanmıştır. Karbonik anhidraz enzim aktivitesi standart KMO ortamında 28,34±7,21 nmol/dk/mg protein iken 7,18±1,95 nmol/dk/mg proteindir. Üreaz enzimi aktivitesi, standart KMO'ya kıyasla KMO-opt. ortamında yaklaşık 80 kat daha yüksek iken, karbonik anhidraz enziminde optimizasyon şartlarında 4 kat azalması dikkat çekicidir (Tablo 4.16). Ayrıca *P. favisporus* U3 ve *S. pasteurii* ATCC 6453 bakterileri için yapılan istatistik analizi sonuçlarına göre farklı besiyerlerinde her iki enzimin aktivitelerinin farkları önemli (p<0,05) olarak bulunmuştur. Bu sonuç bize her iki enzimin de optimizasyonunun daha detaylı olarak yapılması gerektiğini düşündürmüştür. Bununla birlikte *P.*

favisporus U3 bakterisinin üreaz enzim aktivitesindeki artış, CaCO₃ çökelim miktarını doğrular niteliktedir.

Tablo 4.16: *Paenibacillus favisporus* U3 ve *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterilerinin üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri

	Üreaz (µmol/dk/mg)	Karbonik anhidraz (nmol/dk/mg)
<i>Paenibacillus favisporus</i> U3		
LB+üre*	0,25±0,01 ^a	20,76±4,38 ^B
KMO*	0,95±0,14 ^b	28,34±7,21 ^C
LB+üre opt**	20,70±0,14 ^c	4,41±0,50 ^A
KMO opt**	77,47±0,14 ^d	7,18±1,95 ^A
<i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453		
LB+üre***	5,36±0,14 ^a	61,9±8,06 ^B
KMO***	24,98±7,07 ^b	112,9±13,29 ^C

*LB+üre: Luria bertani, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 333 mM ure, %10 (3,75x10⁸ cfu/ml) inokülasyon, 37 °C, pH 6,5; KMO: Nutrient broth, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 333 mM ure, %10 (3,75x10⁸ cfu/ml) inokülasyon, 37 °C, pH 6,5.

** LBüre opt: Luria bertani, 1000 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 100 mM ure, %10 (3,75x10⁸ cfu/ml) inokülasyon, 37 °C, pH 6,5; KMO opt: Nutrient broth, 1000 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 100 mM ure, %10 inokülasyon, 37 °C, pH 6,5.

*** LB+üre: Luria bertani, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 333 mM ure, %20 (7,50x10⁸ cfu/ml) inokülasyon, 30 °C, pH 6,5; KMO: Nutrient broth, 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 333 mM ure, %20 (7,50x10⁸ cfu/ml) inokülasyon, 30 °C, pH 6,5.

Her bir besiyerinde farklı küçük harflerle gösterilenlerin (a,b,c,d) üreaz enzim aktiviteleri arasındaki farklar önemlidir.

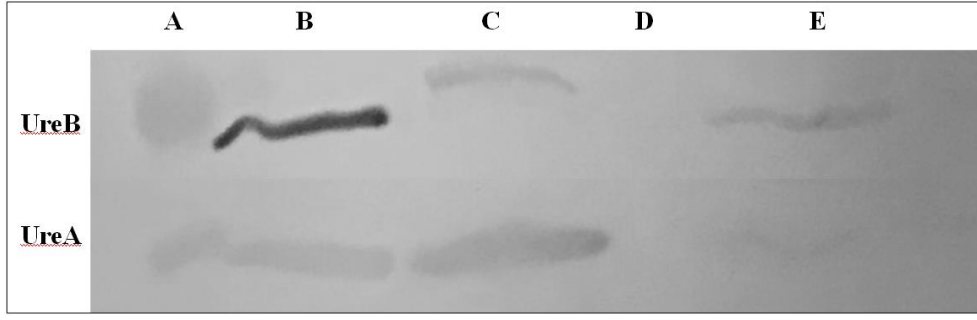
Her bir besiyerinde farklı küçük harflerle gösterilenlerin (A,B,C) karbonik anhidraz enzim aktiviteleri arasındaki farklar önemlidir.

Literatürde yüksek enzim aktivitesine sahip *Bacillus* ve *Pseudomonas* da dahil olmak üzere birçok bakteri suşunun yüksek CaCO₃ çökmesi yaptığı ifade edilmiştir (Dhami ve diğ., 2014; Priya ve Kannan, 2017). Örneğin Omoregie ve diğ. (2017), kireçtaşı mağaralarından izole edilen bakterilerin yüksek üreaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. *Streptomyces* spp. ile yapılmış bir yüksek lisans tezinde üreaz pozitif üç izolatanın üreaz enzim aktiviteleri ölçülmüş ve 1,712-2,323 U/ml aralığında sonuç alınmıştır (Azarno, 2013). Laboratuvarımızda *B. amiloliquefaciens* U17 suşuyla yapılmış çalışmada üreaz enzim aktivitesi LB+üre ortamında 1,315 ve KMO ortamında 0,615 µmol/dk/mg olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada karbonik anhidraz enzim aktiviteleri ise LB+üre ortamında 28,82 ve KMO ortamında 36,03 nmol/dk/mg olarak rapor edilmiştir (Tepe ve diğ., 2019).

Bilindiği gibi besiyeri içeriği, sıcaklık, pH, süre ve bakteri türü gibi birçok faktör tarafından enzim aktivitesi düzenlenmektedir. *S. pasteurii* ATCC 6453 kontrol olarak kullanılmış ve her iki enzimin de aktivitesi çalışılmıştır (Tablo 4.16). KMO besiyerinde üreaz aktivitesi $24,98 \pm 7,07$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein iken aynı besiyerinde karbonik anhidraz aktivitesi $112,9 \pm 13,29$ nmol/dk/mg proteindir. Yerel izolatımız olan *P. favisporus* U3'ün aksine *S. pasteurii* ATCC 6453'ün karbonik anhidraz aktivitesi üreaz enzim aktivitesine kıyasla daha yüksektir. Şu bir gerçektir ki üreaz enzimi tek başına bu biyolojik süreçte etkili değildir. Elde edilen bu sonuç, kalsiyum karbonat presipitasyonunda üreaz dışında karbonik anhidrazın da sanıldığından daha etkili olduğu, her iki enzimin de aktivitelerinin bakteri türüne göre değiştiğinin bir kanıtıdır. Hiç kuşkusuz etkili bir CaCO_3 çökelişi için tüm şartların optimize edilmesi hem zor hem de zaman alıcıdır. Ancak her iki enzimin indüksiyonunun altında yatan mekanizmaları çözmek için daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

4.3.2 Western Blot Analizi

Kalsiyum karbonat çökelişi yapan bakterilere bu süreçte üreaz ve karbonik anhidraz enzimleri yardımcı olmaktadır. Özellikle üreaz enziminin bu süreçteki rolü çok önemlidir. Üreaz enzimi alkali ortamda amonyum ve karbonatı hidroliz ederek kalsiyum karbonat oluşumuna katkı sağlamaktadır. Üreaz 480-500 kDa molekül ağırlığına sahip nikel içeren bir heksamerik metaloenzimdir. Bu enzim iki alt üniteden oluşmaktadır. Bu alt ünitelerden UreB 61 kDa ve UreA 26,5 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Turbett ve diğ., 1992; Mobley ve diğ., 2001). Çalışmada *P. favisporus* U3 (KMO, LB üre, KMO+LB üre, LB optimum) ve *S. pasteurii* ATCC 6453 (KMO, LB üre) farklı besiyerlerinde üreaz protein seviyesi, immünokimyasal olarak western blot ile belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada anti-*Helicobacter pylori* ureaz B antikoru kullanılmıştır.



Şekil 4.2: Üreaz protein profili. (A: protein marker, B: *Paenibacillus favisporus* U3-KMO, C: *Paenibacillus favisporus* U3-LB üre, D: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453-KMO, E: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453-LB üre)



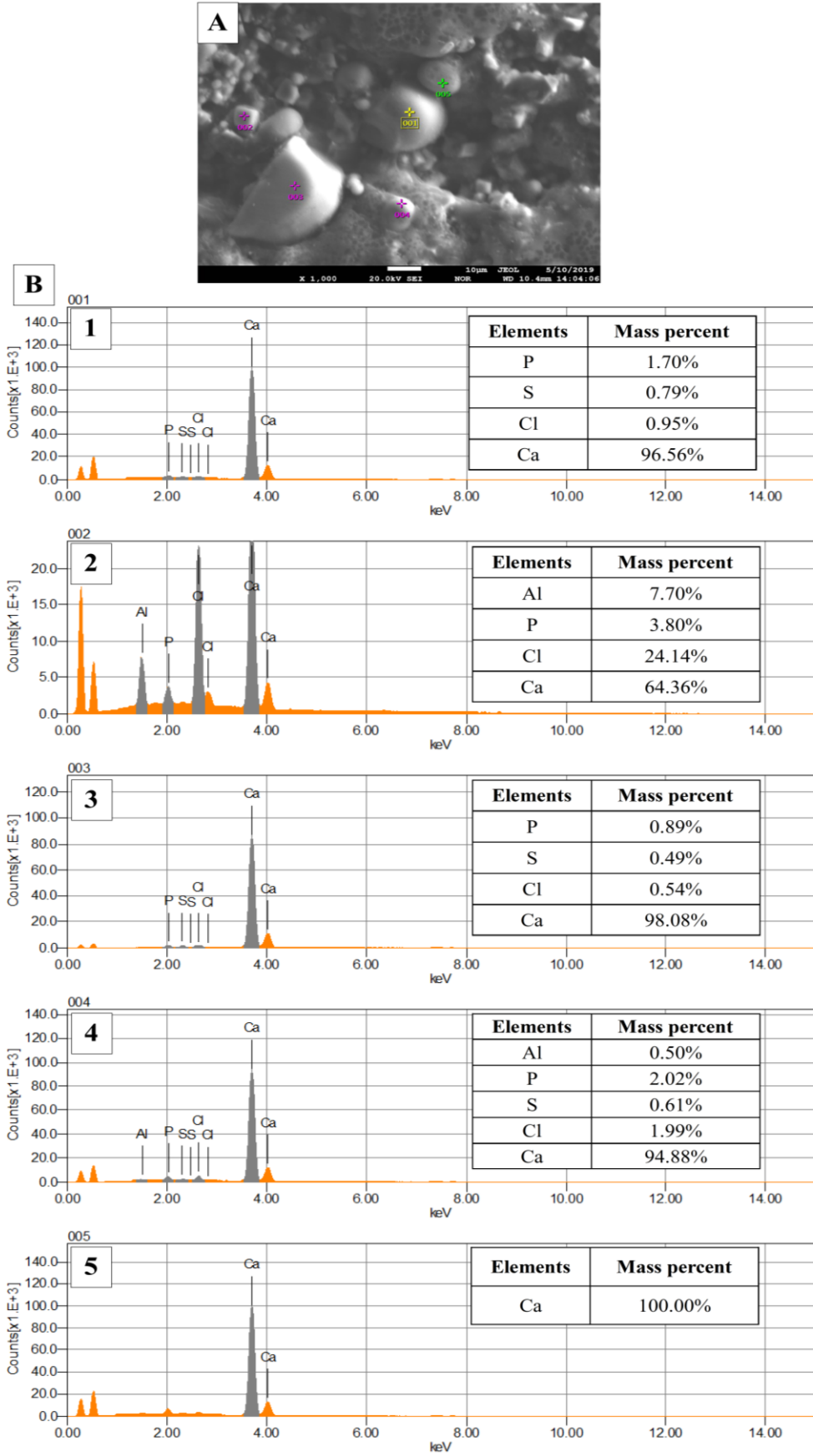
Şekil 4.3: Üreaz protein profili (UreB) (A: protein marker, B: *Paenibacillus favisporus* U3 LB üre, C: *Paenibacillus favisporus* U3 KMO-LB urea, D: *Paenibacillus favisporus* U3 LB optimum, E: *Paenibacillus favisporus* U3 KMO)

Şekil 4.2 ve 4.3'te verilen analiz sonuçlarına bakıldığında hem *Paenibacillus favisporus* U3 hem de *S. pasteurii* ATCC 6453'e ait örneklerde 26,5 kDa molekül ağırlığına sahip UreA alt ünitesi ve 61 kDa molekül ağırlığındaki UreB alt ünitelerine ait bantlar gözlenmektedir. Şekil 4.3'de ise *P. favisporus* U3'e ait 4 farklı ortandan (KMO, LB üre, KMO+LB üre, LB optimum) elde edilmiş üreaz enziminin UreA alt ünitesinin bantları görülmektedir. Literatürdeki diğer mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi çalışmalarına bakıldığında sadece bir tane western blot analizi ile üreaz enzim profilinin belirlendiği görülmektedir. Tepe ve diğ. (2019) tarafından yapılmış bu çalışma laboratuvarımızda gerçekleştirilmiş olup *B. amyloliquefaciens* U17 bakterisinin üreaz enzim profili belirlenmiştir. Bu çalışmada, KMO-opt. besiyerinde geliştirilen U3 hücrelerinin ATCC 6453'e kıyasla immünoreaktif üreaz bandının boyanma yoğunluğunda bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu da optimizasyonumuzun doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Ayrıca literatürde bakteriyel kalsiyum karbonat çökelişinde üreaz enziminin profilini western blot analizi ile ikinci kez bizim çalışmamızla açıklanmaktadır. *P. favisporus* türüne ait ise literatürdeki ilk çalışmadır.

4.4 Mineralojik Analizler

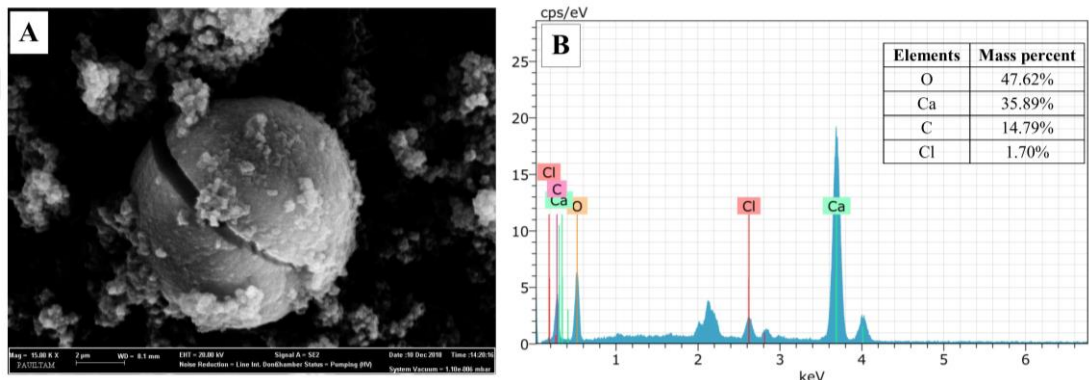
Mineral tipi ve morfolojileri, bakteri tipi, türü ve cinsine göre değişkenlik göstermektedir (Hammes ve diğ., 2003). Doğada en yaygın olan mineral tipleri aragonit, kalsit ve vaterittir. Doğal çevrelerde ve laboratuvar şartlarında bakteriler tarafından yaygın olarak sentezlenen vaterit, kalsit oluşumunda geçiş formudur. Kalsit minerali ise CaCO_3 'ün stabil halidir (Tourney ve Ngwenya, 2009, Wang ve Becker, 2009). Bakteri gelişiminin ilk günlerinde bakteriler yoğun olarak vaterit üretmekte ve ilerleyen inkübasyon günlerinde bu mineralin yerini kalsit almaktadır (Bozbeyoglu ve diğ., 2020). Mikroorganizmaların türlerine göre de baskın kristal tipleri farklılık göstermektedir. Örneğin, *Desulfocella halophila*'da aragonit baskın kristal tipi (Rivadeneira ve diğ., 1996) iken *Bacillus amyloliquefaciens* U17'de hem vaterit hem de kalsit kristalleri (Tepe ve diğ., 2019) bulunmuştur. Kristal oluşumundaki morfolojik farklılıkların üreaz aktivitesindeki farklılıklar nedeniyle suya özgü olabildiği gibi bakterilerin gelişme ortamı veya içeriği de kristal tipini etkilemektedir (Akyol ve diğ., 2017; Tepe ve diğ., 2019). Örneğin *Proteus mirabilis*'in ürettiği CaCO_3 içi boş küre şeklindedir (Chen ve diğ., 2009). Kalsiyum asetat marul benzeri veya lamellar şeklinde vateriti indüklerken, kalsiyum laktat ve kalsiyum glukonat küresel formda vaterit oluşturmaktadır (Tai ve Chen, 1998).

Yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında, çalışmamızdan elde edilen iki türe ait bakteriyel çökeltilerin hem kalsiyum karbonat olup olmadığı hem de mineral tipinin ne olduğunun anlaşılması amacıyla mineralojik analizler yapılmıştır. Bu amaçla, *P. favisporus* U3 ve *S. pasteurii* ATCC 6453 tarafından çökelim sonrasında elde edilen bakteriyel çökeltiler liyofilize edilmiş ve XRD, XRF, CRS ve SEM ile analiz edilmiştir. Her iki bakterinin maksimum kalsiyum karbonat çökelimi yaptığı şartlarda elde edilen SEM görüntüleri, EDX ve EPMA analiz sonuçları Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da görülmektedir. Bu sonuçlara göre U3 izolatu kalsiyum karbonatın tabakalaşmış katmanlar halinde kalsit ve küresel biçimdeki vaterit formlarını oluşturduğu görülürken (Şekil 4.4 ve 4.5), *S. pasteurii* ATCC 6453'ün ürettiği CaCO_3 'ün rhombohedral yapıda vaterit karakterinde olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.6). Her iki bakteride de EDX ve EPMA analizlerinde belirlenen elementler ve kütlece yüzdeleri incelendiğinde Ca elementinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Özellikle *P. favisporus* U3 ile yapılan kalsiyum karbonat çökelimi

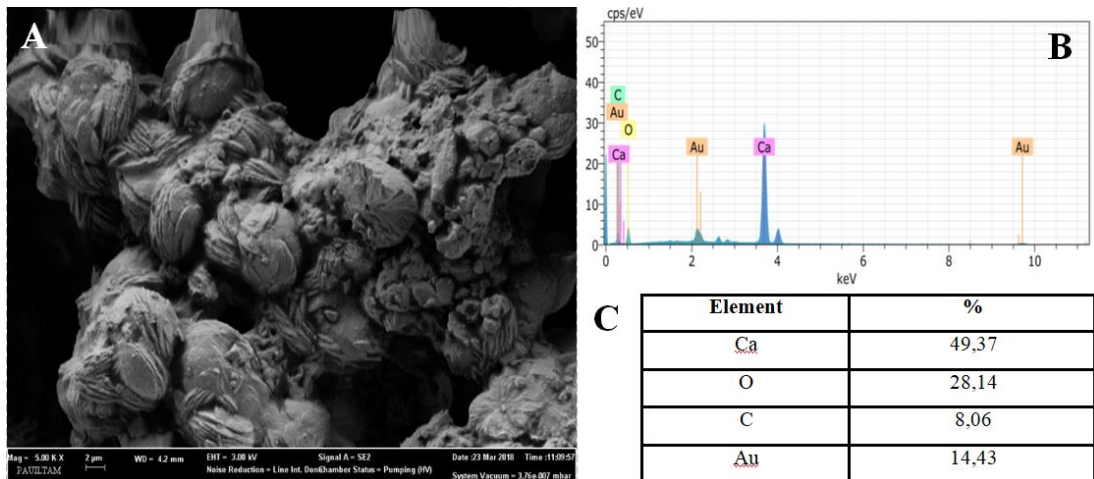


Şekil 4.4: *Paenibacillus favisporus* U3'ün SEM-EPMA analizi (1000 mM CaCl₂, 100 mM üre, pH 6,5, 37 °C, inokülasyon %10) (A: SEM görüntüsü; B: Element analizi ve kütlece yüzdeleri)

çalışmasında ortamda 1000 mM gibi yüksek CaCl_2 olmasına rağmen, EPMA analizlerinde ya iz miktarda klor (Cl) varlığı ya da klora hiç rastlanmaması deneysel çalışmalarımız için oldukça önemli bir veridir. Çünkü mineralojik analizler, sadece U3 izolatının ürettiği bakteriyel çökeltinin kalsiyum karbonat olduğunu kanıtlamamış aynı zaman da yerel izolatımızın 1000 mM CaCl_2 'i tolere edebildiğini ve yüksek konsantrasyonda dahi enzim aktivitesi göstererek bakteriyel CaCO_3 çökeltimi yapma yeteneğine sahip olduğunu da doğrulamıştır. Literatürdeki yerel izolatlarla kıyaslandığında *P. favisporus* U3 izolatı üstün özellikte olup bakteriyel biyoçimento alanında geliştirilebilir bir potansiyele sahiptir (Bozbeyoglu ve diğ., 2021).



Şekil 4.5: *Paenibacillus favisporus* U3 tarafından üretilen CaCO_3 'ün SEM-EDX analizi (1000 mM CaCl_2 , 100 mM üre, pH 6,5, 37 °C, inokülasyon %10) (A: SEM görüntüsü; B: Element analizi ve kütlece yüzdeleri)



Şekil 4.6: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 tarafından üretilen CaCO_3 'ün FESEM-EDX analizi (A: SEM görüntüsü; B: Element analizi, C: kütlece yüzdeleri) (1000 mM CaCl_2 , 333 mM üre, pH 6,5, 30 °C, inokülasyon %10)

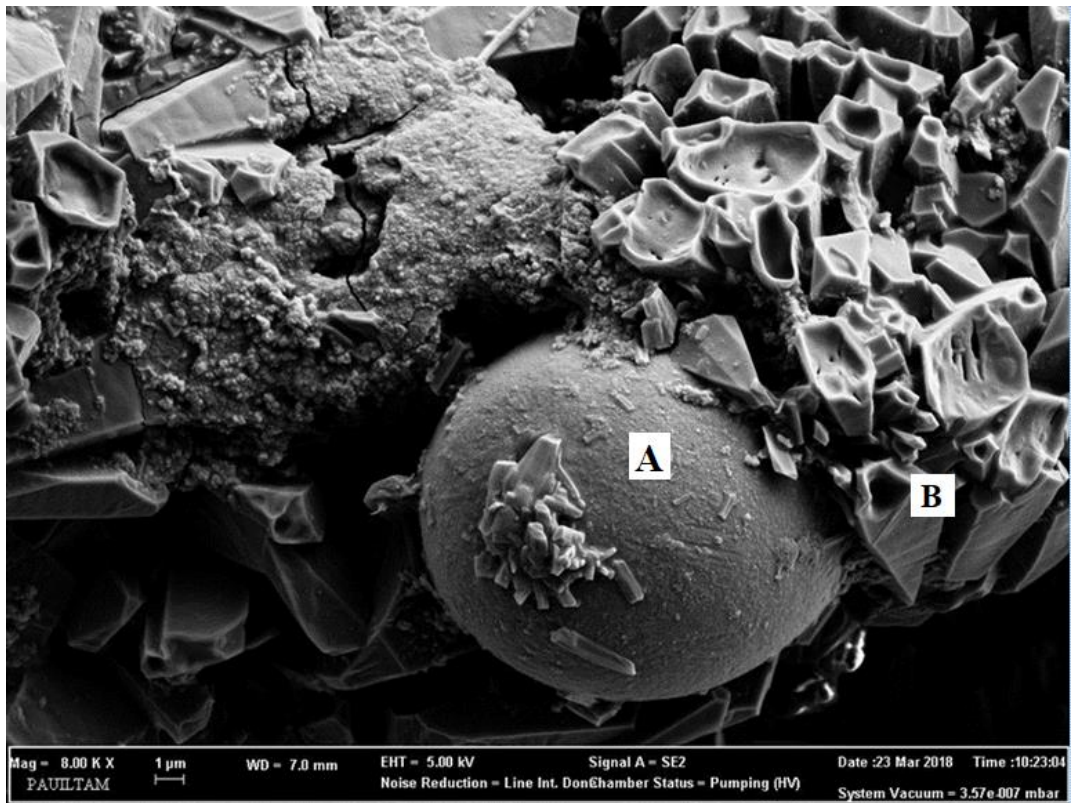
S. pasteurii ATCC 6453'ten elde edilen bakteriyel kalsiyum karbonatın SEM analizinde, kalsit mineralleri üzerinde EPS ile kaplanmış ve fosilleşmiş bakteri hücreleri (Pa 1: 2,129 μm , Pa 2: 527,7 nm) görülmektedir (Şekil 4.7).



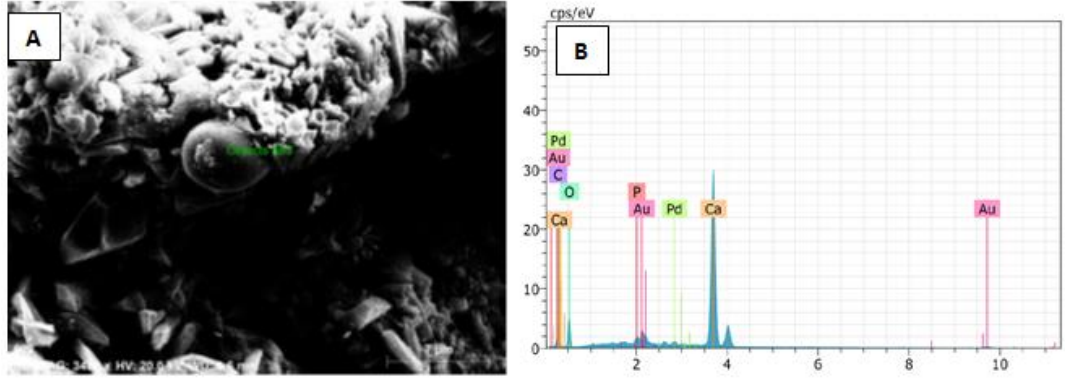
Şekil 4.7: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün SEM görüntüsü (ortam şartları: 10. gün, %20 inokülasyon, 333 mM üre, 250 mM kalsiyum laktat, 30 °C, pH 6.5) (A: fosilleşmiş *S. pasteurii* ATCC 6453; B: kalsit minerali)

100 mM Ca laktat içeren ortam şartları 5. gün, %10 inokülasyon, 100 mM üre, 37 °C, pH 6,5 olan U3 bakterisine ait SEM görüntüsünde kalsiyum karbonatın rhombohedral yapıdaki kalsit ve küresel yapıdaki vaterit formları birlikte görülmüştür (Şekil 4.8 ve 4.9). Yine yerel izolatımız U3'ün Ca-nitrat içeren ortamda ürettiği CaCO_3 'ün SEM-EDX analizi yapılmış ve rhombohedral yapıdaki vaterit formlarının varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10). U3'ün CaCO_3 çökelişi üzerine etkisi çalışılmış her üç kalsiyum kaynağı kıyaslandığında CaCl_2 ve Ca-laktat içeren ortamlarda kalsiyum karbonatın hem vaterit hem de kalsit formları gözlenirken, Ca-nitrat içeren ortamda sadece vaterit formu olduğu dikkati çekmektedir. Bu sonuç bize ortamdaki kalsiyum kaynağının oluşacak kalsiyum karbonat kristali formunu etkilediğini kanıtlamaktadır.

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeliminde oluşan minerallerin karakterizasyonu ile ilgili yapılan literatür taramasında araştırmacıların XRD ve SEM analizlerine başvurduğu görölmüştür. Örn; Tourney ve Ngwenya (2009) tarafından *Bacillus licheniformis* S-86 suşu ile yapılan bakteriyel kalsiyum karbonat çökeli mi çalışmasında örnekler SEM ve XRD ile analiz edilmiş EPS, vaterit ve kalsit mineral tipi tespit edilmiştir. Achal ve Pan (2014) adlı araştırmacıların *Bacillus* sp. CR2 bakterisiyle yaptıkları mikrobiyal indüklü kalsiyum karbonat çökeli mi çalışmasında da XRD ve SEM analizleri sonucunda kalsit ve vaterit dışında bir kalsiyum karbonat formu olan aragonit oluşumu da rapor edilmiştir.

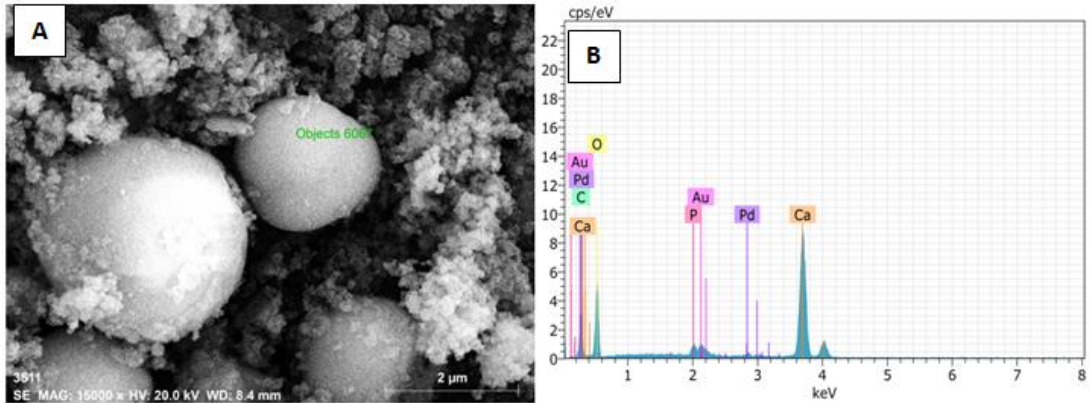


şekil 4.8: *Paenibacillus favisporus* U3'ün Ca-laktat içeren ortamda SEM görüntüsü (ortam şartları: 5. gün, %10 inokülasyon, 100 mM üre, 100 mM kalsiyum laktat, 37 °C, pH 6,5) (A: vaterit; B: kalsit)



Element	Mass percent
P	0,80%
C	7,93%
O	32,52%
Ca	49,63%
Au	7,80%
Pd	1,32%

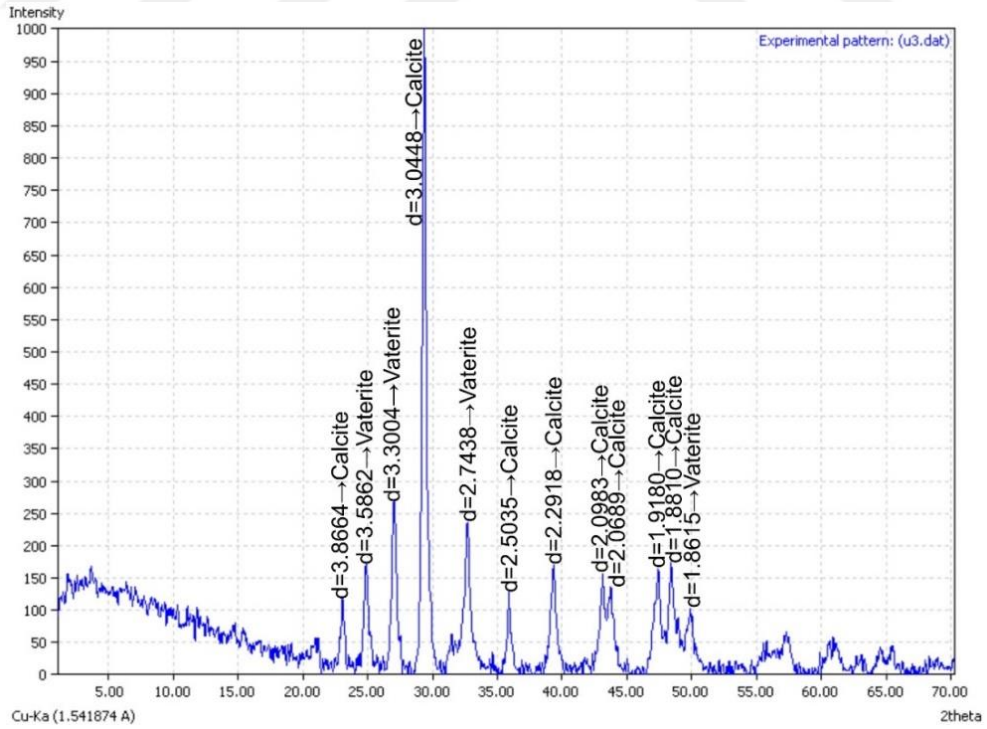
Şekil 4.9: *Paenibacillus faavisporus* U3'ün Ca-laktat içeren ortamda SEM-EDX analizi (ortam şartları: 5. gün, %10 inokülasyon, 100 mM üre, 100 mM kalsiyum laktat, 37 °C, pH 6,5) (A: SEM görüntüsü; B: Element analizi; C: Elementlerin kütlece yüzdeleri)



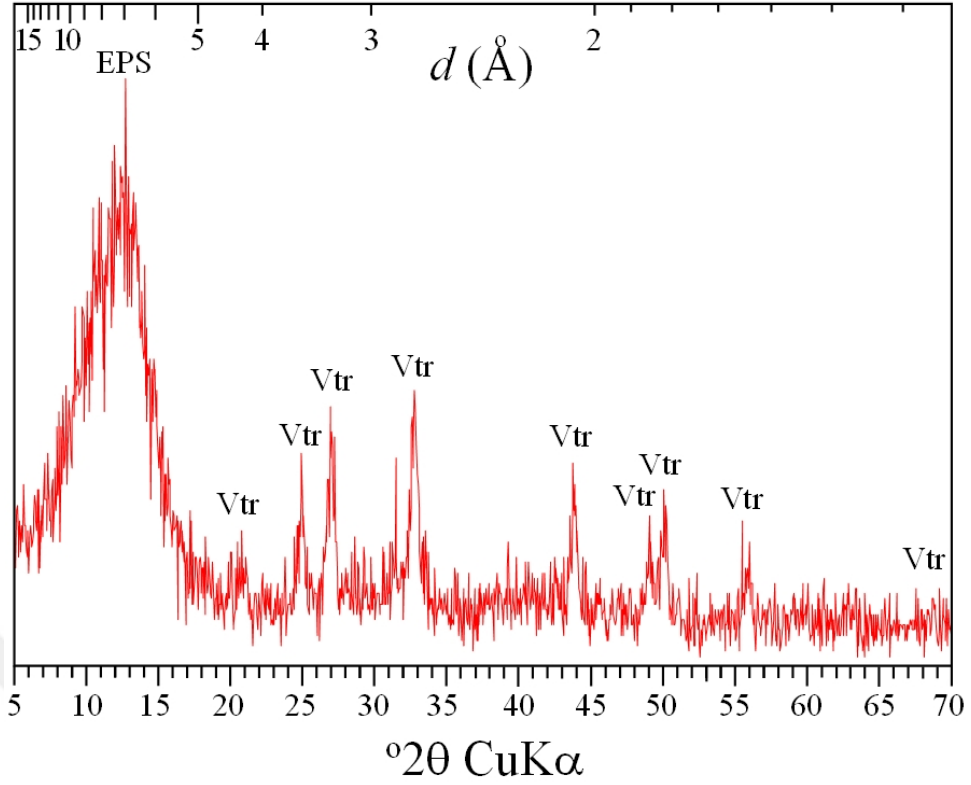
Element	Mass percent
P	1,28%
C	9,41%
O	51,75%
Ca	30,92%
Au	5,97%
Pd	0,67%

Şekil 4.10: *Paenibacillus faavisporus* U3'ün Ca-nitrat içeren ortamda SEM-EDX analizi (ortam şartları: 5. gün, %10 inokülasyon, 100 mM üre, 100 mM kalsiyum nitrat, 37 °C, pH 6,5) (A: SEM görüntüsü; B: Element analizi; C: Elementlerin kütlece yüzdeleri)

Kalsiyum karbonatın kristal yapısının aydınlatılmasında kullanılan ve literatürde sık rastlanan analizlerden biri de XRD analizidir. Bu sebeple biz de çalışmamızda YEBİM ve PAÜ-İLTAM araştırma merkezlerinde her iki bakterinin optimum şartlarda üretmiş olduğu kalsiyum karbonatın XRD analizlerini gerçekleştirdik. Elde edilen veriler SEM analizlerini destekler niteliktedir. Yani *P. favisporus* U3'ün ürettiği CaCO_3 kalsit ve vaterit içerirken, *S. pasteurii* ATCC 6453'ün ürettiği CaCO_3 vaterit yapısındadır (Şekil 4.11 ve 4.12). Literatürde rastlanan diğer XRD analizlerinde çalışılan bakteri türlerine bağlı olarak değişen kalsiyum karbonat formlarının yapısı belirlenmiştir. Örneğin, *Synechococcus leopoliensis* PCC 7942'in ürettiği CaCO_3 kristallerinin aragonit olduğu XRD analizleriyle belirlenmiştir (Obst ve diğ., 2009). *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* ve *L. fusiformis* ile yapılan CaCO_3 çökelişi çalışmasında, XRD analizine göre *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* türlerinin hem kalsit hem de vaterit oluşturduğu, *L. fusiformis*'in ise sadece vaterit ürettiği tespit edilmiştir (Kaur ve diğ., 2013). Önceki çalışmamızda da *B. aerius* U2 suşunun kalsit ve vaterit mineral tipi, *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453'ün ise sadece vaterit oluşturduğu XRD analizi ile gösterilmiştir (Bozbeyoğlu ve diğ., 2019).



Şekil 4.11: *Paenibacillus favisporus* U3 tarafından üretilen CaCO_3 'ün XRD profili (1000 mM CaCl_2 , 100 mM üre, 25 mM NaHCO_3 , pH 6,5, 37 °C, inokülasyon %10)



Şekil 4.12: *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 tarafından üretilen CaCO_3 'ün XRD profili (1000 mM CaCl_2 , 333 mM üre, 25 mM NaHCO_3 , pH 6,5, 30 °C, inokülasyon %20)

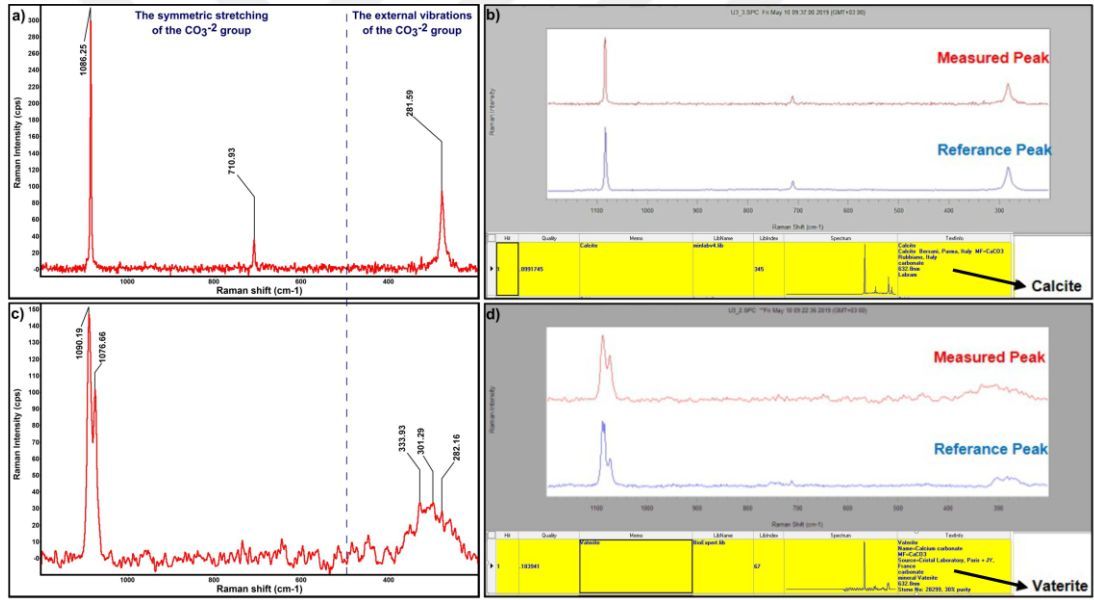
Maddelerin elemental yapısının belirlenmesinde en çok yararlanılan yöntemlerden olan XRF, kristalin CaCO_3 için de kullanılmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda Spectro marka X-LAB 2000 model Polarize Enerji Dispersif X Işınları Floresans Spektrometresi (PED-XRF) ile XRF analizi Ankara-YEBİM'de yapılmıştır. XRF analizine göre U3 tarafından üretilen CaCO_3 'teki Ca (%36,35), Cl (%4,5), Si (%0,21), Zn (44,3 ppm), Sr (41,1 ppm), Ba (18,2 ppm), Ce (22 ppm), La (11 ppm) ve U (10,4 ppm) elementleri diğer elementlere kıyasla daha fazladır (Tablo 4.17). *Sporosarcina pasteurii* ATCC 6453 bakterisinin oluşturduğu çökeltide yapılan XRF analizinde %11,80 Ca elementine rastlanılmıştır (Arpajirakul ve diğ., 2019). Benzer şekilde üreolitik *Bacillus amyloliquefaciens* U17 bakterisinin ürettiği çökeltinin XRF analizi ile yüksek oranda Ca (%29,25) tespit edilmiştir (Tepe ve diğ., 2019).

Tablo 4.17: *Paenibacillus favisporus* U3'ün ürettiği CaCO₃'ün element analizi (1000 mM CaCl₂, 100 mM üre, 25 mM NaHCO₃, pH 6,5, 37 °C, inokülasyon %10)

Element	Yoğunluk (%)	Element	Yoğunluk (ppm)	Element	Yoğunluk (ppm)
Na	0,11	Cu	1,8	Sb	1,3
Mg	0,017	Zn	44,3	Te	1,7
Al	0,0822	Ga	1,1	I	2,9
Si	0,2121	Ge	0,5	Cs	5,3
P	0,999	As	0,4	Ba	18,2
S	0,1115	Se	0,3	La	11
Cl	4,526	Br	2,4	Ce	22
K	0,1104	Rb	0,8	Hf	3,9
Ca	36,35	Sr	41,1	Ta	2,5
Ti	0,0137	Y	0,4	W	2,3
V	0,00093	Zr	4,9	Hg	1,7
Cr	0,0028	Nb	3,6	Tl	1,9
Mn	0,00163	Mo	3,3	Pb	2,9
Fe	0,01689	Cd	1,1	Bi	0,6
Co	7,1 ppm	In	1,1	Th	2,1
Ni	1,3 ppm	Sn	1,3	U	10,4

Sulu çözeltiler, tek kristaller ve/veya polimerlerin yapısının karakterizasyonuna imkân veren konfokal raman spektrometresi (CRS) ile CaCO₃'ün da analizi mümkündür. Bu amaçla yerel izolatomuz U3 tarafından üretilen numunenin CRS analizi yapılmış ve Raman kaymalarına göre hem vaterit hem de kalsit pikleri görülmüştür (Şekil 4.13). Kalsit piklerinde, 1086 cm⁻¹, 710 cm⁻¹ ve 281 cm⁻¹ olmak üzere üç önemli Raman kayması göstermiştir (Şekil 4.13a) ve bu Raman kaymaları, veri tabanındaki kalsitin Raman değerleri ile uyumludur (Şekil 4.13b). Vaterit ise, 1090–1076 cm⁻¹ ve 333–301–282 cm⁻¹'de Raman kaymaları göstermiştir (Şekil 4.13c). Bu vaterit spektrumu, referans spektrum ile eşleştirilmiştir (Şekil 4.13d). Literatüre bakıldığında kalsitin, simetrik gerilme titreşiminin özelliği olan 1086 cm⁻¹'de tek bir banda sahip olduğu, vateritin 1090 ve 1076 cm⁻¹'de ikiz bantlara sahip olduğu görülmüştür (Sun ve diğ., 2014). 710 cm⁻¹'deki Raman kaymasının ise,

bozulmamış CO_3^{2-} grupları için iki kat dejenere olan düzlem içi bükme modundan kaynaklandığı belirtilmiştir (Sun ve diğ., 2014). 281 cm^{-1} kalsit bandındaki Raman kayması, bu grupların rotatif ve translasyon salınımlarını oluşturan CO_3^{2-} grubunun dış titreşimlerinden kaynaklanmıştır (Gunasekaran ve diğ., 2006; Sun ve diğ., 2014). Yaklaşık $282\text{--}333 \text{ cm}^{-1}$ 'deki Raman kaymalarının nedeni ise, katyon ve anyonik gruplar arasındaki göreceli ötelemelerden kaynaklanmaktadır (Gunasekaran ve diğ., 2007a; Gunasekaran ve diğ., 2007b; Sun ve diğ., 2014). Kalsit ve dolomit arasındaki Raman kayması farklılıkları da yapısal varyasyonları ile ilgili olup, kalsit trigonal bir yapıya sahipken, vaterit altıgen bir yapıya sahiptir. Vateritte 1176 cm^{-1} 'deki Raman kayması, silisin varlığından dolayı $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$ 'nin gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Sun ve diğ., 2014). Bu silika içeriği, *P. favisporus* U3 tarafından üretilen CaCO_3 'ün XRF sonuçlarında da görülmüştür.



Şekil 4.13: *Paenibacillus favisporus* U3 tarafından üretilen CaCO_3 'ün Konfokal Raman Spektroskopisi (CRS) analizi (a) Kalsitin CRS spektrumu, (b) kalsitin referans spektrumu ile karşılaştırması, (c) vateritin CRS spektrumu, (d) vateritin referans spektrumu ile karşılaştırması (1000 mM CaCl_2 , 100 mM üre, pH 6,5, 37 °C, inokülasyon %10)

Literatürde genellikle CRS ve XRF analizlerinin bir arada yapıldığı görülmektedir. Bu iki analiz birbirini destekleyerek elde edilen sonucun doğruluğunu arttırmaktadır. Tepe ve diğ. (2019) üreolitik *Bacillus amyloliquefaciens* U17' den elde edilen presipitata XRF ve CRS analizlerini birlikte uygulamışlar ve presipitadaki CaCO_3 varlığını kanıtlamışlardır. *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada

ise biyofilmler içindeki çökeltilerin spektrumları, iç karbonat iyonunun simetrik gerilme titreşiminin neden olduğu 1088 cm⁻¹'de en dikkat çekici zirveyi, 712 cm⁻¹'de düzlem içi bükülme tepe noktasını ve 153 cm⁻¹'de kafes modu tepe noktasını göstermiş olup normal basınç ve sıcaklıkta kalsitin Raman standart spektrumlarıyla eşleşmiştir (Bai ve diğ., 2017).

Sonuç olarak, tüm mineralojik analizler ile bakteriyel kalsiyum karbonat çökeli mi doğrulanmış olup, özellikle yerel izolat U3'ün yüksek kalsiyum klorit içeren ortamda CaCO₃ varlığı gösterilmiştir.

4.5 Kil-Bakteri Etkileşimi

Bakteri-kil etkileşimi, özellikle killi toprakların veya zeminlerin yerinde iyileştirme çalışmalarında yeni stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir. Bu amaçla *P. favisporus* U3 ve *S. pasteurii* ATCC 6453 bakterilerinin kil etkileşimleri hakkında bilgi edinmek için denemeler yapılmıştır. Bentonit kilinin (montmorillonit) her iki bakteri türü üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Bakterilerin gelişim ortamlarına 0,25, 0,50, 1,0 ve 2,0 g/L olacak şekilde kil ilave edilmiştir. 24-48 saat inkübasyon sonunda bakteri gelişimi sağlanamamıştır. Birçok çalışma killerin bakteriler üzerinde inhibisyon etkilerinin olduğunu ifade etmektedir (Haydel ve diğ., 2008; Williams ve Haydel, 2010; Zarate-Reyes ve diğ., 2017). Örneğin; Williams ve Haydel tarafından 2010 yılında yapılan araştırmada smektit (Na-montmorillonit) içeren Fransız yeşil kili gibi geleneksel olarak da kullanılan killerin antibakteriyal etki gösterdikleri belirtilmektedir. Literatürde bu konuda yapılmış diğer çalışmalarda da killerin antibakteriyal etkisi olduğu tekrarlanmış olup antibiyotik dirençliliği yüksek olan patojen bakterilerde dahi etkili olduğu vurgulanmıştır (Haydel ve diğ., 2008; Zarate-Reyes ve diğ., 2017). Çalışmada kullandığımız her iki bakterinin de bentonit kiline duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeli mi zemin güçlendirme, betonların ve tarihi eserlerin restorasyonu, erozyonu önleme, biyoremediyasyon, sağlık ve tarımda biyosensör başta olmak üzere pek çok kullanım alanına sahip çevre dostu bir süreçtir. Bu süreç üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin katkılarıyla uygun ortam şartlarında gerçekleşmektedir. Gezegenimiz için bu kadar faydalı bir sürecin bilimsel çalışmalarla tüm basamaklarının aydınlatılması, optimum ortam şartlarının belirlenmesi, süreçte görevli elemanların rollerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Araştırmamızda *Paenibacillus favisporus* U3'ün CaCO_3 üretimi, farklı kalsiyum karbonat çökeli m parametreleri, çökeli mde rolleri olduğu bilinen üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin farklı besiyerlerinde aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca, mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeli mi için model organizma olarak adlandırılabilen *Sporosarcina pasteurii* ile tüm parametrelerde kıyaslanarak kalsiyum karbonat çökeli m kapasitesi araştırılmıştır.

Sonuç olarak *P. favisporus* U3 bakterisi kalsiyum karbonatın hem kalsit hem de vaterit formlarını üretirken, *S. pasteurii* ATCC 6453 sadece kalsit üretmiştir. Bakteriyel CaCO_3 ürünleri XRD, XRF, CRS ve SEM-EDX ile analiz edilmiş ve yüksek CaCl_2 şartlarında her iki bakterinin de kalsiyum karbonat çökeli mi yüksek düzeyde gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır. *P. favisporus* U3'ün üreaz enzim aktivitesi yüksek iken *S. pasteurii* ATCC 6453'te karbonik anhidraz aktivitesinin daha yüksek olması dikkat çekmiştir. Kalsiyum karbonat çökeli mde farklı rolleri olan üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitesinin de türe spesifik olduğu sonucuna varılmıştır. En iyi kalsiyum karbonat çökeli m şartlarının belirlenmesi türe göre değişkenlik göstereceğinden her iki enzimin aktivite şartlarının detaylı olarak araştırılması gerektiğine karar verilmiştir. Diğer taraftan *P. favisporus* U3 bakterisinin yüksek tuz varlığında kalsiyum karbonat çökeli mi yapabilme yeteneği bir avantajken, aynı bakterinin kil etkileşiminin tespit edilememesi bir dezavantajdır. Özellikle elde edilen veriler, *P. favisporus* U3 izolatın, killi toprakların iyileştirilmesinde kullanım potansiyelinin olmadığını göstermekle birlikte daha detaylı optimizasyon

alışmalarıyla araştırılarak bu özelliğin olup olmadığının ortaya konması gerekmektedir.



6. KAYNAKLAR

Achal, V., Pan, X., Zhang, D., “Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation”, *Ecological Engineering*, 37(10), 1601-1605, (2011).

Achal, V. and Pan, X., “Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2.”, *Appl Biochem Biotechnol.*, 173(1), 307–317, (2014).

Achal, V., “Production of Bacteria for Structural Concrete”, *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering*, 309-323, (2015).

Akkaş, T., “Novel methods to prepare cross-linked enzyme aggregates (CLEA) challenging immobilization models-urea and pepsin”, Doktora tezi, Sabancı Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Enstitüsü, (2016).

Akyol, E., Bozkaya, Ö. and Dogan, N. M., “Strengthening sandy soils by microbial methods”, *Arabian Journal of Geosciences*, 10(15), 1-8, (2017).

Al Imran, M., Shinmura, M., Nakashima, K., Kawasaki, S., “Effects of various factors on carbonate particle growth using ureolytic bacteria”, *Materials Transactions*, 59(9), 1520–1527, (2018).

Ali, N. A., Karkush, M. O., “Improvement of Unconfined Compressive Strength of Soft Clay using Microbial Calcite Precipitates”, *Journal of Engineering*, 3(27), (2021).

Almahamedh, H. H. “Sulfate reducing bacteria influenced calcium carbonate precipitation”. In *CORROSION*. NACE International, (2013).

Al-Thawadi, S., “High strength in-situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria”, PhD Thesis, School of Biological Sciences and Biotechnology, Australia, (2008).

Al-Thawadi, S.M., “Ureolytic Bacteria and Calcium Carbonate Formation as a Mechanism of Strength Enhancement of Sand”, *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 1, 98-114, (2011).

Altındış, M., Özdemir, M., “*Helicobacter pylori* and diagnosis”, *The Medical Journal of Kocatepe*, 2, 1-12, (2003).

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

Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., So., J. S., “Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications”, *Springer Plus.*, 5, 250, (2016).

Anitha, V., Abinaya, K., Prakash, S., Seshagiri Rao, A. Ve Vanavil, B., “*Bacillus cereus* KLUVAA mediated biocement production using hard water

and urea”, *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 32(2), 257-266, (2018).

Arias, D., Cisternas, I. A., Rivas, M., “Biomineralization mediated by ureolytic bacteria applied to water treatment: A review”, *Crystals*, 7, 345, (2017).

Ariyanti, D., Handayani, N. A., Hadiyanto, H., “An overview of biocement production from microalgae”, *Internat. J. of Sci. and Eng.*, 2, 30, (2011).

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

Arpajirakul, S., Likitlersuang, S. ve Pungrasmi, W., “Treatment conditions used in microbial induced calcite precipitation for sandy soil improvement”, *Procds. Of 16th Asian Regional Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering*. October 14-18, 2019, Taipei, Taiwan, (2019).

Azarno, T., “Mikrobiyal çimento üretimine yönelik üreaz enzimi üretiminin optimizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, (2013).

Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R., Bang, S. S., “Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation”, *Journal of Biotechnology*, 93, 171–181, (2002).

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

Bakırhan, P., “Üreaz üreticisi Bacillus spp. Mineralizasyonu ile CaCO₃'ün presipitasyonu ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Kilis, (2020).

Becker–Ritt, A.B., Martinelli, A.H., Mitidieri, S., Feder, V., Wasserman, G.E., Vainstein, M.H., Oliveira, J.T., Fiuza, L.M., Pasqualli, G., Carlini, C.R., “Antifungal activity of plant and bacterial ureases”, *Toxicon.*, 50, 7, 971-983, (2007).

Belie, N., Muynk, W., Verbeken, K., Verstraete, W., “Influence of Urea and Calcium Dosage on the Effectiveness of Bacterially Induced Carbonate Precipitation on Limestone”, *Ecological Engineering*, 36, 99-111, (2010).

Bergaya, F. and Lagaly, G., “Hand book of clay science (vol. 1) General introduction: Clays”, *Clay minerals and clay science*, 1, 1-18, (2006).

Bertucci, A., Moya, A., Tambutté, S., Allemand, D., Supuran, C. T. and Zoccola, D., “Carbonic anhydrases in anthozoan corals-A review”, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 1437–1450. (2013).

Beveridge, T. J., Fyfe, W. S., “Metal fixation by bacterial cell walls”, *Canadian Journal of Earth Science*, 22, 1893–1898, (1985).

Blakeley, R.L. ve Zerner, B., “Jack bean urease: the first nickel enzyme”, *Journal of molecular catalysis*, 23(2-3), 263-292, (1984).

Bozbeyoglu, N. N., Şensoy Candoğan, T., Arslan, S., Kabalay, B., Bozkaya, O., Akyol, E., Mercan Doğan, N., “Calcium Carbonate Precipitation by Urease and Carbonic Anhydrase Positive Bacteria”, *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg. (PAJES)*, 26(3), 513-518, (2020).

Bozbeyoglu, N. N., Mercan Dogan, N., Arslan, S., Deniz, K., Kadioglu, Y. K., “Influence of Calcium Sources on Mineralization of Calcium Carbonate by *Paenibacillus favisporus* U3”, *Fresenius Environmental Bulletin (FEB)*, 30(06B), 7561-7572, (2021).

Cacchiao, P., Ercole, C., Cappuccio, G., Lepidi, A., “Calcium Carbonate Precipitation by Bacterial Strains Isolated from a Limestone Cave and from a Loamy Soil”, *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 85-98, (2003).

Capasso, C.; Supuran, C.T., “An overview of the α -, β - and γ -carbonic anhydrases from Bacteria: Can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria?”, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 30, 325–332, (2015).

Chang, R., Kim, S., Lee, S., Choi, S., Kim, M. and Park, Y., “Calcium Carbonate Precipitation for CO₂ Storage and Utilization: A Review of the Carbonate Crystallization and Polymorphism”, *Front. Energy Res.*, doi: 10.3389/fenrg.2017.00017, (2017).

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

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

Chen, H.J., Huang, Y.H., Chen, C.C., Maity, J.P., Chen, C.Y., “Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) Using Pig Urine as an Alternative to Industrial Urea”, *Waste and Biomass Valorization*, 10, 2887–2895, (2019).

Cheng, L., Shahin, M. A., Cord-Ruwisch, R., “Soil stabilisation by microbial-induced calcite precipitation (MICP): Investigation into some physical and environmental aspects”, *7th International Congress on Environmental Geotechnics*, 64(12), 1105–1112, (2014).

Cheng, L., Shahin, M. A., Mujah, D., “Influence of key environmental conditions on microbially induced cementation for soil stabilization”, *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 143(1), 04016083, (2016).

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

Ciurli, S., Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson, K.S., Miletti, S., Mangani, S., “Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms”, *Coordination Chemistry Reviews*, 192, 331–355, (1999).

Cole, G. T., “*C. immitis*: resistance to host defense mechanisms”, *Clin Adv Treatment Fungal Infect*, 4, 1–12. (1998).

Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A., Perfect, J. R., “Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis”, *Infect Immun.*, 68, 443–448. (2000).

Del Río, A. V., Buys, B., Campos, J. L., Méndez, R. ve Mosquera-Corral, A., “Optimizing upflow velocity and calcium precipitation in denitrifying granular systems”, *Process Biochemistry*, 50(10), 1656-1661, (2015).

Demir, S., ve Kılıç, M., “Şişen zeminlerin tanımlanması ve zemin iyileştirme yöntemleri”, *GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (1), 95-104, (2010).

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

Dev, K., Aggarwal, A. ve Banerjee, S., “Comparative characterization of urease secreting bacterial and fungal isolates from soil sample of farm fields”, *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research.*, 5 (4), 138-150, (2015).

Dhami, N. K., Reddy, M. S., Mukherjee, A., “Biom mineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review”, *Front. Microbiol.*, 4 (2013), 314, (2013).

Dhami, N.K., Reddy, M.S., Mukherjee, A., “Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2552-2561, (2014).

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

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

Ey, P.L., Ashman, L.K., “The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures”, *Methods Enzymol.*, 121, 497-509, (1986).

Fellbauma, C., Gachomoa, E., Beesettyb, Y., Choudharib, S., Strahanc, G., Pfefferc, P., Kiersd, E., Bücking, H., “Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis”, *Proc Natl Acad Sci*, 109, 7, 2666–2671. (2012).

Ferris F. G. and Steinmeier, L.G., U.S. Patent 5,143,155, (1992).

Ferris, F.G., Stehmeier, L.G., Kantzas, A., Mourits, F.M., “Bacteriogenic mineral plugging”, *J Can Pet Technol.*, 35(8), 56–61, (1996)

Ferris, M. J., Magnuson, T. S., Fagg, J. A., Thar, R., Kuhl, M., Sheehan, K. B., “Microbially mediated sulphide production in a thermal, acidicalgal mat community in Yellowstone National Park”, *Environ Microbiol.*, 5(10), 954–60, (2003).

Fersht, A., “Enzyme structure and mechanism”, W.H. Freeman and Co., New York. 1985,

Follmer, C., Wassermann, G.E., Carlini, C.R., “Separation of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity”, *Plant Science*, 167, 241-246, (2004).

Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G., Olivera-Severo, D., Carlini, C., “Jackbean, Soybean and *Bacillus pasteurii* ureases biological effects unrelated to ureolytic activity”, *Eur. J. Biochem.*, 271, 1357-1363, (2004).

Fujita, Y., Ferris, F. G., Lawson, R. D., Colwell, F. S., Smith, R. W., “Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria”, *Geomicrobiol J.*, 17, 305–318, (2000).

Gat, D., Tsesarsky, M., Shamir, D., Ronen, Z., “Accelerated microbial-induced CaCO₃ precipitation in a defined coculture of ureolytic and non-ureolytic bacteria”, *Biogeosciences*, 11, 2561, (2014).

Gonsalves, G. M., “Bioconcrete- A Sustainable Substitute for Concrete?”, Master Thesis, Universitat Politècnica De Catalunya., Spain, (2011).

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

Graham, D.Y., “Therapy of *Helicobacter pylori*: Current status and issues”, *Gastroenterology*, 118, 2-5, (2000).

Gunasekaran, S., Anbalagan, G., Pandi, S., “Raman and infrared spectra of carbonates of calcite structure”, *J. of Raman Spectroscopy*, 37(9), 892–899, (2006).

Gunasekaran, S., Anbalagan, G., “Spectroscopic study of phase transitions in dolomite mineral”, *J. of Raman Spectroscopy*, 38(7), 846–852, (2007a).

Gunasekaran, S., Anbalagan, G., “Spectroscopic characterization of natural calcite minerals”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 68(3), 656–664, (2007b).

Güleşçi, N., “Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere farklı ara kollar üzerinden immobilizasyonu ve karakterizasyonu”, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, (2013).

Günsür, E., “Biogenic Building Material Formation By The Treatment Of Natural Stone Waste With Microbial Induced Calcite Precipitation”, Master Thesis, İstanbul Technical University, İstanbul, (2018).

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

Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S.D., “Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(8), 4901–4909, (2003).

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

Haydel, S. E., Remenih, C. M. and Williams, L. B., “Broad-spectrum in vitro antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens”, *J. Of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 353-361, (2008).

Jiang, N.J., Liu, R., Du, Y.J., Bi, Y.Z., “Short Communication: Microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Pb contaminants: Toxic effects on bacterial activity and immobilization efficiency”, *Science of the Total Environment*, 672, 722–731 (2019).

Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., Schlangen, E., “Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete”, *Ecol. Eng.*, 36, 230–235, (2010).

Kamennaya, N. A., Ajo-Franklin, C. M., Northen, T. ve Jansson, C., “Cyanobacteria as biocatalysts for carbonate mineralization”, *Minerals*, 2(4), 338-364, (2012).

Kang, C. H., Han, S. H., Shin, Y. J., Oh, S. J., So, J. S., “Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172, 1929, (2014).

Kantzas, A., Stehmeier, L., Marentette, D. F., Ferris, F. G., Jha, K. N., Mourite, F. M., “A novel method of sand consolidation through bacteriogenic mineral plugging”, *Petroleum Society of CIM*, 92(46), 1-15, (1992).

Karakostis, K., Zanella-Cléon, I., Immel, F., Guichard, N., Dru, P., Lepage, T., Plasseraud, L., Matranga V. and Marin, F., “A minimal molecular toolkit for mineral deposition? Biochemistry and proteomics of the test matrix of adult specimens of the sea urchin *Paracentrotus lividus*”, *J. Proteomics*, 136, 133–144. (2016).

Kaur, D. N., Reddy, S. M., Mukherjee, A., “Biom mineralization of Calcium Carbonate Polymorphs by the Bacterial Strains Isolated from Calcareous Sites”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 707–714, (2013).

Keykha, H. A., Asadi, A., Zareian, M., “Environmental factors affecting the compressive strength of microbiologically induced calcite precipitation-treated soil”, *Geomicrobiology Journal*, 34(10), 889–894, (2017).

Khodadadi Tirkolaei, H., Bilsel, H., “Estimation on ureolysis-based microbially induced calcium carbonate precipitation progress for geotechnical applications”, *Marine Georesources and Geotechnology*, 35(1), 34–41, (2017).

Kim, G., Kim, J., Youn, H., “Effect of temperature, pH, and reaction duration on microbially induced calcite precipitation”, *Applied Sciences* (Switzerland), 8(8), (2018).

Kyhse-Anderson, “Electroblotting of Multiple Gels. A Simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose”, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10, 203-209, (1984).

Laemmli U.K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227, 680–684, (1970).

Lauchnor, E. G., Schultz, L. N., Bugni, S., Mitchell, A. C., Cunningham, A. B., Gerlach, R., "Bacterially induced calcium carbonate precipitation and strontium coprecipitation in a porous media flow system," *Environ Sci Technol.*, 47(3), 1557-1564, (2013).

Lauchnor, E. G., Topp, D. M., Parker, A. E., Gerlach, R., “Whole cell kinetics of ureolysis by *Sporosarcina pasteurii*”, *J. Appl. Microbiol.*, 118, 1321–1332, (2015).

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

Liu, X., Fan, J., Yu, J., Gao, X., “Solidification of loess using microbial induced carbonate precipitation”, *J. Mt. Sci.*, 18(1), 265-274, (2021).

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

Mackay, E.M., Pateman, J.A., “The regulation of urease activity in *Aspergillus nidulans*”, *Biochemical Genetics*, 7, 763-776, (1982).

Mann, K., Maček, B. and Olsen, J. V., “Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer”, *Proteomics*, 6, 3801–3810, (2006).

Martinez, B.C., DeJong, J.T., Ginn, T.R., Montoya, B.M., Barkouki, T.H., Hunt, C., Tanyu, B., Major, D., “Experimental Optimization of Microbial-Induced Carbonate Precipitation for Soil Improvement”, *J. Geotech. Geoenviron. Eng.*, 139, 587-598, (2013).

Martinez, A., Huang, L., Gomez, M. G., “Thermal conductivity of MICPtreated sands at varying degrees of saturation”, *Geotechnique Letters*, 9(1), 15–21, (2019).

Mattila, H.P. and Zevenhoven, R., “Chapter Ten-Production of Precipitated Calcium Carbonate from Steel Converter Slag and Other Calcium-Containing Industrial Wastes and Residues”, *Advances in Inorganic Chemistry*, 66, 347-384, (2014).

Mirbod, F., Schaller, R.A., Cole, G.T., “Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*”, *Medical Mycology*, 40(1), 35-44, (2002).

Mitchell, A. C., Ferris, F. G., “The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: Temperature and kinetic dependence”, *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 69(17), 4199–210, (2005).

Mitchell, A.C., Dideriksen, K., Spangler, L., Cunningham, A., Gerlach, R., “Microbially enhanced carbon capture and storage by mineral-trapping and solubilitytrapping”, *Environ. Sci. Technol.*,44, 5270–5276, (2010).

Mitra, A., Sreedharan, S.M., Singh, R., “Concrete Crack Restoration Using Bacterially Induced Calcium Metabolism”, *Indian J Microbiol.*, 61(2), 229–233, (2021).

Mobley, L.T, Hausinger, R., “Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization”, *Microbiological reviews*, 53, 85-108, (1989).

Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P., “Molecular Biology of microbial ureases”, *Microbiol. Rev*, 59, 451-480, (1995).

Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., Hazell, S.L., “*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics”, Washington (DC): ASM Press; (2001).

Montoya, B. M., DeJong, J.T., “Stress-Strain Behavior of Sands Cemented by Microbially Induced Calcite Precipitation”, *J. Geotech. Geoenviron.*, 141(6), 04015019 (1-10), (2015).

Morishita, S., Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Takeuchi, H., Sugiura, T., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T., “Cloning, polymorphism, and inhibition of β -carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*”, *J. Gastroenterol.*, 43, 849–857, (2008).

Mudgil, D., Baskar, S., Baskar, R., Paul, D., Shouche, Y.S., “Biomining potential of *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus stabekisii*

and *Staphylococcus epidermidis* strains in vitro isolated from Speleothems, Khasi Hill Caves, Meghalaya, India”, *Geomicrobiology Journal*, 35 (8), 675-694, (2018).

Müller, B. and Defago, G., “Interaction between the bacterium *Pseudomonas fluorescens* and vermiculite: Effects on chemical, mineralogical, and mechanical properties of vermiculite”, *Journal of Geophysical Research*, 111, G02017, 1-8, (2006).

Müller, W. E., Schröder, H. C., Schlossmacher, U., Neufurth, M., Geurtsen, W., Korzhev, M. and Wang, X., *FEBS Open Bio*, 3, 357–362, (2013),

Naveeda, M., Duan, J., Uddin, S., Suleman, M., Hui, Y., Li, H., “Review: Application of microbially induced calcium carbonate precipitation with urea hydrolysis to improve the mechanical properties of soil”, *Ecological Engineering*, 153, 105885, (2020).

Nemati, M, Voordouw, G., “Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ”, *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 635–42, (2003).

Nemati, M., Greene, E. A., Voordouw, G., “Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: Comparison with enzymic option”, *Process Biochem.*, 40(2), 925–933, (2005).

Ng, S. W., Lee, M. L., Hii, S. L., “An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement”, *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, 62, 723–729, (2012).

Nishimori, I., Onishi, S., Takeuchi, H., Supuran, C.T., “The α and β classes carbonic anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets”, *Curr. Pharm. Des.*, 14, 622–630, (2008).

Obst, M, Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W., Benzerara, K., Karunakaran, C., Kaznatcheev, K., Tyliczszak, T., Hitchcock, A. P., “Precipitation of amorphous CaCO_3 (aragonite-like) by cyanobacteria: A

STXM study of the influence of EPS on the nucleation process”, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 4180–4198, (2009).

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

Olivera, D., Wasserman, G., Carlini, C., “Urease display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease producing bacteria?”, *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*, 39, 851-861, (2006).

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

Omoriegbe, A.I., Ngu, L.H., Ong, D.E.L., Nissom, P.M. “Low-cost cultivation of *Sporosarcina pasteurii* strain in food-grade yeast extract medium for microbially induced carbonate precipitation (MICP) application”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 247–255, (2019).

Ozensoy Guler, O.; Capasso, C.; Supuran, C.T., “A magnificent enzyme superfamily: Carbonic anhydrases, their purification and characterization”, *J. Enzyme Inhibi. Med. Chem.*, 31, 689–694, (2016).

Patro Sanjaya, K., Chandra, K.S, Sugandha, S., Chand, S., Sahu, S.K., Manimaran, S., “Effect of bacteria on the properties of concrete using Portland slag cement”, *Proceedings of the National Conference on Recent Advances and Future Prospects in Civil Engineering (RAFPCE-15)*, 89-98. (2015).

Peng, J., Liu, Z., “Influence of temperature on microbially induced calcium carbonate precipitation for soil treatment”, *PLoS ONE*, 14(6), e0218396, (2019).

Perfetto, R., Del Prete, S., Vullo, D., Sansone, V., Barone, C., Rossi, M., Supuran, C.T. and Capasso, C., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32, 632–639. (2017).

Phang, I.R.K., Chan, Y.S., Wong, K.S., Lau, S.Y.,” Isolation and characterization of urease-producing bacteria from tropical peat”, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, doi:10.1016/j.bcab.2017.12.006., (2018).

Priya, J. N., Kannan, M., “Effect of carbonic anhydrase and urease on bacterial calcium carbonate precipitation”, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8 (3), 609-614, (2017).

Rahman, M. A., Oomori, T. and Uehara, T., “Carbonic Anhydrase in Calcified Endoskeleton: Novel Activity in Biocalcification in Alcyonarian”, *Mar. Biotechnol.*, 10, 31–38, (2008).

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

Rebata-Landa, V., “Microbial Activity In Sediments: Effects On Soil Behavior”, Ph.D. thesis, Georgia Institute of Technology, Georgia, (2007).

Rivadeneyra, M.A., Ramos-Cormenzana, A., Delgado, G., Delgado, R., “Process of Carbonate Precipitation by *Deleya halophila*”, *Current Microbiology*, 32, 308–313, (1996).

Rodriguez-Navarro, C., Cizer, O., Kudłacz, K., Ibañez-Velasco, A., Ruiz-Agudo, C., Elert, K., Burgos-Cara, A. and Ruiz-Agudo, E., “The multiple roles of carbonic anhydrase in calcium carbonate mineralization”, *Cryst. Eng. Comm.*, 21,7407-7423, (2019).

Ryparova, P., Prosek, Z., Schreiberova, H., Bílý, P., Tesarek, P., “The role of bacterially induced calcite precipitation in self-healing of cement paste”, *Journal of Building Engineering*, 39, 102299, (2021).

Salih, O. M., Omar, A. E., Elsayed, E. H., Asaad, K., Ahmed, E. S., “Enzyme from new *Proteus mirabilis* strain”, *Journal of Advanced Scientific Research*, 5, 4, (2014).

Sadjadi, M., Nikooee, E., Habibagahi, G., “Biological treatment of swelling soils using microbial calcite precipitation. In *Unsaturated Soils: Research & Applications*; Khalili, N., Russell, A.R., Khoshghalb, A., Eds.”; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, (1-2), 917–922, (2014).

Sarıççek, Y.E., “An experimental investigation for improvement of sands using microbially induced calcium carbonate precipitation”, Master thesis, The Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara, (2016).

Sharma, A., Ramkrishnan R., “Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine grained soils”, *Perspectives in Science*, 8, 198, (2016).

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

Smith, P.T., King, D., Goodman, N., “Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*”, *Microbiology*, 139(5), (1993).

Standard methods 4500-NH₃ Nitrogen (Ammonia). 4500-NH₃ NITROGEN (AMMONIA) Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. Part 4000. doi:10.2105/smww.2882.087, (2017).

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

Sujoy, B., ve Aparna, A., “Enzymology, immobilization and application of urease enzyme”, *International Research Journal of Biological Sciences*, 2 (6), 51-56, (2013).

- Sumner, J. B., “The isolation and crystallization of the enzyme urease. Preliminary paper”. *J. Biol. Chem.*, 69, 435–441, (1926).
- Sun, J., Wu, Z., Cheng, H., Zhang, Z., Frost, R.L., “A Raman spectroscopic comparison of calcite and dolomite”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 158–162, (2014).
- Sun, X., Miao, L., Tong, T., Wang, C., “Improvement of microbial-induced calcium carbonate precipitation technology for sand solidification”, *Journal of Materials in Civil Engineering*, 30(11), 1–8, (2018).
- Sun, X., Miao, L., Tong, T., Wang, C., “Study of the effect of temperature on microbially induced carbonate precipitation”, *Acta Geotechnica*, 14, 627–638, (2019).
- Supuran, C.T., “Carbonic anhydrases—An overview”, *Curr. Pharm. Des.*, 14, 603–614, (2008).
- Supuran, C. T., Capasso, C., “Review: An overview of the bacterial carbonic anhydrases”, *Metabolites*, 7, 56. (2017).
- Tai, C. Y., Chen, F. B., “Polymorphism of CaCO₃ precipitated in a constant-composition environment”, *AIChE J*, 44, 1790–1798, (1998).
- Tazaki, K., “Chapter 9 Clays, Microorganisms, and Biomineralization”, *Developments in Clay Science*, 1, 477–497, (2006).
- Tepe, M., Arslan, Ş., Koralay, T., Mercan Doğan, N., “Precipitation and characterization of CaCO₃ of *Bacillus amyloliquefaciens* U17 strain producing urease and carbonic anhydrase”, *Turkish Journal of Biology*, 43, 198–208, (2019).
- Tourney, J., Ngwenya, B. T., “Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism”, *Chem. Geol.*, 262, 138–146, (2009).

Tovey, E.R., Baldo, B.A., “Comparison of Semidry and Conventional Tank Buffer Electrotransfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes”. *Electrophoresis*, 8, 384-387, (1987).

Turbett, G.R., Hoj, P.B., Horne, R., Mee, B.J., “Purification and characterization of the urease enzymes of *Helicobacter* species from humans and animals”, *Infect Immun.*, 60(12), 5259–5266, (1992).

Türksever Tetiker, A., “Farklı kaynaklardan izole edilen üreaz enziminin immobilizasyonu ve üre tayininde ve hidrolizinde uygulanabilirliğinin araştırılması”, Doktora tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, EDİRNE, (2016).

van Paassen, L. A., Daza, C. M., Staal, M., Sorokin, D. Y., van der Zon, W., van loodrecht, M. C. M., “Potential soil reinforcement by biological denitrification”, *Ecol. Eng.*, 36, 168, (2010).

Veitch, F.P., Blankenship, L.C., “Carbonic Anhydrase in Bacteria”, *Nature*, 197, 76-77, (1963).

Wang, J., Becker, U., “Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO_3)”, *American Mineralogist*, 94 (2-3), 380-386, (2009).

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

Whiffin, V. S., ‘Microbial CaCO_3 Precipitation for the production of Biocement’, Doctor Thesis, School of Biological Sciences & Biotechnology, Murdoch University, Western Australia, (2004).

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

Williams, L.B. and Haydel, S.E., “Evaluation of the medicinal use of clay minerals as antibacterial agents”, *Int.Geology Review*, 52, 745-770, (2010).

Xu, J., Yao, W., Jiang, Z., “Non-Ureolytic Bacterial Carbonate Precipitation as a Surface Treatment Strategy on Cementitious Materials”, *J. Mater. Civ. Eng.*, 26(5), 983-991, (2014).

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

Xu, G., Li, D., Jiao, B., Li, D., Yin, Y., Lun, L., Zhao, Z., Li, S., “Biom mineralization of a calcifying ureolytic bacterium *Microbacterium* sp. GM-1”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 21, (2017).

Yang, G., Li, L., Li, F., Zhang, C., Lyu, J., “Mechanism of carbonate mineralization induced by microbes: Taking *Curvibacter lanceolatus* strain HJ-1 as an example”. *Micron*, 140, 102980, (2021).

Yeşilyaprak, B., “Pazı (*Beta vulgaris* L. Var. cicla)’dan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2004).

Yıldırım, N., Gürtuğ, Y. ve Sesal, C., “Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşum mekanizmaları ve uygulama alanları”, *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 28(2), 70-80, (2016).

Zarate-Reyes, L., Lopez-Pacheco, C., Nieto-Camacho, A., Palacios, E., Gómez-Vidales, V., Kaufhold, S., Ufer, K., García Zepeda, E., Cervini-Silva, J., “Antibacterial Clay Against Gram-negative Antibiotics Resistant Bacteria”, *J. Of Hazardous Materials*, doi: 0.1016/j.jhazmat.2017.08.078, (2017)

Zehner, J., Røyne, A., Sikorski, P., “Calcite seed-assisted microbial induced carbonate precipitation (MICP)”, *PLoS ONE*, 16(2), e0240763, (2021).

Zhu, T., Dittrich, M., “Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 4:4, doi: 10.3389/fbioe.2016.00004, (2016).



EKLER

7. EKLER

EK A. Araştırmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal maddeler

Kalsiyum Mineralizasyon Ortamı (KMO)

- Nutrient Broth (Merck, 70122) 3,0 g
- CaCl₂ (Isolab, 909.023) 25 mM
- NaHCO₃ (VWR, VWRV0865) 25 mM
- Üre (Sigma, 818710) 333 mM
- Distile su 1000 ml

Luria-Bertani+üre besiortamı

- Tripton (Sigma, T9410) 10,0 g
- Maya özüt (Merck, 70161) 5,0 g
- Sodyum klorür (Merck, 31434) 10,0 g
- Üre (Sigma, 818710) 25 mM
- Distile su 1000 ml

Üre agar besiortamı

- Pepton from meat (Merck, 1.07214) 1 g

- D (+) Glikoz (Merck, 1.08337) 1 g
- Sodyum Klorür (Merck, 31434) 5 g
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (Scharlau, PO0260) 2 g
- Fenol Red (Alfa AEsar, 16294) 0,012 g
- Agar-Agar (Sigma, A1296) 12 g
- Distile su 1000 ml

Triptik Soya Agar (Merck)

- Kazein peptonu (Merck, 70169) 15,0 g
- Soya peptonu (Merck, 1.07212) 5,0 g
- Sodyum klorür (Merck, 31434) 5,0 g
- Agar-Agar (Sigma, A1296) 15,0 g
- Distile su 1000 ml

EDTA Titrimetrik yönteminde kullanılan çözeltiler

Tampon Çözelti:

- Na₂EDTA.2H₂O (Sigma, 324503) 1,179 g
- MgSO₄.7H₂O (Merck, 1.05886) 780 mg
- NH₄Cl (VWR, AA0235) 16,9 g
- NH₄OH (Merck, 1.05432) 143 ml

Na₂EDTA.2H₂O ve MgSO₄.7H₂O 50 ml dH₂O'da çözülmüştür. Daha sonra çözeltiye NH₄Cl ve NH₄OH ilave edilerek 250 ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır.

Standart EDTA Cözeltisi:

- EDTA disodyum tuzu dihidrat (Sigma, 324503) 3,723 g
- dH₂O 1000 ml

Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) disodyum tuzu dihidrat maddesi saf su içerisine eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

Lowry metodu kullanılan çözeltiler

Bazik Bakır Cözeltisi:

- Reaktif 1: %2 CuSO₄.5H₂O (Merck, 1.02790)
- Reaktif 2: %2 NaKC₄H₄O₆.4H₂O (Merck, 1.08087)
- Reaktif 3: %2 Na₂CO₃ (Merck, 1.06392) (0,1 N NaOH içinde)

Bazik bakır çözeltisini hazırlamak için 1 pay reaktif 1, 1 pay reaktif 2 ve 100 pay reaktif 3 eklenmiştir.

Lowry Reaktifi:

- dH₂O
- Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Sigma, F9252)

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi ve distile su 1:1 oranında deney anında taze olarak hazırlanmıştır. Reaktif ışığa duyarlı olduğu için karanlıkta hazırlanmıştır.

Modifiye edilmiş fenol-hipoklorit yönteminde kullanılan çözeltiler

Potasyum fosfat tamponu (100 mM, pH 8,0):

- K₂HPO₄ (Merck, 105109) 0,8708 g
- KH₂PO₄ (Scharlau, PO0260) 0,06804 g

Öncelikle K_2HPO_4 100 ml dH_2O 'da ve KH_2PO_4 ise 10 ml dH_2O da manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak ayrı ayrı çözülmüştür. Daha sonra hazırlanan K_2HPO_4 çözeltisinin pH değeri KH_2PO_4 çözeltisi kullanılarak pH 8,0'e titre edilmiştir.

Üre çözeltisi (50 mM):

- Üre (Sigma, 818710) 0,3003 g
- dH_2O 100 ml

Üre 100 ml saf su içerisine eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

Fenol-Sodyum Nitroprussit çözeltisi:

- Sodyum nitroprussit (Merck, 106541) 0,05 g
- Fenol (Merck, 100206) 1 g
- dH_2O 100 ml

Sodyum nitroprussit ve fenol 100 ml saf su da çözülerek fenol-sodyum nitroprussit çözeltisi elde edilmiştir.

Alkali hipoklorit çözeltisi (Sigma, A1727):

- $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 4,47 g
- Sodyum hipoklorit 1 ml
- dH_2O 100 ml

Disodyum hidrojen fosfat tartılarak 100 ml saf suda çözüldükten sonra içerisine 1 ml sodyum hipoklorit eklenerek alkali hipoklorit çözeltisi hazırlanmıştır.

Karbonik anhidraz enzim aktivitesi belirlemede kullanılan çözeltiler

Tris tamponu (50 mM, pH 8,5):

- Trisma Base (Sigma, T1503) 0,6055 g
- dH₂O 100 ml

Trisma base (markası) hassas terazide tartılarak 50 ml saf suda çözülmüştür. Daha sonra çözelti pH'sı HCl kullanılarak pH 8,5'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ilavesi yapılarak çözelti hazırlanmıştır.

p-NPA (4-nitrofenil asetat) (1 mM):

- 4-nitrofenil asetat (p-NPA) (Sigma, N8130) 0,0091 g
- %100 asetonitril (Merck, 100030) 50 ml

4-nitrofenil asetat hassas terazide tartımı yapıldıktan sonra 50 ml %100 asetonitril içinde çözülerek çözelti hazırlanmıştır.

Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

10X Elektro Çözeltisi:

- Glisin (Multicell, 800-045-LG) 72g
- Trisma Base (Sigma, T1503) 15 g
- dH₂O 500 ml

72 g Trisma base (markası) ve 15 g Glisin (marka) hassas terazide tartılarak 500 ml saf suda çözülmüştür.

1X Elektro Çözeltisi:

- SDS (Sigma, L3771) 1 g
- 10X Elektro Çözeltisi 100 ml
- dH₂O 900 ml

SDS ve 10X Elektro çözeltisi karıştırılmış ve çözelti 1000 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Transfer Çözeltisi:

- Metanol (Merck, 822283) 200 ml
- 10X Elektro Çözeltisi 100 ml
- dH₂O 700 ml

Çözelti içindeki tüm maddeler soğuk olacak şekilde belirtilen hacimlerde eklenerek 1000 ml'lik transfer çözeltisi hazırlanmıştır.

Stok Ayırma Çözeltisi (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8):

- Trisma Base (Sigma, T1503) 18,15 g
- dH₂O 100 ml

18,15 g Trisma base öncelikle 60 ml distile su ile çözülmüştür. Çözelti pH'sı 10 M HCl çözeltisi ile pH 8,8'e ayarlanmış ve son hacim dH₂O 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Stok Sıkıştırma Çözeltisi (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8):

- Trisma Base (Sigma, T1503) 6 g
- dH₂O 100 ml

6 g Trisma base öncelikle 40 ml distile su ile çözülmüştür. Çözelti pH'sı 10 M HCl çözeltisi ile pH 6,8'e ayarlanmış ve son hacim dH₂O 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Stok Jel Çözeltisi (%30 T, %2,67 C):

- Akrilamit (Merck, 110784) 29,2 g
- Bisakrilamit (Amresco, 0172) 0,8 g

- dH₂O 100 ml

Akrilamit az suda çözülmüş ve üzerine bisakrilamit eklenmiştir. Son hacim dH₂O 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%10 SDS:

- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma, L3771) 10 g
- dH₂O 100 ml

SDS öncelikle bir miktar distile su ile çözülmüştür. Son hacim dH₂O 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%10 APS (Amonyum Persülfat):

- Amonyum Persülfat (Sigma, A3678) 0,1 g
- dH₂O 1 ml

Deney esnasında kullanmadan hemen önce 0,1 g APS tartılarak 1 ml distile suda çözülerek taze olarak hazırlanmıştır.

4X SDB (Örnek seyreltme çözeltisi):

- 1 M Tris-HCl (pH 6,8) 2,5 ml
- Gliserol (Merck, 356352) 4 ml
- β-merkaptoetanol (Merck, 444203) 2 ml
- SDS (Sigma, L3771) 0,8 g
- Bromfenol mavisi (Serva, 15375.01) 1 mg
- dH₂O 10 ml

Yukarıda verilen tüm bileşenler sırasıyla eklenmiştir. Çözeltinin son pH değeri 1 M HCl kullanılarak pH 6,8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti -80 °C'de saklanmıştır.

TBST (Tris Buffer Saline Tween 20):

- 1 M Tris-HCl (pH 7,4) 20 ml
- NaCl (Merck, 31434) 29,44 g
- Tween 20 (Chem Cruze, sc-39113C) 0,5 ml
- dH₂O 1000 ml

Tüm kimyasallar ve çözeltiler sırasıyla eklenmiş ve son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

Bloke Çözeltisi:

- Yağsız süt tozu (Bioshop, SKI400.1) 5 g
- TBST 100 ml

5 g yağsız süt tozu TBST çözeltisi içinde çözülerek bloke çözeltisi hazırlanmıştır.

ALP (Alkalin fosfataz) Substrat Çözeltisi:

- 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 2,67 ml
- 1 M NaCl (Merck, 31434) 4 ml
- 100 mM MgCl₂ (Merck, 105833) 820 µl
- 100 mM ZnCl₂ (Carlo Erba, 393007) 40 µl
- Diethanolamin (Sigma, D8885) 96 µl
- NBT (Nitrotetrazolyum mavi klorit) (Biomatik, A4120) 0,0122 g

- Sature Tris 2,5 ml
- BCIP (5-Bromo-4-Kloro-3-İndolil) (Sigma, B6149) 0,0054 g
- Fenazin (Sigma, P9625) 270 µl
- dH₂O 40 ml

Tris, NaCl, MgCl₂, ZnCl₂, Diethanolamin ve NBT sırasıyla ilave edildikten sonra çözününceye kadar az miktarda distile su konulmuş ve çözelti pH 'sı 9,45'e sature Tris ile titre edilmiştir. Çözelti hacmi 38-39 ml olacak şekilde dH₂O eklenmiş ve sonrasında Sature Tris ile pH 9,55 e ayarlanmıştır. Sonrasında karanlık ortamda sırasıyla BCIP ve fenazin eklenmiş manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen ALP substrat çözeltisi elde edilmiştir.