

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL KALSİFİKASYON İLE MERMER YÜZEYLERİN
İYİLEŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Türkan DAL BİÇER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM

HAZİRAN 2022

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL KALSİFİKASYON İLE MERMER YÜZEYLERİN
İYİLEŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Türkan DAL BİÇER

(36193611002)

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM

HAZİRAN 2022

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu çalışmanın fikir, çalışma ve sonuç aşamalarının tümünde yardımını esirgemeyen her zaman destek olan ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM'a,

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye,

Tez aşamasında yardımcı olan İnönü Üniversitesi Kimya Bölümünden Prof. Dr. Ahmet GÜLTEK ve Dr. Fadime Nilüfer KIVILCIM'a,

Tez aşamasında İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümünde bulunan stereo mikroskopu kullanmamıza izin veren ve yardımcı olan Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e ve Dr. Duygu ÖZHAN DURHAN'a,

Bu tez çalışmasını FYL-2021-2388 nolu proje olarak destekleyen BAP'a,

Yaşamım boyunca elimden tutan ve her adımında yol gösteren aileme, desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan eşime ve bana destek olan arkadaşlarıma sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Bakteriyel Kalsifikasyon ile Mermer Yüzeylerin İyileştirilmesi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Türkan DAL BİÇER



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kalsifikasyon	2
1.2 Kalsiyum Karbonat	3
1.2.1 Kalsit	4
1.2.2 Vaterit.....	5
1.2.3 Aragonit.....	6
1.3 Mikrobiyal Olarak İndüklenen Karbonat Çökeltisi	8
1.4 Bakteriyel Biyokalsifikasyon.....	10
1.4.1 Üre konsantrasyonu.....	11
1.5 Biyolojik İyileştirme	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	26
3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Mermerler.....	26
3.3 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma	26
3.4 Mermer Örneklerinin Hazırlanması.....	27
3.5 Bakteri İnokülasyonu	29
3.6 Bakteriyel Kalsifikasyonda Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	30
3.6.1 İnokülasyon besiyerinin hazırlanılması.....	30
3.6.2 Presipitasyon besiyerinin hazırlanması	32
3.7 Analizler.....	33
3.7.1 X-Işınları kırınımı (XRD) analizi.....	33
3.7.2 Atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscope) (AFM) analizi	34
3.7.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleme, EDX ve mapping analizi	35
3.7.4 Stereo mikroskobu ile görüntüleme	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1 Bakteri Kültür Ortamında CaCO ₃ Kristallerinin Oluşumlarının Gözlenmesi.....	37
4.2 Makroskobik İncelemeler	37
4.3 Stereo Mikroskop Görüntüleri	38
4.3.1 Karbonlanmış mermer örneklerinin görüntülenmesi	38
4.3.2 Karbonlanmamış mermer örneklerinin görüntülenmesi	44
4.3 Mermer Numunelerinin SEM Görüntüleri, EDX ve Mapping Analiz Sonuçları	46
4.3.1 Karbonlanmış mermer numunelerinin SEM görüntüleri, EDX ve mapping analiz sonuçları.....	48
4.3.2 Karbonlanmamış mermer numunelerinin SEM görüntüleri, EDX ve mapping analiz sonuçları.....	62
4.4 XRD Analiz Sonuçları	71
4.5 AFM Analiz Sonuçları.....	72

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ	85



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
AHA	: Asetohidroksamik asit
BHIB	: Brain heart infusion agar
Ca⁺²	: Kalsiyum
Ca(CH₃COO)₂	: Kalsiyum asetat
CaCO₃	: Kalsiyum karbonat
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
Ca(OH)₂	: Kalsiyum hidroksit
Ca(NO₃)₂	: Kalsiyum nitrat
CFU	: Coloni Forming Unit
CIUC	: Üç eksenli drenajsız sıkıştırma testi
cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
CO₃²⁻	: Karbonat
gr	: Gram
H⁺	: Hidrojen
H₂CO₃	: Karbonik asit
HCO₃⁻	: Bikarbonat
H₂O	: Su
L	: Litre
Mg⁺²	: Magnezyum
mg	: Miligram
MİKÇ	: Mikrobiyal olarak indüklenen karbonat çökmesi
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MPa	: Mega pascal
NaCl	: Sodyum klorür
N₂	: Azot
O₂	: Oksijen

PU	: Poliüretan
rDNA	: Rekombinant DNA
rpm	: Revolutions per minute
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SEM-EDX-Mapping	: Taramalı elektron mikroskobu –energy dispersive spectrometry
UV	: Ultraviyole
YE	: Yeast extract
XRD	: X- ışınları kırınımı



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1: Mermer yüzeylerinde CaCO_3 kristalleri oluşumuna yönelik işlemlerde kullanılan besiyerleri içerikleri.....	31
Çizelge 5.1: Uygulama sonrası mermer numunelerinden elde edilen genel sonuçlar.	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Doğal kalsiyum karbonat oluşumları	4
Şekil 1.2: Kalsit	5
Şekil 1.3: Vaterit	5
Şekil 1.4: Aragonit	6
Şekil 1.5: Kalsiyum karbonat polimorflarının (a) kalsit, b) vaterit, c) aragonit) SEM görüntüleri	7
Şekil 1.6: CaCO ₃ formlarının SEM görüntüleri: (A) amorf kalsit, (B) katmanlı ve eşkenar dörtgen kalsit, (C) küresel vaterit ve (D) iğneli aragonit (Al Omari vd., 2016). .	7
Şekil 1.7: CaCO ₃ polimorflarının SEM görüntüleri ((Ramakrishna, Thenepalli ve Ji Whan, 2017).	8
Şekil 1.8: Kireçtaşı Mağarası (Kireçtaşı Mağarası, t.y.) ve Karınca Tepeleri (Karınca Tepeleri, t.y.).....	9
Şekil 1.9: Bakteriler aracılığıyla oluşan kalsiyum karbonat çökmesi	10
Şekil 1.10: Üreolitik bakteriler aracılığı ile kalsiyum karbonat çökelişi	11
Şekil 1.11: Üreolitik bakteri vasıtasıyla CaCO ₃ oluşması	12
Şekil 1.12: Bakteri sporları ve organik biyomineral (Kalsiyum laktat) ile kil parçacıklarından oluşan karışım beton matrisine gömülerek oluşan çatlağın kalsiyum karbonat çökelişi sonucu iyileşmesi	13
Şekil 1.13: Hasar görmüş tarihi anıtların görünüşleri	14
Şekil 3.1: <i>Bacillus subtilis</i> 'in sıvı kültürünün görünümü.	27
Şekil 3.2: Mermer numunelerinin %70'lik solüsyonda bekletilme görüntüsü.	27
Şekil 3.3: Hazırlanan numunelerin etüvde kurutulma görüntüsü.....	28
Şekil 3.4: Mermer numunelerin UV kabininde steril edilmesi ve bekleme kaplarına alınması.	28
Şekil 3.5: Canlı hücre sayımı için seri sulandırma işleminin yapımı.	29
Şekil 3.6: Bakteri kolonilerinin koloni sayacı cihazında sayımı.	29
Şekil 3.7: Otoklavizasyon işlemi sonrası görüntüsü.	30
Şekil 3.8: Canlı bakteri kültürlerinin otoklavizasyon sonrası görüntüsü.	31
Şekil 3.9: İnokülasyon besiyeri içine konulan mermer numunelerinin etüvde bekleme görüntüsü.....	32
Şekil 3.10: Farklı presipitasyon besiyerlerine konulan mermer numunelerin etüvde bekletilmesi.....	33
Şekil 3.11: Mermer numunelerin etüvde bekletildikten sonra bekleme koşullarına alınması.	33
Şekil 3.12: İBTAM laboratuvarında bulunan XRD cihazının görünümü.	34
Şekil 3.13: SEM, EDX ve Mapping analizi yapılan cihaz ve mermer numunelerinin Au-Pd ile kaplanmış görünüşleri.	36
Şekil 3.14: Stereo mikroskop görüntüsü.	36
Şekil 4.1: CaCl ₂ .2H ₂ O (60 gr/L) içeren CaÜ besiyeri ve Ca(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmış ve canlı bakteri uygulanmış mermer numunelerinin makroskobik görünüşleri.	37
Şekil 4.2: Kontrol grubu işlemler öncesi ve sonrası stereo mikroskop görüntüsü (10 kez büyütme).	38
Şekil 4.3: CaCl ₂ .2H ₂ O (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmış a) Kontrol (7. grup), b) Sadece besin içeren 2. grup, c) Canlı bakteri uygulanan 4. grup, d) Ölü bakteri uygulanan 6. Grup (10 kez büyütme).	39

Şekil 4.4: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde, karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin stereo mikroskopta 10, 15, 20, 30, 40 ve 45 kez büyütme görüntüleri.	40
Şekil 4.5: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde, karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri uygulanan 4. grup ile ölü bakteri uygulanan 6. grup numunelerinin mikroskopik görüntüleri (10 kez büyütme).	41
Şekil 4.6: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde, canlı bakteri uygulanan 4. grup mermer numune yüzeylerinin 40 kez büyütülmüş ve ilgili alana zoomlanmış mikroskop görüntüleri.	42
Şekil 4.7: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde, ölü bakteri uygulanan mermer numunelerinin 10, 30 ve 45 büyütme ile incelenen stereo mikroskop görüntüsü (6. grup).	42
Şekil 4.8: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 3. Grup ve ölü bakteri bulunan 5. grup numunelerinin mikroskopik görünümleri (10 kez büyütme).	43
Şekil 4.9: Karbonlanmamış kontrol gruplarının deney öncesi ve sonrası görünümü (10 kez büyütme).	44
Şekil 4.10: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 11. grup ve ölü bakteri bulunan 13. grup numunelerinin mikroskopik görünümleri (10 kez büyütme).	45
Şekil 4.11: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 10. grup ve ölü bakteri bulunan 12. grup numunelerinin mikroskopik görünümleri (10 kez büyütme).	46
Şekil 4.12: CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri: (A) amorf kalsit, (B) katmanlı ve eşkenar dörtgen kalsit, (C) küresel vaterit ve (D) iğneli aragonit (Al Omari vd., 2016).	47
Şekil 4.13: Saf CaCO_3 granüllerinin SEM görüntüleri.	47
Şekil 4.14: Karbonlanmış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup).	49
Şekil 4.15: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).	50
Şekil 4.16: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).	51
Şekil 4.17: Karbonlanmış mermer yüzeylerinin SEM-EDX ve mapping analizi (Kontrol grubu).	52
Şekil 4.18: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM-EDX ve mapping analizi (4. grup).	53
Şekil 4.19: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup örnekler canlı bakteri içermektedir. 5000 kez büyüme. K; Kalsit, A; Aragonit).	55
Şekil 4.20: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin yüzeyinden ve makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup örnekler canlı bakteri içermektedir, 1000 kez büyüme).	55

Şekil 4.21: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin SEM-EDX ve mapping analizi (4. Grup).....	56
Şekil 4.22: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen, karbonlanmış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (6. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).....	58
Şekil 4.23: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen, karbonlanmış ve ölü bakteri içeren yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM-EDX analizi (6. Grup).....	59
Şekil 4.24: Karbonlanmış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin ve $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (3. grup, A; Aragonit).....	60
Şekil 4.25: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (5. grup, V; vaterit).	61
Şekil 4.26: Karbonlanmamış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmamış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (13. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).....	63
Şekil 4.27: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (13. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).....	64
Şekil 4.28: Karbonlanmamış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin SEM-EDX analizi (14. Grup, Kontrol).	65
Şekil 4.29: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM-EDX analizi (13. grup).	66
Şekil 4.30: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış canlı bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM analizi (10. grup).	67
Şekil 4.31: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM analizi (12. Grup).	68
Şekil 4.34: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin XRD analizindeki piklerini gösteren grafik (4. Grup).	71
Şekil 4.35: Karbonlanmış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin (7.grup, üstte) ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri (4. Grup, altta) tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin AFM analiz sonuçları.	72

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAKTERİYEL KALSİFİKASYON İLE MERMER YÜZEYLERİN İYİLEŞTİRİLMESİ

Türkan DAL BİÇER

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

XII+97 sayfa

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM

Mermer anıtların ve yapıların çoğu, hizmet ömrü boyunca oluşabilecek mikro ve makro çatlakların varlığı nedeniyle bozunmalara uğramaktadır. Bu çatlaklar, zararlı maddelerin mermer matrisine girmesi için uygun yollar oluşturur. Bakteriyel biyokalsifikasyon; üreolitik bakterilerin gerekli ortam koşulları ve besin sağlandığında, ortamda biriken kalsiyum karbonat çökmesi ve kalsit oluşması sonucu bir bağlayıcı gibi davranarak bulunduğu çatlakları doldurması ve iyileştirmesi olayıdır. Mikro/makro çatlaklara uygulandığında su sızmasını engellemekte ve yapının dayanıklılığını artırabilmektedir.

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kullanılmıştır. Üre, kalsiyum klorür ve kalsiyum asetat içeren besiyerilerinde bekletilen mermer örneklerine canlı ve ölü bakteri hücreleri (10^7 CFU/mL) uygulanmıştır. Kullanılan mermer örneklerinin yarısı CO_2 'li etüvde 30 gün bekletildi. Diğer yarısı da karbonlanmamıştır. 2x2 ve 4x4 cm boyutundaki mermer örnekleri yerel işletmelerden temin edilmiştir. Stereo mikroskop SEM görüntülemeleri, EDX-Mapping analizi, XRD ve AFM analizi yapılmıştır.

B. subtilis'in CaCl_2 'li ortamda yoğun bir şekilde CaCO_3 çökelmeleri oluşturduğu görülmüştür. CaCl_2 'li ortamda genellikle kalsit ve aragonit polimorflarına rastlanmıştır. $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 'li ortamda CaCO_3 çökelmelerinin daha az olduğu görülmüştür. $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 'li ortamda genellikle kalsit, aragonit ve vaterit polimorflarının olduğu tespit edilmiştir. Karbonlanmış ve canlı bakteri hücrelerinin uygulandığı mermer numunelerinin makro gözeneklerinin kısmen mikro gözeneklerin ise tamamen doldurulduğu tespit edilmiştir. Karbonlanmamış ölü ve canlı bakteri uygulanan mermer numunelerinin mikro gözeneklerinin de kısmen doldurulduğu yapılan stereo mikroskop ve SEM görüntülerinde görülmüştür. 3-5mm çapında ve 0.02-0.03 mm çapındaki gözeneklerde biyolojik iyileştirmeler gerçekleştirilebilmiştir. SEM-EDX-Mapping ve XRD analizleri ile bu oluşumların mermer yapısından farklı olduğu ve yeni CaCO_3 kristal yapıları olduğu doğrulanmıştır. AFM ölçüm sonuçlarına göre, mermerin porozite yüksekliği kontrol grubunda 35.00 ± 7.07 μm iken örnek grubunda 22.50 ± 8.20 μm olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada CaCO_3 çökmesi sonucunda mermerde oluşan gözeneklerin iyileştirilebildiği, doğal ve çevreye zarar vermeden biyolojik olarak onarılabildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, biyokalsifikasyon, biyolojik iyileştirme, kalsiyum klorür, ölü/canlı bakteri.

ABSTRACT

Master Thesis

HEALING OF MARBLE SURFACES BY BACTERIAL CALCIFICATION

Türkan DAL BİÇER

Inonu University

Graduate School of Nature and Applied Sciences

Department of Biology

XII+97 Pages

Supervisor: Asst. Prof. Seval CING YILDIRIM

Most of the marble monuments and structures undergo degradation due to the presence of micro and macro cracks that may occur during their service life. These cracks create suitable pathways for harmful substances to enter the marble matrix. Bacterial biocalcification; It is the event that ureolytic bacteria fill and heal the crack by acting as a binder as a result of calcium carbonate precipitation and calcite formation that accumulates in the environment when the necessary environmental conditions and nutrients are provided. When applied to micro/macro cracks, it prevents water infiltration and can increase the durability of the structure.

Bacillus subtilis ATCC 6633 was used in this study. Live and dead bacterial cells (10^7 CFU/mL) were applied to marble samples kept in media containing urea, calcium chloride and calcium acetate. Half of the marble samples used were kept in a CO₂ oven for 30 d. The other half is also uncarbonated. Marble samples of 2x2 and 4x4 cm were obtained from the local firm.

Stereo microscope/SEM images, EDX-Mapping analysis and XRD analysis were performed.

It was observed that *B. subtilis* had intense CaCO₃ precipitation in the medium containing CaCl₂. Calcite and aragonite polymorphs were generally found in the medium containing CaCl₂. Less CaCO₃ precipitation was observed in the medium containing C₄H₆CaO₄. It was determined that calcite, aragonite and vaterite polymorphs were generally found in the medium with C₄H₆CaO₄. It was determined that the macro pores of the marble samples, on which carbonated and live bacterial cells were applied, were partially filled and the micro pores were completely filled. It was seen in the stereo microscope/SEM imaging that the micropores of the marble samples, which were treated with uncarbonated, dead and live bacteria, were also partially filled. Biological healing were achieved in pores with a diameter of 3-5 mm and a diameter of 0.02-0.03 mm. SEM-EDX-Mapping and XRD analyzes confirmed that these formations are different from the marble structure and have new CaCO₃ crystal structures. According to the AFM measurement results, the porosity height of the marble was 35.00 ± 7.07 µm in the control group, while it was 22.50 ± 8.20 µm in the sample group. In this study, it has been seen that the pores formed in marble as a result of CaCO₃ precipitation can be improved and biologically repaired without harming the natural and environment.

Keywords: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, biocalcification, biological remediation, Calcium chloride, dead/living bacteria.

1. GİRİŞ

İnsanoğlu tarih öncesi devirlerde, avcı ve toplayıcı bir yaşamı benimsemiştir. İhtiyaçlarını karşılamak için hayvanları avlayarak, bitki ve meyveleri toplayarak beslenme ihtiyacını karşılamıştır. Barınma hususunda ise ağaç kovuklarını ve mağaraları barınma alanı olarak seçmiştir. Akıl yetisi sayesinde zamanla daha iyi yaşayabilmek adına barınma alanları inşa etmeye başlamış ve ihtiyaç duyduğu beslenme ürünlerini yetiştirmiştir. Ekim faaliyetleri zamanla toprağın etkili bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. Bu da toprağa bağlı yerleşik bir yaşamın gelişmesine neden olmuştur. İlk dönemlerde insanlar yakın çevredeki malzemelerle ilkel konutlar inşa etmişlerdir. Ancak zamanla konutların malzemesinde ve mimarik özelliklerinde büyük değişimler meydana gelmiştir.

İlk çağdan itibaren yerleşik hayata geçen insanlar, yapı malzemesinin bölgeden bölgeye değişkenlik gösterdiği konutlar inşa etmişlerdir. Bölgedeki hâkim malzemenin özelliğine göre hangi malzemenin konut yapımında kullanılacağı insanlar tarafından tespit edilmiştir. Bölgedeki malzeme taş ise taş evler, toprak ise kerpiç evler, ağaç ise ahşap evler, soğuk ve buzla kaplı bir yerse buz evler (igloo) veya üç malzemenin (taş, toprak ve ağaç) bir arada kullanıldığı karma malzemeli evler yapılmıştır. Ancak zamanla şehirleşmenin yaygınlaşmasıyla doğal ortamdan uzaklaşmıştır. Bu da konut malzemesine duyulan ihtiyacı artırmış ve malzemenin tek tipleşmesine neden olmuştur. Bu doğrultuda özellikle betonarme yapılar yaygın olarak kullanılır hale gelmiştir. Türkiye’de yakın dönemde briketler, fırınlarda pişirilmiş tuğlalar yapı malzemesi olarak kullanılmakta iken günümüzde ponza, perlit ve ytong (gaz beton) gibi malzemeler betonarme yapılarda kullanılmaya başlanmıştır.

Günümüzde betonarme yapıların yaygınlaşması ile birlikte mermer kullanımında da önemli bir artış meydana geldiği görülmektedir. Dış ticaret verilerinde Çin, İtalya ve Türkiye’nin mermer üretiminde dünyanın en önemli üç ülkesi olduğu görülmektedir. Dünyanın en önemli mermer rezervlerine sahip olan Türkiye’nin rezervleri yüksek olmasına rağmen işlenmiş mermer ihracatında önde gelen ülkelerden biri olmaması dikkat çekicidir. Buna karşın Çin’in mermer kaynağı az olmasına rağmen mermer ihracatında ilk sıralarda yer alması, onun iyi bir ihracat ülkesi olduğunu göstermektedir. Türkiye’nin mermer (doğal taş) üretiminde her geçen yıl artış gerçekleşmektedir. Ancak hammadde satan bir ülke

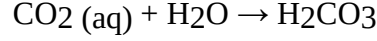
pozisyonundan sıyrılmadığı sürece ülke ekonomisine pozitif manada bir katma değer sağlayamayacağı ifade edilebilir (Adıgüzel ve Şengüler, 2019). Mermerin, gerek hammadde gerekse işlenmiş yapı malzemesi olarak kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle Türkiye'nin mermer üretimine verdiği önemi pazarlamaya da vermesi gerekmektedir. Böylece sağlam yapısı ve estetik görünüşü nedeniyle yapılarda her geçen gün daha fazla tercih edilen mermerin işlenerek ihraç edilmesi, Türkiye'nin ekonomik gücüne katkı sağlayabilir.

Günümüzde mermer birçok yerde kullanılmaktadır. Mermerin niteliğinden dolayı kullanıldığı yapılarda çevre koşullarına ve iklim şartlarına bağlı olarak hasarlar meydana gelmektedir. Özellikle asit yağmurları daha fazla hasar oluşturmaktadır. Mermerin ana bileşiği olan kalsiyum karbonatın (CaCO_3) sudaki çözünme oranı azdır. Ancak asit yağmurları sonucu ortaya çıkan asitler, CaCO_3 'ı kimyasal reaksiyona uğratarak çözünebilir tuzlara dönüştürebilirler. Yıkanma sonucunda malzeme kaybı nedeniyle yapıların yüzeylerinde delikler oluşur, aşınma ve renk değişimi meydana gelir (Naidu, Blair ve Scherer, 2016). Yapılarda oluşan hasarların tamir edilmemesi sonucu birçok yapının yok olduğu ve birçoğunun da yok olmakla karşı karşıya kaldığı görülmektedir. Yapılarda meydana gelen deformasyonlar geleneksel yöntemlerle onarılmaktadır. Mesela akrilik veya epoksi reçineleri yüzey tabakalarının oluşumunda kullanıldığında, uyumsuz ve zararlı yüzey filmleri meydana gelmektedir. Buna ilaveten, organik çözücülerin fazla kullanılması çevre kirliliğinin artmasına da neden olmaktadır. CaCO_3 üretmek için Ca(OH)_2 çözeltisi kullanılan kireç-su tekniği de, kırılğan ve etkisiz kabukların oluşmasına neden olmaktadır. Kullanılan teknikler yapının dayanıklılığını azaltmakta olup yeterli gelmemektedir (De Muynck, De Belie ve Verstraete, 2010). İnsan sağlığını olumsuz etkileyen malzemeler aynı zamanda yapıların da kötü görünmesine neden olmaktadır. Bu da alan uzmanlarını yeni arayışlara itmektedir. Verilen yöntemlerin dışında günümüzde üreolitik-odaklı CaCO_3 oluşumu da araştırılmaya başlanmıştır. Kalsiyum karbonat daha çok üreolitik bakteriler tarafından oluşumunun yüksek olduğu birçok çalışmada tespit edilmiştir.

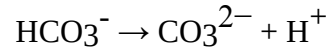
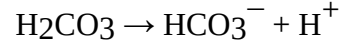
1.1 Kalsifikasyon

Kalsifikasyon, toprakta bulunan minerallerin ve kaya tuzlarının bir araya gelmesiyle kireç taşı oluşturma işlemi olarak tanımlanmaktadır. Bir başka ifade ile kalsifikasyon, karbondioksitin (CO_2) kalsiyum karbonata (CaCO_3) dönüştürülmesi süreçlerini kontrol eden bir mekanizmadır. Karbondioksitin (CO_2) sudaki çözünme oranı, atmosferde en çok

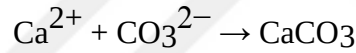
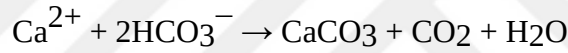
bulunan diğer üç gazdan (N₂, O₂ ve Ar) daha yüksektir. Çözünmüş CO₂ su ile reaksiyona girerek karbonik asit (H₂CO₃) oluşturur.



Karbonik asitin oluşumu sonucu H⁺ açığa çıkar ve bikarbonat (HCO₃⁻) oluşur. Bikarbonatın bir kısmı da karbonata (CO₃²⁻) dönüşür.



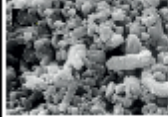
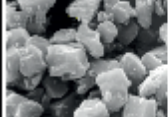
Çözelti, göl veya deniz suyu gibi doğal sular ise karbonat anyonları, çözünmeyen karbonatlar oluşturmak için çözeltilerde bulunan katyonlarla etkileşime girip Ca²⁺ ortamda varsa CaCO₃ oluşturabilir (Kamennaya, Ajo-Franklin, Northen ve Jansson, 2012).



1.2 Kalsiyum Karbonat

Kalsiyum karbonat (CaCO₃), yeryüzünde bulunan en yaygın mineraller arasındadır. Ayrıca kalsiyum karbonat doğadaki en bol bulunan biyomineraldir. Prokaryotlar gibi tek hücreli organizmalar, bitkiler ve kabuklular gibi çok hücreli organizmalar vb. farklı canlı organizmalar tarafından kalsiyum karbonat çökeltilmesi sonucu, doğal taşlar gibi çeşitli maddelerden ve bazı deniz hayvanlarının kabuklarına kadar çeşitli yapıları oluşturabilmektedir (Kart, 2021).

Karbonatlı kayaçların temel minerali kalsit olup, kimyasal yapısı CaCO₃ şeklindedir. Kalsit camsı parlaklıkta olup renksiz saydam özelliğe sahiptir. Kalsit olarak isimlendirilen CaCO₃, dünya pigment pazarında az miktarda tüketilmektedir. Esas tüketim alanı olarak kalsiyum karbonat oluşumları şunlardır: tebeşir, beyaz renkli saf kireç taşları ile iri kristalli mermerler (Şekil 1. 1) (Ercan, Koltka ve Sabah, 2018).

	• Zayıf dayanımlı sedimanter kayaç • Yaş: 80-110 milyon yıl	kristalin
	• Güçlü dayanımlı sedimanter kayaç • Yaş: 110-150 milyon yıl	kristalin
	• Metamorfik kayaç • Yaş: 300-500 milyon yıl	kristalin

Şekil 1.1: Doğal kalsiyum karbonat oluşumları (Arnold, 1998 ve Kogler, 2000'den akt. Ercan vd., 2018).

CaCO_3 yapıştırıcılar, dolgu macunları, gıda ve farmasötikler, boyalar, kaplamalar, çimentolar ile inşaat malzemeleri çeşitli alanlarda kullanılabilen katma değerli yapılara dönüşebilmektedir (Chang, Kim, Lee, Chui, Kim ve Park, 2017).

Ayrıca ısı ile su yalıtımını sağlayan membran üretiminin, ses izolasyonu sağlayan plakaların halı tabanlarının üretiminde kullanıldığı görülmektedir. Kâğıt sektöründe önemli bir yere sahip olan kalsit az selüloz kullanımına sebep olduğundan, çevrenin korunmasında önemli bir yere sahiptir. Tıp alanında, kronik böbrek yetmezliğinde, besinlerdeki fosforun bağlanabilmesi ve fosfatlı bileşiklerin dengesinin sağlanmasında kullanılmaktadır. İlaç üretiminde, en çok da mide ilaçlarında kullanıldığı tespit edilmiştir (Demirci, 2019). Kalsiyum karbonat çökelimi, sonuçta üç farklı polimorfa dönüşmektedir. Bunlar; hekzagonal kristaller olan kalsit, ortorombik kristaller olan aragonit ve rhombohedral kristaller olan vaterit şeklinde bulunmaktadır. Kalsit, aragonit ve vaterit saf halde bulunan kalsiyum karbonat mineralleridir. Bu üç polimorfun oluşumu pH, sıcaklık, konsantrasyon, karbonat ve kalsiyum iyonlarının oranı, katkı maddeleri, karıştırma ve reaksiyon süresi gibi sentez faktörlerine karşı duyarlıdır. Kalsit, bu ortam koşullarında en kararlı polimorftur (Chang vd., 2017).

1.2.1 Kalsit

Kalsit, eşkenar dörtgen yapısında ve kübik görünümünde bir kristaldir (Mateescu, Sarbu, Isopescu, Dumitrescu ve Ghica, 2011) (Şekil 1.2). Normal atmosferik koşullar altında oda sıcaklığında en kararlı polimorftur (Han, Hadiko, Fuji ve Takahashi, 2006).



Şekil 1.2: Kalsit (https://tradevalley.com/tr/product/kalsit_17470).

Kalsit, renksiz, beyaz, mavi, sarı ve kahverengi görünümünde çökelebilmektedir (Seifan, Samani ve Berenjian, 2016). Kalsit kristalleri düşük konsantrasyonda ve aşırı doymun ortamda Ca^{+2} varlığında bulunmaktadır (Chunxiang, Jianyun, Ruixing ve Liang, 2009). Ayrıca çöktürme işleminde ilk olarak polimorf karışımı oluşur ve sonraki aşamalarda polimorfik dönüşümler gerçekleşir. Sıcaklık, pH, ortamdaki katkı maddeleri, hidrodinamik koşullar ve aşırı doymunluk gibi parametreler bu dönüşümü etkilemektedir (Mateescu vd., 2011). Kalsit yaygın olarak mineral yapıda bulunmaktadır ve sızdırmaz kaplama, yapıştırıcı gibi uygulama alanlarında genellikle kullanılır (Kırboğa Okumuş, 2012).

1.2.2 Vaterit

Vaterit, altıgen yapılı ve küresel görünümü olan bir polimorftur (Mateescu vd., 2011). Vaterit kalsitten daha az yoğun olduğundan, vaterit parçacıkları daha fazla yer kaplayabilmektedir. Vaterit genellikle renksiz görünümündedir (Şekil 1.3). Bundan dolayı yapıların görünümünde farklılık yapmadığı için rahatlıkla kullanılmaktadır (Seifan vd., 2016).



Şekil 1.3: Vaterit (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaterite-sea12a.jpg>).

Vaterit, standart ve jeolojik koşullarda kalsit ile karşılaştırıldığında yarı kararlı bir kristaldir. Vateritin çözünmesi ve kalsitin kristalleşmesi sonucu vaterit kalsite dönüşebilmektedir (Wei, Shen, Zhao, Wang ve Xu, 2003). Amonyak, vateritin çekirdeklerinin büyümesine katkıda bulunmakta ve vateritin kalsite dönüşmesini engellemektedir (Han vd., 2006).

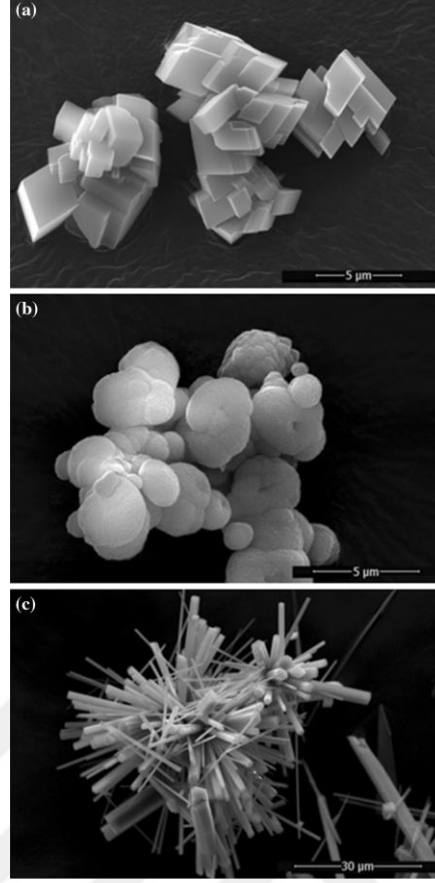
1.2.3 Aragonit

Aragonit, iğne görünümünde olup ortorombik yapıya sahip bir polimorftur (Mateescu vd., 2011) (Şekil 1.4). Yarı kararlı bir polimorf olduğu için kolayca kararlı bir polimorf olan kalsite dönüşebilmektedir. Bunun için ortamın pH'sı, sıcaklığı ve aşırı doygunluğu gibi koşullar polimorf oluşumunu etkilemektedir (Han vd., 2006).

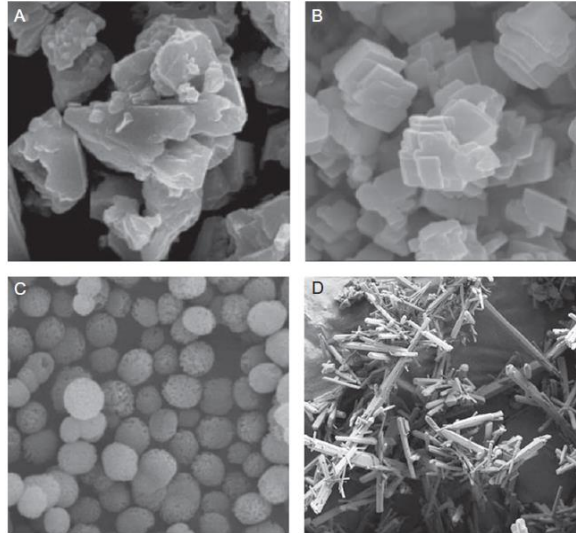


Şekil 1.4: Aragonit (<https://tr.pinterest.com/pin/731342426970458922/?send=true>).

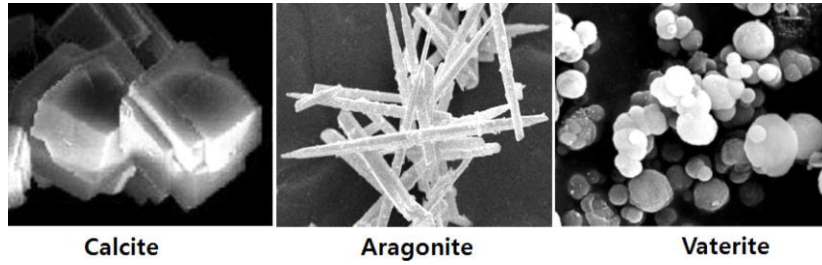
Aragonit; renksiz, beyaz, sarı ve kahverengi gibi farklı renklerde çökelebilen bir partiküldür (Seifan vd., 2016). Aragonit, kalsitten daha az kararlı olmasına rağmen magnezyum aragonit oluşumunu destekleyebilmektedir. Kalsiyum karbonat çökelişi sırasında ortamda Mg^{+2} 'un yüksek olması aragonit polimorfonun oluşmasına neden olmaktadır. Yüksek Mg^{+2} iyonunun bulunduğu ortamda, monohidro kalsit nanokristallere dönüşmektedir. Monohidro kalsitin metastabilitesi sonucu, nanopartiküller sürekli olarak birleşir ve pürüzsüz bir iğneye benzeyen aragonite dönüşürler. Nanopartiküllerin kaybolmasıyla, sadece pürüzsüz yüzeyli aragonit ortamda kalmaktadır (Wei vd., 2003). Şekil 1.5-7'de kalsiyum karbonat polimorflarının SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntülerde katmanlı ve eşkenar dörtgen kalsit, küresel vaterit ve iğneli aragonit yapıları tespit edilmiştir.



Şekil 1.5: Kalsiyum karbonat polimorflarının (a) kalsit, b) vaterit, c) aragonit) SEM görüntüleri (ŠEvčík vd., 2017).



Şekil 1.6: CaCO_3 formlarının SEM görüntüleri: (A) amorf kalsit, (B) katmanlı ve eşkenar dörtgen kalsit, (C) küresel vaterit ve (D) iğneli aragonit (Al Omari vd., 2016).



Şekil 1.7: CaCO₃ polimorflarının SEM görüntüleri ((Ramakrishna, Thenepalli ve Ji Whan, 2017).

1.3 Mikrobiyal Olarak İndüklenen Karbonat Çökeltisi

Mineralizasyon, biyolojik ve kimyasal şekilde doğada kendiliğinden gerçekleşen organik yapıların kendilerini oluşturan inorganik yapılara dönüşmesi olayıdır (Yıldırım, Gürtuğ ve Sesal, 2016). Mineraller hücre içinde ya da üzerinde belirli bir alanda sadece biyolojik olarak kontrol edilen mineralizasyon şeklinde belirli koşullarda sentezlenir (Reddy, 2013). Biyomineralizasyon ise mikroorganizmalar aracılığı ile minerallerin çökeltilmesi ve yapılarının değişmesi işlemidir. Biyominerallerin üretimi için üç farklı mekanizma bulunmaktadır:

1. Biyolojik olarak kontrol sağlayan mineralizasyon, özellikle mineral oluşumuna neden olan hücresel faaliyetlerden meydana gelir. Bu aşamada mikroorganizmalar, hücrenin içinde veya üzerinde belirli bir alanda ve belirli koşullarda minerallerin çekirdeklenmesi ile büyümesini kontrol etmektedir.
2. Biyolojik olarak etkilenen mineralizasyon, biyofilmlerle bağlantılı hücre dışı polimerik maddelere benzer şekilde hücre yüzeyindeki organik maddelerin oluşumundan kaynaklanan pasif mineral çökeltimi sürecidir.
3. Biyolojik olarak indüklenen mineralizasyon, aşırı doyumluk sonucunda minerallerin çökmesine yol açan mikroorganizmaların aktiviteleri ile ortamın kimyasal modifikasyonu olayıdır (Anbu, Kang, Shin ve So, 2016; Anitha, Abinaya, Prakash, Seshagiri Rao ve Vanavil, 2018).

Biyomineraller etrafımızdaki birçok şeyde görebileceğimiz yapılardır. Bunlar; mercanlar, karınca tepeleri, mağaralar, yumuşakça kabukları, dişler, kemikler ve kayalar şeklinde görülmektedir (Şekil 1.8) (Reddy, 2013).



Şekil 1.8: Kireçtaşı Mağarası (Kireçtaşı Mağarası, t.y.) ve Karınca Tepeleri (Karınca Tepeleri, t.y.).

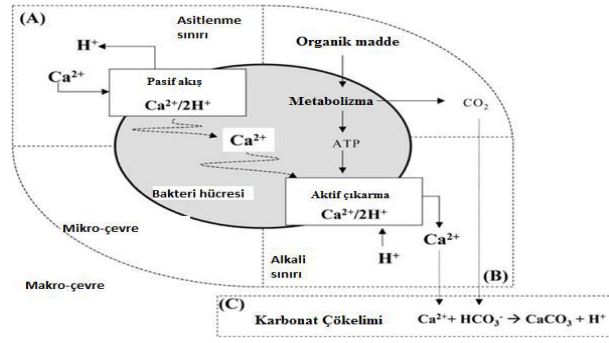
Mikrobiyal olarak indüklenen karbonat çökmesi (MİKÇ), bir mikroorganizmanın metabolik süreçleri sonucunda oluşan mineralleşme olayıdır. MİKÇ oluşumunda bazı bakteri suşları, üreyi hidrolize etmek ve karbonat iyonları üretmek için enzimlerden faydalanmaktadırlar. Ayrıca, bakteri hücrelerinin biyokimyasal aktivitelerine bağlı şekilde bulundukları ortamda doygunluğa ulaştıkları sırada kalsiyum karbonat oluşturmaları ile ifade edilebilir. Bu aktiviteler sırasında mikroorganizmalar ortamdaki Ca^{+2} iyonu ile reaksiyona girerek bir veya daha çok metabolik ürün (CO_3^{-2}) üretebilmektedirler. Biyokimyasal aktiviteler üreaz ve karbonik anhidraz enzimleri ile oluşturulur ve çökelişi olan süreçler karmaşık biyokimyasal reaksiyonlarla şekillenmektedir (Achal vd.'den Akt. Tepe, 2021).

Kalsiyum karbonat çökmesi şu faktörler tarafından yönetilmektedir:

1. Kalsiyum konsantrasyonu,
2. Çözünmüş inorganik karbon konsantrasyonu,
3. pH,
4. Çekirdeklenme alanlarının bulunmasıdır (Candoğan, 2015).

Bu faktörlerin dışında, bakteri türü, bakteri konsantrasyonu, sıcaklık ve üre konsantrasyonu vb.'nin de kalsiyum karbonat çökeltmesini etkilediği bildirilmektedir.

Kalsiyum karbonat, mikroorganizmalar tarafından hem doğal olarak hem de yapay yollardan oluşturulan bir dolgu malzemesidir (Candoğan, 2015). Bakteriyel kalsiyum mekanizması ve bunun sonucunda oluşan CaCO_3 çökmesi, Şekil 1.9'da gösterilmektedir.



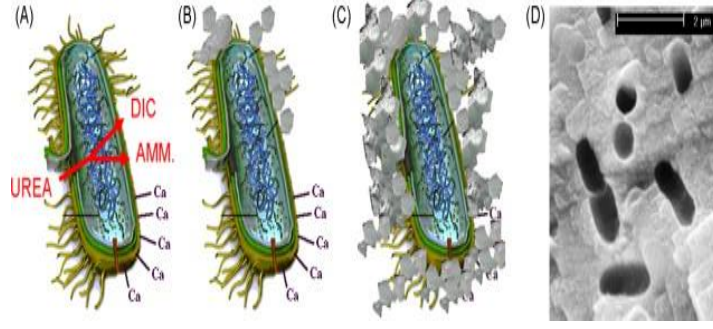
Şekil 1.9: Bakteriler aracılığıyla oluşan kalsiyum karbonat çökmesi (Hammes, 2002).

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökmesi için bir kalsiyum kaynağının olması önemlidir. Ancak Ca^{+2} iyonunun konsantrasyonu da bu süreçte büyük bir etkiye sahiptir. Yüksek oranda bulunan Ca^{+2} iyonu konsantrasyonu mikrobiyal suşun aktivitesini etkileyerek kalsiyum karbonatın üretimini engelleyebilir. Düşük oranda bulunması da iyonik reaksiyona birkaç elektron alıcısı ekleyebilir. Bunun için Ca^{+2} konsantrasyonu iyi şekilde ayarlanmalıdır (Seifan vd., 2016).

1.4 Bakteriyel Biyokalsifikasyon

Biyokalsifikasyon, biyolojik aşamaların sonucu kalsiyum karbonatın çökelişi ve kalsit oluşumu olayıdır (Demirci, 2019). Bakteriyel biyokalsifikasyon, bazı bakteri türlerinin gerekli koşullarda oluşturulması sonucu hücre dışı kalsiyum karbonat salgılaması ile gözeneklerin ve çatlakların dâhili olarak doldurulmasıdır. Bu şekilde yapılarda oluşan çatlaklar daha kompakt ve dirençli hale gelir, basınç dayanımı önemli ölçüde artar ve sızıntıyı kalıcı bir şekilde azaltmış olur. Kalsiyum karbonat çökelişini daha çok üreolitik bakterilerin gerçekleştirdiği söylenebilir (Şekil 1.10).

Ürenin üreaz enzimi tarafından hidrolizi sonucu kalsiyum karbonatın oluştuğu görülmektedir. Bunun meydana geldiği basamaklar; öncelikle 1 mol üre 1 mol amonyak ve 1 mol karbamata hidrolize olmaktadır. Bununla birlikte 1 mol amonyak ve karbonik asit oluşmaktadır. Bu ürünler suda dengeli şekilde bikarbonat, 2 mol amonyum ve hidroksit iyonları oluştururlar ve pH artışı sonucu bikarbonat karbonat iyonlarına dönüşür. Ortamdaki kalsiyum iyonlarının varlığı ile kalsiyum karbonat çökelişi meydana gelmektedir (Hammes, Boon, De Villiers, Verstraete ve Siciliano, 2003).

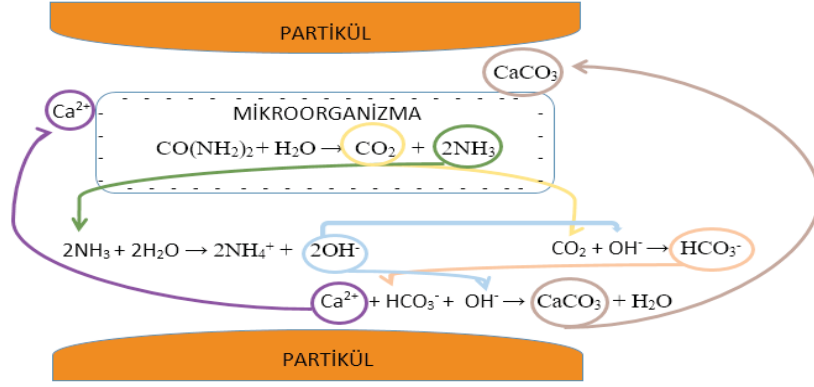


Şekil 1.10: Üreolitik bakteriler aracılığı ile kalsiyum karbonat çökelişi (Anbu vd., 2016). A, Ca iyonlarının bakteriye tutunması; B, Bütün yapının kapsül oluşturmaya; C, Kalsiyum karbonat çökelişinin oluşması; D, Kalsiyum karbonat çökelişinin elektron mikroskopundaki görünümü.

Kalsiyum karbonat kristallerinin çökelişi, aşırı doygunluk elde edildikten sonra bakteri hücre duvarında heterojen çekirdeklenme ile meydana gelmektedir (Siddique & Chahal, 2011). Üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin reaksiyonları sonucu hücrenin dış kısmında CaCO_3 çökelişinin olması için ortamda kalsiyum iyonları belirli seviyede olmalıdır. Bundan dolayı kalsiyum karbonat çökeliş miktarının kalsiyum kaynağının türüne ve ortamdaki yoğunluğuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Kart, 2021).

1.4.1 Üre konsantrasyonu

Üre, yapısında azot olan organik bir bileşiktir. Ayrıca üreaz enziminin substratı şeklindedir. Bunun sonucu olarak ürenin ortamdaki miktarı mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi için önemlidir (Kart, 2021). Negatif yüzey yükü ve üreaz enzime sahip olan mikroorganizmalar, ortamdaki üreyi karbonat ve amonyuma parçalayarak kalsiyum iyonlarının mikroorganizmaların negatif yüzeyine bağlanmasını ve ortamda CaCO_3 çökelişinin oluşmasını sağlayabilir (De Muynck vd., 2010). Ortamdaki üre miktarının fazla olması sonucu bakteriler daha çok CaCO_3 çökelişine neden olmaktadır. Bunun için, üreolitik bakteriler daha çok ortam koşullarına dayanıklı ve uyum sağlayan bakteriler olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.11).



Şekil 1.11: Üreolitik bakteri vasıtasıyla CaCO₃ oluşması (Yıldırım vd., 2016).

Ürenin üreaz enzimleri tarafından hidrolizi, ilgili bir proton üretimi olmadan karbonat iyonlarını üretebilen ve biyolojik şekilde oluşan birkaç reaksiyondan biridir. Bu hidroliz kalsiyumun fazla olduğu bir ortamda oluştuğunda, katı bir kristal olan kalsit ortamda çökelmektedir. Bu nedenle üreolitik bakterilerin ortama eklenmesi ile suda bulunan kalsiyum iyonlarını uzaklaştırmak kolay ve etkili bir yöntem olabilir (Siddique & Chahal, 2011).

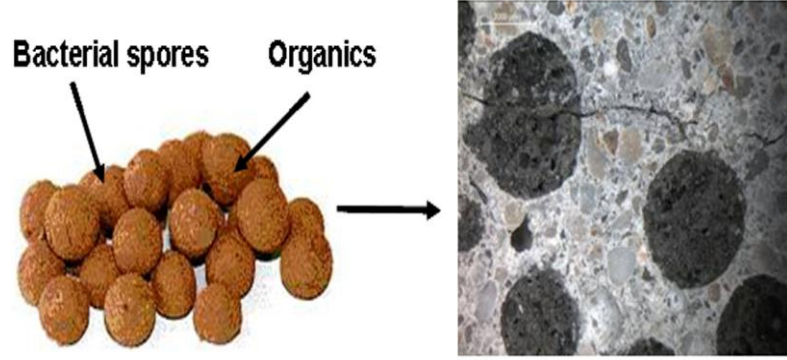
Üre hidrolizi ile biyoçimentolama, biyolojik onarım, biyolojik tıkama, biyolojik tortulaşma ve su arıtma gibi alanlarda çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Yıldırım vd., 2016).

1.5 Biyolojik İyileştirme

Yapılar inşa edilirken kullanılan beton ya da mermer gibi malzemelerin yüzeylerinde zamanla iç ve dış etkenlerden kaynaklı olarak çatlaklar meydana geldiği görülmektedir. Bu çatlaklar zamanla onarılmazsa çatlaklardaki deformasyon ilerler ve onarımı güçleşir. Bunun için bazı geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin maliyetleri yüksek olduğu için araştırmacılar yeni arayışlara yönelmektedir. Bu doğrultuda mikrobiyal CaCO₃ çökelişi ile çatlakların onarımı üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Hedeflenen şey, oluşan çatlakların ve porların CaCO₃ ile kapatılması bir de geçirgenliğin azaltılarak yapının ömrünün uzatılmasıdır.

Delft Teknoloji Üniversitesi'nde Henk Jonkers ve arkadaşları yeni nesil kendi kendini iyileştiren betonlar geliştirmek için, farklı şekillerde kendi kendini iyileştiren katı maddelerin yapılarını araştırmaya başlamışlardır. Bunun için canlı ve hareketsiz bakteri ile gözenekleri genişletilmiş kil partiküllerin içine, paketlenen organik bileşiklerin karıştırılmasıyla çatlak iyileştirme oranı araştırılmıştır. Sonuç olarak, bakteri bulunan

betonda kalsiyum laktatın kalsiyum karbonata dönüşümü ile oluşan çatlakların kapandığı gözlemlenmiştir (Şekil 1.12) (Jonkers, 2011).

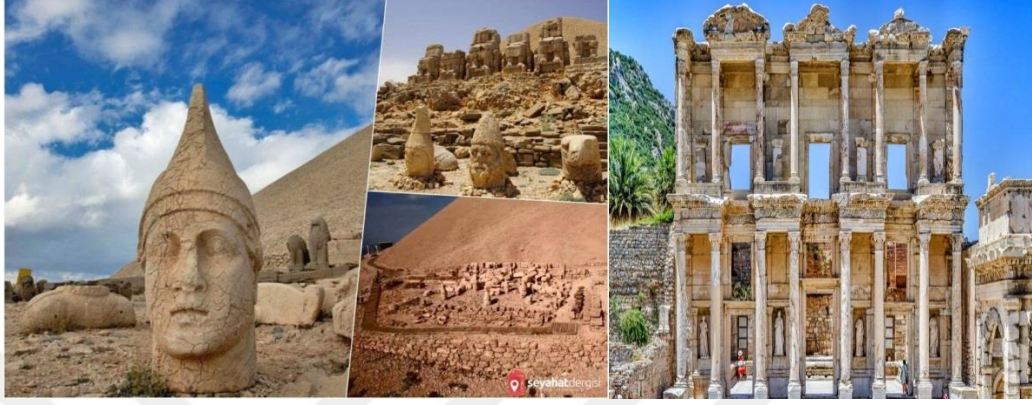


Şekil 1.12: Bakteri sporları ve organik biyomineral (Kalsiyum laktat) ile kil parçacıklarından oluşan karışım beton matrisine gömülerek oluşan çatlağın kalsiyum karbonat çökelişi sonucu iyileşmesi (Jonkers, 2011).

Otonom bakteriyel, kendi kendini iyileştirme yapan çeşitli çalışmalardan biri ile elde edilebilir. Ayrıca suya erişim, iyileştirilecek çatlağın hacmi, betonun iyileşme süresi ve bakterinin türü de betonun biyo tabanlı iyileşmesi için gerekli faktörlerdir (Luhar, Luhar ve Shaikh, 2022). Biyolojik olarak kendi kendini iyileştiren yapıların etkinliği, biyolojik çökeltilerin miktarına ve farklı ortamlarda kısa sürede aktivasyon olasılığı gibi çeşitli faktörlerden de etkilenmektedir. Uygun mikrobiyal bileşenlerin optimum seviyelerde eklenmesi bütün çatlakları ve oluşan gözenekleri kapatmaktadır. Böylece biyolojik olarak kendi kendini onarma yöntemi ile hasar gören yapıların verimli ölçüde tamiri mümkün olabilmektedir (Seifan vd., 2016).

Antik çağlardan beri mimarlar, tarihi anıtların inşası için mermer ve kireçtaşı gibi dayanıklı taşların kullanımına odaklanmışlardır. Bu tür anıtların dış duvarları ve cepheleri, taşın aşamalı bozulmasına neden olan değişken çevre koşullarına ve kirliliğe maruz kalmaktadır. Yüzeylerde meydana gelen bu tarz deformasyonlar müdahale edilmediğinde yapılarda ciddi boyutta zarara neden olmaktadır (Şekil 1.13). Yüzey iyileştirmelerinde çeşitli restorasyon teknikleri uygulanmaktadır. Fakat geleneksel restorasyonların birçok eksik yönü bulunmaktadır (Liu vd., 2011). İnorganik malzemeler (çimento harcı gibi) kullanılarak yapılan restorasyon çalışmalarında yapıların yüzeyindeki veya içindeki çatlaklar dolmaktadır. Ancak çözünabilir kristal minerallerin şişmesi ve farklı genleşme katsayıları hızlandırılmış yapısal ayrışma ve ikincil bozunma mekanizmalarına yol açabilmektedir (Baglioni vd., 2013). Bu nedenle, taş yapıların orjinal estetiğini koruyan, yeni koruma ve restorasyon stratejilerine gereksinim vardır. Bakteri bazlı kendi kendini iyileştirmede

hedeflenen, özellikle yüksek dayanıklılık ve sızıntı önleme ile bu yapıların ömrünün uzatılmasıdır. Bakteriler mineral öncü bileşimini daha iyi kireçtaşı olarak bilinen mineral kalsiyum karbonata dönüştürür. Çatlak yüzeyinde kireçtaşının çökmesi, çatlakların sızdırmazlığını ve tıkanmasını sağlar, bu da matrisi su ve diğer zararlı malzemeler için daha az erişilebilir yapmaktadır. (Katariya, t.y.).



Şekil 1.13: Hasar görmüş tarihi anıtların görünüşleri (Nemrut Dağı, t.y.; Efes Antik Kenti, t.y.).

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu kullanılarak mermer yüzeylerinde oluşan çatlakların CaCO_3 çökelişi ile kapatılması yöntemi kullanılmıştır. Böylece mermer yüzeyindeki çatlakların dâhili olarak dolması ve sızıntıya karşı dirençli hale gelmesi beklenmektedir. Oluşan çatlakların doldurulması ile yapı ömrünün uzatılması ve uzun yıllar dayanıklı bir şekilde özelliğini koruması hedeflenmektedir. Bu çalışmada, tamamen doğa dostu ve yenilikçi bir yöntem kullanılmıştır. Dünya genelinde ve Türkiye’de az sayıda çalışmanın olduğu bu konu, geleneksel yapım yöntemlerine karşı alternatif ve yenilikçi bir uygulamadır. Sürdürülebilir ve düşük karbon salınımı içeren süreçlerin giderek önemli olduğu günümüzde, tamamen doğal ve biyolojik bir süreç olan bakteriyel biyokalsifikasyon ile mermer yüzeylerin iyileştirilmesinin biyobeton alanında da kullanılabilir bir yöntem olduğu ifade edilebilir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüzde mermer birçok yerde kullanılmaktadır. Mermerin niteliğinden dolayı kullanıldığı yapılarda çevre koşullarına ve iklim şartlarına bağlı olarak hasarlar meydana gelmektedir. Özellikle asit yağmurları daha fazla hasar oluşturmaktadır. Mermerin ana bileşiği olan kalsiyum karbonatın (CaCO_3) sudaki çözünme oranı azdır. Ancak asit yağmurları sonucu ortaya çıkan asitler, CaCO_3 'ı kimyasal reaksiyonla yıkayarak çözünebilir tuzlara çevirebilirler. Yıkama sonucunda malzeme kaybı nedeniyle yapıların yüzeylerinde delikler oluşmakta, aşınma ve renk değişimi meydana gelmektedir (Naidu, Blair ve Scherer, 2016). Yapılarda oluşan hasarların tamir edilmemesi sonucu birçok yapının yok olduğu ve birçoğunun da yok olmakla karşı karşıya kaldığı görülmektedir. Yapılarda meydana gelen deformasyonlar geleneksel yöntemlerle tamir edilmektedir. Mesela akrilik veya epoksi reçineleri yüzey tabakalarının oluşumunda kullanıldığında, uyumsuz ve zararlı yüzey filmleri meydana gelmektedir. Buna ilaveten, organik çözücülerin fazla kullanılması çevre kirliliğinin artmasına da neden olmaktadır. CaCO_3 üretmek için $\text{Ca}(\text{OH})_2$ çözeltisi kullanılan kireç-su tekniği de, kırılgan ve etkisiz kabukların oluşmasına neden olmaktadır. Kullanılan teknikler yapının dayanıklılığını azaltmakta olup yeterli gelmemektedir (De Muynck, De Belie ve Verstraete, 2010). İnsan sağlığını olumsuz etkileyen malzemeler aynı zamanda yapıların da kötü görünmesine neden olmaktadır. Bu da alan uzmanlarını yeni arayışlara itmektedir. Verilen yöntemlerin dışında günümüzde üreolitik-odaklı CaCO_3 oluşumu da araştırılmaya başlanmıştır. Kalsiyum karbonatın daha çok üreolitik bakteriler tarafından oluşumunun yüksek olduğu birçok çalışmada tespit edilmiştir.

Zhong, Liu, Zhang, Wang, Chen, Li, Liu ve Ming (2022) tarafından yapılan araştırmada, rezervuar geri kazanımını artırmak için mikrobiyal kaynaklı kalsiyum karbonat çökeltmesi üzerine deneysel çalışma ile *Bacillus subtilis*'in glikoz ve üre karbon kaynaklarının olduğu ortamda önce glikozun tüketildiği gösterilmiştir. Mineralizasyon süresini uzatmak için ilk olarak glikozu yıkma özelliği kullanılarak, heterojen rezervuarların yeniden kazanılmasını artırmak için çalışmalar yapılmıştır. *Bacillus subtilis* aracılığı ile glikoz ve üre kullanımının analiz edilerek ortamdaki glikoz miktarının ayarlanması, öncelikle biyoasit üretebilen bakteriler vasıtasıyla glikoz metabolizmasının

fermentasyonunu geciktirilebileceği anlaşılmıştır. Bu yolla mikroorganizmanın da ortama girmesinde gecikme olabileceği sonucuna varılmıştır (Zhong vd., 2022).

Luhar, Luhar ve Shaikh (2022), bakteriyel betonun kendi kendini iyileştirmesi ve mekanik dayanıklılık özelliğinin tekrardan kazandırılması hedeflenmiştir. Bakterilerin doğrudan eklenmesi veya kapsül şeklinde eklenerek çatlakların iyileşmesi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *Bacillus pasteurii* ve *Bacillus subtilis*'in çatlakları iyileştirmede etkili olduğu düşünülmüş, su ve klorür geçirgenliğinin azaldığı tespit edilmiştir. Çatlak genişliği 0.97 mm ve çatlak derinliği 32 mm olan yapıların kapanma oranının yüksek olduğu düşünülmektedir. Kalsiyum kaynaklarından kalsiyum laktat'ın eklenmesi sertleşme zamanını geciktirebilir, kalsiyum format ve kalsiyum nitrat da sertleşme süresini artırabilir. Kapsüllü bakterilerin uzun süre dayanabildiği ve oluşan çatlakların CaCO_3 'la dolarak dayanıklılığının arttığı düşünülmektedir (Luhar vd., 2022).

Çetinkaya (2021) yaptığı çalışmada, biyobeton üzerinde üreolitik bakterilerin etkisini araştırmıştır. Çalışma için Ankara-Eskişehir yolu ve Salda Gölü'nden üreaz enzimi üretme yeteneğinde olan üreolitik bakterilerin izolasyonu için toprak ve çamur örnekleri toplanmıştır. Toprak zenginleştirme ile toprak kolonları oluşturulmuş, üreolitik bakteriler çoğaltılarak modifiye üre agar üzerine yayma ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada sarı renkten pembe-mor renge dönüşüm, üreaz aktivitesinin bir göstergesi kabul edilmiş ve tek koloni izolasyonu elde edilmiştir. Bakteri identifikasyonu için kullanılan 23 izolat 16S rDNA kolonilerindeki analiz %99'un üzerinde benzerlik göstermiştir. Sonuçta, izole edilen ve tanımlanan izolatların üreaz enzimi üretme yeteneğine sahip olduğu, biyobeton araştırmaları için kullanımının da uygun olduğu görülmüştür (Çetinkaya, 2021).

Bozbeyoğlu Kart (2021) tarafından yapılan çalışmada, bakteriyel kalsiyum karbonat mineralizasyonunda üreolitik bakteri-kil etkileşiminde *P. favisporus* U3 kullanılarak, CaCO_3 çökelinin olduğu ortam belirlenmiş ve mineralojik tahlillerin yapılmasıyla bakteriyel CaCO_3 'ın yapısı anlaşılmaya çalışılmıştır. Ayrıca üreaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri ile üreaz protein düzeyleri belirlenerek, bakteriyel kalsiyum karbonatın (CaCO_3) çökelimindeki etkileri de araştırılmıştır. Mineralojik analizlerde *P. favisporus* U3'ün kalsiyum karbonatın kalsit ve vaterit formlarını ürettiği, enzim çalışmalarında ise, *P. favisporus* U3 yüksek üreaz aktivitesi görüldüğü tespit edilmiştir. Sonuçta, kalsiyum karbonat çökeliminde rolü olan üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin, aktivitelerinin türlere göre farklılık gösterdiği saptanmıştır (Kart, 2021).

Tepe (2021) yaptığı çalışmada, üreolitik bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* U17 suşunun kalsiyum karbonat çökmesiyle betonun fiziksel özelliklerine olan etkisi hakkında sonuçlara ulaşmıştır. Bu çalışmada farklı kalsiyum kaynaklarının (Ca-klorür, Ca-laktat, Ca-nitrat ve Ca-asetat) CaCO₃ çökeline olan etkisine bakılmış ve en iyi kaynağın Ca-nitrat olduğu (25 mM Ca-nitrat, 3282±10,0 mg/L CaCO₃) tespit edilmiştir. Ayrıca, CaCO₃ çökelinin hücre gelişmesinde ilk aşamada başladığı ve büyümenin devamında kalsiyum miktarında artış olduğu, gelişimin durağan ve ölüm fazlarında da kalsiyum karbonatın olduğu gözlenmiştir. Beton çalışmasında, beton dayanımına olumlu ve belirgin bir etkisi tespit edilememiştir. Bakterinin doğrudan betona eklenmesi yerine farklı sistemler geliştirilerek; kendi kendini iyileştiren beton araştırmasında, çatlak onarımında ve tarihi yapı restorasyonu gibi alanlarda yerel izolatımız olan *B. amyloliquefaciens* U17'nin kullanılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir (Tepe, 2021).

Sumathi, Murali, Gowdhaman, Amran, Fediuk, Vatin, Deeba Laxme ve Gowsika (2020) yaptıkları çalışmada, *Bacillus cohnii* bakterisi ile çatlakların iyileşmesi, yapılan ön çatlama sonucunda basınç dayanımının ölçümü ve suyun emiliminin beton mikroyapıları üzerindeki etkileri hakkında araştırmalar yapmışlardır. Beton karışımına *Bacillus cohnii* bakteri konsantrasyonu olarak 10⁵ hücre/mL uygulanmıştır. Hazırlanan beton numuneleri üzerinde, ıslak-kuru ve tam ıslak yöntemleri kullanılarak gözlemler yapılmıştır. Kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum nitrat, azot kaynağı olarak üre ve maya özütü kullanılmıştır. Sonuç olarak önceden çatlamış numunelerin 28 günde tam ıslak ve ıslak-kuru yöntemleri ile yüzey iyileşmesi oranları % 90 ve % 88 olarak tespit edilmiştir (Sumathi vd., 2020).

Demirci (2019) tarafından, yeni ve çok az çalışılan bir yöntem olarak mimari tasarımında biyoişbirlikçi bir yaklaşım olan bakteriyel biyokalsifikasyonun kullanımı üzerine bir inceleme yapılmıştır. Bu yaklaşımla biyokalsifikasyonun farklı alanlarda kullanıldığı gösterilmeye çalışılmıştır. Doğadan esinlenilerek oluşturulan biyoişbirlikçi tasarımın, yeni bir yaklaşımla geleneksel yöntemlerden farklı, doğal ve çevreye zararı olmayan yeni bir uygulama olduğu görülmektedir. Yapı çevresinin daha çok betonarme yapılar şeklinde oluşturulması, bu alanda kullanılan malzemenin üretim ve kullanım süresinin insan sağlığını tehdit ettiği görülmektedir. Ayrıca küresel ölçekteki sorunların, sürdürülebilir yapı malzemelerine olan önemi daha da artırdığı söylenebilir. Biyoişbirlikçi yaklaşım; gelecekte canlı organizmalar, mimarlık ve tasarım alanlarında da kullanılabilir. Bakteriyel biyokalsifikasyon yöntemiyle zararsız, patojen ve kanserojen olmayan yeni tasarımlar yapılabilir (Demirci, 2019).

Castro-Alonso, Montañez-Hernandez, Sanchez-Muñoz, Macias Franco, Narayanasamy ve Balagurusamy (2019) yaptıkları çalışmada, Mikrobiyal Olarak İndüklenmiş Kalsiyum Karbonat Çökeltmesinde (MICP) mikrobiyolojik ve moleküler kavramlarının biyobeton üzerindeki rollerini araştırmışlardır. Üre hidrolizinin; denitrifikasyon, disimilasyon ve sülfat indirgemesi ile yönlendirilen MICP'nin, biyobetonun geliştirilmesine destek olduğu ve betonun dayanıklılık özelliklerinde bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca beton yapıların, kendi kendini iyileştirme sürecini teşvik ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Üre hidrolizi, beton onarım mekanizmalarında en çok kullanılanıdır. Biyobetonun performansını artırmak için mikrobiyolojik ve moleküler bileşenlerin gerekli olduğu görülmektedir (Castro-Alonso vd., 2019).

Atashafrazeh (2018) yaptığı çalışmada, *Viridibacillus arenosii* ve *Bacillus pasteurii* bakterilerinin kendi kendini onaran beton dayanımına etkisini incelemiştir. Yapılan çalışma ile bakterilerin beton onarımı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çatlak gelişiminin betonun ömrünü kısaltması nedeniyle, kendi kendini onaran beton kavramı ortaya çıkmıştır. Literatürden yola çıkılarak daha önceki sonuçlarla kıyaslamak amacıyla *B. pasteurii* ve daha önce betonda kullanılmamış olan *Viridibacillus arenosii* kullanılarak harç ve beton örnekleri oluşturulmuştur. Bir dizi işlemten sonra, elde edilen sonuçlardan her iki bakterinin de 10^8 CFU (canlı hücre/ml) oranında kullanıldığında en yüksek dayanıklılığı sağladığı tespit edilmiştir. Deney sonuçlarıyla elde edilen dayanıklılık artışı ve elde edilen görüntüler, bakterilerin beton içerisinde besinlerini tüketerek kalsiyum karbonat çökeltimi sonucunda çatlak gelişimini önlediğini göstermektedir (Atashafrazeh, 2018).

Chaparro-Acuña, Becerra-Jiménez, Martínez-Zambrano ve Rojas-Sarmiento (2018) yaptıkları çalışmada, üreik aktiviteyi yapan bakteriler ile toprakta bulunan üre ve kalsiyum varlığında, mikrobiyolojik olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat çökeltisi (MICP) sürecinde kalsiyum karbonat üretebilen mikroorganizmaların ağır metallerin giderilmesi, toprak biyokonsolidasyonu, biyoçimento ve karbondioksitin tutulması gibi süreçler üzerindeki etkileri tartışılmaktadır. Bakteri türü, bakteri hücre konsantrasyonları, pH, sıcaklık, kalsiyum ve üre konsantrasyonları etkenleri sonucunda oluşan bakteri üreazı, kalsiyum karbonat kristalleri ile MICP'nin etkinliğini etkileyen faktörlerin mekanizması hakkında, araştırmalar ve uygulamalar yapılmaktadır (Chaparro-Acuña vd., 2018).

Akyol, Bozkaya ve Dogan (2017) yaptıkları çalışmada, bakteriyel karbonat çökeltme yöntemi ile kumlu toprakların mühendislik özelliklerinin iyileşmesi konusunu

araştırmışlardır. Bunun için en yüksek kalsiyum karbonat çökmesi yapabilen üç farklı bakteri türü kullanılmıştır. Bakteriler (*Bacillus aerius* U2, *Paenibacillus favisporus* U3 ve *Lysinibacillus fusiformis* U5) Denizli'deki İsrail Nehri'nden alınmıştır. Numune olarak alınan bakterilerin üre konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve inkübasyon sürelerine bakılmıştır. Kullanılan bakteriler için ortam koşulları; üre konsantrasyonu: 100 mm, sıcaklık: 37°C, pH: 6,5 ve inkübasyon süresi: 10 gün olarak belirlenmiştir. Bu koşullara en iyi uyum sağlayan bakteri türü *P. favisporus* U3 olup maksimum CaCO_3 konsantrasyonu 2803 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Akyol vd., 2017).

Anbu, Kang, Shin ve So (2016) yaptıkları çalışmada, bakteriler tarafından kalsiyum karbonat minerallerinin oluşumu ve çoklu uygulamaların mikrobiyal olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökmesi (MICP) ayrıntılı olarak tartışılmaktadır. Çeşitli kalsiyum kaynakları kullanılarak kalsit kristal yapılarının oluşmasında kalsiyumun rolü ile farklı polimorf oluşumları araştırılmaktadır. Ayrıca üreaz üretimine ve karbonat çökmesine etki eden çevresel faktörler de araştırılmaktadır. MICP yöntemi, çevre sorunlarını çözmek için geleneksel ve güncel iyileştirme teknolojilerinde umut vadeden, çevre dostu ve alternatif yeni bir yaklaşımdır. Bu çalışmada *S. pasteurii* ve *B. megaterium* gibi mikroorganizmaların MICP'de kullanımının iyi bir sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu yeni teknolojik yapının, betonun sızdırmazlığının yanı sıra toprak ve kumun kalitesini artırmak için de uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Anbu vd., 2016).

Başaran Bundur, Ferron ve Kirisits (2015) yaptıkları çalışmada biyomineralizasyon yönteminin betonda kendiliğinden iyileşmeyi sağlayan en yenilikçi yöntemlerden biri olması nedeniyle, bu yöntemin çimento esaslı malzemelerin performansına olan etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışma ile besi yerine katılan *S. pasteurii* suşunun çimento hamurundaki kalsiyum karbonat (CaCO_3) düzeyini artırdığı ve bu nedenle çimento harcı içerisinde bulunan boşluk miktarında azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Çimento harcının ise basınca daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Sonuçta, kendiliğinden iyileşmenin sağlanabilmesi için kullanılan yöntemin, çimento esaslı malzemelerin yapısında değişikliklere neden olduğu görülmektedir (Başaran Bundur vd., 2015).

Zhang, Guo ve Cheng (2015), mikrobiyal harcın mukavemeti ile mikro yapısında kalsiyum kaynaklarının işlevini araştırmışlardır. Bu çalışmada üç farklı kalsiyum kaynağı; kalsiyum klorür (CaCl_2), kalsiyum asetat ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) ve kalsiyum nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) ile karıştırılan mikrobiyal harçların tek eksenli basınç dayanımı, çekme dayanımı ve su emme

oranlarına bakılmıştır. Kalsiyum asetatın bulunduğu mikrobiyal harçların tek eksenli basınç dayanımı ve çekme dayanımının, diğer iki kalsiyum kaynağının bulunduğu mikrobiyal harçların yaklaşık iki katı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucu, kalsiyum asetatın bulunduğu mikrobiyal harçlardaki gözenek boyutu ve dağılımının diğer kalsiyum kaynaklarına oranla daha düzgün olduğu gözlemlenmiştir. Mikrobiyal olarak indüklenen karbonat çökeltisinin (MICP), yapılarda oluşan çatlaklara uygulanırken kalsiyum asetatın sık kullanılan diğer kaynaklara oranla daha iyi bir kalsiyum kaynağı olduğu düşünülmektedir (Zhang vd., 2015).

Wang, Soens, Verstraete ve De Belie (2014) de mikrokapsüllü bakteri sporlarını kullanarak kendi kendini iyileştiren beton çalışması yapmışlardır. Bu süreçte çatlamış numunelerin üzerine mikrokapsülün eklendiği, Taramalı Elektron Mikroskopu (TEM) ile yapılan inceleme sonucu tespit edilmiştir. Kendi kendini iyileştirme oranı, çatlağın iyileşme süresi ve su geçirgenliği değerlendirilmesi yapılmıştır. Sonuç olarak, biyomikrokapsül numunelerin iyileşme yüzdelerinin (%48-%80) bakteri bulunmayanlara (%18-%50) oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bakteri bulunan numunelerde su geçirgenliği bakteri olmayan numunelere göre 10 kat daha düşüktür. Dolayısıyla % 95 bağıl nem bulunan ortamda bekletilen bakterili ve bakterisiz numunelerde iyileşme görülmemiş olup, suyun ortamda bulunmasının kendi kendini iyileştirmek için yeterli olduğu gözlemlenmiştir (Wang vd., 2014).

Dhami, Reddy ve Mukherjee (2013) de kalsiyum karbonatın biyomineralizasyonu ve mühendislik uygulamaları ile ilgili incelemeler yapmışlardır. Üreolitik bakteriler kullanılarak, kalsiyum karbonat biyominerallerin üretiminde bakterilerin rolünün ne olduğu ve biyominerallerin kullanıldığı sektörler araştırılmıştır. Sonuç olarak, biyominerallerin mühendislik uygulamaları için yeni bir alan olduğu keşfedilmiştir. Ancak bunun laboratuvarından saha ölçeklerine getirilmesi için çevresel açıdan güvenilir, uygun maliyetli ve teknolojiye uygun hale kavuşturulması gerekmektedir (Dhami vd., 2013).

Chahal, Siddique ve Rajor (2012) yaptıkları çalışmada, *Sporosarcina pasteurii* bakterisi ile uçucu kül bulunan ve uçucu kül bulunmayan beton numunelerinin basınç dayanımı, su emme ve klorür geçirgenliği hakkında deneyler yapmışlardır. Çimento miktarı % 10, % 20 ve % 30 oranlarında uçucu kül ile değiştirilmiştir. Beton karışımlarına 10^3 , 10^4 ve 10^5 hücre/ml konsantrasyonunda bakteri eklenmiştir. 28 gün bekletilen numunelere basınç dayanımı, su emme ve hızlı klorür geçirgenliği testleri yapılmıştır. Sonuç olarak S.

pasteurii kullanılan 10^5 hücre/ml konsantrasyonunun uçucu kül betonu basınç dayanımını % 22 oranında artırdığı, gözenekliliğini ve geçirgenliğini azalttığı keşfedilmiştir. Ayrıca su emmede dört kat azalma olduğu ve bakteriyel kalsit birikimi olması sonucu klorür geçirgenliğinde sekiz kat azalma olduğu tespit edilmiştir (Chahal vd., 2012).

Wiktor ve Jonkers (2011) yaptıkları çalışmada normal beton agregaların bir parçasının yerine, genişletilmiş gözenekli kil parçacıklarına gömülü rezervuar parçacıkları şeklinde hareketli, yeni ve iki bileşenli biyokimyasal olarak kendi kendini onaran bu maddenin çatlakların kapanmasındaki potansiyelini ölçmüşlerdir. Oluşan çatlakların yüzeyine iki bileşenli biyokimyasal ajan olan bakteri sporları (*Bacillus alkalinitrilicus*) ve kalsiyum laktat giriş suyu çatlakların içine girmektedir. Oluşan mikro çatlakların bakteriler vasıtasıyla kalsiyum karbonat çökelimi sonucu kapanması beklenmektedir. Sonuç olarak, yüz gün suyun içinde kalan numunelerden; bakterili olan numunelerde 0.46 mm, kontrol numunelerinde ise 0.18 mm genişliğindeki çatlaklarda iyileşme olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bakteri bulunan numunelerde oksijen tüketiminin fazla olduğu tespit edilmiştir (Wiktor & Jonkers, 2011).

Jonkers, Thijssen, Muyzer, Copuroglu ve Schlangen (2010) yaptıkları çalışmada, sürdürülebilir betonun gelişmesi için bakterilerin kendi kendini iyileştiren ajan olarak uygulanmasını, bakterilerin hareket etme potansiyelini ve oluşan çatlakların onarılma düzeylerinin araştırılmasını amaçlamışlardır. Bu çalışmada, *Bacillus* cinsi bakterilerin alkali dirençli spor oluşturan özel bir grubu kullanılmıştır. Amaç çimento matrisine eklenen bakterinin, oluşan çatlakları onarım sürecini katalize etmek ve iyileştirme sürecinde hareket edip etmediğini belirlemektir. Beton karışımına eklenen bakterilerin, sadece karışımdan kaynaklanan mekanik streslere direnmesi değil aynı zamanda uzun bir süre yüksek alkaliliğe de dayanıklı olması gerektiği düşünülmektedir. Bunun için alkalofilik spor oluşturan *Bacillus* cinsi bakteriler tercih edilmektedir. Sonuç olarak, *Bacillus* cinsi bakterilerin çatlak içine ilave edilen suyla birlikte kalsiyum laktatı kalsiyum karbonata dönüştürdüğü ve oluşan çatlağı kapattığı gözlemlenmiştir. Bu onarımın çevre dostu olması ve uygun maliyetli olması nedeniyle gelecek vaat ettiği düşünülmektedir (Jonkers vd., 2010).

Chunxiang, Jianyun, Ruixing ve Liang (2009) göre amaç, çimento kullanarak oluşturulan yapıların yüzeylerinde koruyucu bir tabakanın oluşmasını sağlamaktır. Bunun için yeni ve çevre dostu olan, kalsiyum karbonat çökmesi işlemi yapabilen bakteri kullanımının yüzey iyileşmelerini sağlaması beklenmektedir. Böylece, oluşan tabakanın

fiziksel ve kimyasal yapılarını etkileyen bazı faktörlerin ortaya çıkması sağlanmış olacaktır. Bunun için *Bacillus pasteurii* bakterisi kullanılmıştır. Bakteriyel aktivite, Ca^{+2} eklenme şekli ve üre miktarı oluşacak kalsiyum karbonat tabakası özelliklerini belirlemektedir. X-ışını kırınımı, oluşan tabakanın bileşimini karakterize ederken; taramalı elektron mikroskobu, parçacıkların morfolojisi ile ilgili bize bilgi vermektedir. Ayrıca koruyucu tabakanın su penetrasyonuna karşı, direnci geliştirme özelliğini değerlendirmek için kılcal su emme testi yapılmıştır. Sonuç olarak yüksek bakteri aktivitesi, uygun kalsiyum konsantrasyonu ve karışımına üreden önce Ca^{+2} eklenir. Böylece oluşan kalsiyum karbonat tabakasının, numunelerin yüzeyinde su penetrasyonuna direnci yüksek oranda iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir (Chunxiang vd., 2009).

De Muynck, Cox, Belie ve Verstraete (2008) yaptıkları çalışmada, bakteriyel kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) çökeltmesinin beton ve harcın dayanıklılığını etkileyen parametreler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Saf ve karışık üreolitik bakteri kültürlerinin sonuçları, geleneksel yüzey işlemlerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. *Bacillus sphaericus* türü kullanılmıştır. Numunelerin yüzeyinde bakterilerin $CaCO_3$ çökeltmesi sonucu oluşan kalsit tabakası, kılcal su alımı ile gaza karşı geçirgenliğin azaldığı saptanmıştır. Bakteri kültürünün türü ve besi yeri bileşimi $CaCO_3$ kristal yapısını etkilemektedir. Saf kültürlerin kullanımının, macun olarak karışık üreolitik kültürlerin kullanımına göre su alımında belirgin bir düşüşe ve kromatik açıdan daha az bir değişime neden olduğu gözlemlenmiştir (De Muynck vd., 2008).

Whiffin, Van Paassen ve Harkes (2007) yaptıkları çalışmada, mikrobiyal karbonat çökeltme (MCP)'yi bir toprak güçlendirme yöntemi şeklinde değerlendirerek arazi uygulamaları için gerçek koşullarda, beş metrelik bir kum kolonunun bakteri ve reaktiflerle temasını yapmışlardır. Enjeksiyon ve reaksiyon parametreleri işlem sırasında izlenerek, *Sporosarcina pasteurii* ile işlem reaktiflerinin malzemenin tıkanmasına yol açmadan düşük basınçlarda kolonun tamamına enjekte edilmiştir. Yapılan işlemten sonra kolon teste tabi tutulmuş, birkaç metre boyunca mukavemet ve sertlikte önemli bir gelişme olduğu görülmüştür. Dayanım artışının kolonun üst kısmında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Beş metrelik tedavi uzunluğunun tümünde, kalsiyum karbonatın çökeldiği görülmektedir. Sonuç olarak, toprağı sıvı geçirimsiz hale getirmeden toprağın yük taşıma özelliğinin iyileştirilmesi mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltmesi ile uygulanabildiği görülmüştür (Whiffin vd., 2007).

Dejong, Frtzges ve Nüsslein (2006) yaptıkları çalışmada, başlangıçta gevşek ve çökelebilen kumun çimentolu bir toprak matrisinin oluşması için doğal mikrobiyal biyolojik süreçlerinin kullanımını araştırmışlardır. Mikrobiyal olarak indüklenen kalsit çökeltme (MICP), *Bacillus pasteurii* kullanılarak elde edilmiştir. *Bacillus pasteurii* üre ve çözünmüş bir kalsiyum kaynağı ile değiştirilmiş, sıvı besi yerinde kum örneklerine yerleştirilmiştir. İzotopik olarak yapılan bir dizi konsolide edilmiş üç eksenli drenajsız sıkıştırma testinde (CIUC), MICP ile eklenen örneklerin eklenmeyen örneklere oranla daha yüksek bir ilk kesme sertliği ve kesme kapasitesi kazandırdığı görülmüştür. SEM analizleri ile parçacık-parçacık temaslarında çökelmiş kalsit bağlarının konsantrasyonu ile çimentolu kum matrisi oluştuğu, X-ışını bileşim haritalaması ile de çimento bağlarının kalsitten oluştuğu gözlemlenmiştir. Gevşek kum yapılarının sert bir yapıya dönüşmesinin, doğal biyolojik süreçlerle ve bu süreçlerin kontrol edilmesiyle gerçekleşebileceğini göstermektedir (DeJong vd., 2006).

Ghosh, Mandal, Chattopadhyay ve Pal (2005) yaptıkları çalışmada, mikrobiyolojik olarak indüklenen mineralleri çökeltme işlemi ile çimento ve kum karışımının mukavemetini artırma yöntemini açıklamaya çalışmışlardır. Karıştırma suyu için farklı hücre konsantrasyonuna sahip *Shewanella* türüne ait termofilik bir anaerobik mikroorganizma kullanılmıştır. Böylece yaklaşık 10^5 hücre/ml karışım suyu ilave edilmesi ile çimento harcının 28 günlük basınç dayanımında %25'lik bir artış olduğu görülmüştür. Taramalı elektron mikroskobu incelemesi ile mikroorganizmaların varlığından dolayı gözeneklerde lifli dolgu maddesinin büyüdüğü tespit edilmiştir. Bu da dayanıklılığın artmasına neden olmaktadır (Ghosh vd., 2005).

Whiffin (2004), üreaz aktif hücre üretimini sağlamak için endüstriyel olarak uygun maliyette bir mikrobiyal proses geliştirmek ve üreaz aktif hücrelerin biyoçimento üretimi için bir katalizör görevi görme potansiyelini araştırmıştır. *Bacillus pasteurii*'nin *Proteus vulgaris*'den daha yüksek üreaz aktivitesine sahip olduğu fakat üreaz aktivite seviyesinin biyokütleye göre değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Koolschijn kumu ve % 10 turba (Holland veen) ile % 90 Koolschijn kumlarının karışımıyla yapılan biyosementasyon işleminde, Koolschijn kumunun 1.8 MPa'lık bir kesme mukavemeti ve 250 MPa'lık bir sertlik gösterdiği tespit edilmiştir. Turba ve Koolschijn karışımı kumun ise, daha düşük mukavemet iyileştirmeleri yaptığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak yüksek dayanımlı ve ekonomik sementasyonun oluşturulabileceği gevşek kumun, bakteri kültürleri ile etkili bir şekilde konsolidasyonunun sağlanabileceği kanıtlanmıştır (Whiffin, 2004).

Rodriguez-Navarro, Rodriguez-Gallego, Chekroun ve Gonzalez-Munoz (2003) yaptıkları çalışmada, süs taşlarının *Myxococcus xanthus* ile indüklenmiş karbonat biyomineralizasyonu yöntemini kullanarak korunma çalışması yapmışlardır. Bu yolla, *M. xanthus*'un gözenekli kireçtaşının yapısına uyumlu bir koruyucu ve sağlamlaştırıcı karbonat tabakası oluşturma kapasitesi değerlendirilmektedir. *M. xanthus*'un kalsiyum karbonat çökeltme kapasitesi ön testlerle ölçülmüştür. Karbonat çökeltmesinin olduğu silika camı ya da seramik vb. silikat yapıların üzerinde yapılan biyomineralizasyon işleminin, silikat kayalarında kullanımı artırabileceği düşünülmektedir. Yeni oluşan kristaller, taşın yapısında bulunan kalsit partiküllerinden daha çok strese dayanıklı olmaktadır. Sonuç olarak yapılan canlılık testleri, *M. xanthus*'un sıvı kültür ortamında canlı kalabildiğini ancak taş örneğinin kurutulması ile *M. xanthus*'un öldüğü gözlemlenmiştir (Rodriguez-Navarro vd., 2003).

Bachmeier, Williams, Warmington ve Bang (2002), mikrobiyal üreazın kalsit çökeltmesindeki aktivitesi, *Bacillus pasteurii* üreazını kodlayabilen plazmit, pBU11 içeren rekombinant *Escherichia coli* HB101 ile çalışmışlardır. *B. pasteurii* ve *E. coli* tarafından indüklenen kalsit çökeltisi (pBU11), bir üreaz inhibitörü asetohidroksamik asitin (AHA) ortada olması sonucu inhibe edilmiştir. Üreazın kofaktörü olan nikelin düşük konsantrasyonda ortama eklenmesi ile *E. coli* (pBU11) kalsit çökeltmesini artırmıştır. Poliüretan (PU) ile hareketsizleştirilmiş üreaz, yüksek sıcaklık ve konsantrasyonda pronaz varlığında daha yüksek enzimatik aktiviteyi korumuştur. Bu immobilizasyonun enzim aktivitesini çevresel değişikliklere karşı koruma sağladığını göstermektedir. Elde edilen verilere göre, iyileştirmede immobilize edilmiş bütün hücrenin yerine immobilize enzimin kullanılması pozitif potansiyel ortaya koymaktadır (Bachmeier vd., 2002).

Bang, Galinat ve Ramakrishnan (2001) yaptıkları çalışmada, *Bacillus pasteurii*'nin bütün hücrelerini hareketsizleştirmek için poliüretan (PU) kullanmışlardır. Serbest ve immobilize *B. pasteurii*'nin bulunduğu ortamda, kalsit çökeltme ve amonyak üretim oranları karşılaştırılmıştır. PU ile hareketsizleştirilmiş *B. pasteurii*'nin uygulandığı simüle edilmiş çatlakların olduğu, beton küplerin basınç dayanımları ve mikrobiyal kalsit çökeltme sonucu çatlakların iyileşmesi etkinliğini belirlemek için testler yapılmıştır. Bunun sonucunda fizikokimyasal olarak çok yönlü olan PU'nun, beton çatlaklarında mikrobiyolojik olarak indüklenen kalsit çökeltmesinin etkili bir iyileşme yöntemi olduğu görülmüştür. PU polimer matrisi, mikrobiyal enzimatik aktivitelerin daha uzun sürelerde kullanımını sağlayabilmektedir (Bang vd., 2001).

Stocks-Fischer, Galinat ve Bang (1999), *Bacillus pasteurii* kullanılarak indüklenen CaCO_3 çökeltmesinin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. Biyokimyasal süreçler, mikrobiyolojik ve kimyasal CaCO_3 çökeltmesinin kinetikleri karşılaştırılarak araştırılmıştır. Üreaz aktivitesinde, Michaelise-Menten kinetiği ile kalsit çökeltmesinde önemli olan farklı pH değerlerine de bakılmıştır. CaCO_3 'ın mikrobiyal çökeltilmesi, kum kolonlarının yüzeyinde ve altında taramalı elektron mikroskobu ile X-ışını kırınımının nicel analiziyle değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, CaCO_3 çökelme oranının hücre büyümesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Üreazın kalsit çökeltmesinin uygun olduğu yüksek pH değerinde (pH 8-9), daha yüksek enzimatik aktiviteler ve üreye daha güçlü yatkınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca mikrobiyal çökeltmenin, gözenekli ortamın biyolojik olarak iyileştirilmesinde kolay bir uygulama olabileceği fikri desteklenmektedir (Stocks-Fischer vd., 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Statik etüv (Heraeus), çalkalamalı etüv (Thermoshake), karbon dioksitli etüv (Heraeus), otoklav, vorteks (ZX3 Vorteks), hassas terazi (Shimadzu), ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Arec), otomatik pipetler (1000 µL, 100µL) (Dragon), mezur (Isolab), beher (Isolab), erlen (Isolab), petri kabı, deney tüpü, UV sterilizasyon kabini, distile su cihazı, cam kavanoz, idrar kabı ve steril spanç.

3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Mermerler

Üre ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), Yeast Extract, D(+)- Glikoz Monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Kalsiyum Asetat ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$), Kalsiyum Klorür Dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Sodyum Hidroksit (NaOH) ve SF (% 0.9 NaCl (a/h)), etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) kullanılmıştır.

Mermerler, özel bir mermer işleme tesisinden temin edildi. 2x2 ve 4x4 cm boyutlarında mermerler kesim cihazında kestirilerek hazırlandı. 2x2 ve 4x4 cm ebatlarındaki her bir grup için 50 adet mermer kestirildi. Deneyde kullanılmak için saklama kaplarında kuru ortamda muhafaza edilmiştir.

3.3 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma

Bu çalışmada, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan temin edilen *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu kullanılmıştır. Bakteri kültürü, 37°C’de brain hearth infusion agar (BHIA) besi yerinde üretildikten sonra buzdolabında serin koşullarda saklanılmıştır.

Bacillus subtilis, gr (+) ve çubuk şeklinde görünen spor oluşturabilen bir bakteri türüdür. Zor ortam koşullarında canlı kalabilmektedir. Birçok *Bacillus* türü, kalsiyum varlığında kalsiyum karbonat çökmesi gerçekleştirebilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *Bacillus subtilis*'in sıvı kültürünün görünümü.

3.4 Mermer Örneklerinin Hazırlanması

4x4 cm olanlar hazırlanmış olan %70'lik alkollü solüsyonun içinde 30 dakika bekletilmiştir. İçine konulan kabın ağzı alüminyum folyo ve streç çekilerek kapatılmıştır. Mermer numunelerinin her bir yüzeyi 15 dakika arayla çevrilerek alkol çözeltisinde bekletilmiştir. Böylece tüm yüzeylerin alkol çözeltisi ile iyice temas etmesi sağlanmıştır. 2x2 cm'lik mermerlere aynı işlemler uygulanmıştır (Şekil 3.2).



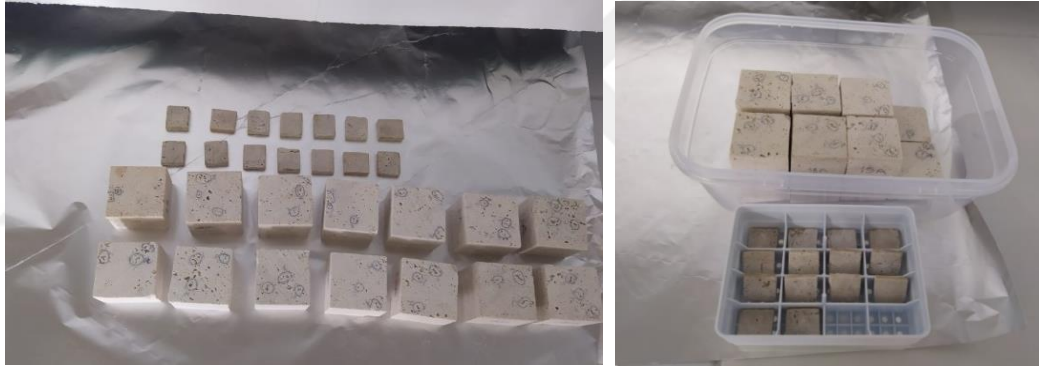
Şekil 3.2: Mermer numunelerinin %70'lik solüsyonda bekletilme görüntüsü.

Solüsyonun içinden çıkarılan mermer numuneleri 40°C olarak ayarlanan etüvde 6 saat bekletilmiştir. Bütün yüzeylerinin tamamen kuruması için belli aralıklarla çevrilmişlerdir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Hazırlanan numunelerin etüvde kurutulma görüntüsü.

Tamamen kurutulan numunelerin ön yüzeyi UV kabininde 30 dakika bekletildikten sonra arka yüzeyi de çevrilip 30 dakika daha bekletilmiştir. Steril edilen mermer numuneleri, steril kapların içine alınarak, UV kabininde beş dakika daha bekletilip kapakları kapatılmış ve deneysel aşamalarda kullanılacağı zamana kadar aseptik şekilde saklanmışlardır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Mermer numunelerin UV kabininde steril edilmesi ve bekleme kaplarına alınması.

Mermer örneklerinin yarısı, %75 nispi nem ve %5 CO₂ içeren karbon dioksitli etüvde 20 gün bekletilmiştir.

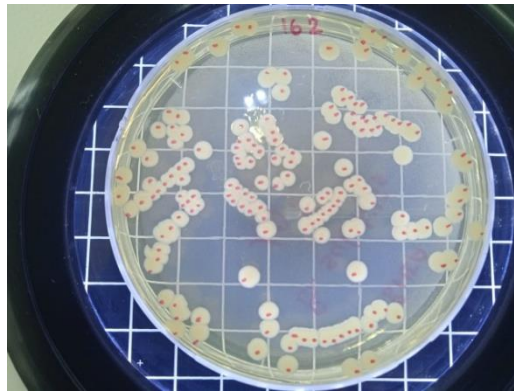
3.5 Bakteri İnokülasyonu

Bakteriyel kalsifikasyon işlemleri öncesinde katı bakteri kültüründen, *B. subtilis* öze ile alınıp, brain hearth infusion broth (BHIB) ortamına inokule edilmiştir. Sıvı bakteri kültürü 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 0.1 mL sıvı bakteri kültürü, 20 mL yeni BHIB ortamına inokule edilerek, 24 saat 37 °C ve 110 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.

Canlı hücre sayımı (CFU) için, 9 mL % 0.9 NaCl (SF) içeren bir seri sulandırım tüpleri hazırlanmıştır (Şekil 3.5). Yukarıda hazırlanış biçimi belirtilen sıvı bakteri kültüründen 1mL alınıp 10 kez sulandırım yapılacak olan tüpe pipetlenmiştir. Tüpe konulan bakterinin homojen şekilde dağılımının sağlanması için vortekslenmiştir. 10 kez sulandırım yapılan tüpten pipet ile 1mL alınıp 10^2 kez sulandırım yapılacak tüpe pipetlenerek aynı şekilde vortekslenmiştir. Aynı işlem diğer tüpler içinde yapılmış ve seyreltme işlemi tamamlanmıştır. 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ve 10^8 kez sulandırım işlemlerinin gerçekleştirildiği tüplerden 100µl dilue sıvı kültür alınıp brain hearth infusion agar (BHIA) içeren besiyerlerine ekim yapıp, L baget ile tüm yüzeye dağılımı sağlanmıştır. Hazırlanan örnekler etüvde 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde plaklarda koloni sayımı yapıp sıvı bakteri kültüründeki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.5: Canlı hücre sayımı için seri sulandırım işleminin yapılmış tüpleri.



Şekil 3.6: Bakteri kolonilerinin koloni sayacı cihazında sayılması.

3.6 Bakteriyel Kalsifikasyonda Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

3.6.1 İnokülasyon besiyerinin hazırlanılması

İnokülasyon besiyeri, maya ekstraktı (25 gr/L) ve üre (25 gr/L) içermektedir. Distile suyla hazırlanan besiyeri, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine konularak homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır. 4x4 cm ebadındaki mermerlerin bekletileceği 18 adet cam kavanoz (maximum 300 mL hacimli) steril edilmiştir. Aynı şekilde 2x2 cm'lik mermer örnekleri için de 18 adet steril idrar kapları (maximum 200 mL hacimli) hazırlanmıştır. Otoklavizasyon işlemlerinden önce kavanozlara 120 mL ve idrar kaplarına ise 15 mL inokülasyon besiyeri konulmuştur (Şekil 3.7). Bütün besiyerleri otoklavda 20 d steril edilmiştir.



Şekil 3.7: Otoklavizasyon işlemi sonrası görüntüsü.

Bölüm 3.5' de belirtilen şekilde hazırlanan *B. subtilis* kültüründen, hazırlanan besi yerlerine Çizelge 3.1'de belirtilen deney şemasına göre ekim yapılmıştır. 1. , 2. ve 8. , 9. gruplar bakteri içermeyen, 3. , 4. ve 10. , 11. gruplar bakteri içeren ve 5. , 6. ve 12. , 13. grup da ölü bakteri içeren gruplardır. Bakteri içermeyen gruplar negatif, ölü bakteri içeren gruplar pozitif bakteri kontrol grupları olarak hazırlanmıştır. Ekimi yapılacak olan bakteri kültürleri, 10^7 CFU/mL olacak şekilde ayarlanıp, kavanoz ve idrar kaplarındaki besiyerlerine ekimleri yapılmıştır.

Çizelge 3.1: Mermer yüzeylerinde CaCO_3 kristalleri oluşumuna yönelik işlemlerde kullanılan besiyerleri içerikleri.

CO ₂ Uygulaması	Bakteri Uygulaması	Presipitasyon Besiyeri	Grup Numarası
Var	-	$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ GM ^a + Ü ^b	1
		$\text{CaCl}_2 + \text{Ü}$	2
	Canlı	$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ GM + Ü	3
		$\text{CaCl}_2 + \text{Ü}$	4
	Ölü	$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ GM + Ü	5
		$\text{CaCl}_2 + \text{Ü}$	6
	-	—	7 (Kontrol)
Yok	-	$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ GM + Ü	8
		$\text{CaCl}_2 + \text{Ü}$	9
	Canlı	$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ GM + Ü	10
		$\text{CaCl}_2 + \text{Ü}$	11
	Ölü	$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ GM + Ü	12
		$\text{CaCl}_2 + \text{Ü}$	13
	-	—	14 (Kontrol)

^a $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, glukoz ve maya özütü içeren besiyeri,

^b Üre,

"-"; bakteri içermeyen,

"—"; herhangi bir besiyeri içermeyen

Kavanozlardaki besiyerine 100 µl ve idrar kaplarına 10 µl ekim bakteri inokulasyonu yapılmıştır. Sadece 3-6. ve 10-13. gruplara bakteri ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan kavanoz ve idrar kaplarının ağızları steril spanç ile kapatılarak çalkalamalı etüve konulmuştur. 37°C ve 90 rpm de 24 saat bekletilmiştir. Bakteri ekimi yapılmayan gruplar 24 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiştir. Ölü bakteri, uygulamaların yapılacağı gruplar inkübasyon süresi dolduktan sonra etüvden alınarak 20 d otoklavize edilmiştir. Otoklavizasyon işlemleri sırasında sıvı kaybını önlemek için kavanozların ve idrar kaplarının kapakları kapatılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: Canlı bakteri kültürlerinin otoklavizasyon sonrası görüntüsü.

Hazırlanılmış olan inokülasyon besiyerlerine mermerler yerleştirilmiştir. Kavanozların içindeki besiyerine 4x4 cm ebadında mermerler ve idrar kaplarındaki besiyerlerine de 2x2 cm'lik mermerler konulmuştur. Mermerlerin tüm yüzeylerinin kültür ile temas edebilmesi sağlanmıştır. Kavanoz ve idrar kaplarının ağız kısımları aynı şekilde steril spanç ile kapatılarak mermer numuneleri 2 gün, 28°C'de ve statik olarak etüvde bekletilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: İnokülasyon besiyeri içine konulan mermer numunelerinin etüvde bekleme görüntüsü.

3.6.2 Presipitasyon besiyerinin hazırlanması

Presipitasyon işlemleri için iki farklı besiyeri hazırlanmıştır: CaAsetatGM+Ü (CAGMÜ) ve CaCl_2 +Ü (CÜ). CAGMÜ besiyeri, $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L), glikoz (2 gr/L), maya özütü (2 gr/L) ve üre (12 gr/L) içermektedir. CÜ besiyeri ise $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) ve üre (24 gr/L) içermektedir.

Hazırlanan farklı içerikteki besiyerlerinden kavanozlara 120 mL ve idrar kaplarına ise 15 mL konulup otoklavize edilmiştir.

İki gün inokülasyon ortamında kalan mermerler, hazırlanan yeni besi yerlerine konulmuştur. Kavanozlara 4x4 cm ebadındaki mermerler, idrar kaplarına da 2x2 cm ebadındaki mermerler konularak ağızları steril spanç ile kapatılmıştır. Mermerlerin tüm yüzeylerinin besiyeri ile temas edebilmesi sağlanmıştır. Numuneler, 4 gün 28 °C'de statik olarak etüvde bekletilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Farklı presipitasyon besiyerlerine konulan mermer numunelerin etüvde bekletilmesi.

Dört gün besi yerinde kalan mermer numuneleri, besiyerinden çıkarılmıştır. Hazırlanan steril alana yerleştirilen mermer numuneleri, 30°C'e ayarlanmış olan etüve konulmuştur. Etüvde 2 gün bekletilen mermer numuneleri 24±2 °C'de, klimatize edilmiş ortamda 3 ay beklemeye bırakılmıştır (Şekil 3.11). Karbondioksitli etüvde 30 gün bekletilen mermerlere aynı işlemler yapılmıştır. Besiyerleri içerisinde bekletilmeyen mermer numuneleri kontrol grubu olarak aynı koşullarda bekletilmiştir.



Şekil 3.11: Mermer numunelerin etüvde bekletildikten sonra bekleme koşullarına alınması.

3.7 Analizler

3.7.1 X-Işınlari kırınımı (XRD) analizi

XRD, malzemelerin kristalin özelliklerinin saptanması için sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Analizler yapılırken, monokromatik X ışınları numuneye çarpıp aynı dalga boyu ile numunedeki elektron dağılımına oranla saçılma göstermektedir. Bu saçılmanın sonuçları incelenerek, numunelerin kristalin oranı ile kristalin yapısı belirlenebilmektedir (Erem, 2012).

XRD, mineral örneklerin karakterizasyonunda en güvenilir ve yaygın olarak kullanılan analiz tekniklerinden biridir. Toz haline getirilen mermer örneklerinin, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma (İBTAM) laboratuvarında bulunan (rigaku X-ray diffractometer marka) XRD cihazı ile karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 3.12). Karakterizasyonlar yapılırken önce silicane grease lamlele sürülmekte sonra 5 mg numuneden lamelin üzerine yayılımı yapıp cihaza yerleştirilerek ölçümler yapılmaktadır. Bu analizler hizmet alımı yoluyla sağlanmıştır.



Şekil 3.12: İBTAM laboratuvarında bulunan XRD cihazının görünümü.

3.7.2 Atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscope) (AFM) analizi

AFM, katı malzeme yüzeylerinin üç boyutlu gerçek görüntülerini verebilen son derece önemli bir görüntüleme yöntemidir. AFM’de temaslı, temassız ve tapping olarak üç yöntem bulunmaktadır. Temassız AFM’de ölçüm probu örnek üzerine temas etmeden, yüzeyin üç boyutlu topografik yapısı ve yüzey pürüzlülüğünü örneğe zarar vermeden görüntülemektedir. Bu açıdan, yaptığımız çalışmada temassız (non- contact) AFM yöntemi kullanılarak örnek yüzeylerinin pürüzlülüğü, çatlakları ve deney süresince geçen zaman zarfında çatlakların kalsifikasyon yoluyla kapanıp kapanmadığı tespit edilmektedir. Non-contact AFM örnek yüzeyine zarar vermediğinden, süreye bağlı olan çalışmalarda yüzey görüntüsü alındıktan sonra aynı örnek ile tekrar deneye devam edilebilmektedir.

Deneyin başlangıcında ve sonunda, İnönü Üniversitesi Kimya Bölümünde bulunan AFM mikroskobu ile 2x2 cm boyutundaki mermer örneklerinin yüzeyleri incelenmiştir.

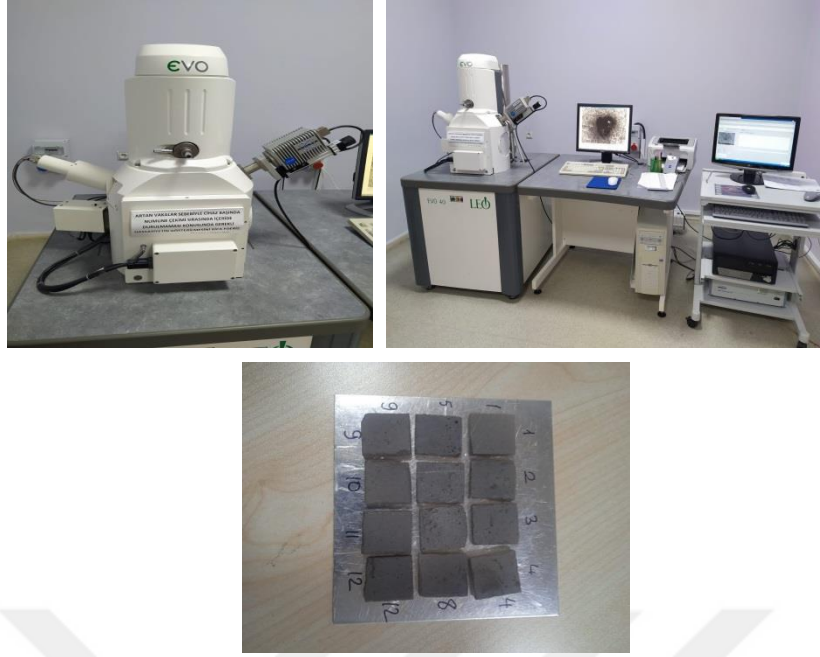
3.7.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleme, EDX ve mapping analizi

SEM, odaklanmış elektron demeti ile numune yüzeylerinin taranması sonucu görüntülerin elde edilmesinde kullanılır. Elektronların numunedeki atomlarla etkileşmesi ile numune yüzeyindeki topografi ve kompozisyonuyla ilgili bilgiler barındıran farklı sinyaller üretmektedir. Oluşan sinyaller, dedektörler tarafından toplanıp bilgisayar ortamına aktararak görüntü meydana gelmektedir (Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2018).

SEM analizi örneklerinin morfolojisi, mikron altı boyutlardaki çatlakları belirlemek amacıyla kullanılacaktır. Mermer örnekleri iletken olmadığından, SEM görüntüleme öncesinde yüzeylerin kaplanması gerekmektedir. Bu nedenle mermer yüzeyi bozulmakta ve SEM görüntüleri alındıktan sonra kullanılan örneklerle herhangi bir işlemin yapılması mümkün olmamaktadır. SEM'e götürülen örneklerin yüzeyleri 10 nm kalınlığında altın ve paladyum karışımı ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir. Cihaza yerleştirilen örneklerin 20 kV ile ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.13). Böylece, işlem öncesi ve sonrası mikron altı yüzey özelliklerini gözlemlemek için en az sayıda ve rastgele seçimler yapılarak numunelerin SEM görüntüleri alınmıştır.

EDX analizlerinde, mermer yüzeyinde bir bölge seçilmektedir. Seçilen alandan dört bölge alınarak o bölgede bulunan Ca, C, O ve Si elementlerin spektrum ve oranlarının olduğu tablo verilmektedir.

Mapping, analitik haritalama olarak bilinmektedir. Hesaplama yapılmamaktadır. Sadece görüntü olarak renklendirilen Ca, C, O ve Si elementlerin seçili bölgede nerede olduğunu tespit eden bir analiz yöntemidir. Burada elementer dağılım oranına bakılmaktadır. İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma (İBTAM) laboratuvarında hizmet alımı yoluyla SEM görüntüleri, EDX ve Mapping analizleri alınmıştır.



Şekil 3.13: SEM, EDX ve Mapping analizi yapılan cihaz ve mermer numunelerinin Au-Pd ile kaplanmış görüntüleri.

3.7.4 Stereo mikroskobu ile görüntüleme

Mermer numunelerinin her biri stereo mikroskobu (kamera sistemi Euromex NZ 1903) kullanılarak incelenmiştir. Stereo mikroskopları, ışık geçirmeyen katı yüzeylerin görüntülenmesinde oldukça kullanışlı cihazlardır. Işık mikroskobu olarak stereo mikroskop kullanılmıştır. Bütün mermer numuneleri, deney öncesi ve sonrasında çatlakların kapanıp kapanmadığını gözlemlemek amacıyla stereo mikroskop ile görüntülenmiştir. Stereo mikroskopla alınan görüntüler, numune yüzeyinde herhangi bir işlem gerektirmediğinden, numunelere zarar vermeden görüntüleme işlemi yapıldıktan sonra aynı numuneler kullanılarak deneye devam edilmiştir (Şekil 3.14). İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarındaki Stereo Mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır.



Şekil 3.14: Stereo mikroskop görüntüsü.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bakteri Kültür Ortamında CaCO_3 Kristallerinin Oluşumlarının Gözlenmesi

İnokülasyon besiyerinde üretilen *B. subtilis*, mermer konulmayan presipitasyon besiyerlerinin içine inoküle edildikten sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde, erlenlerin iç çeperlerinde kalsiyum karbonat halkalarının olduğu gözlemlenmiştir.

4.2 Makroskobik İncelemeler

3 aylık bekleme süresi sonunda 2x2 ve 4x4 cm ebadındaki mermer numunelerinin yüzeylerinin makroskobik olarak incelemeleri yapılmıştır. Gözlemler sonucunda, genellikle 4x4 cm ebadındaki ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmış ve canlı bakteri uygulanmış mermer numunelerinin yüzeyindeki makro gözeneklerin iç kısımlarında beyaz renkli küçük granüler oluşumlara rastlanmıştır. Ayrıca $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmış ve canlı bakteri uygulanmış mermer numunelerin yüzeylerinde ise beyaz renkli, pudra benzeri tozumsu yapılar gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyeri ve $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmış ve canlı bakteri uygulanmış mermer numunelerinin makroskobik görünüşleri.

Mikrobiyal kalsit çökmesi, X-ışını kırınım (XRD), AFM ve SEM-EDX/Mapping analizi ile nicelendirildi ve stereo mikroskop ve SEM görüntülemeleri ile görselleştirildi.

4.3 Stereo Mikroskop Görüntüleri

4.3.1 Karbonlanmış mermer örneklerinin görüntülenmesi

Yaptığımız deney çalışmaları sonucunda 20 gün CO_2 'ye maruz bırakılan numunelerin üç aylık bekleme süreleri sonunda 4x4 cm mermer numuneleri stereo mikroskopta incelenmiştir. Herhangi bir işleme tabi tutulmayan kontrol grubunun deney öncesi ve deney sonrası incelemeleri yapılmıştır. Kontrol grubunda CaCO_3 kristal oluşumları görülmemiştir (Şekil 4.2).



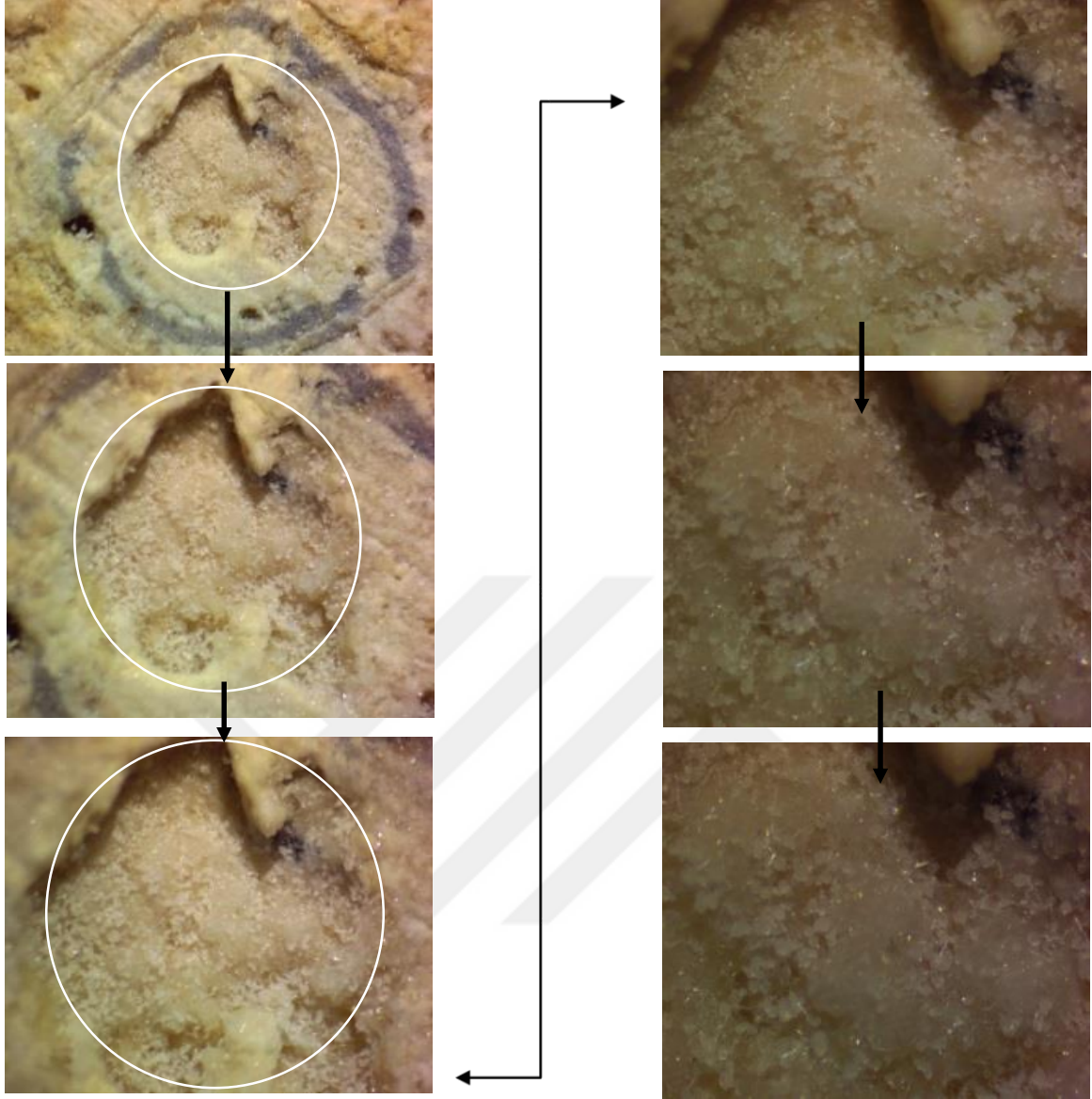
Şekil 4.2: Kontrol grubu işlemler öncesi ve sonrası stereo mikroskop görüntüsü (10 kez büyütme).

Stereo mikroskop ile karbonlanmış kontrol grubuna ait mermer numunelerinin ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bakteri olmayan, bakteri bulunan ve ölü bakterili ortamda bekletilen grupları incelenerek kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Canlı bakteri bulunan grupta mermer yüzeyinde ve gözeneklerde CaCO_3 çökelmeleri olduğu düşünülen yapılara rastlanmıştır. Kontrol grubu ve bakteri olmayan besiyerinde herhangi bir oluşum görüntüsü tespit edilmemiştir. Ölü bakterili grupta yüzeyde ve gözeneklerde canlı bakterili gruba oranla daha az olan CaCO_3 benzeri yapılar olduğu mikroskop incelemeleri ile görülmüştür (Şekil 4.3).

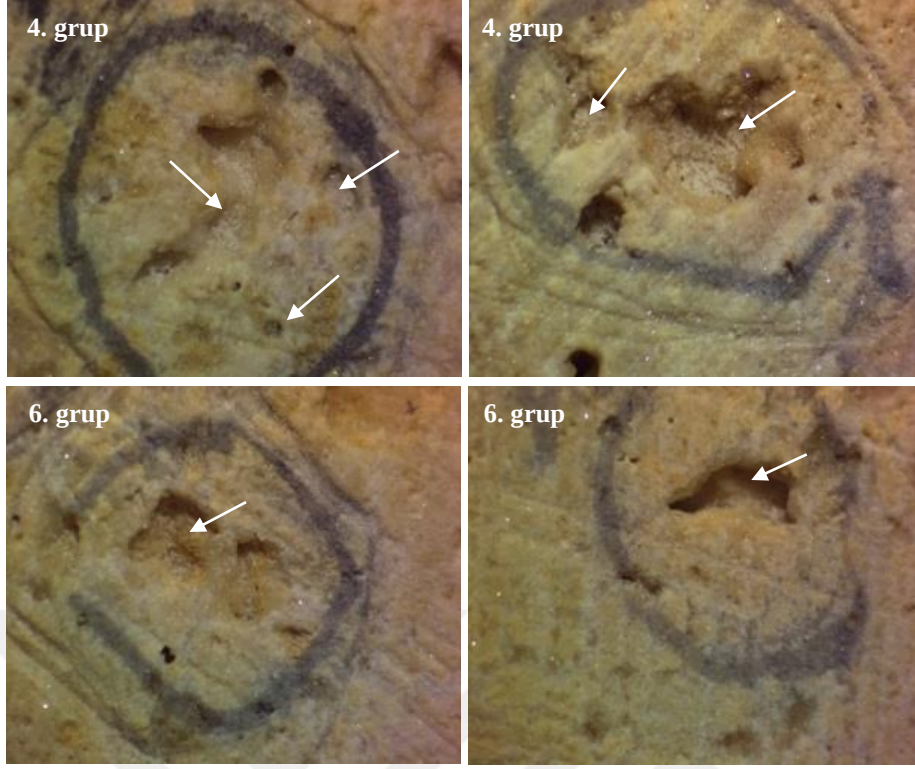


Şekil 4.3: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmış a) Kontrol (7. grup), b) Sadece besin içeren 2. grup, c) Canlı bakteri uygulanan 4. grup, d) Ölü bakteri uygulanan 6. Grup (10 kez büyütme).

Şekil 4. 4’de görüldüğü gibi kalsiyum klorürlü besiyerinde canlı bakteri uygulaması yapılan mermer numunesinin deney öncesinde belirlenen makro gözeneklerinin, CaCO_3 çökelişi sonucu, kısmen kapandığı ve mikro gözeneklerinin tamamen kaplandığı görülmektedir. Mikroskop büyötmeleri ile oluşan yapıların mermerden farklı bir yapı olduğu tespit edilmiştir. Gözeneklerin çapı 3-5 mm’dir.

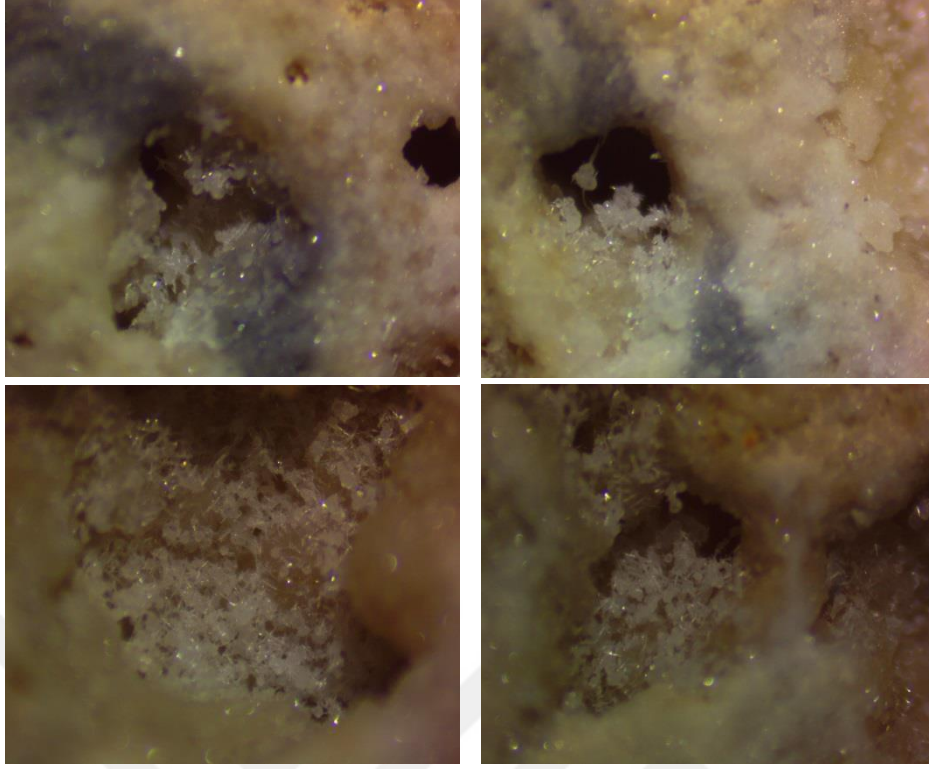


Şekil 4.4: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde, karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin stereo mikroskopta 10, 15, 20, 30, 40 ve 45 kez büyütme görüntüleri.



Şekil 4.5: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde, karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri uygulanan 4. grup ile ölü bakteri uygulanan 6. grup numunelerinin mikroskopik görüntüleri (10 kez büyütme).

Canlı bakteri hücresi uygulanan numunelerde makro gözeneklerin tüm alanının kaplandığı görülürken ölü bakteri hücresi uygulanan bölgelerde kısmi kapanmaların olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



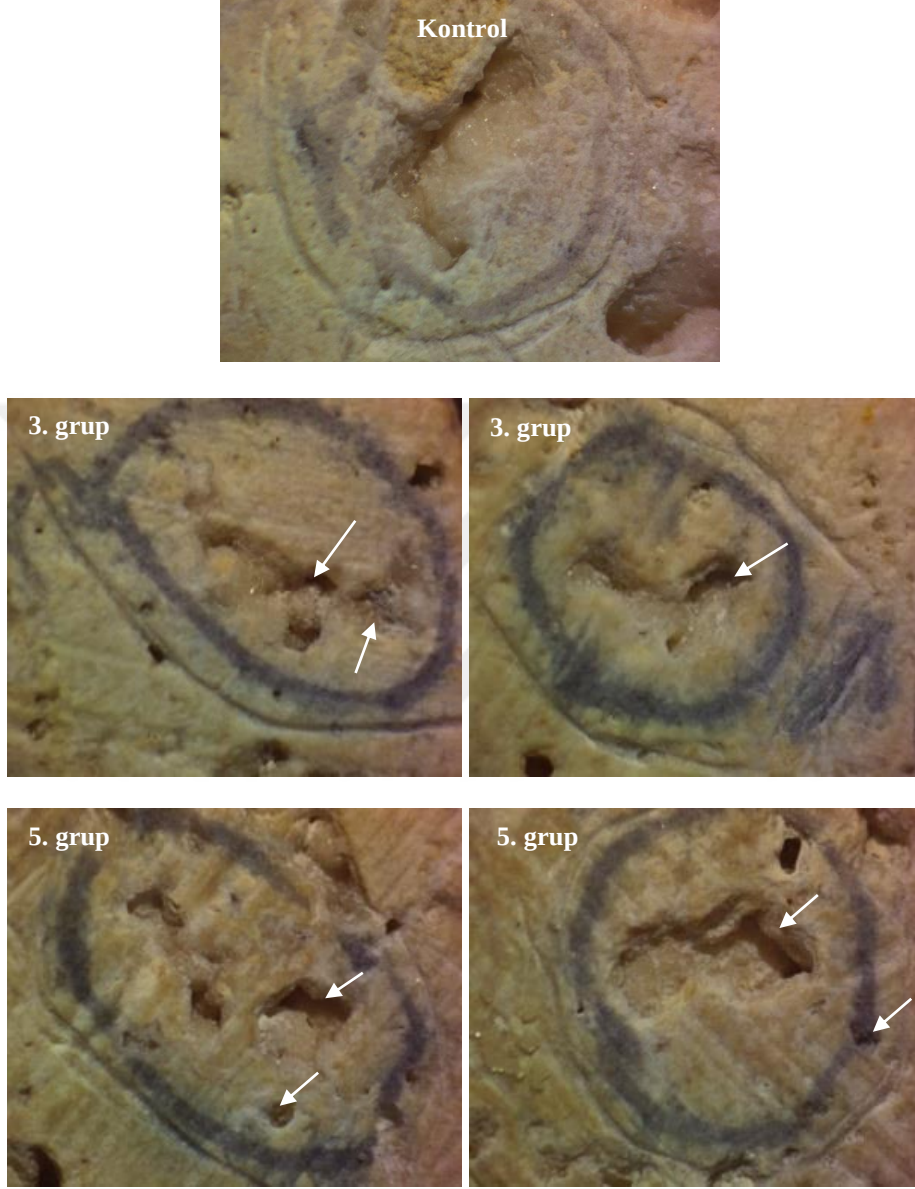
Şekil 4.6: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde, canlı bakteri uygulanan 4. grup mermer numune yüzeylerinin 40 kez büyütülmüş ve ilgili alana zoomlanmış mikroskop görüntüleri.

Makro gözeneklerdeki oluşumların 40 kez büyütme incelemeleri sonucunda tespit edilen yapıların literatürde karşılaşılan CaCO_3 kristalleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Wiktor ve Jonkers, 2011) (Şekil 4.6).



Şekil 4.7: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde, ölü bakteri uygulanan mermer numunelerinin 10, 30 ve 45 büyütme ile incelenen stereo mikroskop görüntüsü (6. grup).

Ölü hücre uygulamalarının mikroskop büyütmelerinde taranan bölgede CaCO_3 çökelmelerinin olduğu ancak canlı hücredekine göre bu yapının az olduğu Şekil 4.7’ de görülmektedir.



Şekil 4.8: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 3. Grup ve ölü bakteri bulunan 5. grup numunelerinin mikroskopik görüntüleri (10 kez büyütme).

Kalsiyum asetatlı ortamda bekletilen mermer numunelerinin, canlı bakteri ve ölü bakteri uygulamasında mermerlerin yüzeyinde ve makro/mikro gözeneklerinde kalsiyum karbonat yapılarının olduğu stereo mikroskopta görüntülenmiştir (Şekil 4.8).

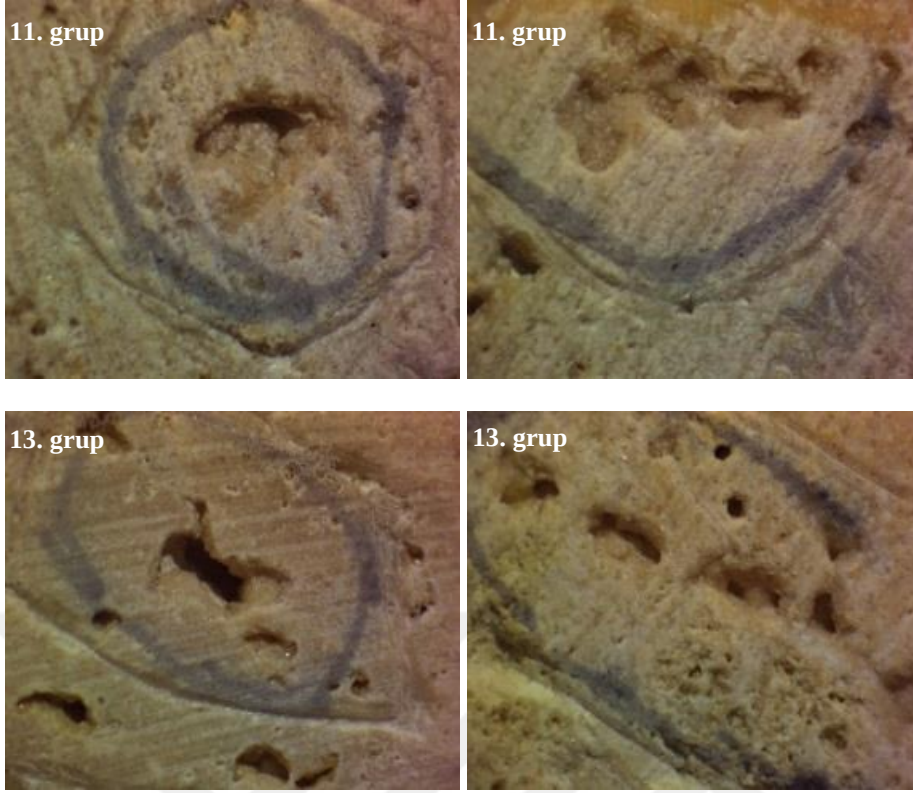
İncelemeler sonucunda kalsiyum klorür bulunan ortamda, numune yüzeylerinde daha fazla kalsiyum karbonat oluştuğu; kalsiyum asetatlı ortamda ise numune yüzeyinde daha az kalsiyum karbonat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca oluşan kalsiyum karbonatın yapılarının farklı olduğu görülmektedir. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerindeki numunelerin yüzeyinde granüler beyaz yapılara benzer oluşumlar görülürken, $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerindeki numunelerde ise pudramsı beyaz toz oluşumlara rastlanmıştır.

4.2.2 Karbonlanmamış mermer örneklerinin görüntülenmesi

Karbonlanmamış mermer numunelerinin mikroskop incelemelerinde bekleme süresi sonunda kontrol grubunda mermer yüzeyinin normal görüntüsü dışında farklı bir yapı görülmemiştir. Mermer numunelerinin stereo mikroskopta yüzey taraması yapılmıştır. Ayrıca, deney öncesi belirlenen bölgeler deney sonrası ile karşılaştırılarak aynı mikroskop büyütmesinde tekrardan incelemeleri gerçekleştirildi (Şekil 4.9).



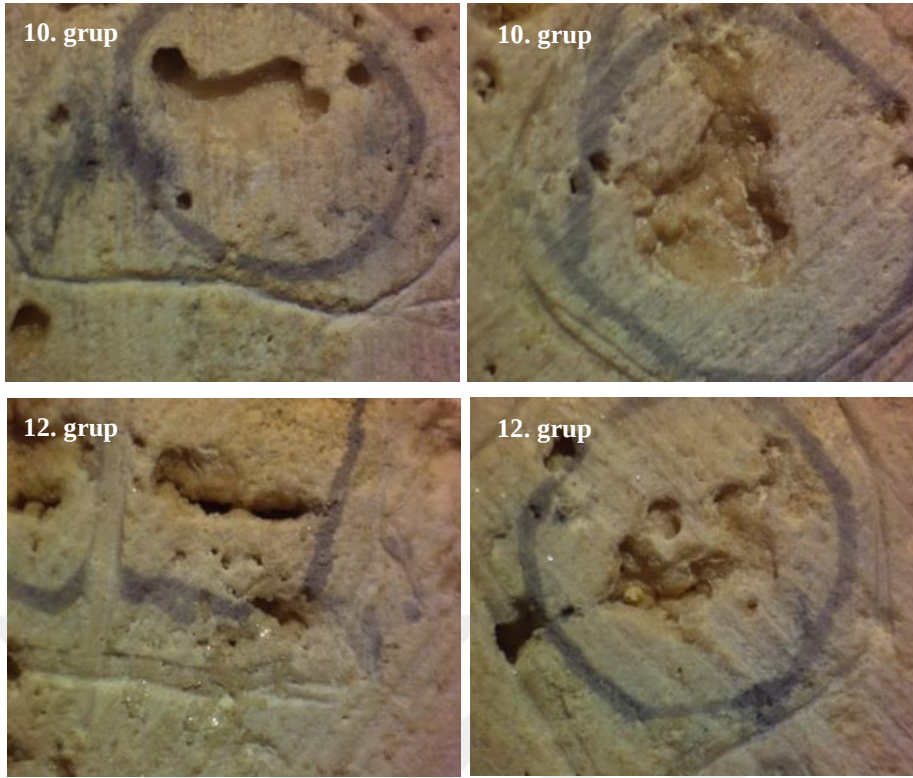
Şekil 4.9: Karbonlanmamış kontrol gruplarının deney öncesi ve sonrası görünümü (10 kez büyütme).



Şekil 4.10: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 11. grup ve ölü bakteri bulunan 13. grup numunelerinin mikroskopik görüntüleri (10 kez büyütme).

Karbonlanmamış ve kalsiyum klorürlü ortamda, canlı bakteri uygulamalarının mikroskopik incelemelerinde, karbonlanmış numunelere göre oluşan yapıların az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca karbonlanmamış ölü bakteri uygulamalarında ise mikroskopik incelemelerde herhangi bir oluşuma rastlanmamıştır. Ancak SEM görüntülemelerinde CaCO_3 kristal yapıların olduğu hem canlı hem de ölü bakteri uygulamalarında görülmüştür (Şekil 4.10).

Kalsiyum asetatlı besiyerindeki mermer numunelerinde mikroskopik incelemelerde makro gözeneklerde ve mermer yüzeyinde farklı yapılara rastlanmıştır (Şekil 4.11). Bu yapıların kalsiyum klorürlü ortamdaki yapılardan farklı olduğu ve az olduğu görülmüştür.



Şekil 4.11: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 10. grup ve ölü bakteri bulunan 12. grup numunelerinin mikroskobik görüntüleri (10 kez büyütme).

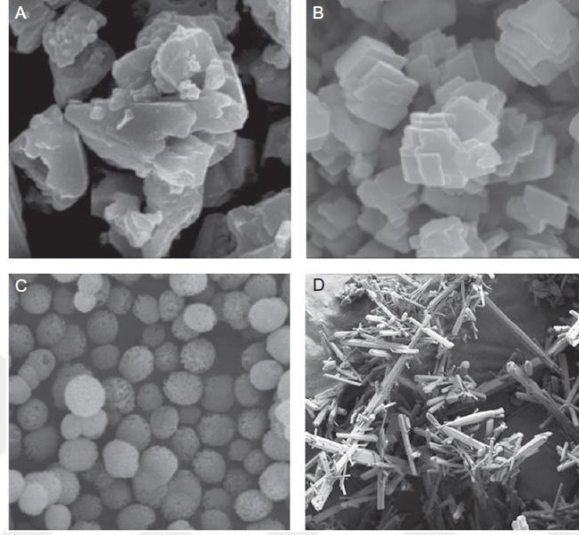
Karbonlanmamış numunelerde, bakterilerin yüzey kaplama ve makro gözenekleri doldurma yoğunluğunun incelemeler sonucu karbonlu numunelere göre daha az olduğu tespit edilmiştir.

Ölü bakteri uygulamalarında mikroskobik görüntülerinde makro gözeneklerde belirgin yapılar olmamasına rağmen SEM görüntülemelerinde ölü bakterilerin uygulandığı mermer örneklerinde kalsiyum karbonat kristallerine rastlandığından bu alanların mikroskobik görüntüleri verilmiştir.

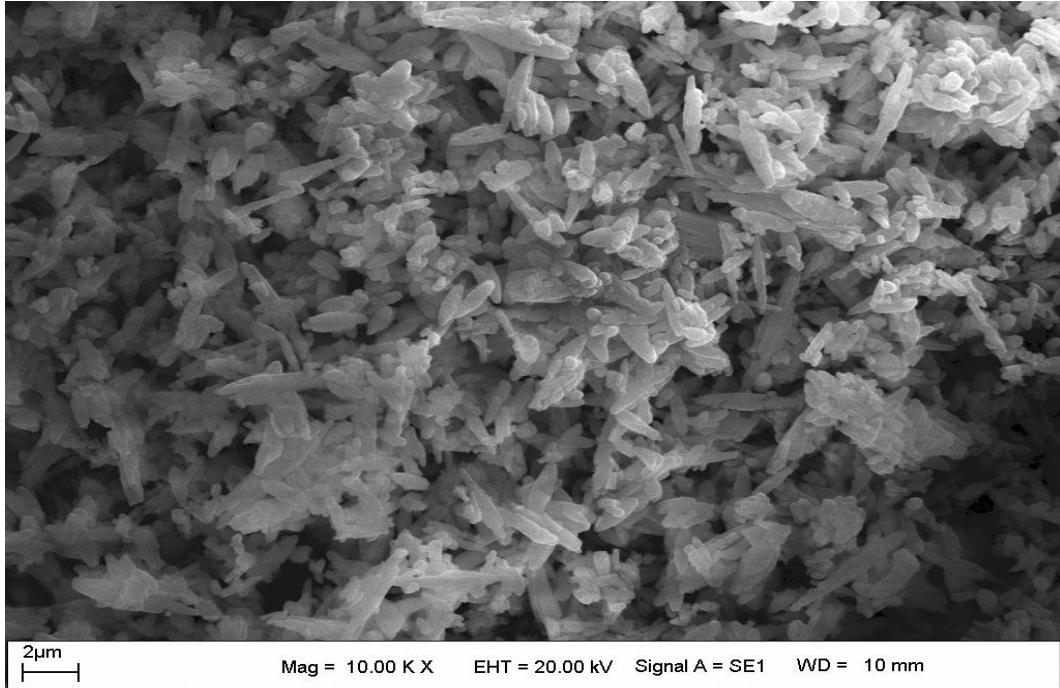
4.3 Mermer Numunelerinin SEM Görüntüleri, EDX ve Mapping Analiz Sonuçları

Kalsiyum karbonatın bakteriler tarafından çökmesi sonucunda farklı tiplerde CaCO_3 kristalleri oluşmaktadır. Şekil 4.12’de literatürden alınan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Doğada yaygın olan mineral tipleri kalsit, aragonit ve vaterittir. Doğal çevrelerde ve laboratuvar şartlarında bakteriler tarafından yaygın olarak sentezlenen vaterit, kalsit oluşumunda geçiş formudur. Kalsit minerali ise CaCO_3 ’ın en kararlı halidir (Tourney ve Ngwenya, 2009; Wang ve Becker, 2009). Bakteri gelişiminin ilk günlerinde

bakteriler yoğun olarak vaterit üretmektedir. İnkübasyonun ileri dönemlerinde vaterit kristallerinin yerini kalsit almaktadır (Bozbeyoğlu vd., 2020). Bu çalışma kapsamında elde edilen SEM görüntüleri literatür ile karşılaştırılarak verilmiştir. Kimyasal olarak sentezlenmiş saf CaCO_3 granüllerinin de SEM görüntüleri çekilerek, CaCO_3 'ın hem kimyasal hem de biyometabolik olarak sentezlenmiş halleri kıyaslanmıştır (Şekil 4.13). Saf CaCO_3 granüllerinin SEM görüntülerinde yoğun olarak aragonit kristallere rastlanmıştır.



Şekil 4.12: CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri: (A) amorf kalsit, (B) katmanlı ve eşkenar dörtgen kalsit, (C) küresel vaterit ve (D) iğneli aragonit (Al Omari vd., 2016).

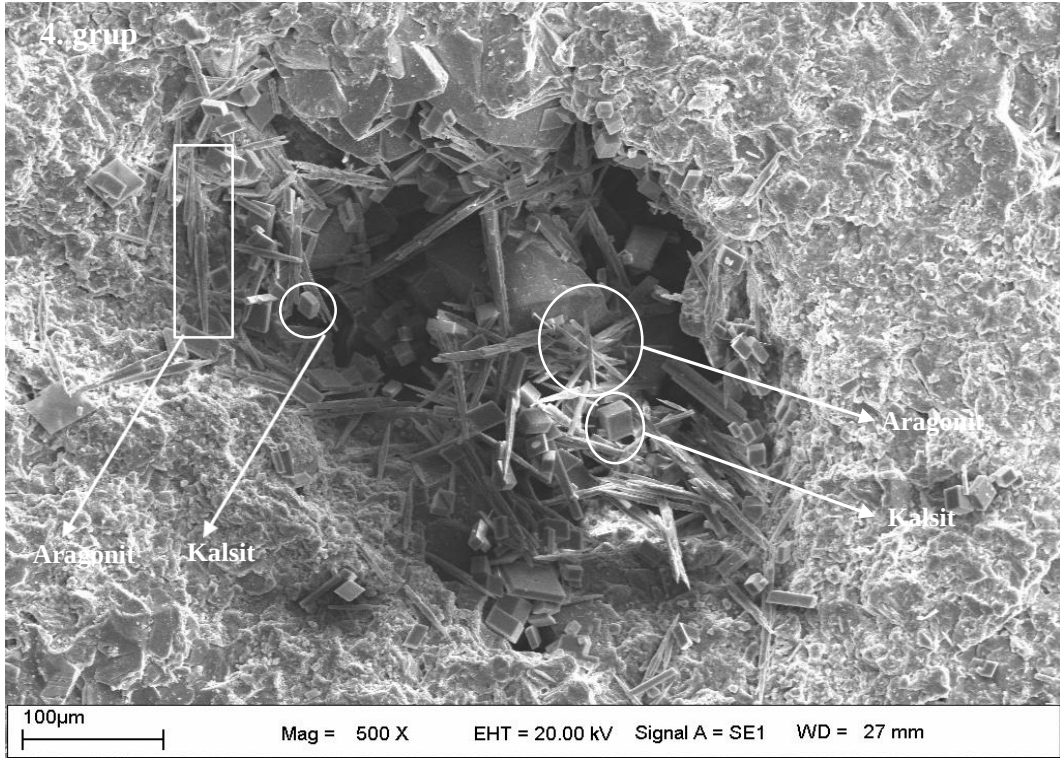
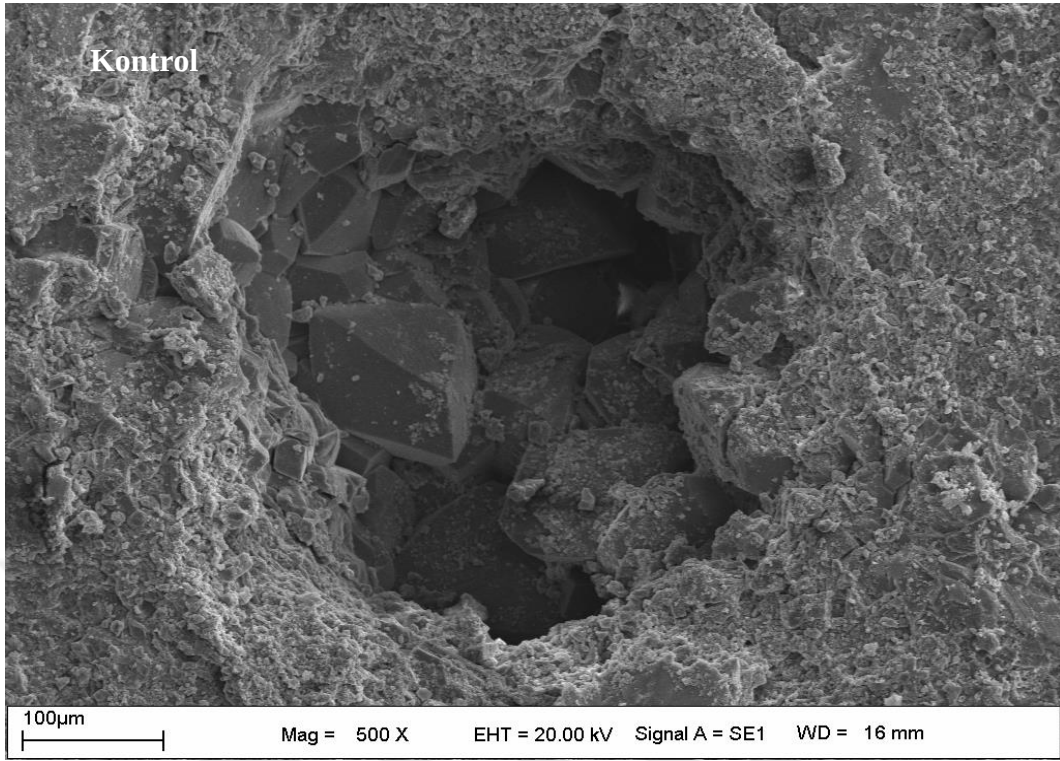


Şekil 4.13: Saf CaCO_3 granüllerinin SEM görüntüleri.

Kalsiyum karbonat bileşeninin kristallenmiş halleri; kalsit, aragonit ve vaterittir. Genel olarak kalsiyum oksit (CaO) ve karbondioksitten (CO₂) oluşmaktadır. Kalsiyum karbonat kristalleri gri/beyaz renkte olup beton/mermer benzeri yapıların mikro gözeneklerinde olduğu durumlar, SEM görüntüleri ile tespit edilebilmektedir. Çünkü oluşan yeni yapılar, hem boyutları hem renkleri hem de tipleri ile mermerin amorf yapısından farklı olduğu için kolaylıkla ayırt edilebilmektedir.

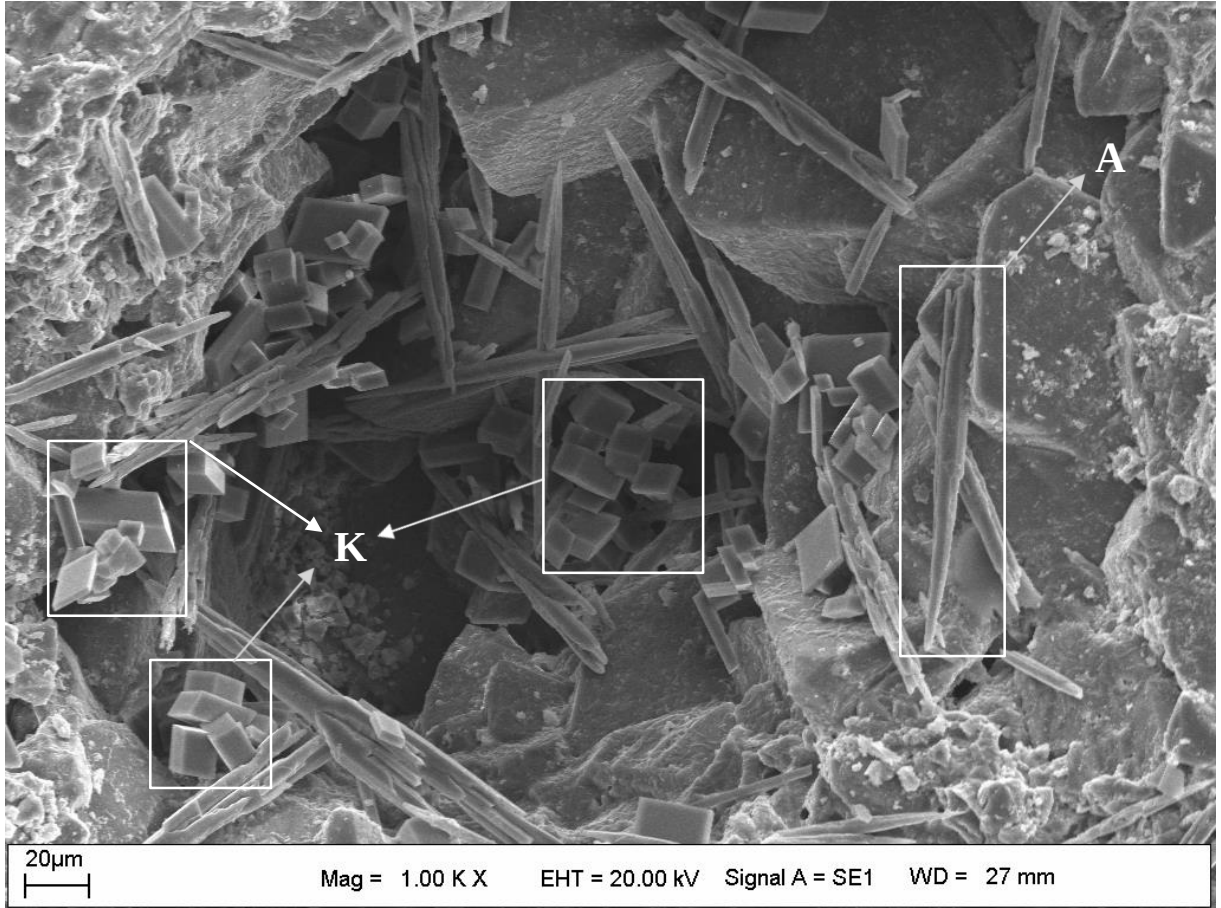
4.3.1 Karbonlanmış mermer numunelerinin SEM görüntüleri, EDX ve mapping analiz sonuçları

Kontrol grubu mermer numunelerinin yüzeyinin amorf bir yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). Kontrol grubundaki mermer yüzeylerinin literatürdeki mermer yüzeyleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Colao vd.,2004; Moropoulou vd., 2019).

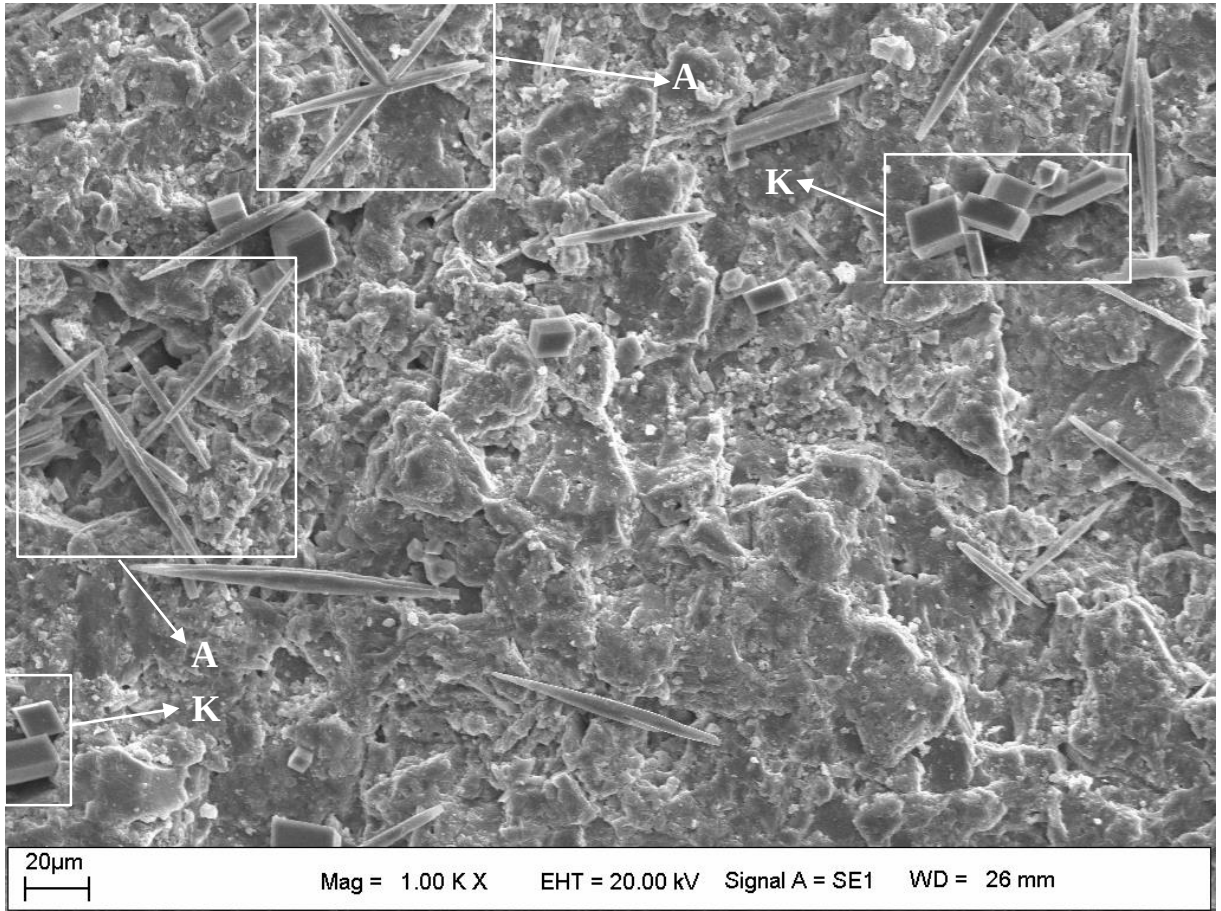


Şekil 4.14: Karbonlanmış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup).

Canlı *B. subtilis* bakterisi uygulanan mermer numunelerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.14-16'da görülmektedir. Numunelerinin belirlenen yüzey alanlarından alınan SEM görüntülerinde 20-100 µm büyüklüğünde çok sayıda kalsit ve aragonit kristal yapıları tespit edilmiştir. Bu yapılara, mermer yüzeyinde ve mikro gözeneklerde rastlanılmıştır. Mikro gözeneklerin bakteriyel kalsifikasyon sonucu oluşan CaCO_3 kristalleri tarafından doldurulmaya başlandığı gözlenmektedir. Mermer örnek numunelerinde oluşan yapıların kontrol grubunun yüzeyindeki amorf yapılardan tamamen farklı olduğu görülmektedir. Kontrol grubundaki Mermer numunelerinin yüzeyindeki mikro gözenekleri çevreleyen kalsit kristallerin de bakteriyel kalsifikasyon sonucu üretilen kalsitlerden hem boyut hem de renk olarak farklı olduğu gözlenmiştir. Çalışılan tüm gruplar içerisinde 4. Grup, biyokalsifikasyon sonucunda üretilen CaCO_3 kristallerinin hem boyut hem de yoğunluk açısından en büyük ve en fazla olduğu gruptur.

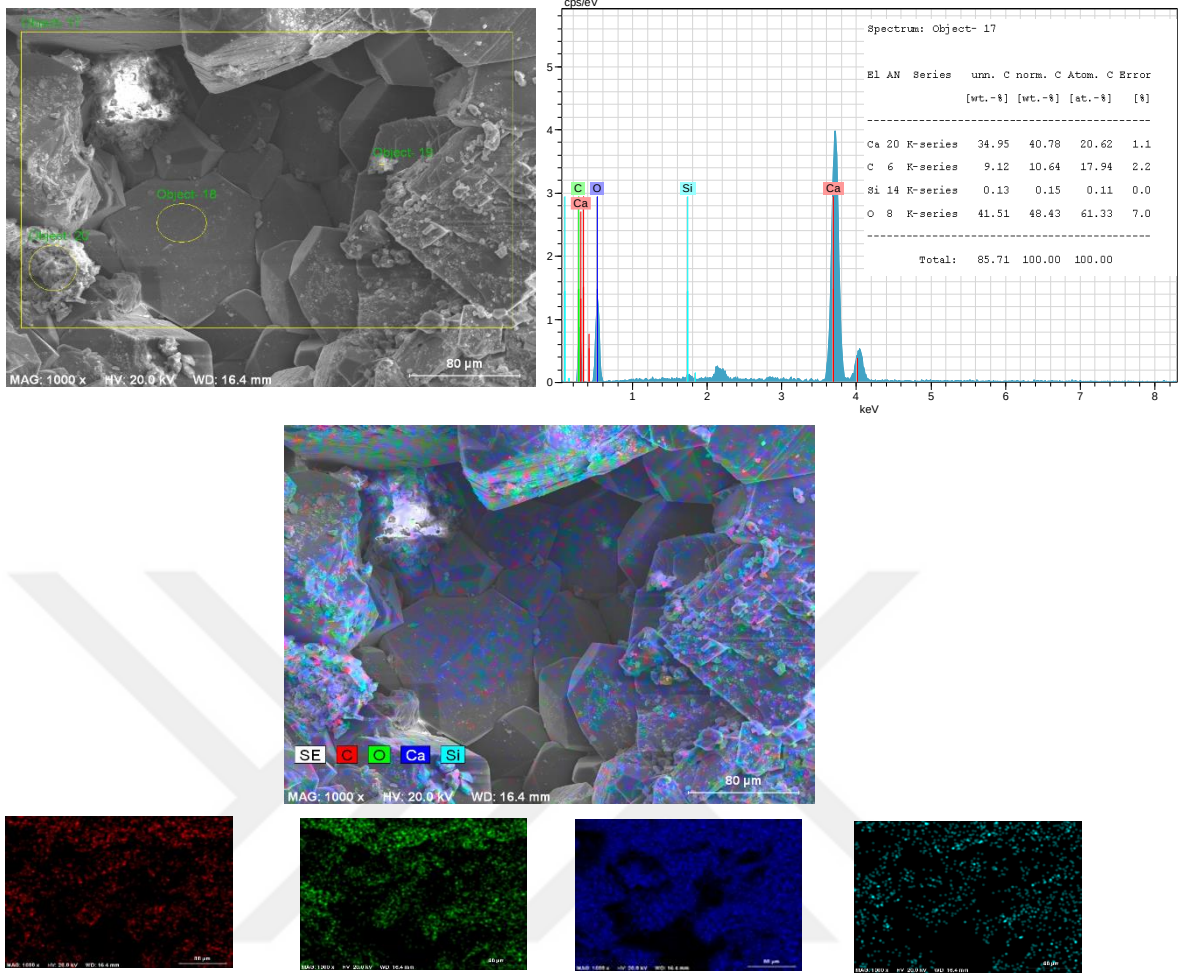


Şekil 4.15: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).



Şekil 4.16: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).

Bakteriyel karbonat çökmesi hem pasif hem de aktif çekirdeklenmeden kaynaklanır (Schultze-Lam ve Beveridge, 1994; Schultze-Lam vd., 1996; Stocks-Fischer vd., 1999; Warren vd., 2001). Pasif karbonat çekirdeklenmesi, mineral doygunluğu artıran ve çekirdeklenmeyi indükleyen bakteri hücrelerinin etrafındaki mikroçevrelerde ve uygulanan çözeltinin kimyasında metabolik olarak yönlendirilen değişikliklerden meydana gelir (Schultze-Lam vd., 1996). Bu, genellikle bakteriyel amonyaklaştırma (Stocks-Fischer vd., 1999) veya anoksik ortamlarda sülfat indirgenmesi (Van Lith vd., 2003) yoluyla CO_3^{2-} veya HCO_3^- üretiminden veya fotosentetik HCO_3^- tüketimi ve bakteriler tarafından OH^- üretimi yoluyla alkalizasyondan kaynaklanan pH artışını yansıtır (Ferris vd., 1997).

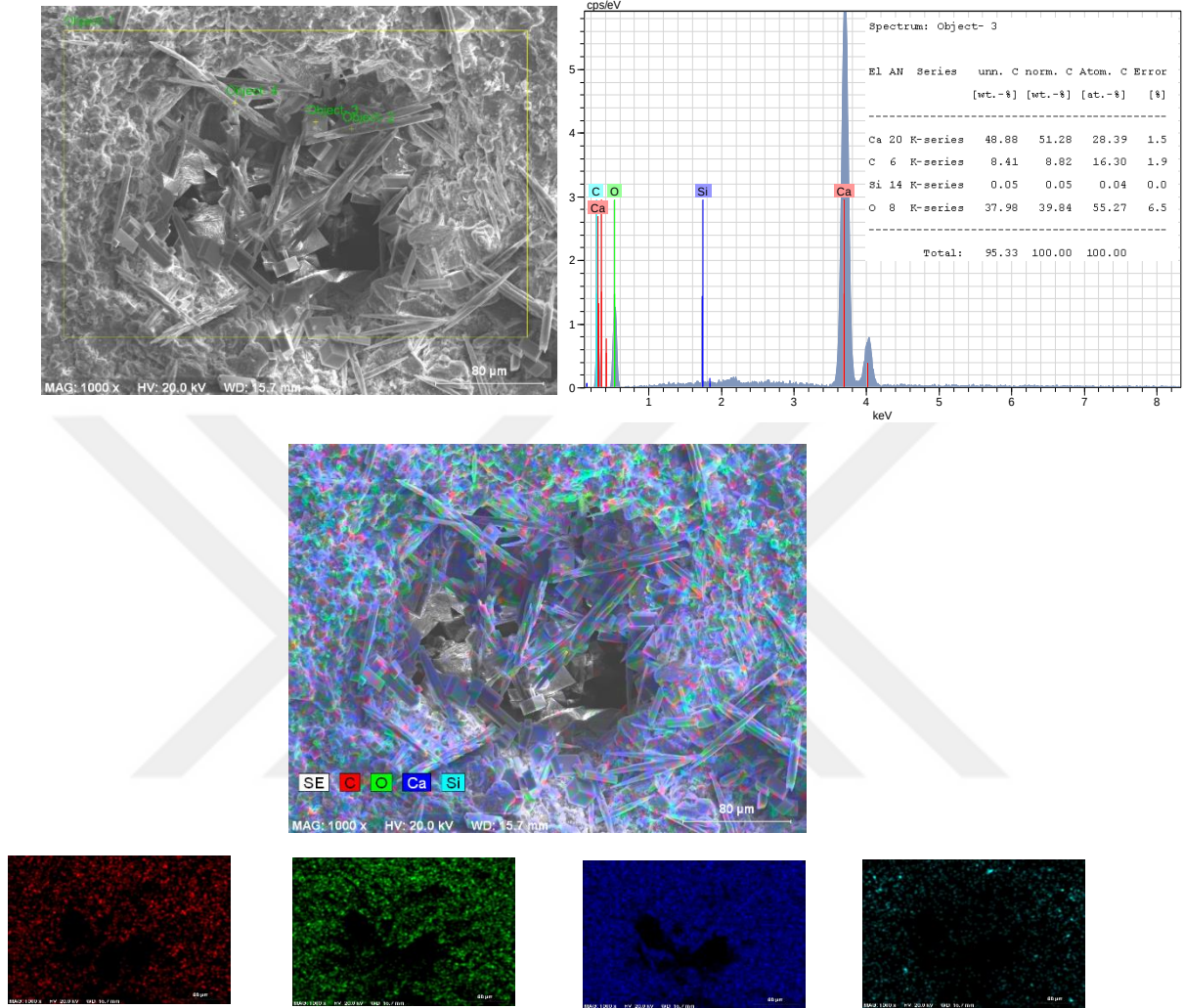


Şekil 4.17: Karbonlanmış mermer yüzeylerinin SEM-EDX ve mapping analizi (Kontrol grubu).

Şekil 4.17 ve 4.18’de karbonlanmış kontrol grubu ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\bar{\text{U}}$ besiyerinde bekletilmiş ve canlı bakteri uygulanan grubun mermer yüzeylerinin SEM-EDX ve mapping analizi sonuçları görülmektedir. Karbonlanmış mermer örneklerindeki karbon oranının, EDX analizleri sonuçlarına göre, karbonlanmamış kontrol grubu mermer örneklerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuca göre mermer numunelerinin işlemlerden önce karbondioksitli etüvde bekletilmesi, işlem öncesinde mermer yüzeylerindeki karbon miktarını artırarak CaCO_3 kristallerinin oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir. Sonuçlarımız literatürle paralellik göstermektedir (Shirakawa vd., 2015).

SEM-EDX analiziyle de bakteriyel kalsifikasyon sonucunda oluşan yeni yapıların, yüzeylerde kontrol grubuna göre daha yüksek oranda Ca, C ve O elementlerinin olduğu

tespit edilmiştir. SEM-EDX analiz ve mapping sonuçları baz alınarak oluşan yeni yapıların kalsiyum karbonat olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri tarafından üretilen CaCO_3 kristallerinin SEM-EDX ve mapping analizi (4. grup).

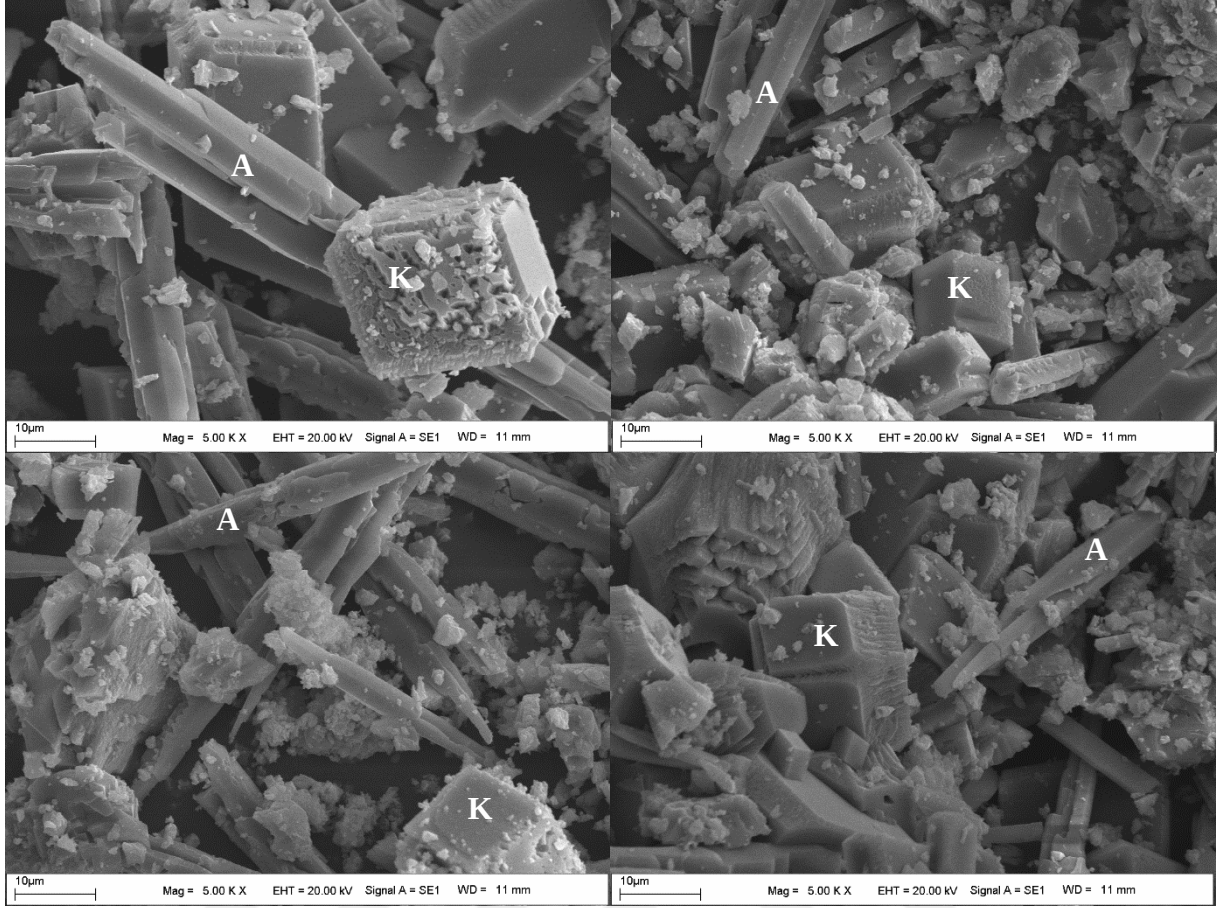
EDX sonuçlarına göre mermer numunelerinde yüksek oranda Ca, C, Si ve O bulunduğu tespit edilmiştir. Mermerin doğal yapısı itibarıyla bu beklenen bir sonuçtur. Grafiklerde görülen istenmeyen piklerin gürültü pikleri ya da numunelerin kaplanmasında kullanılan Au pikleri olduğu görülmektedir. Mermerin homojen bir malzeme olmadığı ve ölçümün noktasal bölgelerden yapıldığı düşünüldüğünde, farklı EDX değerlerinin elde edilmesi, bu bileşenlerin miktarlarının kesin olarak bu grafiklerden belirlenemeyeceğini

göstermektedir. Fakat bakteri içeren ve Ca, besin ve üre eklenen tüm gruplardaki Ca miktarının, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Bu durum bakteriyel kalsifikasyon işlemleri esnasında bakterilerin bu element ve besinleri tüketerek daha fazla CaCO_3 kristalleri oluşturduğu şeklinde yorumlanabilir. Analizler esnasında birden fazla bölgeden alınan sonuçların benzer olması bu tezi desteklemektedir. Ancak bu yöntemle kesin bir yargıya varmak yine de mümkün olamamaktadır.

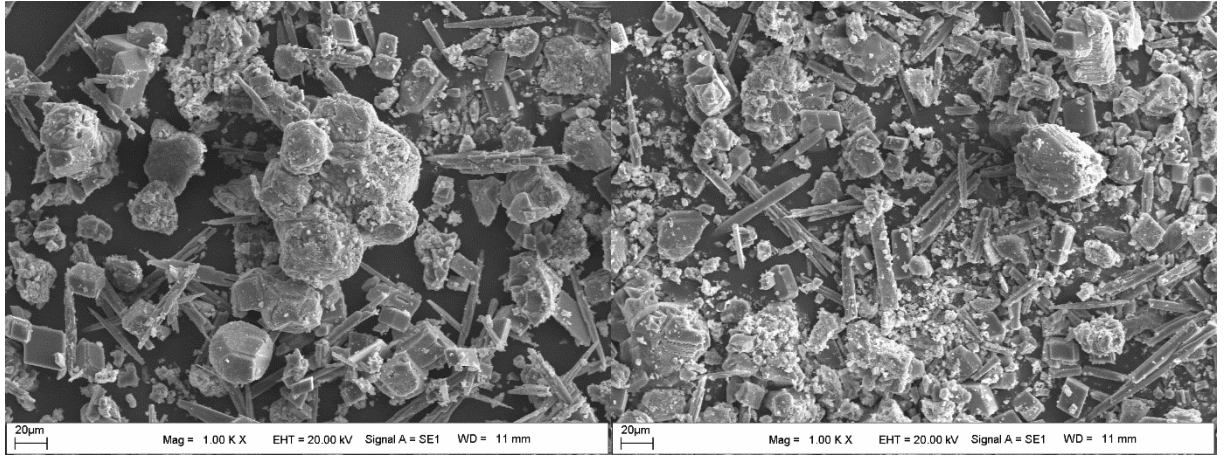
Canlı hücre uygulanan bu grupta kontrol numunesine göre Ca oranlarında artış, O ve Si oranlarında düşüş tespit edilmiştir. En yüksek pik Ca olarak belirlenmiştir. Bunu takip eden O ve Si pikleri görülmektedir. Kalsiyum oranı en fazla % 48.88 değeri karbonlanmış ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen canlı bakteri (4. Grup) uygulamalarında elde edilmiştir (Şekil 4.18). Besin ve bakteri içermeyen kontrol grubunda % 34.95 oranında Ca tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

CaCO_3 kristalleri olduğu düşünülen yapı üzerinde (Şekil 4.18) EDX mapping (haritalama) yöntemi ile elementer tarama gerçekleştirilmiştir. Bu taramada CaCO_3 varlığının yarı kantitatif olarak kanıtlanması için C, O, Ca ve Si elementleri aranmıştır. Taranan bölgede CaCO_3 kristalleri olduğu düşünülen yapının üzerindeki Ca, C ve O elementi temsil eden sırasıyla mavi, kırmızı ve yeşil renk kümeleri tüm alanı kaplamaktadır. Hedef elementlerin EDX spektrogramında pik oluşturması canlı bakteri tarafından kalsiyum karbonat kristalleri üretilmiş olduğunu destekleyici niteliktedir.

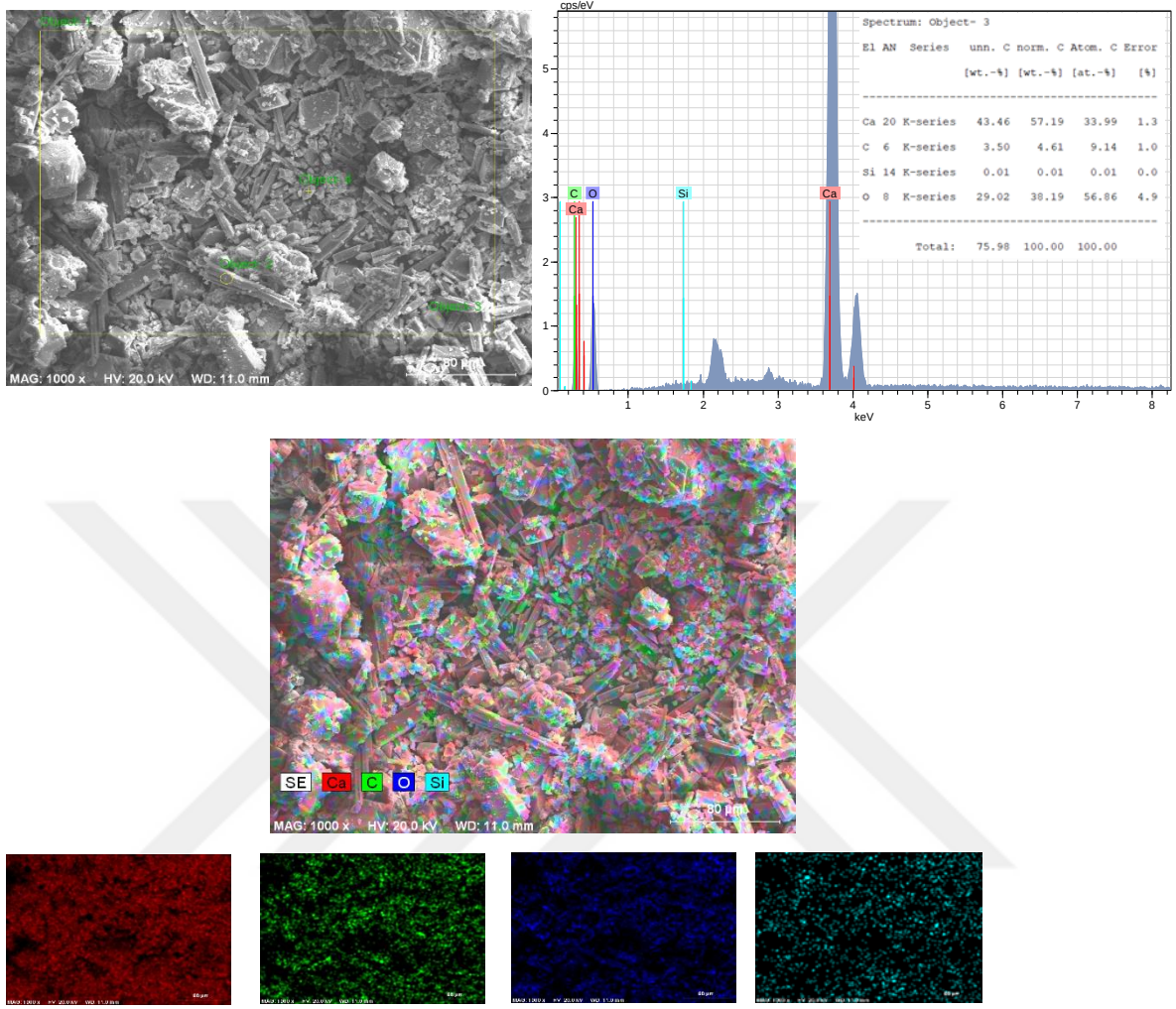
Şekil 4.4’de görüntüsü verilen, 4.gruba ait 4x4 cm ebadındaki mermer yüzeylerindeki makro gözeneklerin içinde belirgin olarak görülen ve kalsiyum karbonat kristalleri olduğu düşünülen yapılardan örnekler alınarak SEM-EDX ve mapping analizleri yapılmıştır (Şekil 4.19-21). Direkt bakteriyel kalsifikasyon sonucu oluşan bu yapıları içeren SEM görüntülerinde kalsit ve aragonit kristallerine rastlanmıştır. Ca oranı % 43.46 olarak tespit edilmiştir. Literatürde genellikle CaCl_2 ortamında elde edilen CaCO_3 kristalleri olarak sadece kalsitten bahsedilmiştir. Literatürden farklı olarak yaptığımız çalışma sonucunda SEM görüntülerinde ağırlıklı olarak kalsit, daha az sayıda aragonit kristalleri tespit edilmiştir. *Sporosarcina pasteurii* ile yapılan çalışmada kalsiyum klorürlü ortamda sadece kalsit kristali belirlenirken kalsiyum laktat, kalsiyum asetat ve kalsiyum glukonat varlığında ise sadece vaterit yapıları SEM görüntülemesinde gözlenmiştir (Gorospe vd., 2013).



Şekil 4.19: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup örnekler canlı bakteri içermektedir. 5000 kez büyüme. K; Kalsit, A; Aragonit).



Şekil 4.20: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin yüzeyinden ve makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (4. grup örnekler canlı bakteri içermektedir, 1000 kez büyüme).

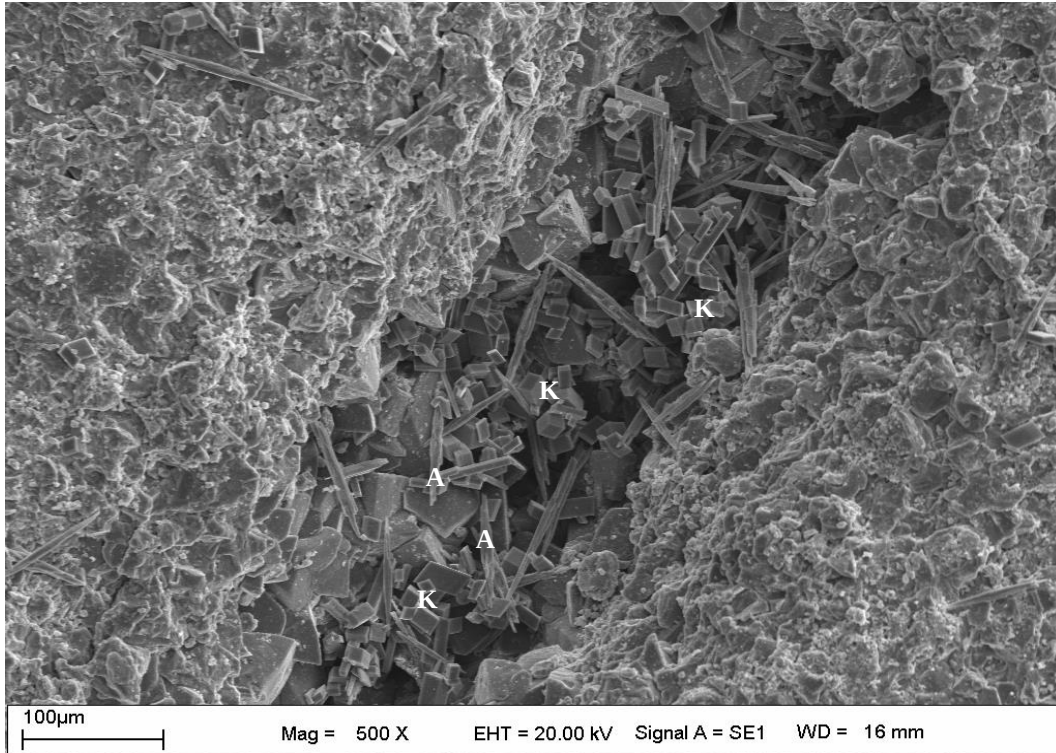
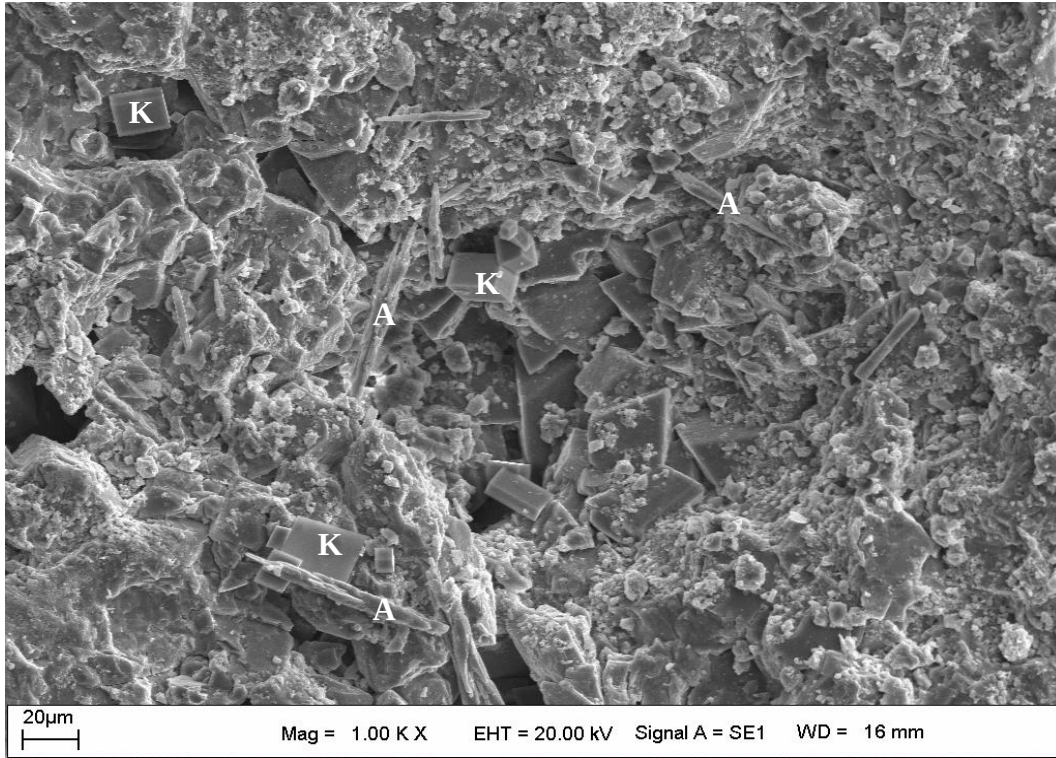


Şekil 4.21: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin SEM-EDX ve mapping analizi (4. Grup).

CaCO_3 kristalleri olduğu düşünülen yapı üzerinde (Şekil 4.21) EDX mapping (haritalama) yöntemi ile elementer tarama gerçekleştirilmiştir. Hedef elementlerin EDX spektrogramında pik oluşturması, canlı bakteriler tarafından kalsiyum karbonat kristallerinin üretimini desteklemektedir.

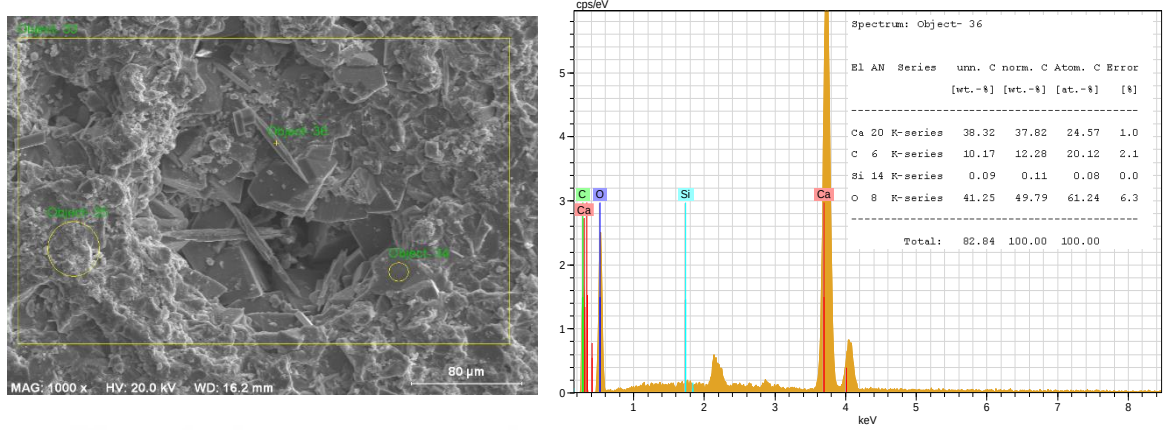
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmış ve ölü bakteri içeren yüzeylerin makroskobik gözlemlerinde mermer yüzeylerinde herhangi bir toz ya da granül şeklinde beyaz renkli yapılar gözlenmezken mikroskobik görüntülemelerde (10-45 kez büyütme) bu yapılar rastlanmıştır. Yapılan SEM görüntülemelerinde de (500-1000 kez büyütme) kalsit, aragonit ve amorf yapılar tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Ölü bakteri

hücreleri, mermer yüzeylerinde CaCO_3 kristallerinin oluşumuna sebep olmuştur. Aynı besiyerinde üretilen fakat canlı hücre içeren numunelere göre daha az yoğunlukta CaCO_3 kristallerine rastlanmıştır. Oluşan kristalleşmelerin meydana gelmesi aktif çekirdeklenme reaksiyonu ile açıklanabilmektedir. Ölü hücre yüzeyleri elektronegatif yüklerinden dolayı çekirdeklenme için substrat görevi görmektedir. Buradaki mekanizma canlı hücre ile yapılan amonifikasyon sonucu oluşturulan HCO_3^- üretiminden kaynaklanan CaCO_3 oluşumundan ziyade katyonların adsorpsiyonunu ve ardından CO_3^{2-} veya HCO_3^- (Schultze-Lam and Beveridge, 1994; Schultze-Lam vd., 1996; Stocks-Fischer vd., 1999; Warren vd., 2001) çekiciliğini destekleyen net elektronegatif yük veren kimyasal olarak heterojen makromoleküller nedeniyle bakteri hücre yüzeylerinin çekirdeklenme substratları olarak kullanılmasıyla oluşmaktadır. Bu işlem aktif çekirdeklenme olarak literatürde yer almaktadır (Schultze-Lam ve Beveridge, 1994 ; Bosak ve Newman, 2003; Van Lith vd., 2003). Çoğu gram-pozitif ve gram-negatif bakterinin yüzeyinde bulunan karboksil grupları, kalsit kafesi ile aynı uzamsal konfigürasyonu sergiler ve karbonat iyonları ile geometrik homolojileri paylaşır ve bu nedenle aktif kalsit oluşumu için kritik olmaktadır (Braissant vd., 2003).



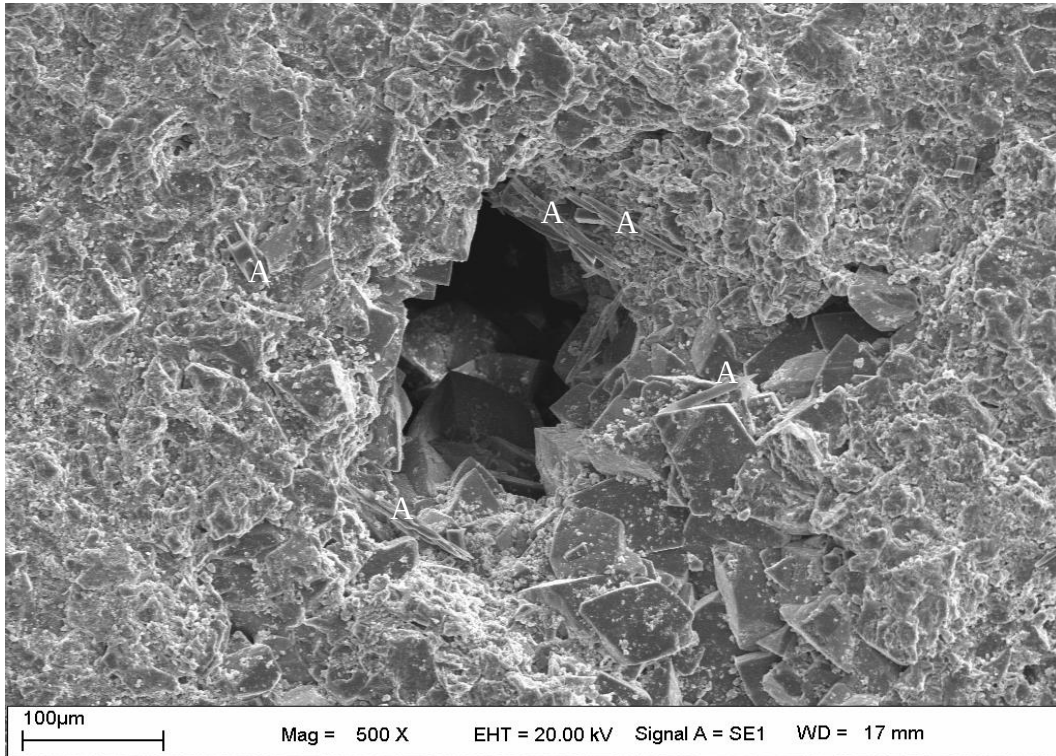
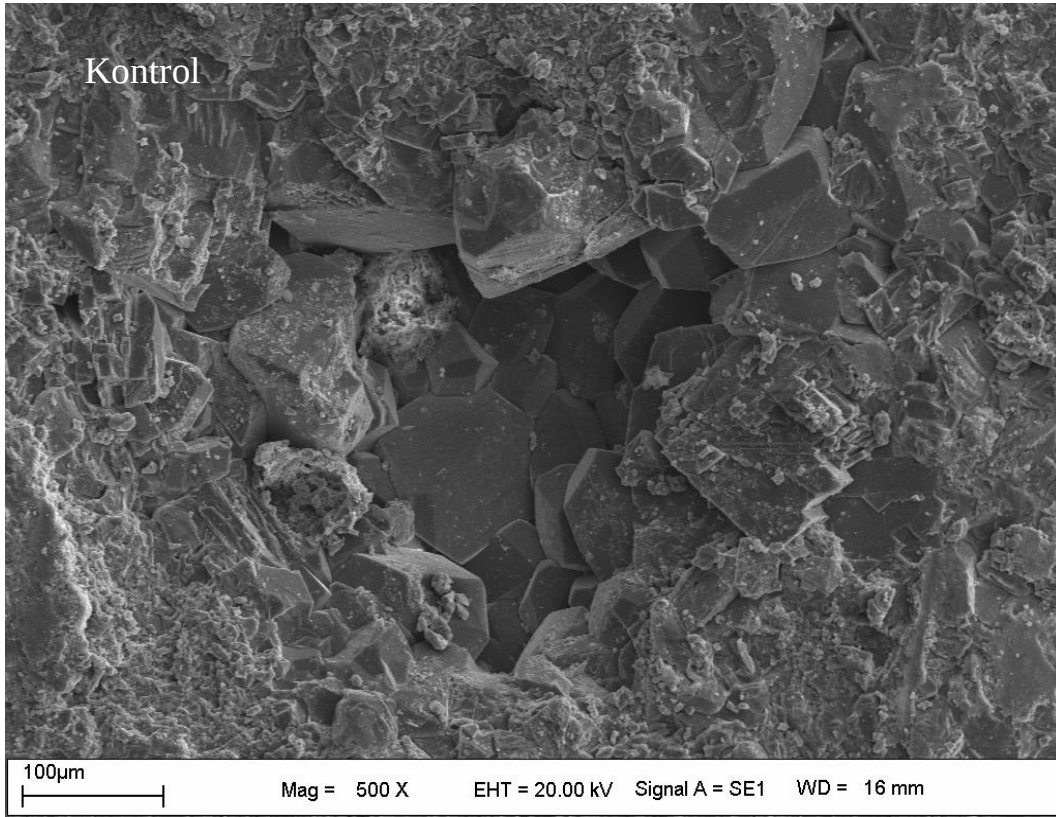
Şekil 4.22: CaCl₂.2H₂O (60 gr/L) içeren CaŪ besiyerinde bekletilen, karbonlanmış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO₃ kristallerinin SEM görüntüleri (6. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).

Ölü hücre içeren grupların SEM-EDX analiz sonuçlarına göre Ca miktarı kontrol grubuna göre yüksek, canlı hücre içeren gruba göre düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.23).

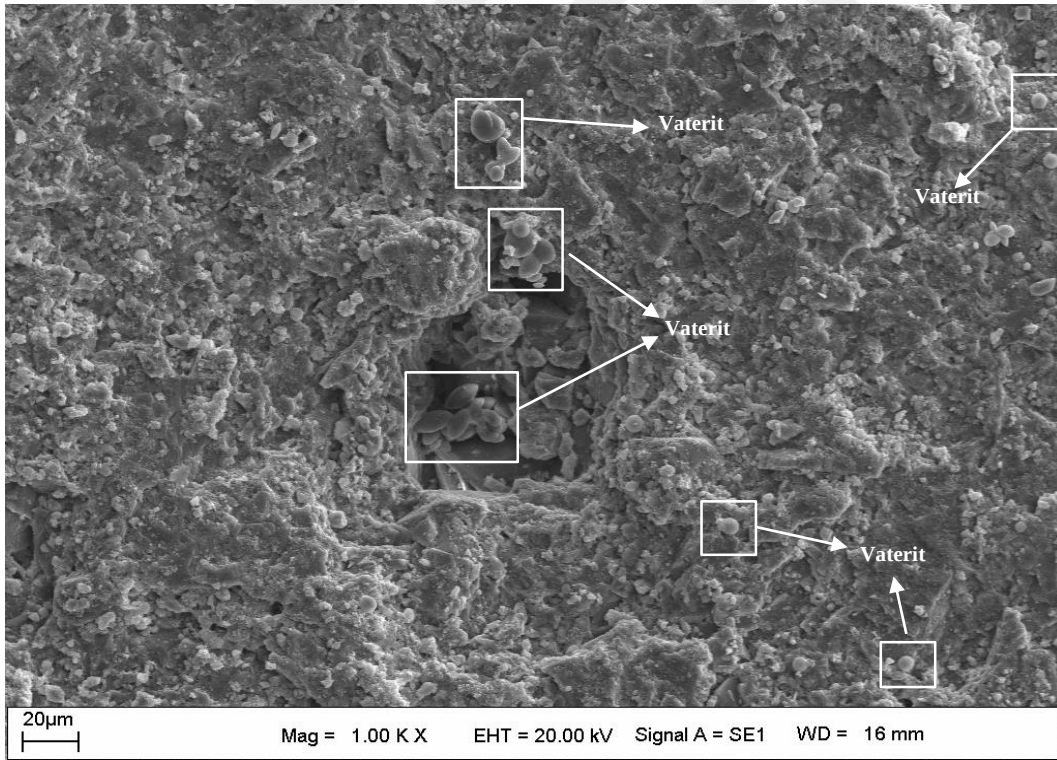
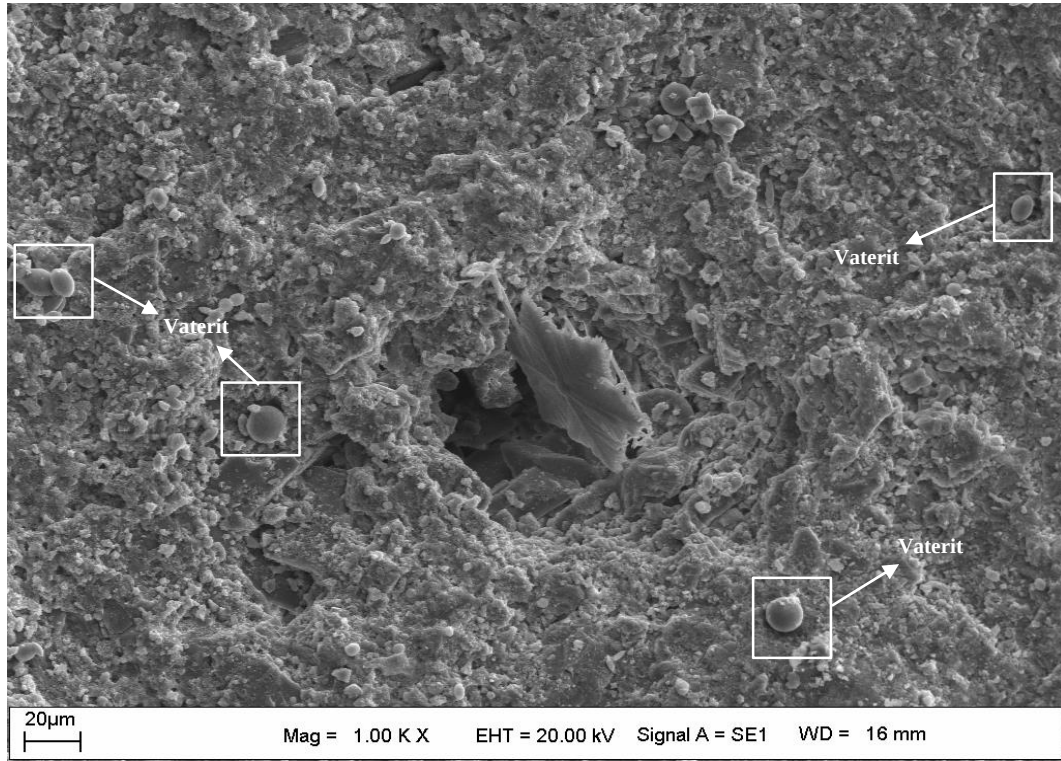


Şekil 4.23: CaCl₂.2H₂O (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmış ve ölü bakteri içeren yüzeylerinde oluşan CaCO₃ kristallerinin SEM-EDX analizi (6. Grup).

Ca(C₂H₃O₂)₂ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 3. Grup ve ölü bakteri bulunan 5. grup numunelerin SEM görüntülerinde mikroskopik görüntülere paralel olarak daha az yoğunlukta CaCO₃ kristallerine rastlanmıştır (Şekil 4.24). Gözlenen CaCO₃ kristalleri aragonit ve vaterit yapılarıdır. Ölü bakteri hücresi uygulamalarında sadece vaterit kristalleri görülmüştür (Şekil 4.25). *Bacillus sp.* CR2 suşu ile kalsiyum kaynakları olarak kalsiyum klorür, kalsiyum oksit, kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat kullanılan çalışmalarda XRD, SEM ve FTIR analizleri sonucunda tüm ortamlarda belirgin kalsit kristalleri, kalsiyum asetat ortamında ise kalsit kristallerine ilaveten daha az oranlarda vaterit ve aragonit kristalleri olduğu saptanmıştır (Achal ve Pan, 2014). Başka bir çalışmada *Sporocarcina pasteurii* ATCC 6453 farklı kalsiyum karbonat kaynakları ile hazırlanan biyojenik sıva örneklerinde, kalsiyum nitrat ve klorür ile iyileştirme yapılan sıva örneklerinde kalsit, kalsiyum asetat ile hazırlanan sıva örneklerinde ise aragonit ile vaterite rastlanmıştır (Zhang vd., 2014). Ca(C₂H₃O₂)₂ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri bulunan 3. Grup mermer örneklerinde sadece az miktarda aragonit kristal formlarına rastlanırken mikro gözeneklerin iyileştirilmesinin erken safhada olduğu görülmektedir.



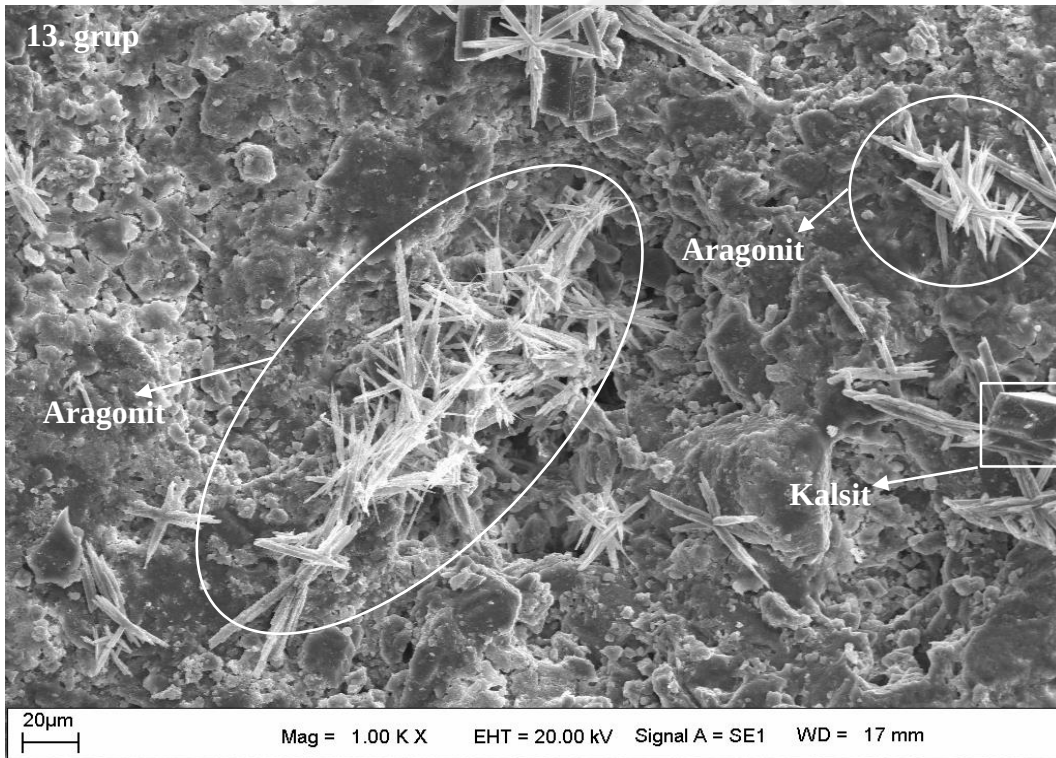
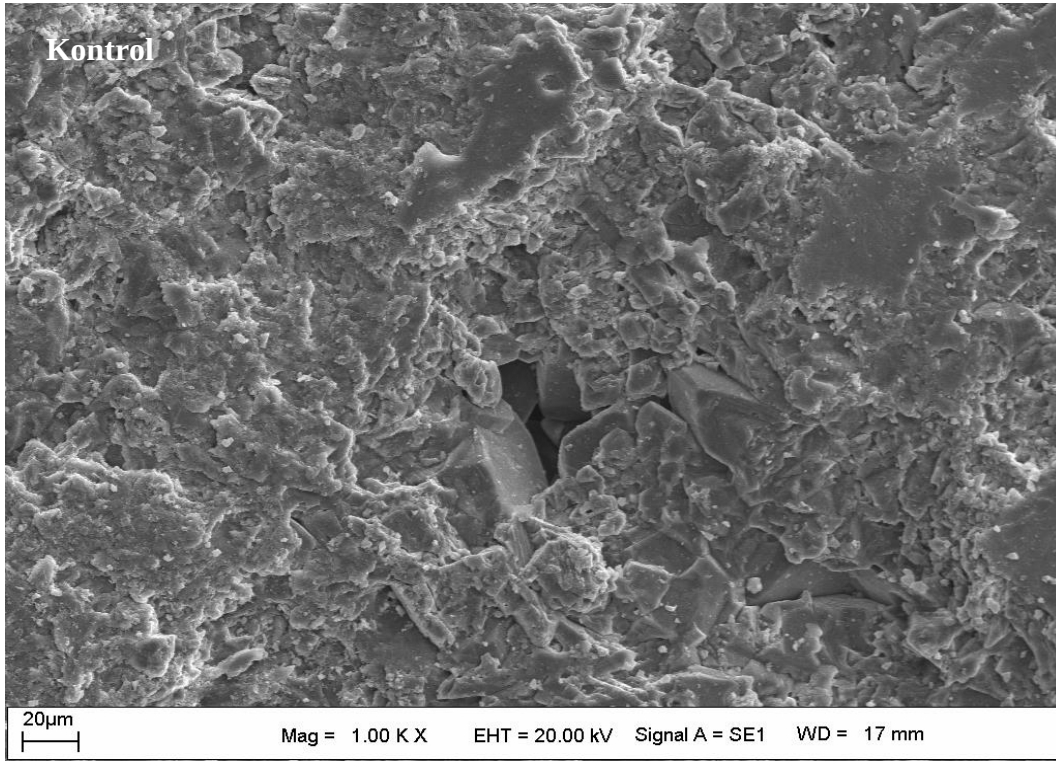
Şekil 4.24: Karbonlanmış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin ve $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, canlı bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (3. grup, A; Aragonit).



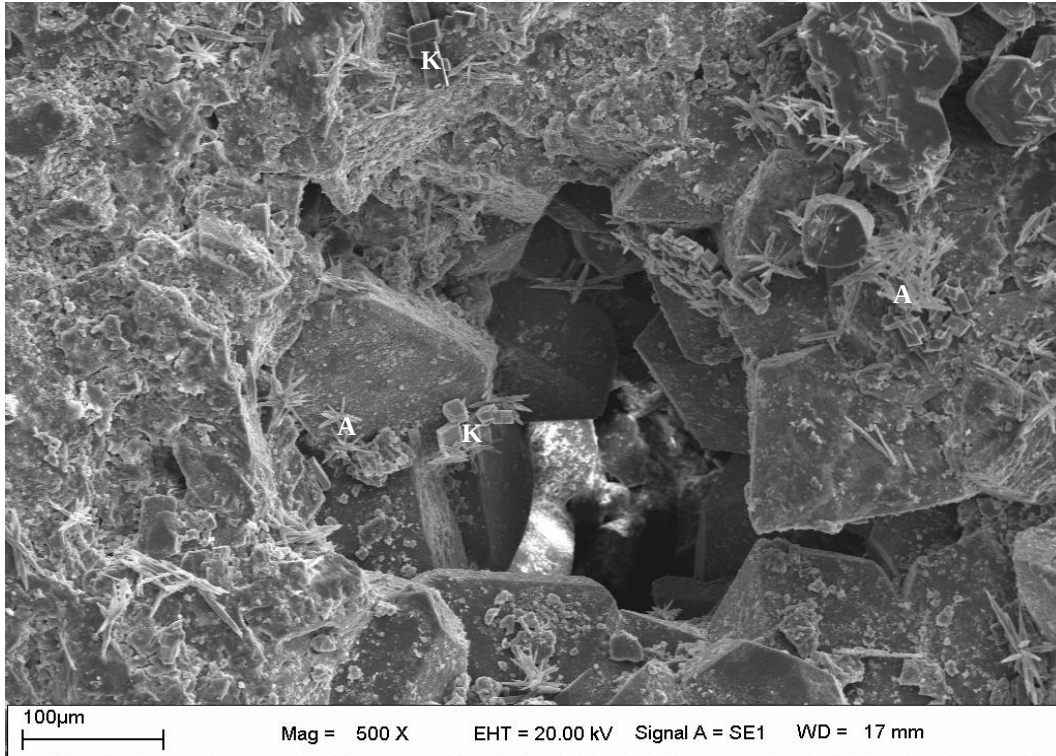
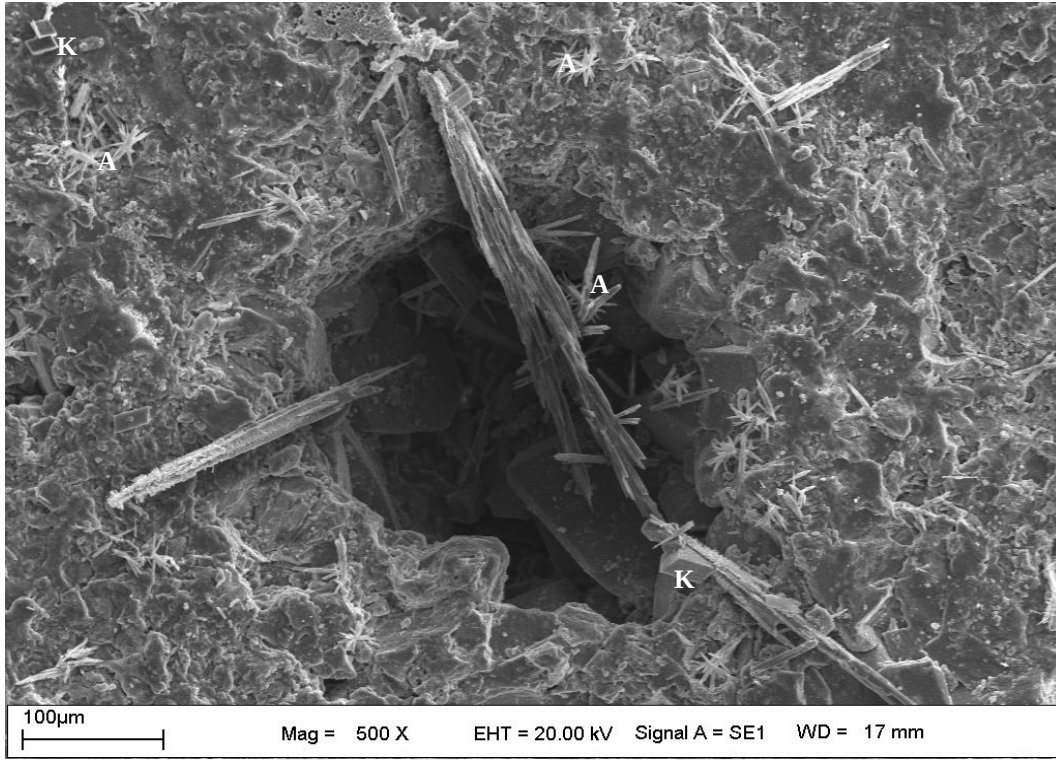
Şekil 4.25: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (5. grup, V; vaterit).

4.3.2 Karbonlanmamış mermer numunelerinin SEM görüntüleri, EDX ve mapping analiz sonuçları

Karbonlanmamış, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyeri ortamına canlı bakteri inokule edildiği mermer örneklerinde mikro/makroskobik incelemelerde CaCO_3 polimorflarına ait görüntüler saptanmamıştır. Aynı şekilde SEM görüntülemelerinde de CaCO_3 polimorflarına ait bulgulara rastlanmamıştır. Fakat ölü hücre ile muamele edilen mermer örneklerinde SEM görüntülerinde CaCO_3 polimorfik yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27). Karbonlanmamış, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyeri ortamında canlı hücrelerin ürettiği CaCO_3 polimorfik yapılarının olmamasından dolayı 13. Grup (ölü bakteri içeren) verilerini karbonlanmış canlı (4. Grup) ve ölü (6. Grup) hücre uygulamaları ile kıyaslanmıştır. Canlı hücre içeren gruplara göre daha fazla iğnemsî yapıda aragonit yapılar görülmüştür. Tespit edilen aragonit yapıların boyutları tek olarak daha küçüktür. Aragonitlerin boyutları yaklaşık 20 μm büyüklüğündedir.

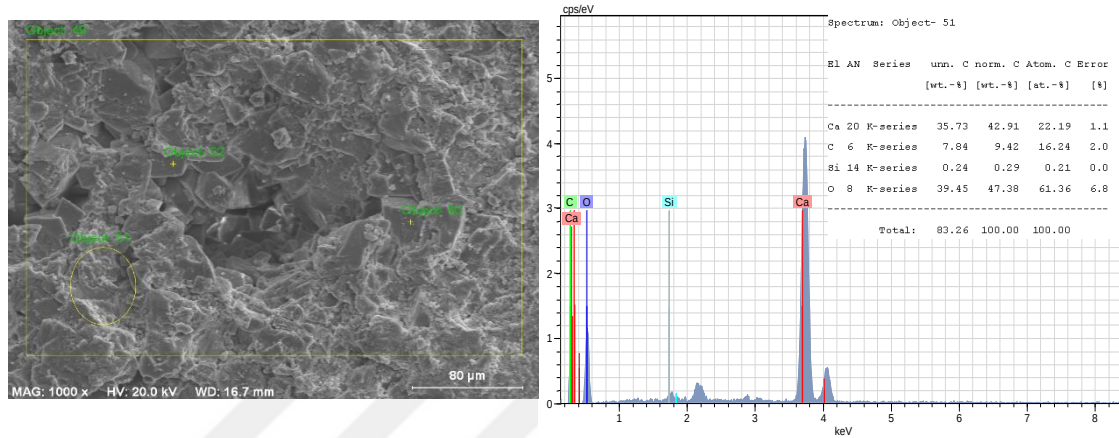


Şekil 4.26: Karbonlanmamış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilmiş, karbonlanmamış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (13. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).



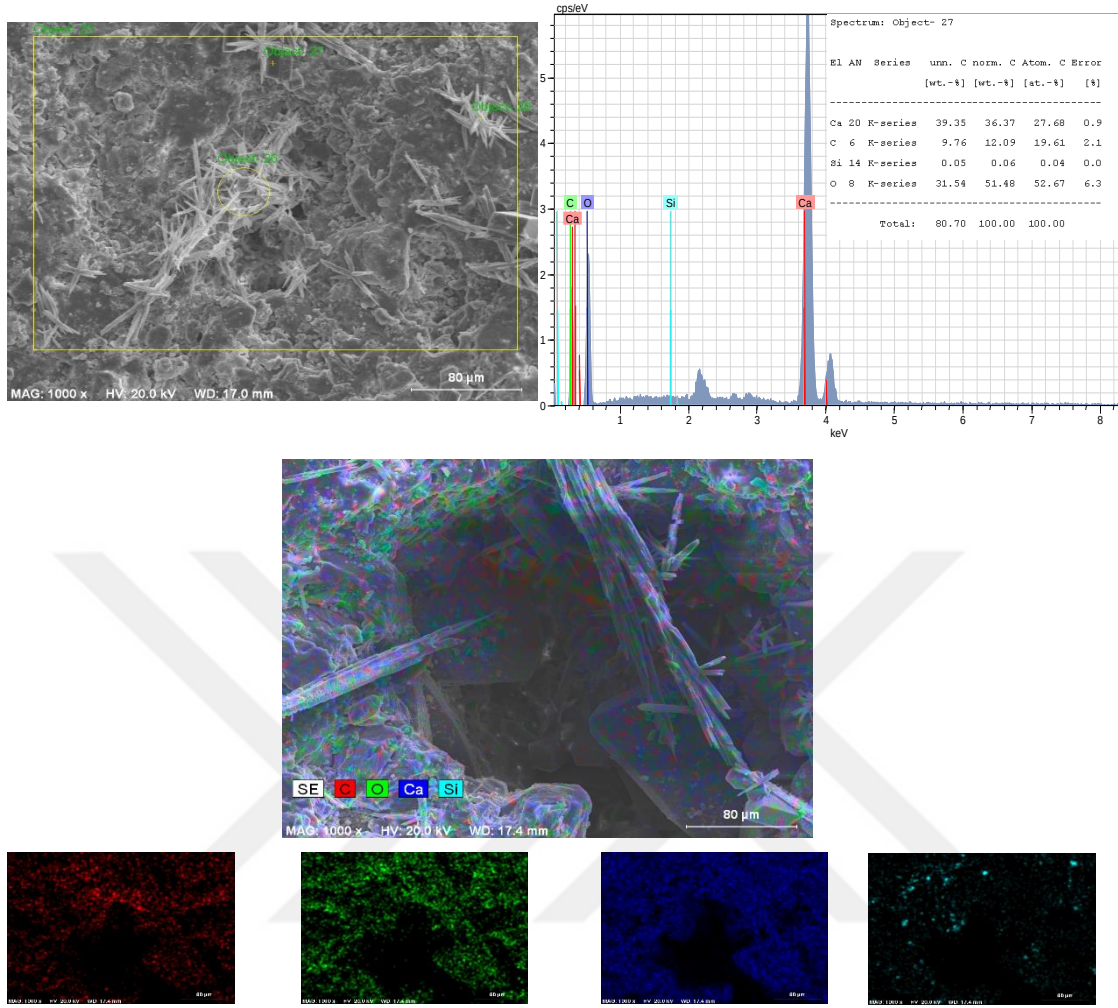
Şekil 4.27: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinde oluşan CaCO_3 kristallerinin SEM görüntüleri (13. grup, K; Kalsit, A; Aragonit).

Karbonlanmamış kontrol grubunun SEM-EDX elementer taraması yapıp çıkan değerler tablo ile gösterilmiştir. Bu taramada CaCO_3 varlığını kanıtlamak için kalsiyum (Ca), oksijen (O), karbon (C) elementleri ile bakteri, silisyum (Si) elementi ile de yapının mermer olup olmadığı araştırılmıştır. Taranan bölgede kalsiyum karbonat olduğu düşünülen görüntünün spektrumu ve hesaplama tablosunda Şekil 4.28’de verilmiştir. Bu değerlerin kontrol grubunda CaCO_3 çökmesinin olmadığını mermerin kendi yapısı olduğunu göstermektedir. C miktarı karbonlanmış kontrol numunelerine göre daha azdır.



Şekil 4.28: Karbonlanmamış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin SEM-EDX analizi (14. Grup, Kontrol).

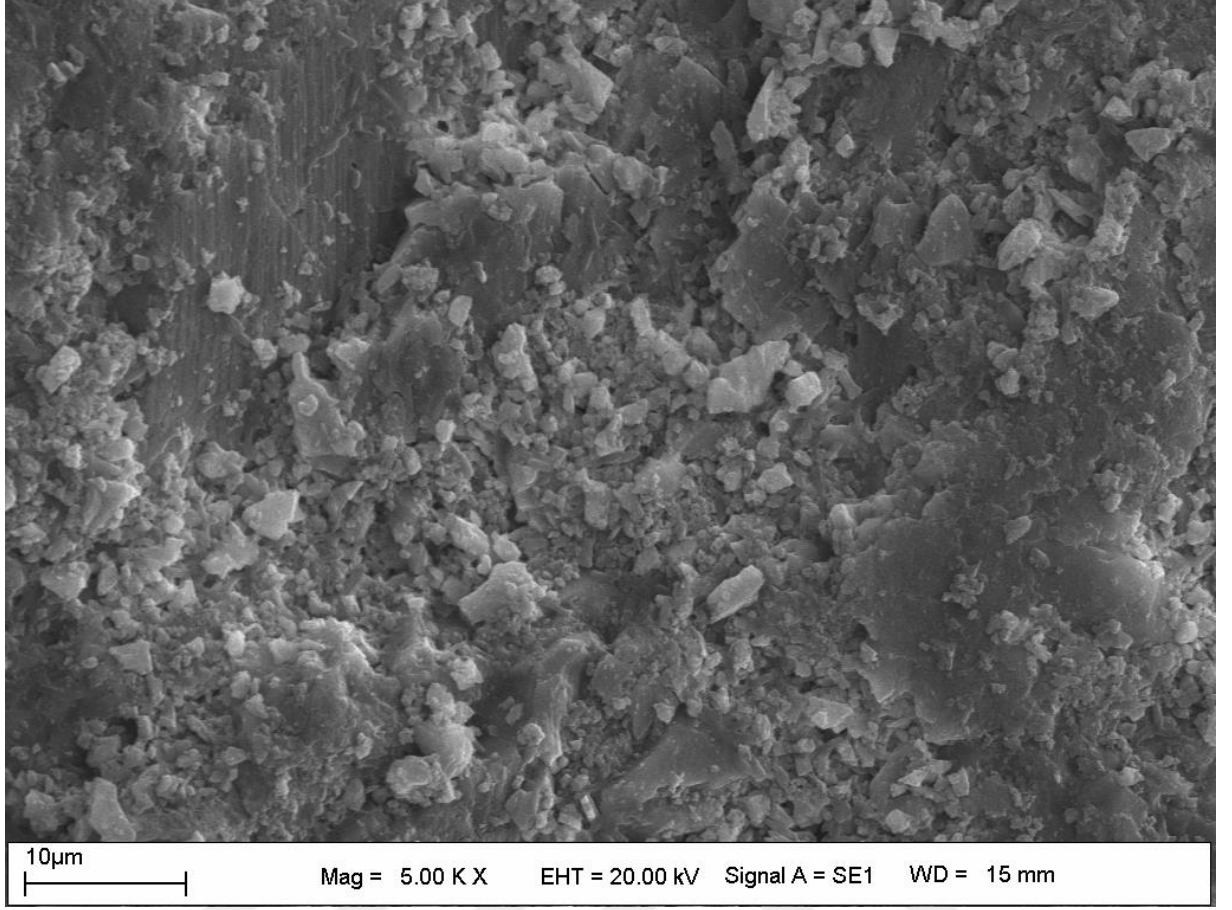
Karbonlanmamış kalsiyum klorürlü besiyerinde bulunan ölü bakteri uygulanan mermer numunesinin SEM-EDX ile elementer hesaplaması ve mapping haritalaması gerçekleştirilmiştir. Ca, O, C elementlerinin spektrumda piklerinin yüksek olması ortamda CaCO_3 olduğunu göstermektedir. Mapping haritalamada da bu elementlerin yoğun bir şekilde görülmesi bu teoriyi desteklemektedir (Şekil 4.29). Literatürde yapılan benzer çalışmalarda da bu elementlerin olduğu görülmüştür. İsar (2020) yaptığı çalışmada Ca, O, C ve N elementlerinin ortamda bulunması ile biyokalsit’in olduğunu açıklamıştır. Polat (2019) yaptığı çalışmada C, O, Na, Al, Si, K, Ca ve Ti element yapılarına göre ortamda CaCO_3 ’ın olduğunu ifade etmiştir.



Şekil 4.29: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaU besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış ve ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM-EDX analizi (13. grup).

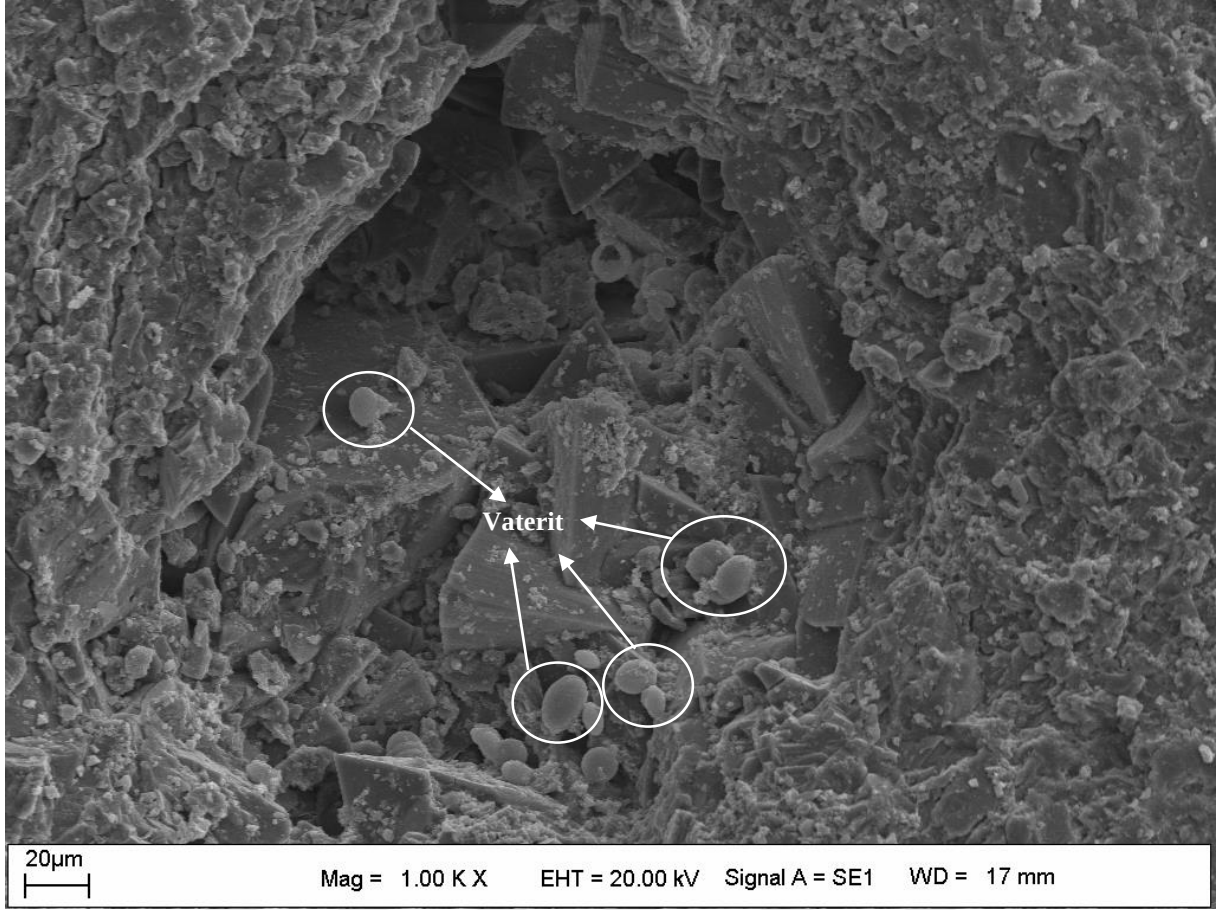
CaCO_3 kristalleri olduğu düşünülen yapı üzerinde (Şekil 4.29) EDX mapping (haritalama) yöntemi ile elementer tarama gerçekleştirilmiştir. Bu taramada CaCO_3 varlığının yarı kantitatif olarak kanıtlanması için C, O, Ca ve Si elementeri aranmıştır. Taranan bölgede CaCO_3 olduğu düşünülen yapının üzerindeki Ca, C ve O elementi temsil eden sırasıyla mavi, kırmızı ve yeşil renk kümeleri tüm alanı kaplamaktadır. Hedef elementlerin EDX spektrogramında pik oluşturması, ölü bakteri tarafından kalsiyum karbonat kristallerinin üretimini destekleyici niteliktedir.

$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış canlı bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM görüntülemelerinde belirgin CaCO_3 kristallerine rastlanmamıştır. Yüzeyde, mermer yüzeyine benzer amorf yapılar görülmüştür (Şekil 4.30).

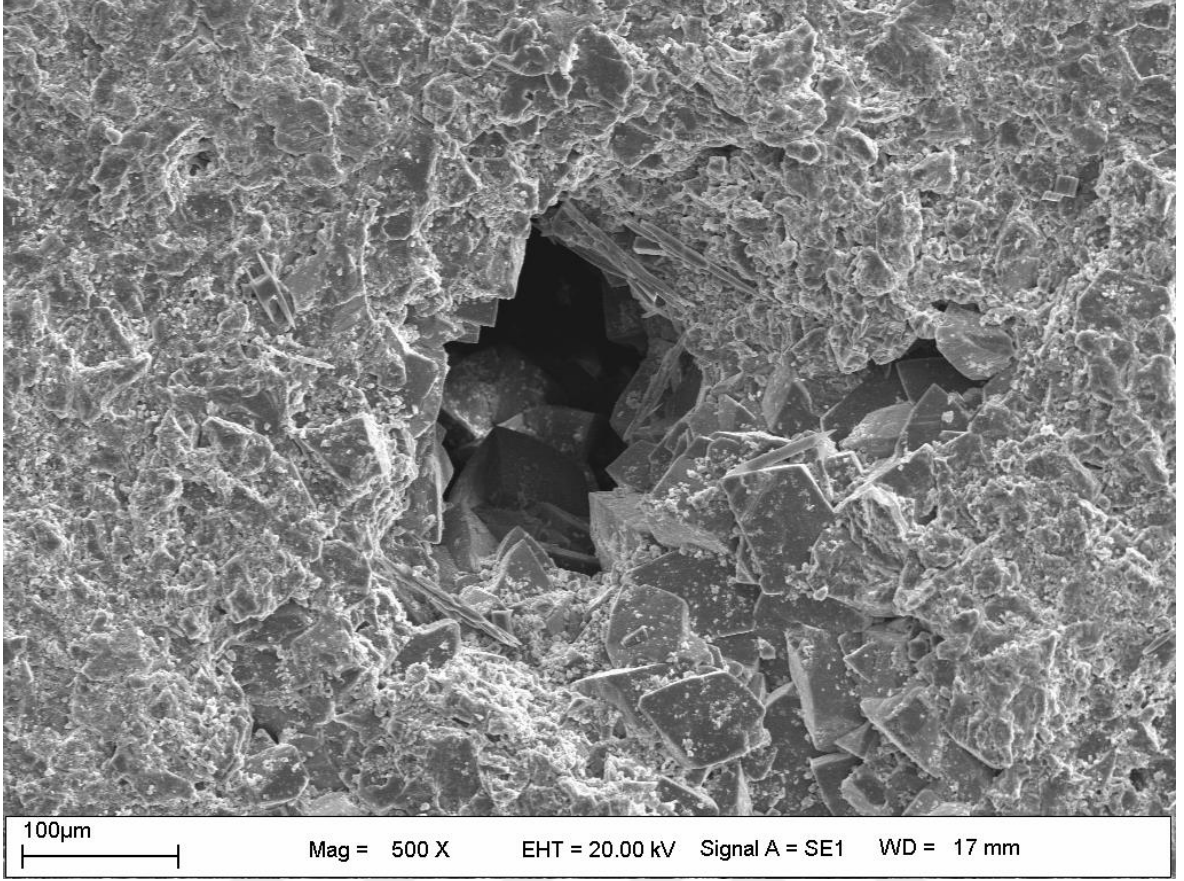


Şekil 4.30: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış canlı bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM analizi (10. grup).

$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM görüntülemelerinde sadece vaterit kristallerine rastlanmıştır (Şekil 4.31). Vaterit, bir ara faz olup çok nadir gözlenmektedir. Ancak biyokalsifikasyon ile bu ara faz çok rahat bir şekilde çöktürebilmektedir (Mann, 2001). Kalsiyum asetat marul benzeri beyaz lameller şeklinde vateriti indüklerken kalsiyum laktat ve kalsiyum glukonat küresel formda vaterit oluşturmaktadır (Tai ve Chen, 1998). Literatürün aksine kalsiyum asetat bulunan ortamlarda ölü *B. subtilis* hücreleri küresel formda vaterit oluşumunu sağlamıştır.

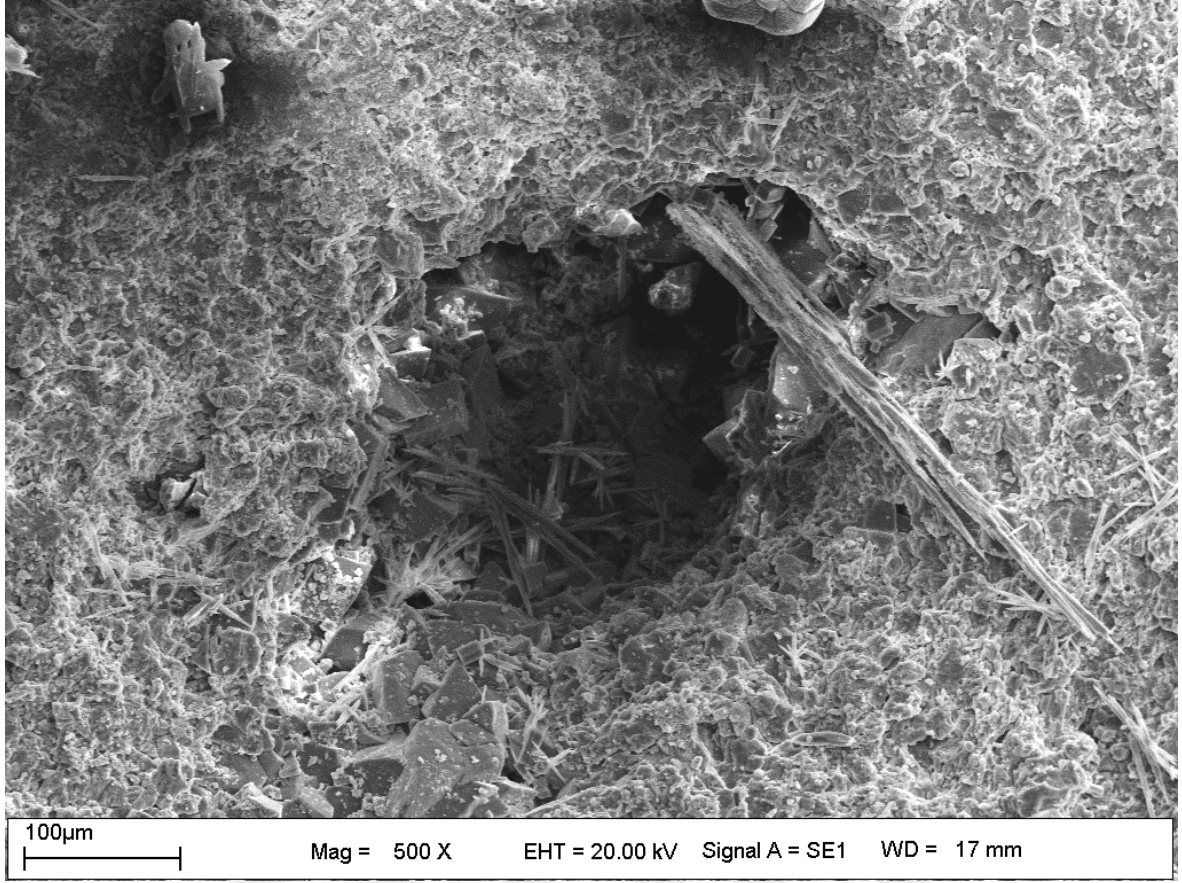


Şekil 4.31: $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (6 gr/L) içeren CAGMÜ besiyerinde bekletilen, karbonlanmamış ölü bakteri içeren mermer yüzeylerinin SEM analizi (12. Grup).



Şekil 4.32: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen karbonlanmış ve bakteri içermeyen mermer yüzeylerinin SEM görüntüsü (2. grup).

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren $\text{Ca}\ddot{\text{U}}$ besiyerinde bekletilen karbonlanmış ve bakteri içermeyen mermer yüzeylerinin SEM görüntüsünde aragonit kristal yapılarına rastlanmıştır. CaCO_3 kristal yapılarının, canlı bakteri ve ölü bakteri bulunan mermer numunelerinin yüzeyine göre bakteri içermeyen mermer numunelerinin yüzeyinde daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.32). Bakteri bulunan mermer numunelerin, yüzeyleri ve makro/mikro gözeneklerinin dolduğu yapılan analizlerle tespit edilmiştir.



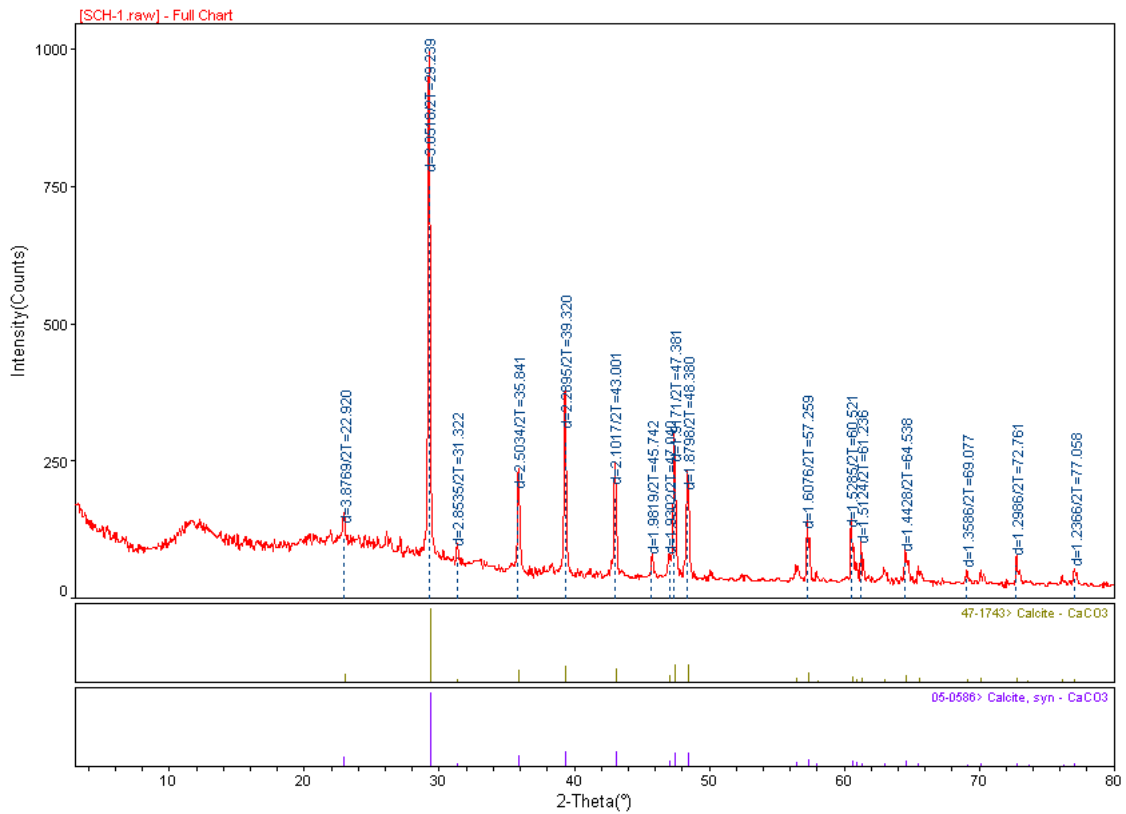
Şekil 4.33: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen karbonlanmamış ve bakteri içermeyen mermer yüzeylerinin SEM görüntüsü (9. grup).

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen karbonlanmamış ve bakteri içermeyen mermer yüzeylerinin SEM görüntüsünde az miktarda oluşumlara rastlanmaktadır. Oluşan CaCO_3 kristallerinin yapı olarak daha çok aragonit olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.33).

Oluşan kristalleşmelerin meydana gelmesi aktif çekirdeklenme reaksiyonu ile açıklanabilmektedir. Buradaki mekanizma canlı hücre ile yapılan amonifikasyon sonucu oluşturulan HCO_3^- üretiminden kaynaklanan CaCO_3 oluşumundan ziyade katyonların adsorpsiyonunu ve ardından CO_3^{2-} veya HCO_3^- (Schultze-Lam and Beveridge, 1994; Schultze-Lam vd., 1996; Stocks-Fischer vd., 1999; Warren vd., 2001) çekiciliğini destekleyen net elektronegatif yük veren kimyasal olarak heterojen makromoleküller nedeniyle bakteri hücre yüzeylerinin çekirdeklenme substratları olarak kullanılmasıyla oluşmaktadır. Bu işlem aktif çekirdeklenme olarak literatürde yer almaktadır (Schultze-Lam ve Beveridge, 1994; Bosak ve Newman, 2003; Van Lith vd., 2003).

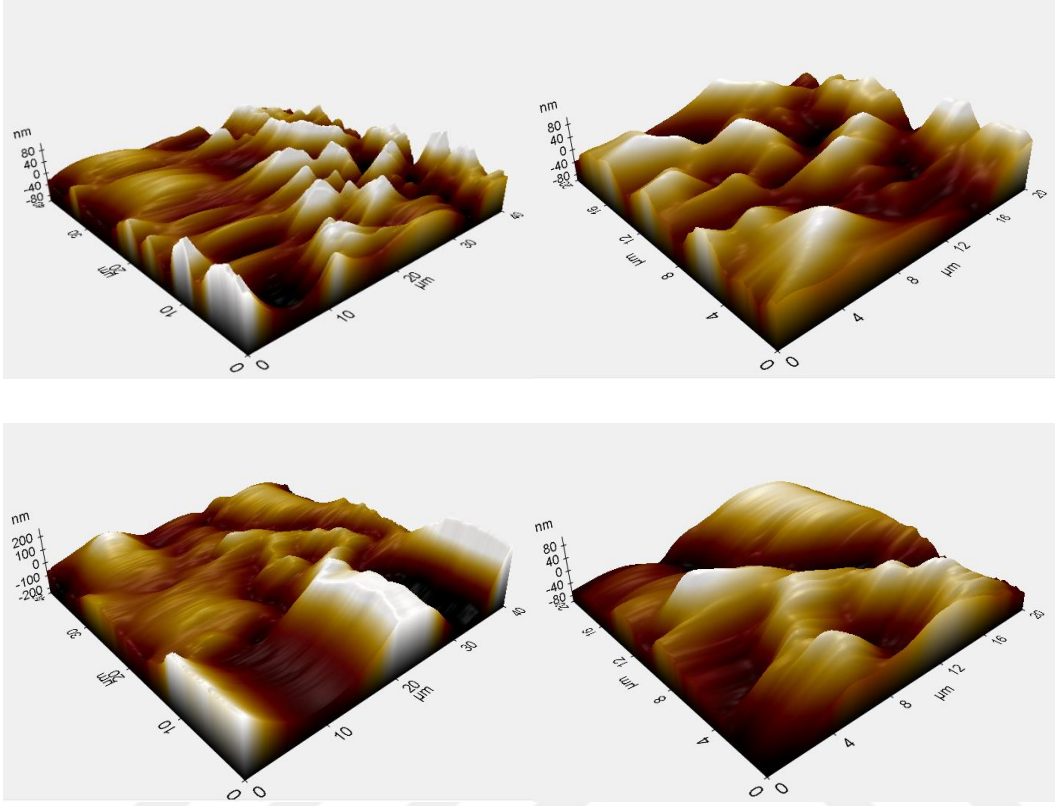
4.4 XRD Analiz Sonuçları

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin XRD sonuçlarında kalsit görülmüştür. Yapılan SEM görüntülemelerinde kalsit ve aragonit yapıları görülmektedir. Aragonit yarı kararlı bir polimorf olduğu için zamanla kararlı polimorf olan kalsite dönüşmektedir. XRD grafiğinde oluşan pikler gösterilmiştir (Şekil 4.34). Sıcaklık ve yaşlandırma süresi polimorf oluşumunu etkilemiştir. Her bir çekirdeğin üzerine bindirilmiş aragonit büyüme birimlerinin kararlılığı, kalsitinkinden daha düşüktür. Kalsit büyüme birimlerinin rekabeti aragonitten daha küçük olduğundan, aragonitin çekirdeklenmesi önceliğe sahiptir. Küçük boyutu nedeniyle aragonit çekirdeklenmesi başladığında çekirdeklerin kaybolmasının itici gücü, çekirdek büyümesinin minimum itici kuvvetinden daha azdır, bu nedenle çekirdekler büyüebilir (Ramakrishna vd., 2016).



Şekil 4.34: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilmiş ve karbonlanmış mermerin makro gözeneklerinden alınan CaCO_3 kristallerinin XRD analizindeki piklerini gösteren grafik (4. Grup).

4.5 AFM Analiz Sonuçları



Şekil 4.35: Karbonlanmış kontrol grubuna ait mermer yüzeylerinin (7.grup, üstte) ve CaCl₂.2H₂O (60 gr/L) içeren CaÜ besiyerinde bekletilen ve karbonlanmış mermer yüzeylerinde canlı bakteri (4. Grup, altta) tarafından üretilen CaCO₃ kristallerinin AFM analiz sonuçları.

Mermer yüzeylerinin dört farklı noktasından alınan ölçüm sonuçlarına göre, mermerin porozite yüksekliği kontrol grubunda $35.00 \pm 7.07 \mu\text{m}$ iken örnek grubunda $22.50 \pm 8.20 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Bakteriyel kalsifikasyon sonucu mermerlerin porlarının CaCO₃ ile doldurulması, yüzeyi daha pürüzsüz hale getirmiştir (Şekil 4.35). Sonuç olarak yaptığımız çalışmada mermer yüzeyinde ve makro/mikro gözeneklerde CaCO₃ kristallerine rastlanmıştır. Bunu yapılan stereo mikroskop ve SEM görüntülerinde, EDX-Mapping, XRD analizlerinde de görmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde mermer birçok yerde kullanılmaktadır. Mermerin niteliğinden dolayı kullanıldığı yapılarda çevre koşullarına ve iklim şartlarına bağlı olarak hasarlar meydana gelmektedir. Özellikle asit yağmurları daha fazla hasar oluşturmaktadır. Mermerin ana bileşiği olan kalsiyum karbonatın (CaCO_3) sudaki çözünme oranı azdır. Ancak asit yağmurları sonucu ortaya çıkan asitler, CaCO_3 'ı kimyasal reaksiyonla yıkayarak çözünebilir tuzlara çevirebilirler. Yıkama sonucunda malzeme kaybı nedeniyle yapıların yüzeylerinde delikler oluşmakta, aşınma ve renk değişimi meydana gelmektedir. Dış ortamlarda bekletilen tarihi eser niteliğindeki mermer yapı ve binaların bu aşınmalardan korunması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenlerden dolayı iyileştirilecek yüzey olarak mermer yüzeyleri tercih edilmiştir.

Mineralizasyon, biyolojik ve kimyasal şekilde doğada kendiliğinden gerçekleşen organik yapıların kendilerini oluşturan inorganik yapılara dönüşmesi olayıdır. Mineraller hücre içinde ya da üzerinde belirli bir alanda sadece biyolojik olarak kontrol edilen mineralizasyon şeklinde belirli koşullarda sentezlenir (Reddy, 2013). Biyomineralizasyon ise, mikroorganizmalar aracılığıyla minerallerin çökeltilmesi ve yapılarının değişmesi işlemidir. Kalsiyum karbonatın bakteriyel kalsifikasyonu, çözülmüş karbon konsantrasyonu, kalsiyum iyonlarının kaynağı, bakteri türü, bakterinin canlı veya ölü oluşu ve çekirdeklenme bölgelerinin varlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bakterinin hücre duvarı bir çekirdeklenme bölgesi olarak işlev görmektedir. Biyolojik mineralizasyonu artırmak için mermer yüzeyleri işlem öncesinde CO_2 gazına maruz bırakılmıştır. Karbonlama işlemi biyomineralizasyonu tetikleyerek karbonlama yapılmayan kontrol grubuna göre biyokalsifikasyonu artırmıştır.

Üreolitik-odaklı CaCO_3 oluşumu biyolojik iyileştirme işlemlerinde tercih edilmeye başlanmıştır. Kalsiyum karbonatın daha çok üreolitik bakteriler tarafından oluşumunun yüksek olduğu birçok çalışmada tespit edilmiştir. Çalışmamızda tercih ettiğimiz bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633, üreaz enzimi içeren bir bakteri olduğundan üre içeren ortamlarda biyomineralizasyonu gerçekleştirebilmiştir. Biyomineralizasyonun gerçekleştiği mermer yüzeylerindeki mikro/makro gözenekler, oluşan CaCO_3 kristali ile kısmi olarak

doldurulabilmiştir. Üç aylık bekleme süresinde alınan bu sonuçlar sonrasında örnek numuneleri aynı bekleme koşullarında bekletilmeye devam edilmiştir. İleriki dönemlerde mikro/makro gözeneklerin tamamıyla dolması beklenmektedir.

Canlı bakteri hücrelerinin pasif nükleasyonla gerçekleştirdikleri kalsifikasyon işlemlerinde kalsit ve aragonit kalsiyum kristalleri oluşturulurken, aktif nükleasyonla kalsifikasyon yapan ölü hücreler genellikle aragonit ve vaterit kristalleri oluşumuna neden olmuşlardır. Literatürde ölü hücrelerin biyomineralizasyon işlemlerinde kullanımıyla ilgili sınırlı veri bulunmaktadır. Bu çalışmalarda da ölü hücre kullanılan ortamlarda olumlu sonuçlar alınamamıştır. Çalışmamızda *B. subtilis*'in hem canlı hem de ölü formuyla biyokalsifikasyon işlemleri, uygulanan yöntemlerle ve tercih edilen besiyerleri ile başarıyla gerçekleştirilebilmiştir.

Kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum klorür ve kalsiyum asetat biyokalsifikasyonda farklı tipte kalsiyum karbonat kristallerinin oluşumuna neden olmuştur. Kalsiyum klorür kullanılan ortamlarda kalsit ve aragonit kristaller oluşturulurken kalsiyum asetat kullanılan besiyerlerinde daha çok vaterit oluşumu sağlanmıştır.

Mermer yüzeylerindeki makro gözeneklerde ve amorf şekillerde kalsit formlarının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SEM görüntülerinden anlaşıldığı kadarıyla kristalleşen yapıların, XRD analizi ile kalsiyum kalsit polimorfları olduğu sonucuna da varılmıştır. Mermerden yüzeylerinin hem makro hem mikro hem de SEM görüntülemeleri sonucunda sadece biyomineralizasyonun gerçekleştiği bölgelerdeki yapıların kalsiyum kalsit kristallerinin olduğunun tespit edilmesi oldukça önemlidir. Böylece literatüre katkı sağlanabilecektir.

Çapları 3-5 mm olan makro gözenekler kısmen, çapları 0.02-0.03 mm olan mikrogözenekler ise tamamen kalsiyum kristalleri ile doldurulmuştur. Böylece mermer yüzeylerinde yer alan doğal boşluklar doldurulabilmiştir. Mermer yüzeylerindeki aşınmalar sonucunda oluşabilecek makro/mikro çatlaklar da bu yöntemle iyileştirilebilecektir. Mermer yüzeylerindeki makro çatlaklar için yapılan mevcut restorasyon işlemleri, mikro çatlaklara ulaşamayabilmektedir. Fakat bakteri inokulasyonu ile gerçekleşecek olan biyokalsifikasyonla mermerin mikro çatlaklarına da ulaşılacağı düşünülmektedir.

Çizelge 5.1: Uygulama sonrası mermer numunelerinden elde edilen genel sonuçlar.

Bakteri	CO ₂ uygulanması var					CO ₂ uygulanması yok			
	CAÜ			CaAsetatGMÜ		CAÜ		CaAsetatGMÜ	
	Kristal Boyutu (µm)	Kristal tipi	İyileştirme Boyutu (mm)	Kristal Boyutu (µm)	Kristal tipi	Kristal Boyutu (µm)	Kristal tipi	Kristal Boyutu (µm)	Kristal tipi
Canlı	20-100	Kalsilt Aragonit	0.214 (çap) 0.059 (çap) 0.033x0.062 (alan) 0.031x0.066 (alan) 3x5 mm (alan)	10-20	Aragonit	—	—	—	—
Ölü	10-20	Kalsilt Aragonit	0.036 (çap)	1-10	Vaterit	10-20	Kalsit Aragonit	1-10	Vaterit

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi karbonlanmış ve karbonlanmamış mermer numunelerinin canlı bakteri uygulaması sonucunda mermer yüzeyinin, makro/mikro gözeneklerin CaCO₃ kristalleri ile dolduğu görülmektedir. Ölü bakteri uygulanan mermer numunelerinin yüzey ve makro/mikro gözeneklerinin de kısmen dolduğu yapılan ölçümlerle anlaşılmıştır. Ölçüm sonuçlarında, canlı bakteri uygulanan ve karbonlanmış mermer örneklerinde bakterinin boyutunun daha büyük olduğu, doldurulan alanın daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Achal, V., & Pan, X.** (2014). Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(1), 307-317.
- Adigüzel, M., & Şengüler, M.** (2019). Türkiye Mermer Sektörünün ve Mermer Gücünün İncelenmesi, *Üçüncü Sektör Sosyal Ekonomi Dergisi*, 54(3), 1530-1546.
- Akyol, E., Bozkaya, Ö., & Dogan, N. M.** (2017). Strengthening sandy soils by microbial methods. *Arabian Journal of Geosciences*, 10(15), 1-8.
- Al Omari, M. M. H., Rashid, I. S., Qinna, N. A., Jaber, A. M., & Badwan, A. A.** (2016). Chapter Two—Calcium Carbonate. İçinde H. G. Brittain (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (C. 41, ss. 31-132). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.11.003>
- Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J., & So, J.-S.** (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus*, 5(1), 1-26.
- Anitha, V., Abinaya, K., Prakash, S., Seshagiri Rao, A., & Vanavil, B.** (2018). *Bacillus cereus* KLUVAA mediated biocement production using hard water and urea. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 32(2), 257-266.
- Atashafrazeh, M.** (2018). *Viridibacillus Arenosii ve Bacillus Pasteurii Bakterilerinin Kendi Kendini Onaran Beton Dayanımına Etkisi*. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Erzurum.
- Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R., & Bang, S. S.** (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 171-181. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00393-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00393-5)
- Baglioni, P., Chelazzi, D., Giorgi, R., & Poggi, G.** (2013). Colloid and materials science for the conservation of cultural heritage: cleaning, consolidation, and deacidification, *Langmuir*, 29: 5110–5122.
- Bang, S. S., Galinat, J. K., & Ramakrishnan, V.** (2001). Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and microbial technology*, 28(4-5), 404-409.

- Bosak, T., & Newman, D. K.** (2003). Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology*, 31(7), 577-580.
- Bozbeyoğlu, N. N., Sensoy Candogan, T., Arslan, Ş., Kabalay, B., Bozkaya, Ö., Akyol, E., & Mercan Doğan, N.** (2020). Calcium carbonate precipitation by urease and carbonic anhydrase. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 26(3),
- Braissant, O., Cailleau, G., Dupraz, C., & Verrecchia, E.P.** (2003). Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *J Sediment Res* 73:485–490.
- Bundur, Z. B., Kirisits, M. J., & Ferron, R. D.** (2015). Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength. *Cement and Concrete Research*, 67, 237-245.
- BY-Ashish, K.** (t.y.). Self Healing Concrete-A Sustainable Future, B. E. Civil Engineering G.H.R.C.E.M., PUNE.
- Candoğan, T. Ş.** (2015). *Üreolitik bakteriler ile kalsiyum karbonat mineralizasyonu ve zemin iyileştirmede kullanımı* [Master's Thesis]. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., & Balagurusamy, N.** (2019). Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. *Frontiers in Materials*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmats.2019.00126>
- Chahal, N., Siddique, R., & Rajor, A.** (2012). Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete. *Construction and Building Materials*, 28(1), 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2011.07.042>
- Chang, R., Kim, S., Lee, S., Choi, S., Kim, M., & Park, Y.** (2017). Calcium Carbonate Precipitation for CO₂ Storage and Utilization: A Review of the Carbonate Crystallization and Polymorphism. *Frontiers in Energy Research*, 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenrg.2017.00017>

- Chaparro-Acuña, S. P., Becerra-Jiménez, M. L., Martínez-Zambrano, J. J., & Rojas-Sarmiento, H. A.** (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: Mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*, 67(2), 277-288.
- Chunxiang, Q., Jianyun, W., Ruixing, W., & Liang, C.** (2009). Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO₃ by *Bacillus pasteurii*. *Materials Science and Engineering: C*, 29(4), 1273-1280. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.025>
- Colao, F., Fantoni, R., Lazic, V., Morone, A., Santagata, A., & Giardini, A.** (2004). LIBS used as a diagnostic tool during the laser cleaning of ancient marble from Mediterranean areas. *Applied Physics A*, 79(2), 213-219.
- Çetinkaya, A.** (2021). Üreolitik Bakterilerin Araştırılması ve Biyobeton. Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Demirci, B. F.** (2019). Mimari Tasarımda Biyoişbirlikçi Bir Yaklaşım Olarak Bakteriyel Biyokalsifikasyonun Kullanımı Üzerine Bir İnceleme. Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- De Muynck, W., Cox, K., Belie, N. D., & Verstraete, W.** (2008). Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, 22(5), 875-885. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011>
- De Muynck, W., De Belie, N., & Verstraete, W.** (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological engineering*, 36(2), 118-136.
- DeJong, J. T., Fritzges, M. B., & Nüsslein, K.** (2006). Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering*, 132(11), 1381-1392.
- Demirci, B. F.** (2019). *Mimari tasarımda biyoişbirlikçi bir yaklaşım olarak bakteriyel biyokalsifikasyonun kullanımı üzerine bir inceleme* [Master's Thesis]. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A.** (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in microbiology*, 4, 314.

- Ercan, M., Koltka, S., & Sabah, E.** (2018). Mermer Artıklarından Öğütülmüş Kalsiyum Karbonat (Gcc) Üretimi: Yaş Ve Kuru Öğütme Ürünlerinin Karşılaştırılması. *Bilimsel Madencilik Dergisi*, 57(1), 34-43.
- Erem, A. D.** (2012). *Nanokompozit Yapılı Tekstillerin Geliştirilmesi Ve Antimikrobiyal Özellik Kazandırılması* [PhD Thesis]. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ferris, F. G., Thompson, J. B., & Beveridge, T. J.** (1997). Modern freshwater microbialites from Kelly Lake, British Columbia, Canada. *Palaios*, 213-219.
- Ghosh, P., Mandal, S., Chattopadhyay, B. D., & Pal, S.** (2005). Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cement and concrete research*, 35(10), 1980-1983.
- Gorospe, C. M., Han, S. H., Kim, S. G., Park, J. Y., Kang, C. H., Jeong, J. H., & So, J. S.** (2013). Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 18(5), 903-908.
- Hammes, F.** (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in environmental science and biotechnology*, 1(1), 3-7.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., & Siciliano, S. D.** (2003). Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4901-4909.
- Han, Y. S., Hadiko, G., Fuji, M., & Takahashi, M.** (2006). Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH. *Journal of crystal growth*, 289(1), 269-274.
- İsar, A.** (2020). Bakteriyel Biyomineralizasyon ile Mikroyapısal Özellikleri İyileştirilmiş Çimentolu Kompozit Tasarımı. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Jonkers, H. M.** (2011). Bacteria-based self-healing concrete. *Heron*, 56 (1/2).
- Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., & Schlangen, E.** (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological engineering*, 36(2), 230-235.

- Kamennaya, N. A., Ajo-Franklin, C. M., Northen, T., & Jansson, C.** (2012). Cyanobacteria as biocatalysts for carbonate mineralization. *Minerals*, 2(4), 338-364.
- Kart, N. N. B.** (2021). Bakteriyel kalsiyum karbonat mineralizasyonunda üreolitik bakterikil etkileşimi: *Paenibacillus Favisporus* U3. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Denizli.
- Kırboğa Okumuş, S.** (2012). Kalsiyum karbonat (CaCO_3) üretiminde reaksiyon parametrelerinin incelenmesi ve morfolojinin kontrolü. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
- Liu, Q., Liu, Y., Zeng, K., Yang, F., Zhu, H., & Liu, Q.** (2011), Advanced design of Chinese traditional materials for the conservation of historic stone buildings, *J.Archaeol. Sci.* 38:1896–1900.
- Luhar, S., Luhar, I., & Shaikh, F. U. A.** (2022). A Review on the Performance Evaluation of Autonomous Self-Healing Bacterial Concrete: Mechanisms, Strength, Durability, and Microstructural Properties. *Journal of Composites Science*, 6(1), 23.
- Mann, S.** (2001). *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. New York: Oxford.
- Mateescu, C. D., Sarbu, C., Isopescu, R., Dumitrescu, O., & Ghica, D.** (2011). Sonocrystallization of calcium carbonate metastable polymorphs in alcoholic solutions as reaction media. *18th International Symposium on Industrial Crystallization*, 4.
- Moropoulou, A., Zendri, E., Ortiz, P., Delegou, E. T., Ntoutsis, I., Balliana, E., Becerra, J., & Ortiz, R.** (2019). Scanning Microscopy Techniques as an Assessment Tool of Materials and Interventions for the Protection of Built Cultural Heritage. *Scanning*, 2019, 5376214. <https://doi.org/10.1155/2019/5376214>.
- Naidu, S., Blair, J., & Scherer, G. W.** (2016). Acid-resistant coatings on marble, *J. Am. Ceram. Soc.*, 99(10): 3421–3428.
- Polat, B.** (2019). Geopolimer harcın mikro organizmalar yardımıyla kendiliğinden iyileşmesinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.

- Ramakrishna, C., Thenepalli, T., & Ahn, J.W.** (2017). A Brief review of Aragonite Precipitated Calcium Carbonate (PCC) Synthesis Methods and Its Applications. *Korean Chemical Engineering Research*, 55(4), 443-455. <https://doi.org/10.9713/KCER.2017.55.4.443>
- Ramakrishna, C., Thenepalli, T., Huh, J. H., & Ahn, J. W.** (2016). Preparation of needle like aragonite precipitated calcium carbonate (PCC) from dolomite by carbonation method. *Journal of the Korean Ceramic Society*, 53(1), 7-12.
- Reddy, M. S.** (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00314>
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K., & Gonzalez-Munoz, M. T.** (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2182-2193.
- Schultze-Lam, S., & Beveridge, T. J.** (1994). Physicochemical characteristics of the mineral-forming S-layer from the cyanobacterium *Synechococcus* strain GL24. *Canadian journal of microbiology*, 40(3), 216-223.
- Schultze-Lam, S., Fortin, D., Davis, B. S., & Beveridge, T. J.** (1996). Mineralization of bacterial surfaces. *Chemical Geology*, 132(1-4), 171-181.
- Seifan, M., Samani, A. K., & Berenjian, A.** (2016). Induced calcium carbonate precipitation using *Bacillus* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(23), 9895-9906.
- Shirakawa, M. A., John, V. M., De Belie, N., Alves, J. V., Pinto, J. B., & Gaylarde, C. C.** (2015). Susceptibility of biocalcite-modified fiber cement to biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 215-220.
- Siddique, R., & Chahal, N. K.** (2011). Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Construction and building materials*, 25(10), 3791-3801.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., & Bang, S. S.** (1999). Microbiological precipitation of CaCO_3 . *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563-1571. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6)

- Sumathi, A., Murali, G., Gowdhaman, D., Amran, M., Fediuk, R., Vatin, N. I., Deeba Laxme, R., & Gowsika, T. S.** (2020). Development of bacterium for crack healing and improving properties of concrete under wet-dry and full-wet curing. *Sustainability*, 12(24), 10346.
- ŠEvčík, R., ŠAšek, P., & Viani, A.** (2017). Physical and nanomechanical properties of the synthetic anhydrous crystalline CaCO_3 polymorphs: vaterite, aragonite and calcite. *Journal of Materials Science*, 53(6), 4022–4033. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1884-x>.
- Tai, C. Y., & Chen, F. B.** (1998). Polymorphism of CaCO_3 , precipitated in a constant-composition environment. *AIChE Journal*, 44(8), 1790-1798.
- Tepe, M.** (2021). Üreolitik Bakteri *Bacillus Amylolyquefaciens* U17 İle Kalsiyum Karbonat Çökeli mi Ve Betonun Fiziksel Özelliklerine Etkisi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Denizli.
- Tourney, J., & Ngwenya, B. T.** (2009). Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO_3 morphology and polymorphism. *Chemical Geology*, 262(3-4), 138-146.
- Van Lith, Y., Warthmann, R., Vasconcelos, C., & McKenzie, J. A.** (2003). Microbial fossilization in carbonate sediments: a result of the bacterial surface involvement in dolomite precipitation. *Sedimentology*, 50(2), 237-245.
- Wang, J., & Becker, U.** (2009). Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO_3). *American Mineralogist*, 94(2-3), 380-386.
- Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W., & De Belie, N.** (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cement and concrete research*, 56, 139-152.
- Warren, L. A., Maurice, P. A., Parmar, N., & Ferris, F. G.** (2001). Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal*, 18(1), 93-115.
- Wei, H., Shen, Q., Zhao, Y., Wang, D.-J., & Xu, D.-F.** (2003). Influence of polyvinylpyrrolidone on the precipitation of calcium carbonate and on the transformation of vaterite to calcite. *Journal of Crystal Growth*, 250(3-4), 516-524.

- Whiffin, V. S.** (2004). Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement [Phd, Murdoch University]. İçinde *Whiffin, Victoria S.* <[https://researchrepository.murdoch.edu.au/view/author/Whiffin, Victoria.html](https://researchrepository.murdoch.edu.au/view/author/Whiffin,Victoria.html)> (2004) *Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement.* PhD thesis, Murdoch University. <https://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/399/>
- Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A., & Harkes, M. P.** (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417-423.
- Wiktor, V., & Jonkers, H. M.** (2011). Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, 33(7), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012>
- Yıldırım, N., Gürtuğ, Y., & Sesal, C.** (2016). Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşum mekanizmaları ve uygulama alanları. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 28(2), 70-80.
- Zhang, Y., Guo, H. X., & Cheng, X. H.** (2014). Influences of calcium sources on microbially induced carbonate precipitation in porous media. *Materials Research Innovations*, 18(sup2), S2-79.
- Zhang, Y., Guo, H. X., & Cheng, X. H.** (2015). Role of calcium sources in the strength and microstructure of microbial mortar. *Construction and Building Materials*, 77, 160-167.
- Zhong, M., Liu, B., Zhang, L., Wang, J., Chen, J., Li, J., Liu, Y., & Ming, L.** (2022). Experimental Study on Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation to Enhance Reservoir Recovery. *Iranian Journal of Biotechnology*, 20(1), 46-55.

İNTERNET KAYNAKÇASI

Aragonit. (t.y). https://tr.pinterest.com/pin/731342426970458922/?send=true_ adresinden 25 Mart 2022 tarihinde erişildi.

Efes Antik Kenti. (t.y). <https://www.ensaz.com/tr/turkiyenin-en-populer-20-tarihi-eseri> adresinden 5 Haziran 2022 tarihinde erişildi.

Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi. (2018, 22 Temmuz). Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM). <https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/65/taramali-elektron-mikroskobu-sem>

Kalsit. (t.y). https://tradevalley.com/tr/product/kalsit_17470 adresinden 25 Mart 2022 tarihinde erişildi.

Karınca Tepesi. (t.y). <https://www.muhammedinur.com/photos/picture.php?/18523> adresinden 30 Nisan 2022 tarihinde erişildi.

Kireçtaşı Mağarası. (t.y). https://www.tripadvisor.com.tr/ShowUserReviews-g297961-d2287097-r418134654-Dim_Cave-Alanya_Turkish_Mediterranean_Coast.html adresinden 30 Nisan 2022 tarihinde erişildi.

Nemrut Dağı. (t.y). <https://tr.pinterest.com/pin/355714070571962011/> adresinden 5 Haziran 2022 tarihinde erişildi.

Vaterit. (t.y). <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaterite-sea12a.jpg> adresinden 25 Mart 2022 tarihinde erişildi.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Türkan DAL BİÇER

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2008-2012 İnönü Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu
Ebelik Bölümü
- **Lisans** : 2015-2019 İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
- **Yüksek Lisans** : İnönü Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji

MESLEKİ DENEYİM:

- [2014-2015] Ergani Devlet Hastanesi (Ebe)
- [2015-2021] Malatya Devlet Hastanesi (Ebe)
- [2021-2022] Fırat Aile Sağlığı Merkezi (Ebe)