T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

GEOPOLİMER HARCIN MAĞARA BAKTERİLERİ KULLANILARAK KENDİ KENDİNE İYİLEŞTİRİLMESİ

Yağmur AVCI

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Mücteba UYSAL

Ocak, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 4.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Orhan CANPOLAT
Yıldız Teknik Üniversitesi
İnşaat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 37445 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Bilgi birikimi ve deneyimlerini aktararak birçok şey öğrenmemi sağlayan, üzerimde emekleri bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR'e, sayın Prof. Dr. Mücteba UYSAL'a, karşılaştığım sorunlarda yanımda olan, çoğu laboratuvar bilgilerimin referansı değerli Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya, yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI ve Doç. Dr. Elif BOZÇAL DAĞDEVİREN'e, desteğini her zaman hissettiren anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Her anlamda destek ve yardımını esirgemeyen, çözümleriyle beni çıkmazlardan kurtaran Arş. Gör. Gülnihan SELİM ve Elif KANSIZ'a, deneylerimde yardım eden Eda ÖZALTUN, Gizem BATTAL, Jale Nil GÜRSOY, Aleyna AYDIN, Merve Dilek TÜRKGENCİ, Nahdhoit Ahamada RACHID'e, inşaat deneylerimde beni yalnız bırakmayan ve destek olan Ramazan CİNGİ'ye, desteklerinden dolayı Züleyha YILMAZ ve tüm Gensenta Mikrobiyoloji ekibine, her zaman yanımda olan ve motivasyonumun düşmesine izin vermeyen tüm dostlarıma,

Tökezlediğim her anımda beni çabucak ayağa kaldıran, elinden gelen tüm yardımıyla yanımda olan, her sorunumu basitleştiren sevgili Aziz Semih Sözdinler'e,

Beni ben yapan her zerremde izi bulunan, ilk ve en büyük destekçim olan anneme, sevgili kardeşim Görkem'e, babama, bana kötü olan her şeyi unutturan kedim Duman'a çok teşekkür ediyorum.

Son olarak tezimi, sevgili dayım Cengiz MALAY'a ithaf ediyorum.

Ocak 2023 Yağmur AVCI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xii**
SUMMARY ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. MICP İLE KALSİYUM KARBONAT ÇÖKELME MEKANİZMALARI 3
2.1.1. Üre Hidrolizi 3
2.1.2. Denitrifikasyon 4
2.1.3. Amonifikasyon 5
2.1.4. Fotosentez 5
2.1.5. Sülfat İndirgenmesi 6
2.1.6. Metan Oksidasyonu 6
2.2. MİKROBİYAL KALSİYUM KARBONAT ÇÖKELMESİNİN BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM ALANLARI 7
2.2.1. Ağır Metallerin Giderilmesi 7
2.2.2. CO_2 Sekestrasyonu 8
2.2.3. Kalsiyum Bakımından Zengin Endüstriyel Atıklardan Kalsiyum Uzaklaştırılması 9
2.2.4. İnşaat Malzemelerinin İyileştirilmesi 10
3. MALZEME VE YÖNTEM **14**
3.1. MAĞARA İZOLATLARININ TÜRLERİ VE KODLARI 14
3.2. BAKTERİLERİN ÇOĞALTILMASI 17
3.3. BAKTERİLERİN $CACO_3$ KRİSTALİ ÇÖKELTME KABİLİYETLERİNİN TESPİT EDİLMESİ 17
3.4. BAKTERİLERİN NİTRAT İNDİRGEME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ 18
3.5. BAKTERİLERİN NİTRİT İNDİRGEME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ 19
3.6. BAKTERİLERİN ORGANİK NİTROJENİ AMONYAĞA AYRIŞTIRMA YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ 20

3.7. BAKTERİLERİN ÜREAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ 21
3.8. BAKTERİLERDE *NAPA* VE *UREC* GEN BÖLGELERİNİN ARAŞTIRILMASI 22
3.8.1. *napA* Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması 22
3.8.2. *ureC* Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması 22
3.8.3. *napA* ve *ureC* PZR Ürünlerinin Elektroforezi 23
3.9. GEOPOLİMER HARCIN MAĞARA BAKTERİLERİYLE İYİLEŞTİRİLMESİ 24
3.9.1. Yüksek Dayanımlı Serilerin Belirlenmesi 26
3.9.1.1. Harç Üretimi 26
3.9.1.2. Eğilme Dayanımı Deneyi 27
3.9.1.3. Basınç Dayanımı Deneyi 28
3.9.2. Bakteri İçeren Geopolimer Harç Serilerinin Üretimi 28
3.9.2.1. Bakteri Üretimi 28
3.9.2.2. Beton Serilerinin Üretimi 29
3.9.2.3. Su Emme Deneyi 30
3.9.3. Bakteri İçermeyen Geopolimer Harcın Bakterilerle İyileştirilmesi 31
3.9.3.1. Beton Üretimi 31
3.9.3.2. Betonlara Çatlak Oluşturulması 31
3.9.3.3. Betonların Çatlak Boyutlarının Ölçülmesi 32
3.9.3.4. Betonların Çatlak İyileştirilmesi İçin Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması 33
3.9.3.5. Betonların Çatlak İyileştirilmesinin Görüntülenmesi 33
3.9.3.6. Betonların Su Emme ve Eğilme Dayanımı Deneyleri 33
3.9.3.7. Beton Çatlaklarının SEM ve EDS Analizleri 33
3.10. BESİYERLERİ VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI 33
3.10.1. Reasoner's 2 Agar (R2A) 33
3.10.2. B-4 Agar 34
3.10.3. Chiristensen Üre Agar (UAB) 35
3.10.4. Amonifikasyon Agar 35
3.10.5. Nitrat İndirgeme Sıvı Besiyeri 36
3.10.6. Nitrit İndirgeme Agar 36
3.10.7. NH_4-YE Besiyeri (ATCC Besiyeri 1376) 37
3.10.8. 10x TBE 37
3.10.9. 1x TBE 37
3.10.10. %1,2'lik Agaroz 37

3.10.11. Reaktif A ve Reaktif B 37
3.10.12. Kalsiyum Laktat Çözeltisi 38
4. BULGULAR 39
4.1. BAKTERİLERİN $CACO_3$ KRİSTALİ ÇÖKELTME KABİLİYETLERİNİN TESPİT EDİLMESİ 39
4.2. BAKTERİLERİN ÜREAZ AKTİVİTELERİNİN VE *UREC* GEN BÖLGESİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ 39
4.3. BAKTERİLERİN NİTRAT-NİTRİT İNDİRGEME YETENEKLERİNİN VE *NAPA* GEN BÖLGESİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ 39
4.4. BAKTERİLERİN ORGANİK NİTROJENİ AMONYAĞA AYRIŞTIRMA YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ 40
4.2. GEOPOLİMER HARCIN MAĞARA BAKTERİLERİYLE İYİLEŞTİRİLMESİ 46
4.2.1. Yüksek Dayanımlı Serilerin Belirlenmesi 46
4.2.1.1. Basınç Dayanımları 46
4.2.1.2. Eğilme Dayanımları 46
4.2.2. Bakteri İçeren Gepolimer Harç Serilerinin Dayanımları 47
4.2.2.1. Basınç Dayanımları 47
4.2.2.2. Eğilme Dayanımı 48
4.2.2.3. Ağırlıkça Su Emme 49
4.2.3. Bakteri İçermeyen Geopolimer Harcın Bakterilerle İyileştirilmesi 50
4.2.3.1. Betonların Çatlak Boyutlarının Ölçülmesi 50
4.2.3.2. Betonların Çatlak İyileştirilmesinin Görüntülenmesi ve İyileşme Süreleri 50
4.2.3.3. Su Emme ve Eğilme Dayanımı Deneyleri 53
4.2.3.4. İyileşme Sonrası Numune Çatlaklarına Ait SEM-EDS Analizleri 54
5.TARTIŞMA VE SONUÇ 63
KAYNAKLAR 73
EKLER 81
ÖZGEÇMİŞ 82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: MICP ile ağır metal ile kontamine olmuş topraktan ağır metal uzaklaştırılması diyagramı (Han ve diğ., 2020).....8

Şekil 2.2: Enkapsülasyon ile kendi kendini iyileşme şeması (Dinarvand ve Rashno, 2022).....12

Şekil 3.1: İzolatların B-4 besiyerinde oluşturduğu $CaCO_3$ kristalleri (4x büyütme).....17

Şekil 3.2: İzolatlara ait nitrat indirgeme örnekleri.....19

Şekil 3.3: İzolatlara ait nitrit indirgeme örnekleri. 20

Şekil 3.4: İzolatlara ait organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma örnekleri.....21

Şekil 3.5: İzolatlara ait üreaz aktivite örnekleri.....21

Şekil 3.6: *napA* genine ait PZR ürünlerinin UV altında elektroforez görüntüleri. Ec: *Escherichia coli* (pozitif kontrol), Nk: Negatif kontrol.....23

Şekil 3.7: *ureC* genine ait PZR ürünlerinin UV altında elektroforez görüntüleri. SP: *Sporosarcina pasteurii* (pozitif kontrol), NK: Negatif kontrol. 24

Şekil 3.8: Geopolimer harcın iyileştirilme metotları.....25

Şekil 3.9: Beton serilerine ait malzemeler. A: Cüruf, B: Uçucu kül, C: Kum, D: Metakaolin.....27

Şekil 3.10: Basınç dayanımı deneyi. 28

Şekil 3.11: 24 saat sonunda kalıplardan çıkarılan numuneler. 30

Şekil 3.12: Su emme deneyi. 30

Şekil 3.13: Eğilme dayanımı cihazıyla çatlak oluşturulması.....32

Şekil 3.14: Oluşturulan çatlağın mikroskop görüntüsü (x40 büyütme).....32

Şekil 4.1: C14'e ait SEM görüntüleri. A: 20000x B: 10000x 55

Şekil 4.2: C14'e ait EDS analizi.....55

Şekil 4.3: C15'e ait SEM görüntüleri. A: 10000x B: 20000x 56

Şekil 4.4: C15'e ait EDS analizi.....56

Şekil 4.5: C17'ye ait SEM görüntüleri. A: 10000x B: 5000x 57

Şekil 4.6: C17'ye ait EDS analizi. 57
Şekil 4.7: D25'e ait SEM görüntüleri. A: 5000x B: 10000x 58
Şekil 4.8: D25'e ait EDS analizi 58
Şekil 4.9: B12'ye ait SEM görüntüleri. A: 5000x B: 10000x 59
Şekil 4.10: B12'ye ait EDS analizi. 59
Şekil 4.11: SP'ye ait SEM görüntüleri. A: 20000x B: 10000x 60
Şekil 4.12: SP'ye ait EDS analizi. 60
Şekil 4.13: K8'e ait SEM görüntüleri. A: 10000x B: 5000x 61
Şekil 4.14: K8'e ait EDS analizi 61
Şekil 4.15: K10'a ait SEM görüntüleri. A: 5000x B: 10000x 62
Şekil 4.16: K10'a ait EDS analizi 62

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Dupnisa Mağarası'ndan izole edimiş bakterilerin filogenetik olarak ilişkili olduğu bakteri türleri ve izole edildikleri yerler. 14

Tablo 3.2: Numunelerin karışım oranları. 26

Tablo 4.1: Bakterilerin $CaCO_3$ kristali oluşturma, üreaz, nitrat-nitrit indirgeme, organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yetenekleri ve *napA* ile *ureC* varlığı (+++: Güçlü, ++: İyi, +: Orta, +-: Zayıf,-:Negatif). 41

Tablo 4.2: 7 farklı içeriğe sahip numunelerin basınç dayanımı sonuçları. 46

Tablo 4.3: 7 farklı içeriğe sahip numunelerin eğilme dayanımı sonuçları. 47

Tablo 4.4: 75M25 ve C serilerine ait basınç dayanımları. 48

Tablo 4.5: 75M25 ve C serilerine ait eğilme dayanımları. 48

Tablo 4.6: 75M25 ve C serilerine ait ağırlıkça su emme yüzdeleri. 49

Tablo 4.7: Numunelere ait çatlak genişlikleri. 50

Tablo 4.8: Numunelerin çatlak iyileşme süreleri. 51

Tablo 4.9: Bakterilerle iyileştirilen çatlaklara ait numunelerin su emme yüzdeleri. 53

Tablo 4.10: Bakterilerle iyileştirilen çatlaklara ait numunelerin eğilme dayanımları. 53

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

°C **: Santigrat**

Kısaltmalar **Açıklama**

bp : Baz çifti
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
DNA : Deoksiribo nükleik asit
g : Gram
HCl : Hidroklorik asit
ml : Mililitre
L : Litre
M : Molar
mM : Milimolar
MICP : Mikrobiyal olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökelmesi
pH : Potansiyel hidrojen
PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu
TBE : Tris borat EDTA
UV : Ultraviyole
SP : *Sporosarcina pasteurii*

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GEOPOLİMER HARCIN MAĞARA BAKTERİLERİ KULLANILARAK KENDİ KENDİNE İYİLEŞTİRİLMESİ

Yağmur AVCI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

II. Danışman : Prof. Dr. Mücteba UYSAL

Mikroorganizmaların ekosistemlerde önemli rolleri ve etkileri vardır. Bulundukları ekosistemin değişimi ve oluşumunda metabolik aktiviteleri ile etkili olurlar. Ekstrem ortamlar arasında bulunan mağaralardaki mikroorganizmalar da çevrelerini biyomineralizasyon gibi çeşitli süreçlerle etkilerler. Mikrobiyal olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökelmesi (MICP) biyomineralizayonun baskın örneğidir. Üre hidrolizi, denitrifikasyon, amonifikasyon, sülfat indirgenmesi gibi çeşitli yolaklarla gerçekleşmektedir. MICP mekanizmalarından yararlanarak betonların kendi kendine iyileştirilmesi gerçekleştirilmektedir.

Dupnisa Mağarası'ndan izole edilen bakterilerdeki amonifikasyon, nitrit-nitrat indirgeme ve üre hidrolizinde metabolik fenotip sergileyip sergilemedikleri ve üre hidrolizi (*ureC*) ile nitrat indirgeme (*napA*) yolaklarına ait genlerin varlığını belirlemek amaçlanmıştır. Bakteriler metabolik fenotip ve *ureC* ile *napA* genlerine sahip olma durumlarına göre seçilmiştir. Kendi kendini iyileştirme için iki metot uygulanmıştır. İlkinde iki farklı içerikli seriler (%75 metakaolin+%25 cüruf ve %100 cüruf) metakaoline emdirilmiş bakteriler eklenerek üretilmiş ve basınç-eğilme dayanımlarıyla su emme oranları belirlenmiştir. İkinci metotta iki farklı içerikli seriden biri (%75 metakaolin+%25 cüruf) bakteri ilavesi olmadan üretilmiştir Çatlak oluşturulduktan sonra *Rhodococcus erythropolis* ile 49 günde, *Achromobacter pestifer* ve *Bacillus zhangzhouensis* ile 28 günde çatlak onarımı gerçekleştirilmiştir Çalışmamız kapsamında 63 günde çatlak onarımını tamamlayan *Sporosarcina pasteurii* bakterisine kıyasla

21 günde onarımı tamamlayan daha önce kullanılmamış iki bakteri türü (*Viridibacillus arvi* ve *Streptomyces spororaveus*) literatüre kazandırılmıştır.

Ocak 2023, 97. sayfa.

Anahtar kelimeler: $CaCO_3$ çökelmesi, Mikro-çatlaklar, Kendi kendine iyileşme, Üre hidrolizi, Denitrifikasyon, Biyoteknoloji

SUMMARY

M.Sc. THESIS

SELF-HEALING OF GEOPOLYMER MORTAR USING CAVE BACTERIA

Yağmur AVCI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

Co-Supervisor : Academic Title Mücteba UYSAL

Microorganisms plays a huge role in ecosystems. They are effective in the change and formation of the ecosystem they are in by their metabolic activitiesMicroorganism in caves- which are considered as extreme environments- affect their environment through various processes such as biomineralization. Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) is the predominant example of biomineralization. MICP occurs through various pathways such as urea hydrolysis denitrification, ammonification, and sulfate reduction. Self-healing of concrete is carried out by using MICP mechanisms.

It was aimed to determine whether bacteria isolated from Dupnisa Cave exhibit metabolic phenotype in ammonification, nitrite-nitrate reduction and urea hydrolysis, and the presence of genes belonging to urea hydrolysis (*ureC*) and nitrate reduction (*napA*) pathways. Bacterias were selected according to their metabolic phenotype and *ureC* and *napA* genes. Two methods have been applied for self-healing. In the first, two different content series (75% metakaolin + 25% slag and 100% slag) were produced by adding bacteria impregnated to metakaolin and their compressive-bending strength and water absorption rates were determined. In the second method, one of the two different batches (75% metakaolin + 25% slag) was produced without the addition of bacteria. After crack formation, crack repair was performed with *Rhodococcus*

erythropolis in 49 days, *Achromobacter pestifer* and *Bacillus zhangzhouensis* in 28 days. Within the scope of our study, while *Sporosarcina pasteurii* repaired the crack in 63 days, previously unused two bacteria species (*Viridibacillus arvi* and *Streptomyces spororaveus*) that completed the crack repair in 21 days were brought to the literature.

January 2023, 97 pages.

Keywords: $CaCO_3$ precipitation, Micro-cracks, Self-healing, Urea hydrolysis, Denitrification, Biotechnology

1. GİRİŞ

Ekosistemlerin şekillenmesinde temel olarak biyotik ve abiyotik faktörler etkilidir. Biyotik faktörlerde mikroorganizmaların rolü çok büyüktür. Örneğin mağara ekosistemlerinde bakterilerin çeşitli mineralleri çözerek veya kalsiyum karbonat çökelterek aysütü, dikit, sarkıt gibi mağara oluşumlarının meydana gelmesinde payları bulunmaktadır (Northup ve Lavoie, 2001). Bakterilerin bu paylarının anlaşılabilmesi için özellikle kalsiyum karbonat çökeltme yeteneklerine dair geniş kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Stocks-Fisher ve diğ., 1999; Kandianis ve diğ., 2008; Hammes, 2002). Üre hidrolizi, denitrifikasyon, sülfat indirgenmesi, fotosentez, amonifikasyon gibi çeşitli mekanizmalarla bakterilerin kalsiyum karbonat çökelttikleri belirlenmiştir (Anbu ve diğ., 2016). Son yıllarda çalışmaların odağı, bu mekanizmalar ve bilgiler ışığında kalsiyum karbonat çökeltilmesinin biyoteknolojik olarak kullanılması haline gelmiştir. Doğa ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimden ilham alınarak karbondioksit sekestrasyonu (Okyay ve diğ., 2016), kalsiyum bakımından zengin endüstriyel atıklardan kalsiyum uzaklaştırılması (Czaplicka ve Konopacka-Łyskawa, 2020), ağır metal giderimi (Gomaa, 2018), yapı malzemelerinin kendi kendine iyileştirilmesi (Sierra-Beltran ve diğ., 2014) gibi çeşitli sorunlara çözümler geliştirilmektedir (Seifan ve Berenjian, 2019).

İnsanlığın en büyük ihtiyacı olan barınma için yapı malzemelerinin önemi fazladır. İnşaat sektörü maliyetin ve doğaya verilen zararın en yüksek olduğu sektörlerdendir (Silva ve diğ., 2015). Çimento üretiminden kaynaklanan sera gazları emisyonu nedeniyle çimento içerikli yapı malzemelerinin küresel ısınma ile ilişkili iklim değişikliklerinde payı bulunmaktadır. Geopolimer esaslı harç ve beton çevre dostu olması sebebiyle çimento içerikli yapı malzemelerine alternatif olmaktadır (Meyer, 2009). Çimento ve geopolimer esaslı olması fark etmeksizin beton ve harca en büyük zararı veren ve ömrünü azaltan unsur çatlaklardır (Sharma ve diğ., 2017). Çatlak sorununa alternatif çözüm olarak mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelmesinden yararlanılarak kendi kendine iyileşme uygulanmaktadır ve yalnız çatlak onarımı için değil beton ve harcın dayanımını arttırmak için de tercih edilmektedir. Fakat çalışmaların çoğu üre hidrolizi ile kalsiyum karbonat çökelmesi mekanizmasıyla yapılmaktadır ve *Bacillus* cinsi bakteriler ile *Sporosarcina pasteurii* çalışmaların odağındadır.

Çalışmamız kapsamında Dupnisa Mağarası'ndan izole edilmiş bakterilerin üreaz aktivitesi, nitrat- nitrit indirgeme, amonifikasyon bakımından metabolik fenotip sergileyip sergilemedikleri araştırılmış, üreaz ile nitrat indirgeme yolaklarına ait genlerin varlıkları belirlenmiştir. Ardından genotipik ve fenotipik sonuçları farklı, literatürde daha önce çalışılmamış bakteriler seçilerek geopolimer harcın kendi kendine iyileştirilmesi incelenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

Organizmalar tarafından mineral oluşturulmasına biyomineralizasyon denir. Biyomineralizasyon sonucu karbonat, fosfat, sülfat, arsenat gibi biyomineraller elde edilir. Minerallerin sentezlenmesi prokaryotlarda üç şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar; biyolojik olarak kontrollü mineralizasyon, biyolojik olarak etkilenen mineralizasyon ve biyolojik olarak indüklenmiş mineralizasyondur. Biyolojik olarak kontrollü mineralizasyonda biyominerallerin bileşimi, aktivitesi, çekirdeklenmesi, morfolojisi ve lokalizasyonu mikroorganizmanın metabolik faaliyetleri ile kontrol edilir. Mineral oluşumu sadece belli şartlar altında hücrenin belli kısmında mikroorganizmanın kontrolünde gerçekleşir. Örneğin çökelti ve topraklarda bulunan bazı bakterilerin manyetit kristallerini biyomineralizasyon yoluyla çökeltmesi bu yolakla gerçekleşmektedir. Biyolojik olarak etkilenen mineralizasyon ise hücre dışı polimerik maddelerin çevre ile etkileşime girerek biyomineral oluşturduğu pasif mineralizasyondur. Biyolojik olarak indüklenmiş mineralizasyonda mikroorganizmanın ürettiği metabolik yan ürünlerin çevredeki iyonlarla etkileşime girerek mineral parçacıkların çekirdeklenip büyümesine sebep olan bir süreçtir. Mineral oluşumu mikroorganizma tarafından kontrol edilmez. Bu mekanizmaya en yaygın örnek mikrobiyal olarak kalsiyum karbonat çökelmesidir (Reddy, 2013; Castro-Alonso ve diğ., 2019; Arias ve diğ., 2017; Frankel ve Bazylinski, 2003; Anbu ve diğ., 2016; Bazylinski ve diğ., 2007; Weiner ve Dove, 2003).

Mikrobiyal olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökelmesi (MICP) toprak, karstik mağaralar, deniz çökeltileri gibi doğada çeşitli yerlerde meydana gelen biyojeokimyasal süreçtir. Bu süreç, mikroorganizmanın metabolik ürünleri olan CO_3^{2-} ve HCO_3^- ile ortamda bulunan Ca^{+2} iyonlarının reaksiyona girerek $CaCO_3$ çökeltileri oluşturmasını içerir. Kalsiyumun çözünebilir yapısı çeşitli koşullar altında çözünmez yapıya çevrilmiş olur. Doğada $CaCO_3$ çökeltilerinin oluşması çeşitli mekanizmalar ile gerçekleşir. Bunlar; üre hidrolizi, denitrifikasyon, amonifikasyon, fotosentez, sülfat indirgenmesi ve metan oksidasyonudur (Wang ve diğ., 2021; Bhutange ve Latkar, 2020; Seifan ve Berenjian, 2018; Seifan ve diğ., 2020).

2.1. MICP İLE KALSİYUM KARBONAT ÇÖKELME MEKANİZMALARI

2.1.1. Üre Hidrolizi

Üre hidrolizi ile $CaCO_3$ çökeltilmesi, nispeten en çok uygulanan MICP mekanizmasıdır. Bunun sebebi sürecin kolay ve uygulanabilirliğinin yüksek olmasıdır. Bu mekanizma ile

mikroorganizmanın ürettiği üreaz enzimi üreyi karbondioksit (CO_2) ve amonyağa (NH_3) hidrolize eder (E1). Açığa çıkan amonyak suda çözünür ve amonyum iyonları (NH^{4+}) ile hidroksit iyonları (OH^-) meydana gelir (E2). Buna bağlı olarak pH yükselir. Aynı zamanda karbondioksitin suda çözünmesiyle bikarbonat iyonları (HCO_3^-) ve hidrojen iyonları (H^+) oluşur (E3). Yüksek pH ortamında bikarbonat ile hidroksil iyonları reaksiyona girerek karbonat (CO_3^{2-}) iyonlarını meydana getirir (E4). Ortamdaki Ca^{+2} iyonları ile birleşen karbonat iyonları ile $CaCO_3$ oluşur ve suda çözünürlüğü az olması sebebiyle hızlıca çökeltilir (E5) (Reddy, 2013; Kalkan, 2020; Naveed ve diğ., 2020; Golovkina ve diğ., 2020).

$CO(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow 2NH_3 + CO_2$ (E1)

$2NH_3 + 2H_2O \rightarrow 2NH_4 + 2OH^-$ (E2)

$CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$ (E3)

$HCO_3^- + H^+ + 2OH^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + 2H_2O$ (E4)

$Ca^{2+} + HCO_3^- \rightarrow CaCO_3$ (s) (E5)

2.1.2. Denitrifikasyon

Denitrifikasyon, bazı bakteriler tarafından nitratın terminal elektron alıcısı görevi görerek N_2'ye indirgendiği bir süreçtir. Bu süreç sırasında birçok nitrojen ara maddesinin oluştuğu reaksiyon şu şekilde gerçekleşir;

$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$

Denitrifiye edici bakteriler nitratın indirgenmesi ile organik bileşikleri okside ederek mineral çökeltilmesini gerçekleştirir.

Organik bileşik + $aNO_3^- + bH^+ \rightarrow cCO_2 + dH_2O + eNO_2$ (E6)

Organik bileşik + $eNO_2 + fH^+ \rightarrow gCO_2 + hNO + kH_2O$ (E7)

Organik bileşik + $lNO + mH^+ \rightarrow nCO_2 + N_2O + pH_2O$ (E8)

Organik bileşik + $rN_2O + sH^+ \rightarrow tCO_2 + yN_2 + zH_2O$ (E9)

$CO_2 + 2OH^- \rightarrow CO_3^{2-} + H_2O$ (E10) pH artar

$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3$

İndirgenmenin son basamağında ortamda bulunan Ca^{2+} iyonları ile $CaCO_3$ çökeltilir (Erşan ve diğ., 2016; Seifan ve diğ., 2016; Soares, 2000).

Denitrifikasyon anoksik koşullarda gerçekleştiği gibi aerobik koşullarda da gerçekleşmektedir. Aerobik denitrifikasyonda oksijen ve nitrat aynı anda kullanılır. Bunu sağlayan mekanizma elektronların eş zamanlı olarak oksijene ve denitrifikasyon enzimlerine aktarımının gerçekleşmesidir (Bernat ve Wojnowska-Baryła, 2007).

2.1.3. Amonifikasyon

Proteinlerin degradasyonu ile amino asitlerin amonyaklaşması sonucu kalsiyum karbonat çökelmesi meydana gelmektedir. Amino asitlerin amonyaklaşması ile karbondioksit ve amonyak meydana gelir (E11). Oluşan amonyağın hidroliz edilmesiyle amonyum ve hidroksit iyonları oluşur (E12). Karbondioksit ile hidroksit iyonlarının reaksiyonu ile bikarbonat oluşur (E13) ve ortamda bulunan Ca^{2+} iyonlarıyla reaksiyonu sonucu kalsiyum karbonat çökelmesi gerçekleşir (E14). Bu reaksiyon sonucu mikroorganizmaların çevresinde kalsiyum karbonat çökelmesini teşvik edici alkali mikro-ortam oluşmaktadır (Castro-Alonso ve diğ., 2019; González-Muñoz ve diğ., 2010; Seifan ve Berenjian, 2019).

Amino asitler + $O_2 \rightarrow NH_3 + CO_2 + H_2O$ (E11)

$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4 + OH^-$ (E12)

$CO_2 + OH \rightarrow HCO^-_3$ (E13)

$Ca^{2+} + HCO^-_3 \rightarrow CaCO_3 + H^+$ (E14)

2.1.4. Fotosentez

Kalsiyum karbonat çökelmesi üre hidrolizi, amonifikasyon, denitrifikasyon gibi heterotrofik metabolik aktivitelerin dışında fotosentez ve metan oksidasyonu gibi ototrofik metabolik aktiviteler ile de meydana gelmektedir. Bu süreç, mikrobiyal fotosentez ile karbondioksit tüketilmesi ile başlamaktadır (E15). Hücre membranından sitozole difüzyon ile geçen HCO_3^-, karbonik anhidraz enzimi ile CO_2 ve OH^- moleküllerine ayrışır (E16). Buna bağlı olarak pH

artar. Ortamda bulunan Ca^{+2} iyonları ile HCO_3^- moleküllerinin reaksiyonu sonucu kalsiyum karbonat çökelmesi gerçekleşir (E17) (Visscher ve diğ. 1998; Castro-Alonso ve diğ., 2019; Ludwig ve diğ., 2005).

$CO_2 + H_2O \rightarrow [CH_2O] + O_2$ (E15)

$HCO_3^- \rightarrow CO_2 + OH^-$ (E16)

$Ca^{2+} + HCO_3^- \rightarrow CaCO_3 + H^+$ (E17)

2.1.5. Sülfat İndirgenmesi

İnorganik sülfatı indirgeyerek hidrojen sülfit oluşumuna sebep olan sülfat indirgeyen mikroorganizmalar uygun koşullar altında karbonat çökelmesinde rol alırlar. Bu çökelme mekanizması üç farklı şekilde gerçekleşebilmektedir. İlk mekanizmada, sülfat redüksiyonu ile pH artışına bağlı olarak doygunluk indeksine ulaşılmasıyla karbonat çökelmesinin gerçekleşmesidir. İkinci olarak, sülfat indirgeyen bakterilerin organik asitleri tüketirken karboksilik asitleri azaltmasıyla kalsiyum iyonlarının miktarının artmasına sebep olmasına bağlı olarak meydana gelir. Üçüncü mekanizma ise sülfat iyonlarının uzaklaştırılmasıyla dolomit oluşumunun desteklenmesidir. Ayrıca inaktif olan sülfat indirgeyen bakterilerin varlığı heterojen çekirdeklenme yerleri olarak hizmet ederek kalsiyum karbonat çökelmesinde rol almaktadır (Braissant ve diğ., 2007; Barton ve Faugue, 2009; Castro-Alonso ve diğ., 2019).

$6CaSO_4 + 4H_2O + 6CO_2 \rightarrow CaCO_3 + 4H_2S + 2S + 11O_2$

2.1.6. Metan Oksidasyonu

Metan oksitleyici bakteriler metanı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Bu süreç aerobik ve anaerobik olarak gerçekleşmektedir. Aerobik ortamda meydana gelen sürecin ilk basamağı metan gazının metanole çevrilmesiyle başlamaktadır. Metanol formata dönüştürülür ve formik asitle denge halindedir. Enzimatik reaksiyonlarla formik asit CO_2'ye oksitlenmektedir (E19). Ortamda bulunan Ca^{+2}, CO_2'nin dönüştürüldüğü CO_3^{-2} ile birleşerek $CaCO_3$ çökeltisi meydana getirmektedir. Anaerobik koşulda ise elektron alıcısı olarak oksijen yerine sülfat kullanılmaktadır. Reaksiyonun ilerleyen basamaklarında aynı şekilde bikarbonat iyonları ve kalsiyum karbonat oluşmaktadır (E21, E22) (Ganendra ve diğ., 2014; Erşan, 2019; Jain ve diğ., 2021). Anaerobik reaksiyon toksik bir bileşik olan hidrojen sülfür açığa çıkmasıyla

sonuçlandığı için uygulanabilirliği açısından daha fazla çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmiştir (Seifan ve Berenjian, 2019).

$CH_4 + O_2 \rightarrow HCOOH + OH^- + H_2O$ (E18)

$HCOOH \rightarrow CO_2$ (E19)

$Ca^{+2} + CO_3^{-2} \rightarrow CaCO_3$ (E20)

$CH_3^{2-} + H_2O \leftrightarrow HCO^-_3$ (E21)

$CH_4 + SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$ (E22)

2.2. MİKROBİYAL KALSİYUM KARBONAT ÇÖKELMESİNİN BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM ALANLARI

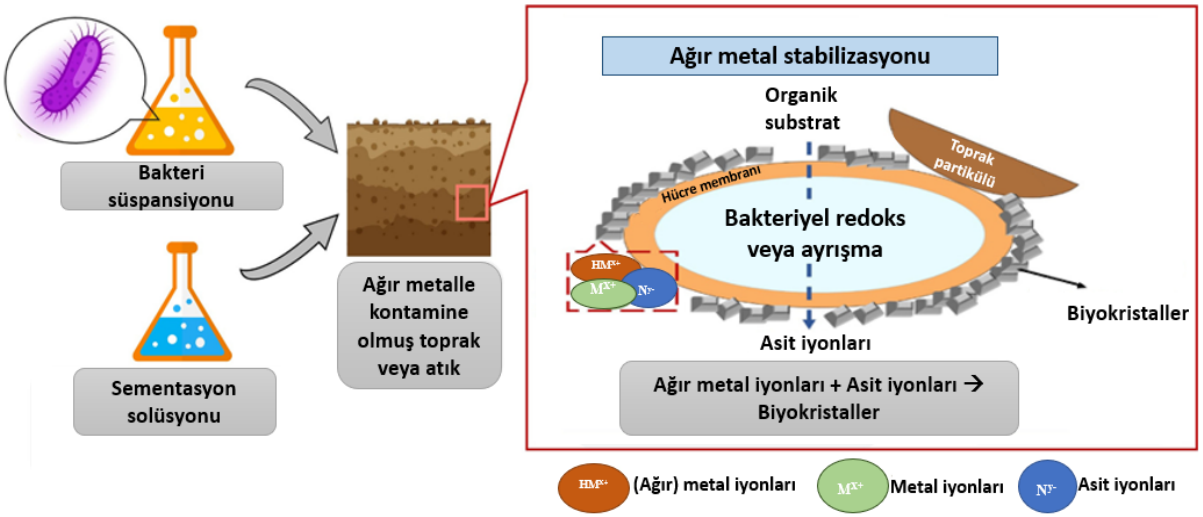
Dünya'da bulunan mineral yataklarının oluşumunda mikroorganizmaların da payı bulunmaktadır. Çeşitli mekanizmalarla gerçekleşen bu süreçten ilham alınarak birçok alanda biyoteknolojik çözümler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları ağır metallerin giderilmesi, yüksek konsantrasyonda kalsiyum içeren endüstriyel atık sulardan kalsiyumun uzaklaştırılması, CO_2 sekestrasyonu ve kendi kendini onaran betondur.

2.2.1. Ağır Metallerin Giderilmesi

Özgül ağırlık değeri 3 g/cm^3 ve daha yüksek olan metaller ağır metal olarak tanımlanmaktadır. Ağır metal iyonları güçlü bir şekilde proteinlerdeki sülfidril grupları tarafından bağlanır. Sülfidril bağlanması proteinlerin yapısını ve enzimatik aktivitelerini değiştirir ve tüm organizma düzeyinde belirgin toksik etkilere neden olur. Cd, Cu, Hg, Zn ve Pb gibi ağır metal iyonları yeterince yüksek konsantrasyonlarda organizmaları öldürebilir veya sucul topluluk yapılarını değiştiren diğer olumsuz etkilere neden olabilir (Bánfalvi, 2011; Mizrahi ve Achituv, 1989).

Ağır metalleri uzaklaştırarak canlılar üzerindeki olumsuz etkilerinin önüne geçilebilmesi için çeşitli geleneksel metotlar uygulanmaktadır. Pahalı ve yeterince etkili olmamaları nedeniyle geleneksel yöntemlere alternatif bulunabilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. MICP ile ağır metallerin uzaklaştırılması çevre dostu, hesaplı ve verimli olması sebebiyle alternatif yöntemler için umut vaat etmektedir (Anbu ve diğ., 2016).

MICP ile ağır metallerin uzaklaştırılması iki şekilde gerçekleşmektedir. İlki metal-karbonat oluşumuyla sonuçlanan çökelmedir. İkincisi ise Zn^{2+}, Pb^{2}, Cd^{2+}, Ni^{2} gibi iyonların kalsit yapısına kafeslenerek entegre olmasıdır (Torres-Aravena ve diğ., 2018). MICP ile kalsiyum karbonat çökelmesini kalsiyum kaynağı, pH, hücre dışı polimerik madde, çözünmüş inorganik karbon gibi parametreler etkilemektedir. Ağır metal uzaklaştırılması amacıyla MICP kullanımında bunlara ek olarak ağır metal konsantrasyonunun da etkisi bulunmaktadır. Ağır metal konsantrasyonu ağır metallerin uzaklaştırılma oranını negatif yönde etkilemektedir.



Şekil 2.1: MICP ile ağır metal ile kontamine olmuş topraktan ağır metal uzaklaştırılması diyagramı (Han ve diğ., 2020).

Serratia marcescens bakterisinin 5 mg/L, 10 mg/L ve 15 mg/L kadmiyum içeriğine sahip solüsyonlardan kadmiyum giderimi sırasıyla %98, %79 ve %65 oranında gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Bhattacharya ve diğ. 2018). Ayrıca *Micrococcus* sp. ile yapılan bir çalışmada 48 saat içinde Pb^{2+} ağır metali %97,20 oranında uzaklaştırılmıştır (Gomaa, 2018). Maity ve diğ. (2019) ise yaptıkları çalışma sonucunda *Bacillus subtilis*'in ağır metal karışımındaki Cr(III)'u %99.95, Cu(II)'ı %95.90 ve Zn(II)'yi % 86.59 oranında uzaklaştırdığını ortaya koymuşlardır.

2.2.2. CO_2 Sekestrasyonu

Endüstriyel aktiviteler ve fosil yakıtların kullanımı sonucu atmosferde karbondioksit ve sera gazlarının seviyesi artmaktadır. Bu gazların küresel ısınma ve iklim değişikliğine yol açan olumsuz etkileri bulunmaktadır. Karbondioksit diğer sera gazlarına oranla en yüksek (%65)

katkıya sahiptir. Endüstri öncesi dönemde atmosferde 280 ppm bulunan CO_2 konsantrasyonu 2019 yılında 409.09 ppm'e yükselmiştir. Karbondioksit sekestrasyonu atmosferdeki karbondioksiti yakalama, tutma ve depolama sürecini kapsamaktadır. Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelmesi ile CO_2 sekestrasyonu ekonomik, çevre dostu ve güvenilir olmasıyla gelecek vaat etmektedir (Yamasaki, 2003; Bhattacharyya ve diğ., 2021).

Küresel ısınmanın önüne geçilebilmesi amacıyla CO_2 sekestrasyon yöntemleri arayışına girilmiş ve mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelmesinin CO_2 sekestrasyonunda kullanılabilirliği öne sürülmüştür. MICP ile oluşan pH artışı ve karbonat alkaliliği ile HCO^-_3 ve CO_3^{2-} konsantrasyonları artarken $CO_{2(aq)}$ azalır. Bu koşullar ile gaz halindeki CO_2'nin tutulumunu kolaylaştırır ve ortamdaki iki değerlikli katyonların mevcut olmasıyla karbonat çökeltmesi ile CO_2 tutulumu gerçekleşir (Millo ve diğ., 2012). Yapılan bir çalışmada (Okyay ve diğ., 2016) 15 farklı konsorsiyum incelenmiş ve %86.4'e kadar karbondioksit sekestrasyonu gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

2.2.3. Kalsiyum Bakımından Zengin Endüstriyel Atıklardan Kalsiyum Uzaklaştırılması

Tarım ve endüstriyel aktiviteler sonucu her yıl kalsiyumca zengin atıklar ortaya çıkmaktadır. Kâğıt geri dönüşümü, kemik işleme, sitrik asit üretimi, çöp sahası sızıntı suları kalsiyumca zengin atıkların kaynaklarındandır. Bu atıklar endüstrilerdeki boru hatlarının, kazanların ve ısı eşanjörlerinin kireçleme yoluyla tıkanmasına veya aerobik ve anaerobik reaktörlerin arızalanmasına yol açmaktadır. Tüm bunlar istenmeyen ekonomik kayıplara ve endüstrideki işleme adımlarında sorunlara ve verim düşüklüğüne sebep olmaktadır. Bu sorunların giderilmesi için kimyasal kristalizasyon yöntemi kullanılmaktadır fakat sonuçta yüksek miktarda alkali atıklar oluşmaktadır. Ayrıca sürecin izlenmesi ve kontrolü karmaşıktır. Mikrobiyal karbonat çökelmesi bu sorunlar için alternatif bir mekanizmadır (Hammes ve diğ., 2003; Czaplicka ve Konopacka-Łyskawa, 2020).

Kâğıt geri dönüşüm tesisine ait atık su örneğinden üre hidrolizi yoluyla kalsiyum karbonat çökelmesi gerçekleştiren bakterilerle kalsiyum uzaklaştırılan bir çalışma yapılmıştır. 6. günden itibaren kalsiyum uzaklaştırılmasının %90 olduğu tespit edilmiştir. 24 saat ve sonrasında kalsiyum uzaklaştırılmasının giderek artmasının sebebi olarak artan üreaz aktivitesi ve çekirdeklenme bölgelerinin artışına bağlı olduğu düşünülmüştür (Hammes ve diğ., 2003).

2.2.4. İnşaat Malzemelerinin İyileştirilmesi

Mikroorganizmaların inşaat malzemeleri üzerinde gösterebilecekleri olumlu etkiler sebebiyle son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalar artmaktadır. Çalışmaların odağı mikrobiyal kaynaklı kalsiyum karbonat çökelmesi (MICP) mekanizmasıdır. Bu mekanizma ile beton ve harç yüzeylerinin sağlamlaştırılması ve korunması, toprak ve kum gibi gevşek parçacıkların çimentolanması ve sağlamlaştırılması, özellikle çatlak gibi kusurların onarılması, matris özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır.

MICP mekanizması ile inşaat malzemelerinin yüzeylerinin korunması özellikle tarihi eserler ve çimento bazlı malzemeleri kapsamaktadır. Tarihi eserlerin korunması amacıyla yapılan ilk çalışma 1993'te Saint Medard Kilisesi'nin (Thouars, Fransa) kulesine uygulanmıştır. Bolivian Altiplano (Puno, Peru) ve Pamukkale (Denizli, Türkiye) gibi karstik alanlardan izole edilip seçilen bakteriler 50 m^2'lik alana uygulanmıştır. Gaz geçirgenliğinde ve su emiliminde azalma olduğu ve karbonatojenik (karbonat oluşturan) bakteri popülasyonunun varlığının asitleşmeye sebep olan bakteri popülasyonunun gelişimini engellediği de tespit edilmiştir. Uygulamadan 3,5 yıl sonra bile kulenin görünümünde değişim olmamıştır (Le Metayer-Levrel ve diğ., 1999).

İnşaat yapılarının zeminlerine ait mekanik özellikler son derece önemlidir. Toprak stabilizasyonu ile zemin güçlendirme amaçlanmaktadır ve bunun için kimyasal enjeksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem maliyetli olmasının yanında epoksi, silikat, poliüretan gibi kimyasalların enjekte edilmesinden dolayı çevreye verdiği zararlar endişelere sebep olmaktadır. Kimyasal enjeksiyon yerine MICP ile toprak ve kumun sağlamlaştırılması iyi bir alternatif olma potansiyeline sahiptir. Bunun için biyo-stimülasyon ve biyo-augmentasyon olarak iki yöntem uygulanmaktadır. Biyo-stimülasyon ile topraktaki mikroorganizmalara uygun besinlere ulaşması enjeksiyon ile sağlanarak karbonatojenliklerini teşvik etmek amaçlanır. Ancak belirli mikroorganizmaları teşvik etmek için uygun besin içeriğinin belirlenmesi zordur. Bu sebeple $CaCO_3$ çökeltme kabiliyeti bulunan mikroorganizmaları ve bunlara uygun besinleri toprak matriksine enjekte etme prensibine dayanan biyo-augmentasyon daha elverişli ve tercih edilen yöntemdir. Çanakçı ve diğ. (2015) *Sporosarcina pasteurii* ile muamele edilen organik toprağın kontrol örneklerine göre çökeltilmiş kalsiyum karbonatın %20 arttığını ve bu durumun toprağın sıkıştırılabilirliğini ve kesme mukavemetini etkilediğini tespit etmişlerdir (Whiffin ve diğ., 2007; DeJong ve diğ., 2010).

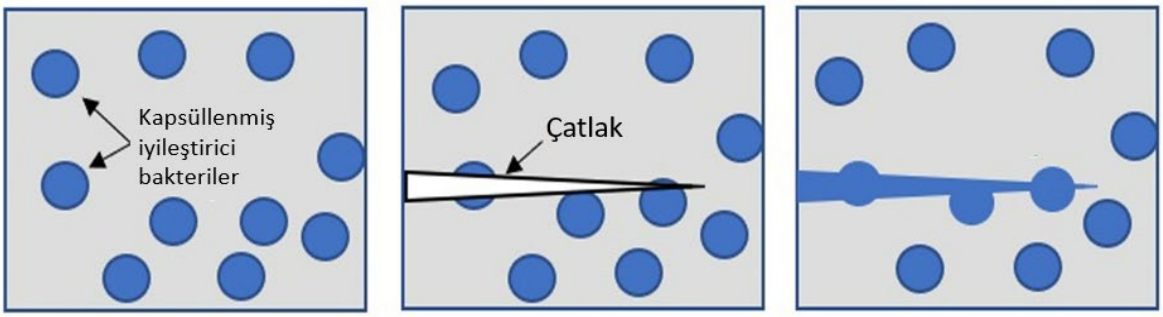
Beton ve harç en çok kullanılan inşaat malzemelerindendir. Harç ve beton üretimi büyük ölçekte çimento üretimini gerektirmektedir. Çimento üretimi sırasında açığa çıkan karbondioksit, çevreye salınan toplam karbondioksit miktarının yaklaşık %5 ila %7'sine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir. Çimentoya alternatif olarak geopolimer malzemelerle (geopolimer; kovalent bağlarla bağlanmış mineral molekül zincirleri veya ağlarıdır) beton ve harç üretimi de gerçekleştirilmektedir. Geopolimerik malzemeler, sera gazı yayan bağlayıcı madde olan çimento üretimini gerektirmez bu nedenle çevre dostu bir malzemedir (Davidovits, 1994; Jindal, 2019).

Beton ve harçlarda meydana gelen çatlaklar yapının ömrünü azaltmaktadır. Çatlak onarımı için üç farklı kendi kendini iyileştirme metodu bulunmaktadır. Bunlar doğal kendi kendini iyileştirme, yapay kendi kendini iyileştirme ve biyolojik kendi kendini iyileştirmedir. Bu metotlardan biyolojik kendi kendine iyileşme MICP mekanizması ile gerçekleşmektedir ve çevre dostu olma özelliğiyle umut vaat etmektedir. Biyolojik kendi kendine iyileşen yapı malzemelerini bakteri türü ve konsantrasyonu, bakteri canlılığı, besin ve kalsiyum kaynağı, pH, sıcaklık gibi parametreler etkilemektedir (Talaiekhozani ve Abd Majid, 2014).

Kendi kendine iyileşen yapı malzemelerinde hücresel solunum yoluyla CO_2 üreterek ortamın pH'ını artmasını sağlayıp $CaCO_3$ çökelmesine uygun koşullar sağlamaları, yüksek pH ve nem bakımından verimsiz olan matris ortamında dayanımı arttıran spor oluşturma yetenekleri ile genellikle *Bacillus* türleri tercih edilmektedir. Bir diğer tercih edilme sebepleri de patojen olmamalarıdır. Üre hidrolizi ile $CaCO_3$ çökeltmesi gerçekleştiren *Sporosarcina pasteurii* kendi kendini iyileştirmede en çok kullanılan bakteri türüdür. Çoğu kendi kendini iyileştiren beton çalışmalarında üreolitik bakterilere yer verilse de üreolitik olmayan *Bacillus pseudofirmus, Bacillus subtilis, Bacillus halmapalus* gibi türler de kullanılmaktadır. Ayrıca fakültatif anaerob olması sebebiyle *Shewanella* türleri de kullanılabilmektedir (Sharma ve diğ., 2017; Jang ve diğ., 2020; Lou ve diğ., 2021).

Kendi kendine iyileşmede bakteri ilavesi direkt uygulama, enkapsülasyon ve immobilizasyon olarak üç farklı şekilde gerçekleşmektedir. Enkapsülasyon ve immobilizasyon yöntemleri temel olarak beton ve harcın yüksek pH, yoğun matris, oksijen ve besine ulaşımın sınırlı olması ve nem bakımından elverişsiz olması gibi özelliklerinden dolayı bakterilerin vejetatif ve spor formlarının korunması için uygulanmaktadır. Enkapsülasyon yöntemi betonun kendi kendini iyileştiren genel performansını arttırmak için bakterilerin polimer bazlı bir kaplama tabakasında

kapsüllenmesidir. Çatlak oluşunca gömülü mikrokapsüllerdeki bakteriler çatlak yüzeylerine salınır ve suyla teması halinde aktive olarak yakınlardaki çatlakların kapanmasını sağlar (Şekil 2.2). Enkapsülasyon yöntemi bakteri canlılığını arttırmak için iyi bir yöntemdir. Ancak yüksek maliyetli ve üretim aşamaları basit olmayan adımları içermektedir. Kapsül malzemesi seçiminde bazı özellikler göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlardan ilki insan ve çevreye zararlı olmaması ve bakteri ile beton matrisine karşı inert olması gerekliliğidir. Bir diğer özellik kapsül duvarı karıştırma sırasında yırtılacak kadar ince olmamalı ve bakteri salınımını engelleyecek kadar kalın da olmamalıdır (Dinarvand ve Rashno, 2022; Wang ve diğ, 2012).



Şekil 2.2: Enkapsülasyon ile kendi kendini iyileşme şeması (Dinarvand ve Rashno, 2022).

Bakterilerin immobilizasyonu metakaolin, diyatomlu toprak, uçucu kül gibi gözenekli maddeler içinde bakterileri ve besin maddelerini birlikte veya ayrı ayrı emdirilmesi prensibine dayanmaktadır. Emdirilerek immobilizasyonu sağlanan bakteriler beton ve harç üretimi sırasında eklenir. Bu yöntem enkapsülasyon yöntemine göre daha az maliyetlidir ve bakterilerin direkt uygulandığı yönteme göre de hem kendi kendine çatlak iyileştirme hem de beton dayanıklılığını arttırma kapasitesi bakımından daha başarılıdır (Talaiekhozani ve Abd Majid, 2014; Wiktor ve Jonkers, 2011).

İmmobilizasyon ve enkapsülasyonun yanı sıra bakterilerin direkt olarak herhangi bir korunma sağlanmadan beton ve harç üretimi sırasında karışıma eklenmesine dayanan yöntem de uygulanabilmektedir. Bu sayede basınç dayanımı artışı, su absorpsiyonu ile klorür iyonu penetrasyonunda azalma sağlandığı bildirilmiştir (Balam ve diğ., 2017). Ancak karıştırma sırasında bakteriler zarar görebilmektedir ve bu durum kendi kendini iyileştirme etkinliğini azaltabilmektedir. Direkt uygulamanın bir diğer çeşidi ise bakteri ilavesi olmadan üretilen beton ve harçlarda oluşan çatlakları bakteri + besin + kalsiyum içeren solüsyon ile enjeksiyon,

spreyleme veya numuneyi bu solüsyona batırarak iyileştirmektir. Enjeksiyon yönteminde beton matrisinde bakteri adezyon değeri, gözenek yapısı, bakteri boyutunun gözenek boyutuna oranı gibi parametreler etkili olmaktadır. Yapıların yıkılıp yeniden inşaatının yapılması maliyet açısından yüksek olduğundan yapıların durumunu iyileştirmek için yüzey onarımının uygulanması tercih edilebilecek bir yöntemdir (Dinarvand ve Rashno, 2022).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MAĞARA İZOLATLARININ TÜRLERİ VE KODLARI

Çalışmada Dupnisa Mağarası'nın 6 yüzeyinden (dikit, damlataşı, akmataş, sarkıt) izole edilmiş 43 bakteri kullanılmıştır (Türkgenci ve Doğruöz Güngör, 2021). Standart bakteri olarak SP kodlu *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 (Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu (DSMZ), Braunschweig, Almanya) kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Dupnisa Mağarası'ndan izole edimiş bakterilerin filogenetik olarak ilişkili olduğu bakteri türleri ve izole edildikleri yerler**.**

Kod	Gen Bankasındaki En Yakın Mikroorganizma, Aksesyon Numarası ve Benzerlik Yüzdesi	İzole Edildiği Bölge ve Yüzey Şekli	Filum
A1	*Achromobacter pestifer* strain LMG 3431 (NR_152016.1), %99	1.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
A2	*Lelliottia amnigena* strain Lmb019 (KT986089.1), %99.17	1.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
A3	*Bacillus safensis* strain Md1-35 (MF581441.1), %98.63	1.Yüzey Damlataşı	Firmicutes
A4	*Pseudomonas granadensis* strain PF29 (MF838687.1), %99.62	1.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
A5	*Serratia proteamaculans* 568 (CP000826.1), %99,42	1.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
A6	*Viridibacillus arenosi* strain B-21 (KJ671467), %97,69	1.Yüzey Damlataşı	Firmicutes
A7	*Staphylococcus cohnii* strain RCB1038 (KT261250.1), %99,91	1.Yüzey Damlataşı	Firmicutes
B8	*Bacillus cereus* strain DFT-5 16S (KY750689.1), %98,02	2. Yüzey Damlataşı	Firmicutes
B9	*Pseudomonas putida* strain Atol3T (MN560132.1), %98,52	2. Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
B10	*Carnobacterium maltaromaticum* strain PYCC 8218 (MN179346.1), %97,24	2. Yüzey Damlataşı	Firmicutes

Tablo 3.1 (devam): Dupnisa Mağarası'ndan izole edilmiş bakterilerin filogenetik olarak ilişkili olduğu bakteri türleri ve izole edildikleri yerler**.**

Kod	Gen Bankasındaki En Yakın Mikroorganizma, Aksesyon Numarası ve Benzerlik Yüzdesi	İzole Edildiği Bölge ve Yüzey Şekli	Filum
B11	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1), %99,01	2. Yüzey Damlataşı	Firmicutes
B12	*Viridibacillus arvi* strain O27.1 (MN198089.1), %98,95	2. Yüzey Damlataşı	Firmicutes
C13	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1), %98,93	3.Yüzey Sarkıt	Firmicutes
C14	*Rhodococcus erythropolis* strain I-A-R-27 (KT922050.1), %97,95	3.Yüzey Sarkıt	Actinobacteria
C15	*Streptomyces spororaveus* strain HBUM173231 (EU841667.1), %97,50	3.Yüzey Sarkıt	Actinobacteria
C16	*Bacillus zhangzhouensis* strain D10302 (MK070088.1), %99,75	3.Yüzey Sarkıt	Firmicutes
C17	*Achromobacter pestifer* strain LMG 3431 (NR_152016.1), %98,27	3.Yüzey Sarkıt	Proteobacteria
C18	*Bacillus safensis* strain Rb7S3 (MH844959.1), %98,41	3.Yüzey Sarkıt	Firmicutes
C19	*Bacillus zhangzhouensis* strain D10302 (MK070088.1), %98,77	3.Yüzey Sarkıt	Firmicutes
C20	*Pseudomonas jessenii* strain S30_BP2TU (MK883111.1), %98,02	3.Yüzey Sarkıt	Proteobacteria
C21	*Bacillus butanolivorans* strain SQ7-2 (MN235850.1), %99,46	3.Yüzey Sarkıt	Firmicutes
C22	*Serratia proteamaculans*strain P4_BA1R (MK883049.1), %97,83	3.Yüzey Sarkıt	Proteobacteria
C23	*Lelliottia amnigena* strain Lmb019 (KT986089.1), %99,61	3.Yüzey Sarkıt	Proteabacteria
D24	*Pseudomonas baetica* strain S42_BP2TU (MK883123.1), %99,46	4.Yüzey Akmataş	Proteobacteria
D25	*Bacillus zhangzhouensis* strain SML_M145 (MG937681.1), %99,73	4.Yüzey Akmataş	Firmicutes
D26	*Pseudomonas stutzeri* strain KGS-8 (CP018050.1), %99,32	4.Yüzey Akmataş	Firmicutes

Tablo 3.1 (devam): Dupnisa Mağarası'ndan izole edilmiş bakterilerin filogenetik olarak ilişkili olduğu bakteri türleri ve izole edildikleri yerler**.**

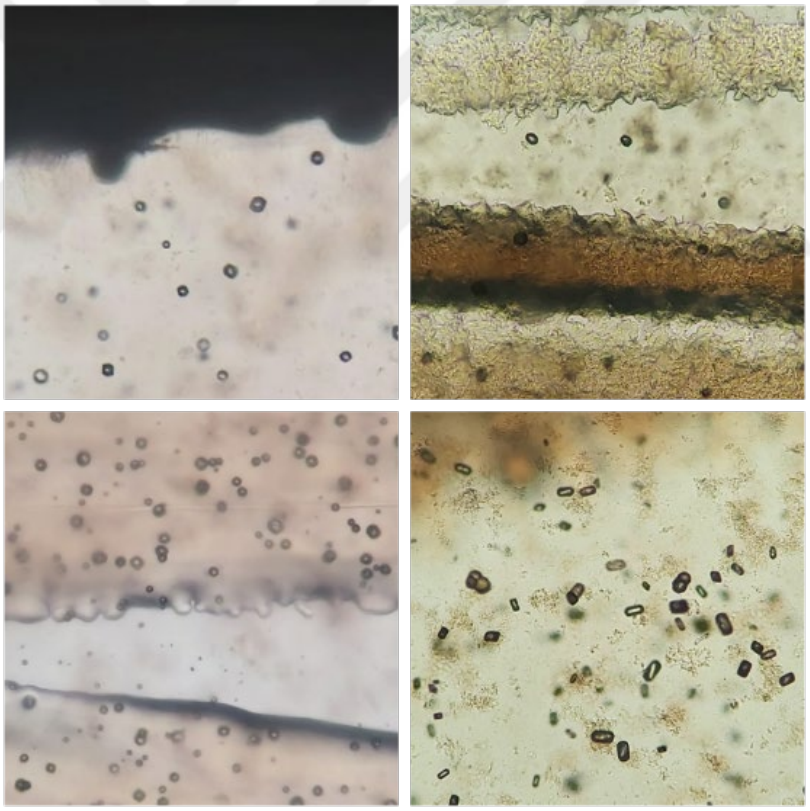
Kod	Gen Bankasındaki En Yakın Mikroorganizma, Aksesyon Numarası ve Benzerlik Yüzdesi	İzole Edildiği Bölge ve Yüzey Şekli	Filum
D27	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1), %99,16	4.Yüzey Akmataş	Firmicutes
D28	*Psychrobacter faecalis* strain H5 (JF710999.1), %98,02	4.Yüzey Akmataş	Proteobacteria
D29	*Bacillus cereus* strain ML272 (KC692201.1), %98,64	4.Yüzey Akmataş	Firmicutes
D30	*Pseudomonas baetica* strain S42_BP2TU (MK883123.1), %98,83	4.Yüzey Akmataş	Proteobacteria
E31	*Stenotrophomonas rhizophila* strain WWv256 (MH396739.1), %98,59	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
E32	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1), %99,32	5.Yüzey Damlataşı	Firmicutes
E33	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1), %99,41	5.Yüzey Damlataşı	Firmicutes
E34	*Serratia quinivorans* strain D73_SO3R (MK883176.1), %98,83	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
E35	*Phyllobacterium ifriqiyense* strain WTB32 (MK240448.1), %97,02	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
E36	*Serratia proteamaculans* 568 (CP000826), %97,50	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
E37	*Phyllobacterium zundukense* strain WTB7 (MK240435.1), %98,42	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
E38	*Stenotrophomonas rhizophila* strain D81_CV1R (MK883184.1), %97,04	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
E39	*Stenotrophomonas maltophilia* strain 262XG5 (KF818624.1), %98,81	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
E40	*Janthinobacterium lividum* strain V3 (KU144682), %99,09	5.Yüzey Damlataşı	Proteobacteria
F41	*Serratia quinivorans* strain D73_SO3R (MK883176.1), %99,26	6.Yüzey Dikit	Proteobacteria
F42	*Pseudomonas koreensis* strain NFS-STR-2 (MF079350.1), %98,83	6.Yüzey Dikit	Proteobacteria
F43	*Pseudomonas reinekei* strain LN32 (KC790246.1), %98,55	6.Yüzey Dikit	Proteobacteria

3.2. BAKTERİLERİN ÇOĞALTILMASI

-86 C°'de muhafaza edilen Dupnisa Mağarası'nın 6 yüzeyinden izole edilmiş 43 bakteri R2A, *Sporosarcina pasteurii* ise NH_4-YE besiyerine ekilmiştir. 30 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra besiyeri üzerinde çoğalan kolonilerden azaltma yöntemi ile ekim yapılmıştır.

3.3. BAKTERİLERİN $CACO_3$ KRİSTALİ ÇÖKELTME KABİLİYETLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

43 mağara izolatı, B-4 besiyerine $CaCO_3$ kristali çökeltme kabiliyetlerinin belirlenmesi için ekilmiştir. İzolatlar 30 °C'de inkübe edilmiş ve kristal oluşumu gözlemlenene kadar her gün ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir (Boquet ve Ramos-Cormenzana, 1973). İzolatların oluşturduğu $CaCO_3$ kristallerinden bazıları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: İzolatların B-4 besiyerinde oluşturduğu $CaCO_3$ kristalleri (4x büyütme).

3.4. BAKTERİLERİN NİTRAT İNDİRGEME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

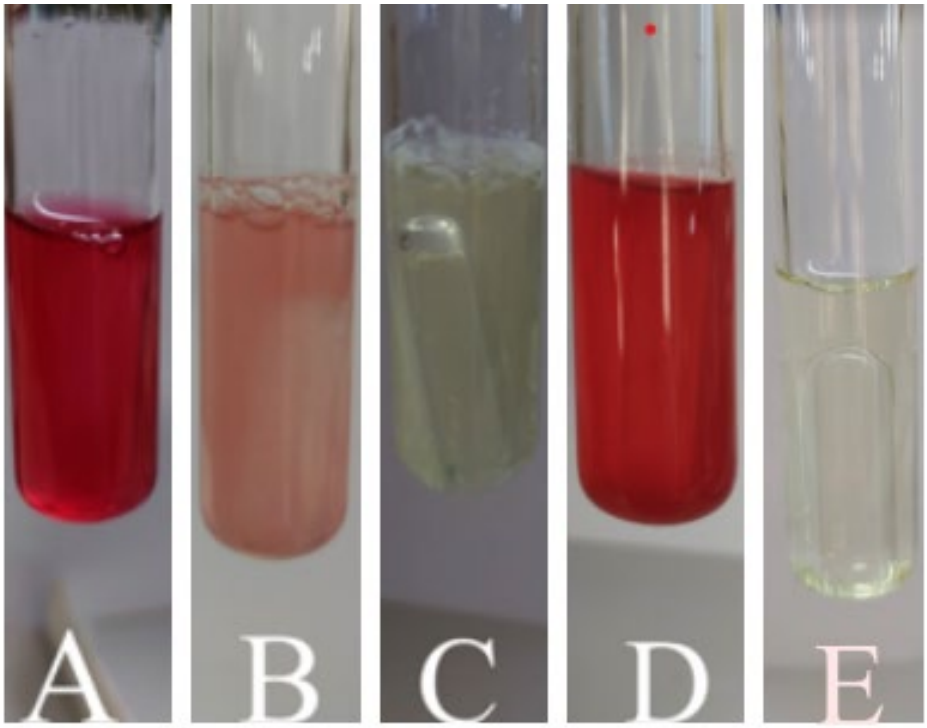
İzolatlar içinde Durham tüpü bulunan nitrat sıvı besiyerlerine ekilmiştir. 28 °C'de 1 hafta boyunca inkübe edilmiştir. İlk olarak Durham tüpünde gaz oluşumu olup olmadığı gözlemlenmiştir. Gaz oluşumunun varlığı Durham tüpünde oluşan baloncuk ile anlaşılmaktadır. Durham tüpünde baloncuk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilir (Şekil 3.2 C). Ardından tüpe reaktif A ve reaktif B üçer damla damlatılmıştır. Nitratın nitrite indirgenmesi gerçekleşmişse reaktif A diazonyum tuzu oluşturmak suretiyle nitrit ile reaksiyona girer. Elde edilen diazonyum tuzu reaktif B ile reaksiyona girerek Şekil 3.2 A'da görüldüğü gibi kırmızı/pembe renkte suda çözünür bir azo boyası oluşturur. İki dakika içerisinde pembe/kırmızı renk oluşumu nitratın nitrite indirgendiğini gösteren pozitif sonuçtur. İki dakika içinde renk değişimi gözlemlenmemesini açıklayacak üç durum bulunmaktadır;

i) NO_3^- indirgenememiştir.

ii) NO_3^- , NO_2'ye indirgenmiştir ve oluşan NO_2'de de indirgenme gerçekleşmiştir.

iii) NO_3^- doğrudan moleküler nitrojene indirgenmiştir.

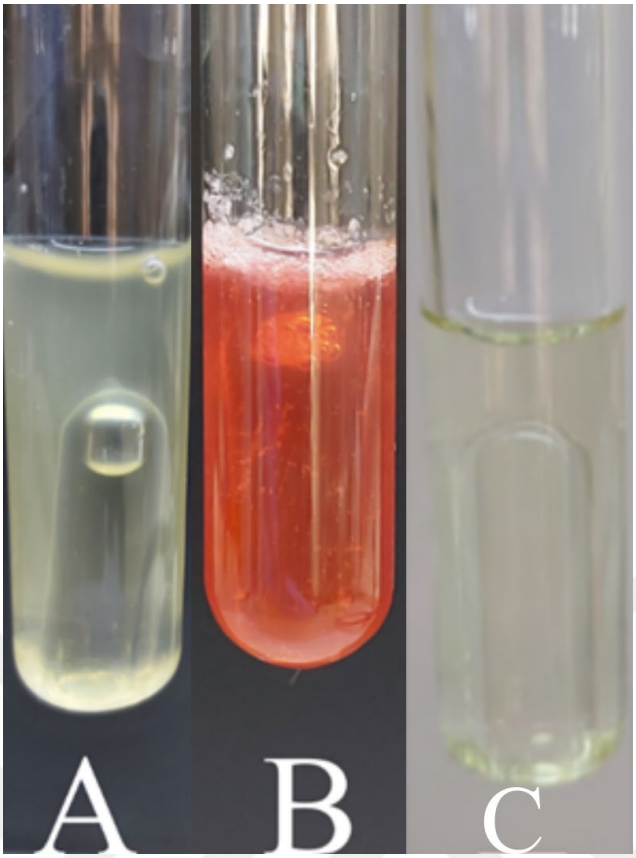
Negatif sonuç çıkması durumunda çinko tozu tüpe eklenmiştir. Renksiz deney tüpüne çinko tozu ilave edildikten sonra kırmızı rengin ortaya çıkması mikroorganizmanın nitratı indirgeme yeteneğinin olmadığını göstermektedir (Şekil 3.2 B, D). Eğer çinko tozu ilavesinden sonra sıvı besiyerinde renk değişimi oluşmazsa, nitratın bulunmadığını ve nitritin ötesinde amonyak veya nitrojen gazına indirgendiğini gösterir (Şekil 3.2 C). Nitrat indirgenmesi için pozitif sonuçtur (Carlin ve diğ., 2022). Pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* kullanılırken, ekim yapılmamış tüp negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2 E).



Şekil 3.2: İzolatlara ait nitrat indirgeme örnekleri.

3.5. BAKTERİLERİN NİTRİT İNDİRGEME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

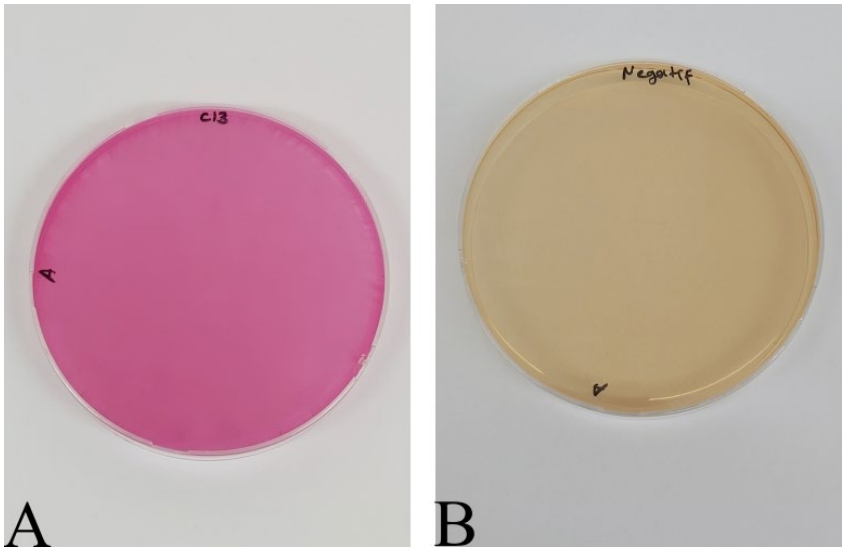
İzolatlar Durham tüpü içeren nitrit sıvı besiyerlerine ekilmiştir. 28 °C'de 1 hafta boyunca inkübe edildikten sonra reaktif A ve reaktif B ile nitrit indirgenmesinin gerçekleşip gerçekleşmediğine bakılmıştır. İlk olarak Durham tüpünde gaz oluşumu olup olmadığı gözlemlenmiştir. Gaz oluşumunun varlığı Durham tüpünde oluşan baloncuk ile anlaşılmaktadır. Gaz oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesi için Durham tüpünde baloncuk oluşumu pozitif sonuçtur (Şekil 3.3 A). Ardından reaktif A ve reaktif B üçer damla damlatılmıştır. Mikroorganizma nitrit indirgenmesini gerçekleştirdiyse renk değişimi gözlemlenmez ve sonuç pozitiftir (Şekil 3.3 A). Pembe/kırmızı renk oluşumu nitrit varlığını gösterir, sonuç negatiftir (Şekil 3.3 B) (Carlin ve diğ., 2022). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* kullanılırken, ekim yapılmamış tüp negatif kontrol (Şekil 3.3. C) olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.3: İzolatlara ait nitrit indirgeme örnekleri.

3.6. BAKTERİLERİN ORGANİK NİTROJENİ AMONYAĞA AYRIŞTIRMA YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

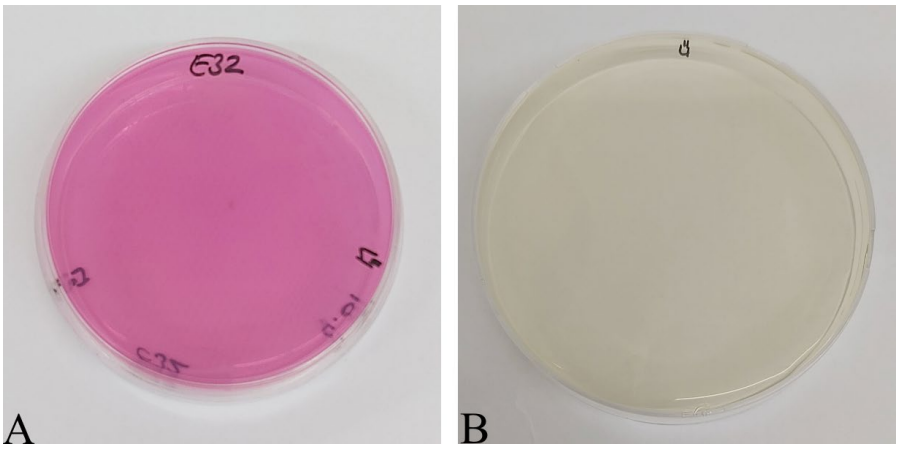
Amonifikasyon besiyerine noktasal olarak ekilen izolatlar 28 °C'de 1 hafta boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda peptitlerin / amino asitlerin bozulmasının ardından amonyak oluşumuna bağlı olarak pH artışını gösteren pembe bir rengin gelişimi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.4 A) (Maciejewska ve diğ., 2017). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ekilmiştir. Ekim yapılmamış Petri kabı negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.4 B).



Şekil 3.4: İzolatlara ait organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma örnekleri.

3.7. BAKTERİLERİN ÜREAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Christensen Üre Agar (UAB) besiyerine noktasal olarak ekilen izolatlar 28 °C'de 27 gün inkübe edilmiştir. İzolatların ekimi yapılan Petri kutuları her gün incelenmiştir. Üreaz enziminin aktivitesi sonucu olarak pH artışını gösteren pembe renk, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.5 A) (Maciejewska ve diğ., 2017). Pozitif kontrol olarak *Sporosarcina pasteurii* kullanılırken, ekim yapılmamış Petri kabı negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.5 B).



Şekil 3.5: İzolatlara ait üreaz aktivite örnekleri.

3.8. BAKTERİLERDE *NAPA* VE *UREC* GEN BÖLGELERİNİN ARAŞTIRILMASI

3.8.1. *napA* Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

Aerobik denitrifikasyon Nap proteinleri tarafından ifade edilmektedir. *napA* geni, aerobik denitrifikasyonun periplazmik nitrat redüktaz ile kataliz olup olmadığının anlaşılması amacıyla mağara izolatları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edilmiştir (Ji ve diğ., 2015).

Türkgenci ve Doğruöz Güngör (2021)'ün çalışmasında izole edilen mağara izolatlarına ait DNA örneklerinin spektrofotometre (NanoDrop spektrofotometre Thermo Scientific) ile ng/µl miktarı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak *Escherichia coli*, negatif kontrol için saf su kullanılmıştır. PZR için gerekli 25 µl hacimli reaksiyon karışımının içeriği; 12,5 µl master mix (PCR Master Mix (2X) - Thermo Fisher Scientific), 2 µl forward primer (10 µmol) NAP1 (5′-TCTGGACCATGGGCTTC AA CCA-3′), 2 µl reverse primer (10 µmol) NAP2 (5′-ACGACGACCGGCCAGCGCAG-3′), 1 µl DNA (10 ng/µl şeklinde sulandırılmış solüsyondan), 7,5 µl nükleaz içermeyen saf su şeklindedir. Hazırlanan reaksiyon karışımı ilk denatürasyon için 94°C'de 5 dakika, denatürasyon için 94 °C'de 30 saniye, bağlanma için 59 °C'de 30 saniye, uzama için 72 °C'de 1 dakika (35 döngü) ve son uzama için 72 °C'de 5 dakika muamele olacak koşullarda PZR cihazına (BIORAD T100 Thermal Cycler) konmuştur (Kong ve diğ., 2006).

3.8.2. *ureC* Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

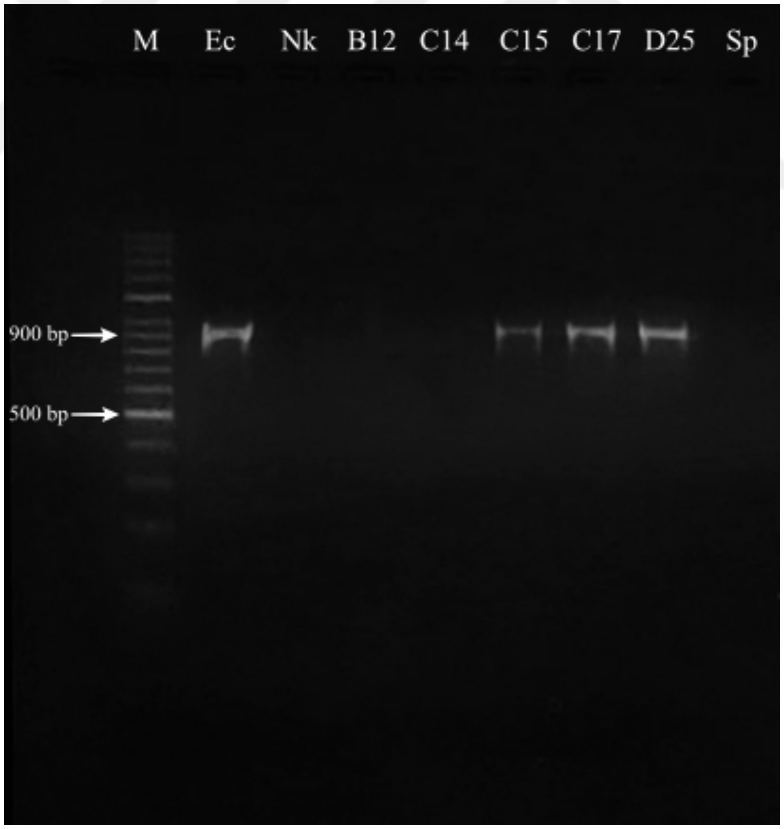
Üreaz enzimi üç yapısal alt birim tarafından kodlanmaktadır. Üç alt birimden biri olan *ureC* geninin varlığının araştırılması için mağara izolatlarına ait DNA'lar PZR ile analiz edilmiştir (Fisher ve diğ., 2017).

Pozitif kontrol olarak *Sporosarcina pasteurii,* negatif kontrol olarak saf su kullanılmıştır. 25 µl PZR karışımı 12,5 µl master mix, 2 µl forward primer (10 µmol) ureC1F(5′-AAGMTSCACGAGGACTGGGG-3′), 2 µl reverse primer (10 µmol) ureC2R (5′-AGRTGGTGGCASACCATSAGCAT-3′), 1 µl DNA (10 ng/µl şeklinde sulandırılmış solüsyondan), 7,5 µl nükleaz içermeyen saf su içermektedir. Hazırlanan reaksiyon karışımı ilk denatürasyon için 94°C'de 10 dakika, denatürasyon için 94°C'de 1 dakika, bağlanma için

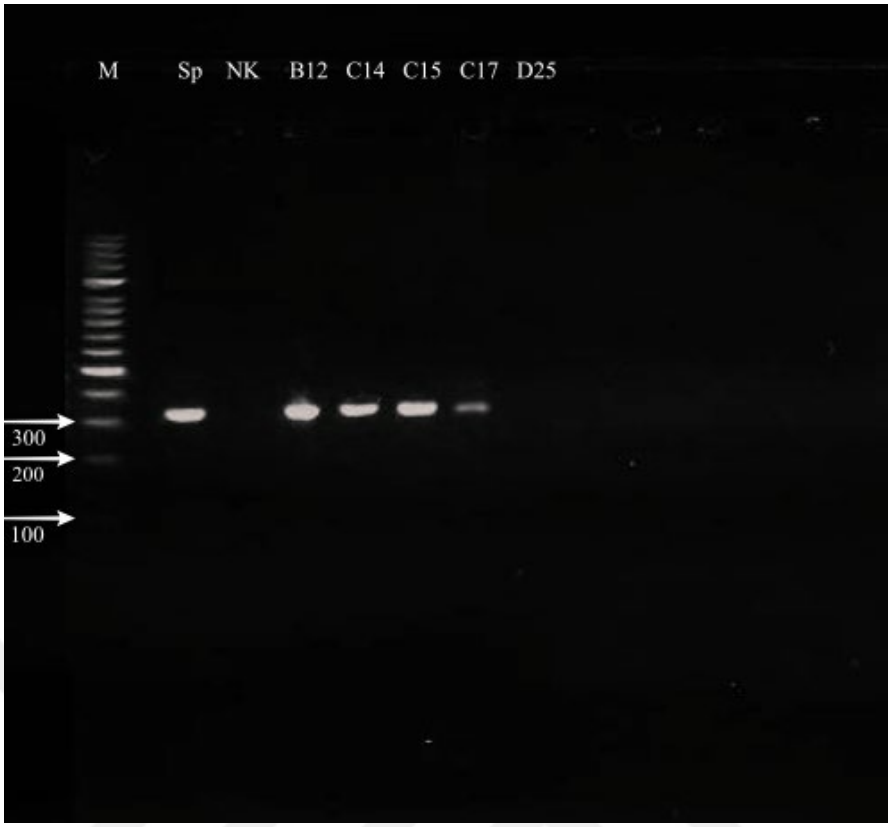
55°C'de 1 dakika, uzama için 72°C'de 2 dakika (30 döngü) ve son uzama için 72°C'de 10 dakika muamele olacak koşullarda PZR cihazına konmuştur (Koper ve diğ., 2004).

3.8.3. *napA* ve *ureC* PZR Ürünlerinin Elektroforezi

%1,2'lik Agaroz jel 1x TBE solüsyonuyla mikrodalga ile çözülmüştür. Soğuduktan sonra Agaroz jele %1 olacak şekilde Gel Red (Fisher Biotec) ilave edilmiştir. İçinde tarak bulunan Agaroz jel tankına dökülerek donması beklendikten sonra taraklar çıkarılmıştır. Agaroz jelin ilk kuyucuğuna 5 µl marker (GENESTA^{TM} 100 bp DNA Ladder) sonraki kuyucuklara pozitif kontrol, negatif kontrol ve izolatlara ait amplifiye edilmiş PZR ürünlerinden 5 µl alınıp 1 µl loading dye (6X TriTrack DNA Loading Dye, Thermo Scientific) ile karıştırılarak eklenmiştir. Tanka 1x TBE eklenerek 90 voltta 45 dakika boyunca yürütülmüştür. Ardından UV Transilluminatör cihazında sonuçlar incelenmiştir. Şekil 3.6'da *napA* gen bölgesine, Şekil 3.7'de *ureC* gen bölgesine ait elektroforez sonuçlarından bazıları gösterilmiştir.



Şekil 3.6: *napA* genine ait PZR ürünlerinin UV altında elektroforez görüntüleri. Ec: *Escherichia coli* (pozitif kontrol), Nk: Negatif kontrol.



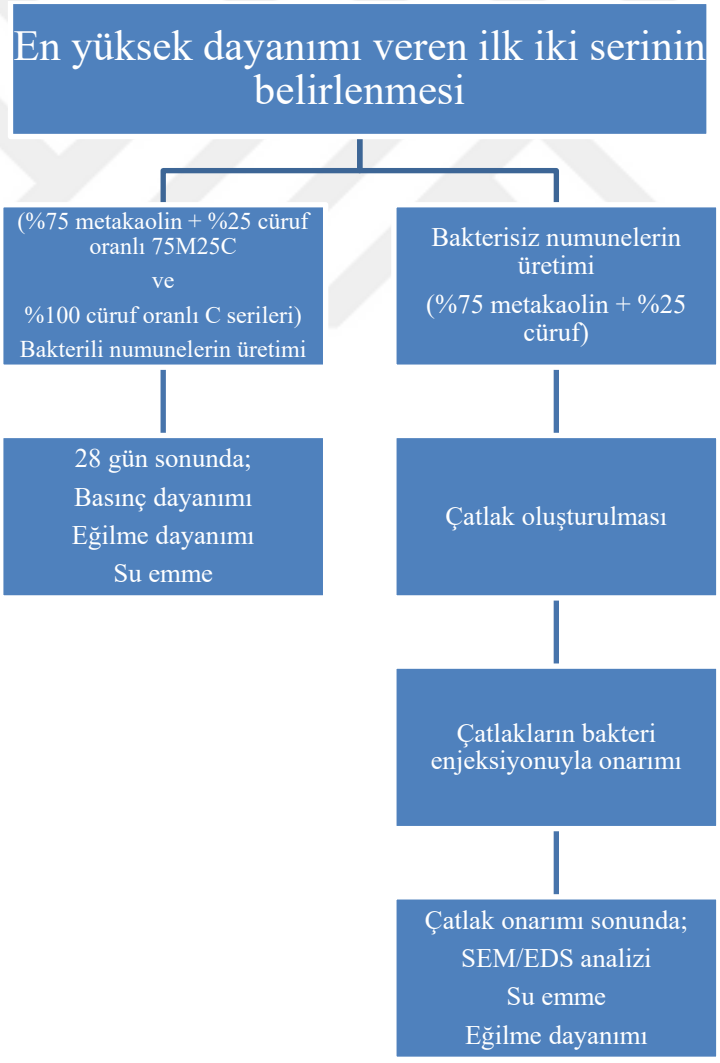
Şekil 3.7: *ureC* genine ait PZR ürünlerinin UV altında elektroforez görüntüleri. SP: *Sporosarcina pasteurii* (pozitif kontrol), NK: Negatif kontrol.

3.9. GEOPOLİMER HARCIN MAĞARA BAKTERİLERİYLE İYİLEŞTİRİLMESİ

Bakterilerin geopolimer harcın iyileştirilmesinde etkili olup olmadığını saptamak amacıyla ilk önce 7 farklı içeriğe sahip seri arasından dayanımı yüksek olan ilk iki seriyi belirlemek amaçlanmıştır. Belirlenen iki seri ile bakterili ve bakterisiz numuneler hazırlanarak iki farklı metot uygulanmıştır. İlk olarak bakteri içermeyen kontrol numunesi ile bakteri içeren numuneler üretilmiştir. Bakterilerin geopolimer harcın basınç ve eğilme dayanımı ile su emme oranlarına etkisini belirlemek amaçlanmıştır. 43 mağara izolatından B12 (*Viridibacillus arvi),* C13 (*Bacillus mycoides),* C14 (*Rhodococcus erythropolis*) C15 (*Streptomyces spororaveus*) C17 (*Achromobacter pestifer),* C18 (*Bacillus safensis*), D25 (*Bacillus zhangzhouensis)*, E31 (*Stenotrophomonas rhizophila),* E34 (*Serratia quinivorans*), E36 (*Serratia proteamaculans*), F42 (*Pseudomonas koreensis*) ve SP (*Sporosarcina pasteurii*) kodlu 11 bakteri seçilmiştir. Bakteriler üreaz aktivitesi ve *ureC* varlığı, nitrat indirgeme ve *napA* varlığı, amonifikasyon, nitrit indirgeme ve kalsiyum karbonat oluşturma günlerine göre seçilmiştir. Daha sonra mağara

izolatlarının geopolimer harç üzerindeki basınç ve eğilme dayanımı ile su emme oranına etkisi belirlenmiştir.

İkinci metotta ise bakterisiz numuneler üretilerek numunelerde çatlak oluşturulmuş ve çatlaklara bakteri+kalsiyum laktat+besin içeren solüsyon enjekte edilerek çatlak onarımı gerçekleştirilmiştir. İlk metotta kullanılan 11 mağara izolatından 5 izolat yine üreaz aktivitesi ve *ureC* varlığı, nitrat indirgeme ve *napA* varlığı, amonifikasyon, nitrit indirgeme ve kalsiyum karbonat oluşturma günlerine göre seçilmiştir. Çatlak onarımının bakteriyel kaynaklı olup olmadığının anlaşılması için iki farklı kontrol kullanılmıştır. İlk kontrole yalnızca besiyeri enjeksiyonu yapılırken ikinci kontrolde besiyeri+kalsiyum laktat enjekte edilmiştir. Çatlak onarımının ardından numunelere su emme ve eğilme dayanımı testi yapılmıştır. (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: Geopolimer harcın iyileştirilme metotları.

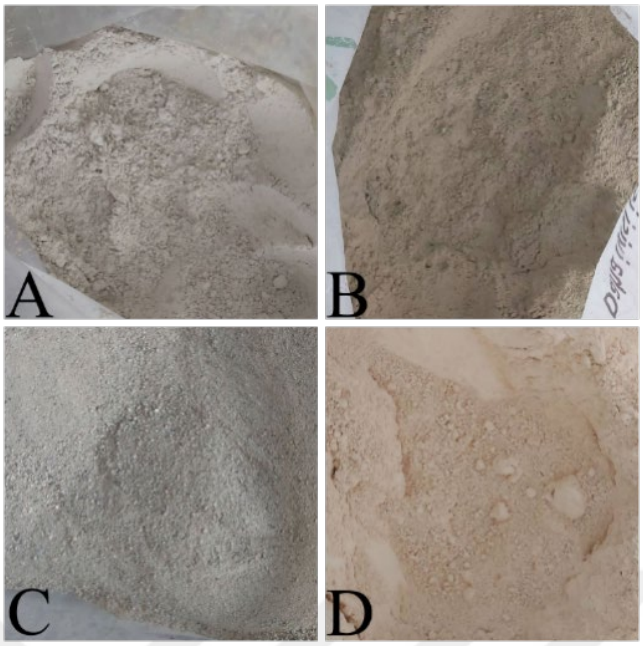
3.9.1. Yüksek Dayanımlı Serilerin Belirlenmesi

3.9.1.1. Harç Üretimi

Tablo 3.1'de harç serilerinin cüruf, metakaolin, uçucu kül oranları ve bu ve serilere verilen kodlar gösterilmiştir. 7 seri üçer prizma ve üçer küp olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.2: Numunelerin karışım oranları.

	Seri Kodları	**Cüruf**	**Metakaolin**	**Uçucu Kül**
1. SERİ	C	%100	-	-
2. SERİ	75C25M	%75	%25	-
3. SERİ	75C25U	%75	-	%25
4. SERİ	50C50M	%50	%50	-
5. SERİ	50C50U	%50	-	%50
6. SERİ	25C75M	%25	%75	-
7. SERİ	25C75U	%25	-	%75



Şekil 3.9: Beton serilerine ait malzemeler. A: Cüruf, B: Uçucu kül, C: Kum, D: Metakaolin

Harç üretiminin basamakları aşağıdaki gibidir;

1. Harç mikserine ilk olarak her serinin bağlayıcı maddesi eklenmiştir. Ardından 12M sodyum hidroksit ve sodyum silikat karışımı eklenerek karıştırılmıştır.

2. Son olarak kum eklenmiştir. Homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır.

3. Karışım, önceden yağlanmış olan demir kalıplara eklenmiştir.

4. 24 saat sonunda numuneler kalıplardan çıkarılmış ve 28 gün bekletilmiştir.

3.9.1.2. Eğilme Dayanımı Deneyi

Eğilme dayanımı deneyinde prizma numunelerine uygulanan maksimum yük ile eğilme dayanımı bulunmaktadır (Mayers ve Chawla, 2008). 28 gün oda sıcaklığında bekletilen numunelere eğilme dayanım cihazı ile üç noktalı eğilme testi uygulanmıştır. Her seri için 3 numunenin ortalaması alınarak eğilme dayanım değerleri belirlenmiştir.

3.9.1.3. Basınç Dayanımı Deneyi

Basınç dayanımı tespitinde küp numuneleri kırılana kadar uygulanan yük ile basınç mukavemetinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. 28 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş olan numuneler basınç pres cihazıyla kırılıncaya kadar yük uygulanmıştır. Her seri için 3 numunenin ortalaması alınarak basınç dayanım değerleri belirlenmiştir.



Şekil 3.10: Basınç dayanımı deneyi.

3.9.2. Bakteri İçeren Geopolimer Harç Serilerinin Üretimi

En yüksek basınç ve eğilme dayanımını veren 75M25C ve C kodlu iki farklı beton serisine göre numuneler hazırlanmıştır. Her bir bakteri için üçer küp ve prizma numunesi olacak şekilde 12 farklı bakteri içeren ve bakteri içermeyen kontrol numuneleri üretilmiştir. Numuneler 28 gün bekletilmiştir. 28 gün sonunda basınç dayanımı, eğilme dayanımı ve su emme deneyleri yapılmıştır.

3.9.2.1. Bakteri Üretimi

İki farklı içeriğe sahip beton serilerine 11 mağara izolatı (B12, C13, C14, C15, C17, C18, D25, E31, E34, E,36, F42) ve *Sporosarcina pasteurii* eklenerek üretilmesi amaçlanmıştır. Her bakteri iki tekrarlı olacak şekilde üçer gram santrifüj ile çöktürülerek elde edilmiştir. Elde edilen bakteriler 153 ml PBS ve 39,5 gram metakaolin içeren solüsyona eklenmiştir. Bakteri + metakaolin içeren solüsyon 24 saat boyunca 30 °C sıcaklığında 120 rpm'de inkübe edilmiştir.

24 saatin sonunda membran filtrasyon sistemiyle 125 mm filtre kağıdı ile bakterilerin metakaoline emdirilmesi gerçekleştirilmiştir.

3.9.2.2. Beton Serilerinin Üretimi

Bakterilerin metakaoline emdirilmesi işleminden sonra %100 cüruf içeren C kodlu seri ve %75 metakaolin + %25 cüruf içeren 75M25C kodlu seri üretim basamakları şu şekildedir;

1. Harç mikserine ilk olarak her serinin bağlayıcı maddesi eklenmiştir. Ardından 12M sodyum hidroksit ve sodyum silikat karışımı eklenerek karıştırılmıştır.

2. Son olarak kum ile bakteri emdirilmiş metakaolin eklenmiştir. Homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır.

3.Karışım, önceden yağlanmış olan demir kalıplara eklenmiştir.

4. 24 saat sonunda numuneler kalıplardan çıkarılmış ve 28 gün bekletilmiştir.

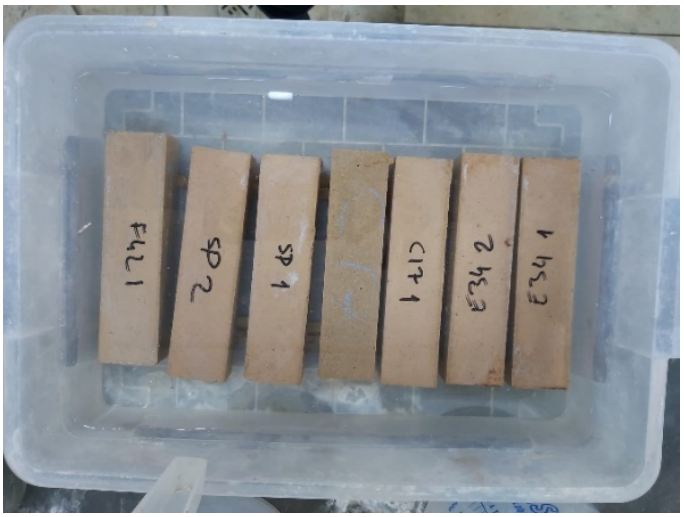
28 gün boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra basınç dayanımları, eğilme dayanımları ve su emme deneyleri yapılmıştır.



Şekil 3.11: 24 saat sonunda kalıplardan çıkarılan numuneler.

3.9.2.3. Su Emme Deneyi

Su emme deneyi betonun dış koşullar ile teması olan boşluk oranını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Numunelerin ilk ağırlıkları belirlendikten sonra her bakterili numune ikişer tekrarlı olarak eşit oranda suyla temas etmesine dikkat edilerek 24 saat suda bekletilmiştir. 24 saatin sonunda sudan çıkarılan numunelerin ağırlıkları ölçülmüştür. Son ağırlıktan ilk ağırlıkları çıkarılarak su emme oranları hesaplanmıştır.



Şekil 3.12: Su emme deneyi.

3.9.3. Bakteri İçermeyen Geopolimer Harcın Bakterilerle İyileştirilmesi

3.9.3.1. Beton Üretimi

En yüksek dayanım sonuçlarını veren 75M25C kodlu seri üretilmiştir. Her bakteri için iki tekrarlı olacak şekilde numune üretilmiştir. İki farklı uygulama yapmak amacıyla dört adet kontrol numunesi de yapılmıştır. K8 ve K16 kodlu numuneler besiyeri enjeksiyonu yapılan kontrol numuneleriyken, K10 ve K11 besiyeri + kalsiyum laktat solüsyonunun enjeksiyonu için kullanılan kontrol numunelerini yansıtmaktadır. Üretim aşamaları şu şekildedir;

1. Harç mikserine ilk olarak bağlayıcı madde eklenmiştir. Ardından 12M sodyum hidroksit ve sodyum silikat karışımı eklenerek karıştırılmıştır.

2. Karıştırma sırasında 3 adet prizma için 7 gram fiber eklenmiştir. Fiber eklenmesi ile çatlak oluşturulma sırasında eğilme direnci sağlanarak çatlak oluşumunu sınırlayıp istenilen boyutta çatlak elde edilmesi amaçlanmıştır. Son olarak kum ilave edilmiştir. Homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır.

3. Karışım, önceden yağlanmış olan demir kalıplara eklenmiştir.

4. 24 saat sonunda numuneler kalıplardan çıkarılmış ve 28 gün bekletilmiştir.

3.9.3.2. Betonlara Çatlak Oluşturulması

Numunelere eğilme dayanım cihazıyla çatlak oluşturulmuştur. Öncelikle birkaç numuneye eğilme dayanımı testi yapılarak numunelerin eğilme dayanım sonuçları elde edilmiştir. Ardından elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır. Çatlak oluşturulacak numunelere eğilme dayanımının %70'i kadar yük uygulanarak çatlaklar oluşturulmuştur (Tanyıldızı ve diğ., 2022).



Şekil 3.13: Eğilme dayanımı cihazıyla çatlak oluşturulması.

3.9.3.3. Betonların Çatlak Boyutlarının Ölçülmesi

Çatlak genişliği üç eşit parçaya bölündükten sonra üç noktadan ölçülerek ortalaması alınmıştır (Van Tittelboom ve diğ., 2009). Şekil 3.6 da gösterildiği gibi toplam 16 numune çatlak tespit mikroskobu kullanılarak 40x büyütme ile ölçülmüştür.



Şekil 3.14: Oluşturulan çatlağın mikroskop görüntüsü (x40 büyütme).

3.9.3.4. Betonların Çatlak İyileştirilmesi İçin Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması

İyileştirme için 5 adet mağara izolatı ile *Sporosarcina pasteurii* (SP) bakterisi kullanılmıştır. B12, C14, C17, C15, D25 kodlu izolatlar üre hidrolizi, nitrat-nitrit indirgeme, amonifikasyon yeteneklerine göre seçilerek TSB besiyerinde, *Sporosarcina pasteurii* ise sıvı NH_4-YE besiyerinde üretilmişlerdir.

-20'de muhafaza edilen bakterilerin R2A ve NH_4-YE besiyerlerine sıçratma yöntemiyle üremesi sağlanmış ardından saf kolonilerden azaltma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 24 saat 30°C'lik çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Üreme gerçekleştikten sonra her bakteri yoğunluğu Mc Farland 3.0 (9×10^8 hücre/ml) standardına göre elde edilmiştir. Elde edilen bakteri solüsyonuna kalsiyum laktat çözeltisi 20 ml/l olacak şekilde eklenmiştir. Çatlaklar kapanana kadar karışım enjektör ile beton çatlaklarına her gün günde iki kez 6 saat aralıkla çatlak içine tamamen karışımla muamele olana kadar enjekte edilmiştir.

3.9.3.5. Betonların Çatlak İyileştirilmesinin Görüntülenmesi

Numuneler çatlak tespit mikroskobu kullanılarak 40x büyütme ile 7 gün aralıklarla incelenmiştir.

3.9.3.6. Betonların Su Emme ve Eğilme Dayanımı Deneyleri

Numunelere 60 gün sonunda su emme ve eğilme dayanımı deneyleri yapılmıştır.

3.9.3.7. Beton Çatlaklarının SEM ve EDS Analizleri

60 gün sonunda iyileştirme gerçekleştirilen numunelerin çatlak kısımlarından 2 mm boyutunda parçalar alınmıştır. Alınan parçalar Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dispersiv Spektrum (EDS) kullanılarak incelenmiştir. Analizler EDAX Octane dedektörü ve FEI Versa 3D Dual Beam ile gerçekleştirilmiştir. SEM görüntülerine 5000x, 10 0000x ve 20 000x büyütmeleriyle bakılmıştır.

3.10. BESİYERLERİ VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

3.10.1. Reasoner's 2 Agar (R2A)

Glikoz, 0.5 g/L

Proteoz pepton, 0.5 g/L

Maya ekstraktı, 0.5 g/L

Kazein hidrolizat, 0.5 g/L

Maya ekstraktı, 0.5 g/L

Nişasta, 0.5 g/L

Sodyum pirüvat, 0.3 g/L

Di-potasyum fosfat, 0.3 g/L

Magnezyum sülfat, 0.024 g/L

Agar, 15.0 g/L

pH: 7.2 ± 0.2

1000 ml besiyeri için 18.1 g R2A distile suya ilave edilmiştir. Otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilip 90 mm'lik steril Petri kaplarının her birine yaklaşık 15 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

3.10.2. B-4 Agar

Bakteriler ile mineral çökelmesini gözlemlemek amacıyla kullanılmaktadır.

Glikoz, 10.0 g/L

Maya özütü, 4.0 g/L

Kalsiyum asetat, 2.5 g/L

Agar, 15.0 g/L

pH: 8.1 ± 0.2

Otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilip 90 mm'lik steril Petri kaplarının her birine yaklaşık 15 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

3.10.3. Chiristensen Üre Agar (UAB)

Bakterilerin üreaz aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır.

Üre, 20.0 g/L

NaCl, 5.0 g/L

Pepton, 1.0 g/L

Glikoz, 1.0 g/L

KH_2PO_4 , 2,0 g/L

Fenol kırmızısı, 0,012 g/L

Agar, 15.0 g/L

pH: 6.5

Üre ve fenol kırmızısı haricinde tüm bileşenler otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Üre ve fenol kırmızısı diğer bileşenlerin otoklavda steril edilmesinden sonra 0,22 µm gözenek çaplı filtre ile steril edilerek besiyerine eklenmiştir.

3.10.4. Amonifikasyon Agar

Bakterilerin organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yeteneklerinin tespiti için kullanılmaktadır.

Pepton, 5.0 g/L

Et özütü, 3.0 g/L

NaCl, 5.0 g/L

Fenol kırmızısı, 0.012 g/L

Agar, 15.0 g/L

pH 7.0

Fenol kırmızısı haricindeki bileşenler otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Üre ve fenol kırmızısı diğer bileşenlerin otoklavda steril edilmesinden sonra 0,22 µm gözenek çaplı filtre ile steril edilerek besiyerine eklenmiştir. 90 mm'lik steril Petri kaplarının her birine yaklaşık 15 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

3.10.5. Nitrat İndirgeme Sıvı Besiyeri

Bakterilerin nitratın (NO_3^-) nitrite (NO_2^-) nitrat redüktaz enzimi ile indirgeme yeteneğinin belirlenmesi için kullanılır.

Et özütü, 3.0 g/L

KNO_3, 1.0 g/L

Pepton,5.0 g/L

pH: 7.2–7.4.

Besiyeri Durham tüpü bulunan cam tüplere paylaştırılmıştır. Otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.10.6. Nitrit İndirgeme Agar

Bakterilerin nitriti (NO_2^-) çeşitli nitrojen ürünlerine (NO, N_2O, N_2 ve NH_3) indirgeme yeteneğinin belirlenmesi için kullanılır.

Et özütü, 3.0 g/L

KNO_2, 1.0 g/L

Pepton, 5.0 g/L

pH: 7.2–7.4.

Besiyeri Durham tüpü bulunan cam tüplere paylaştırılmıştır. Otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.10.7. NH_4-YE Besiyeri (ATCC Besiyeri 1376)

Sporosarcina pasteurii üretilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Li ve Qu, 2011).

Maya özütü, 20 g/L

$(NH_4)_2SO_4$, 10 g/L

0.13 M Trisma Base (pH 9.0) 1 L

Otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.10.8. 10x TBE

Tris base, 108 g/L

Borik asit, 55 g/L

0.5M EDTA (pH 8) 40 ml/L

Önce 0.5 M EDTA hazırlanır. 0.5 M EDTA için 186,1 g/l tartılmıştır. Ardından tris base ve borik asit içeren solüsyona gereken kadar EDTA konmuştur.

3.10.9. 1x TBE

100 ml 10x TBE'nin 900 ml distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

3.10.10. %1,2'lik Agaroz

100 ml için 1,2 gram Agaroz 1x TBE içinde mikrodalga fırında çözdürülmüştür. El yakmayacak sıcaklığa geldiğinde %1 olacak şekilde GelRed ilave edilmiştir.

3.10.11. Reaktif A ve Reaktif B

Reaktif A:

Sülfanilik asit, 0.2 g

Asetik asit (5N), 25.0 ml

Reaktif B:

N, N-Dimetil-1-naftilamin, 0.15 g

Asetik Asit (5N) 25.0 ml

3.10.12. Kalsiyum Laktat Çözeltisi

Kalsiyum laktat 20 g/L

Distile suda çözülen kalsiyum laktat otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir (Tanyıldızı ve diğ., 2022).

4. BULGULAR

Dupnisa Mağarası'ndan izole edilmiş bakterilerin $CaCO_3$ kristali oluşturma, üreaz, nitrat-nitrit indirgeme, organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yetenekleri belirlenmiş ve *napA* ile *ureC* genlerine sahip olup olmamaları incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

4.1. BAKTERİLERİN $CACO_3$ KRİSTALİ ÇÖKELTME KABİLİYETLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

Dupnisa Mağarası'nın yüzeyinden izole edilmiş 43 bakteriden A7 kodlu bakteri hariç hepsi B-4 besiyerinde 27 gün içerisinde kristal oluşturmuştur.

4.2. BAKTERİLERİN ÜREAZ AKTİVİTELERİNİN VE *UREC* GEN BÖLGESİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ

İzolatların üreaz enzim ve *ureC* gen bölgesi varlığı Tablo 4.1.'de görülmektedir. Üreaz aktiviteleri test edilen 43 bakteriden 14 tanesinin üreaz aktivitesi gösterdiği ve *ureC* genini bulundurduğu belirlenmiştir. Üre hidrolizinde rol alan 300-340 bp uzunluğa sahip *ureC* (Koper ve diğ., 2004) geni için yapılan PZR sonuçlarına göre, metabolik olarak negatif olan 29 bakteriden 11 tanesinin *ureC* genine sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.3. BAKTERİLERİN NİTRAT-NİTRİT İNDİRGEME YETENEKLERİNİN VE *NAPA* GEN BÖLGESİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ

Bakterilerin nitrat-nitrit indirgeme ve *napA* gen bölgesi varlığı Tablo 4.1.'de görülmektedir. Nitrat indirgeme yeteneklerine bakılan 44 izolattan ve (43 mağara izolatı ve *Sporosarcina pasteurii*) 23 tanesi nitratı indirgerken 2 tanesinde gaz üretimi gözlemlenmiştir. Bakterilerin aerobik denitrifikasyonunda rol alan 876 bp uzunluğundaki *napA* genini (Kong ve diğ., 2006) hedef alınarak yapılan PZR sonuçlarına göre 30 bakteride *napA* varlığı belirlenmiş ve bunlardan metabolik olarak nitrat indirgemeyen 20 bakteriden 7 tanesinin *napA* geni bulundurduğu tespit edilmiştir.

44 bakteriden bir tanesinin metabolik olarak nitrit indirgeme yeteneği bulunurken iki tanesinde gaz üretimi gözlemlenmiştir.

4.4. BAKTERİLERİN ORGANİK NİTROJENİ AMONYAĞA AYRIŞTIRMA YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

SP hariç mağara izolatlarının hepsinin organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma kabiliyetinin var olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.1: Bakterilerin $CaCO_3$ kristali oluşturma, üreaz, nitrat-nitrit indirgeme, organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yetenekleri ve *napA* ile *ureC* varlığı (+++: Güçlü, ++: İyi, +: Orta, +-: Zayıf,-:Negatif).

Kod	Tür	$CaCO_3$ Oluşturduğu Gün	Üreaz Aktivitesi	*ureC* Varlığı	Nitrat İndirgeme/ Gaz Oluşumu	*napA* Varlığı	Nitrit İndirgeme/ Gaz Oluşumu	Organik Nitrojeni Amonyağa Ayrıştırma (Amonifikasyon)
A1	*Achromobacter pestifer* strain LMG 3431 (NR_152016.1)	4	+-	+	-/-	+	-/-	+
A2	*Lelliottia amnigena* strain Lmb019 (KT986089.1) 99.2	2	+++	+	-/-	-	-/-	+-
A3	*Bacillus safensis* strain Md1-35 (MF581441.1) 98.6	8	-	-	-/-	-	-/-	+
A4	*Pseudomonas granadensis* strain PF29 (MF838687.1) 99.6	4	-	+	-/-	-	-/-	+
A5	*Serratia proteamaculans* 568 (CP000826.1) 99.4	3	-	-	+++/-	+	-/-	+
A6	*Viridibacillus arenosi* strain B-21 (KJ671467) 97.7	4	+++	+	-/-	-	-/-	+++
A7	*Staphylococcus cohnii* strain RCB1038 (KT261250.1) 99.9	-	-	-	+/-	+	-/-	+
B8	*Bacillus cereus* strain DFT-5 16S (KY750689.1) 98.0	2	-	-	-/-	-	-/-	++
B9	*Pseudomonas putida* strain Atol3T (MN560132.1) 98.5	2	-	-	-/-	-	-/-	++

Tablo 4.1. (devam): Bakterilerin $CaCO_3$ kristali oluşturma, üreaz, nitrat-nitrit indirgeme, organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yetenekleri ve *napA* ile *ureC* varlığı (+++: Güçlü, ++: İyi, +: Orta, +-: Zayıf, -:Negatif).

Kod	Tür	$CaCO_3$ Oluşturduğu Gün	Üreaz Aktivitesi	*ureC* Varlığı	Nitrat İndirgeme/ Gaz Oluşumu	*napA* Varlığı	Nitrit İndirgeme/ Gaz Oluşumu	Organik Nitrojeni Amonyağa Ayrıştırma (Amonifikasyon)
B10	*Carnobacterium maltaromaticum* strain PYCC 8218 (MN179346.1) 97.2	2	+++	+	+-/-	+	-/-	+
B11	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1) 99.0	5	+-	+	+++/-	+	-/-	++
B12	*Viridibacillus arvi* strain O27.1 (MN198089.1) 98.9	4	+++	+	-/-	-	-/-	+++
C13	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1) 99.8	5	+++	+	+++/-	+	-/-	+++
C14	*Rhodococcus erythropolis* strain I-AR-27 (KT922050.1) 97.9	1	+++	+	-/-	-	-/-	+-
C15	*Streptomyces spororaveus* strain HBUM173231 (EU841667.1) 97.5	5	-	+	-/-	+	-/-	+
C16	*Bacillus zhangzhouensis* strain D10302 (MK070088.1) 99.7	1	-	-	-/-	-	-/-	+
C17	*Achromobacter pestifer* strain LMG 3431 (NR_152016.1) 98.3	1	-	+	+/+	+	+/+	+-
C18	*Bacillus safensis* strain Rb7S3 (MH844959.1) 98.4	2	++	+	+++/-	+	-/-	+-

Tablo 4.1. (devam): Bakterilerin $CaCO_3$ kristali oluşturma, üreaz, nitrat-nitrit indirgeme, organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yetenekleri ve *napA* ile *ureC* varlığı (+++: Güçlü, ++: İyi, +: Orta, +-: Zayıf, -:Negatif).

Kod	Tür	$CaCO_3$ Oluşturduğu Gün	Üreaz Aktivitesi	*ureC* Varlığı	Nitrat İndirgeme/ Gaz Oluşumu	*napA* Varlığı	Nitrit İndirgeme/ Gaz Oluşumu	Organik Nitrojeni Amonyağa Ayrıştırma (Amonifikasyon)
C19	*Bacillus zhangzhouensis* strain D10302 (MK070088.1) 98.8	2	-	-	-/-	-	-/-	+
C20	*Pseudomonas jessenii* strain S30_BP2TU (MK883111.1) 99.0	19	-	+	++/-	+	-/-	+
C21	*Bacillus butanolivorans* strain SQ7-2 (MN235850.1) 99.5	20	-	-	-/-	+	-/-	+
C22	*Serratia proteamaculans* strain P4_BA1R (MK883049.1) 97.8	2	-	-	+++/-	+	-/-	++
C23	*Lelliottia amnigena* strain Lmb019 (KT986089.1) 99.6	7	+-	+	+/+	+	-/+	++
C24	*Pseudomonas baetica* strain S42_BP2TU (MK883123.1) 99.5	3	-	+	+/-	+	-/-	+
D25	*Bacillus zhangzhouensis* strain SML_M145 (MG937681.1) 99.7	1	-	-	+++/-	+	-/-	++
D26	*Pseudomonas stutzeri* strain KGS-8 (CP018050.1) 99.3	1	-	+	+/-	+	-/-	++
D27	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1) 99.2	7	-	-	++/-	+	-/-	+++

Tablo 4.1. (devam): Bakterilerin $CaCO_3$ kristali oluşturma, üreaz, nitrat-nitrit indirgeme, organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yetenekleri ve *napA* ile *ureC* varlığı (+++: Güçlü, ++: İyi, +: Orta, +-: Zayıf, -:Negatif).

Kod	Tür	$CaCO_3$ Oluşturduğu Gün	Üreaz Aktivitesi	*ureC* Varlığı	Nitrat İndirgeme/ Gaz Oluşumu	*napA* Varlığı	Nitrit İndirgeme/ Gaz Oluşumu	Organik Nitrojeni Amonyağa Ayrıştırma (Amonifikasyon)
D28	*Psychrobacter faecalis* strain H5 (JF710999.1) 98.0	27	-	-	+++/-	+	-/-	+
D29	*Bacillus cereus* strain ML272 (KC692201.1) 98.6	2	-	-	++/-	+	-/-	++
D30	*Pseudomonas baetica* strain S42_BP2TU (MK883123.1) 99.8	6	-	+	-/-	+	-/-	++
E31	*Stenotrophomonas rhizophila* strain WWv256 (MH396739.1) 98.6	1	-	-	-/-	-	-/-	+++
E32	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1) 99.3	6	+++	+	+++/-	+	-/-	+++
E33	*Bacillus mycoides* strain TS27 (MN710449.1) 99.4	6	-	-	+++/-	+	-/-	+++
E34	*Serratia quinivorans* strain D73_SO3R (MK883176.1) 98.8	3	-	-	+++/-	+	-/-	+
E35	*Phyllobacterium ifriqiyense* strain WTB32 (MK240448.1) 97.0	13	+++	+	-/-	-	-/-	+
E36	*Serratia proteamaculans* 568 (CP000826) 97.5	4	-	-	+++/-	+	-/-	++

Tablo 4.1. (devam): Bakterilerin $CaCO_3$ kristali oluşturma, üreaz, nitrat-nitrit indirgeme, organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yetenekleri ve napA ile ureC varlığı (+++: Güçlü, ++: İyi, +: Orta, +-: Zayıf, -:Negatif).

Kod	Tür	$CaCO_3$ Oluşturduğu Gün	Üreaz Aktivitesi	*ureC* Varlığı	Nitrat İndirgeme/ Gaz Oluşumu	*napA* Varlığı	Nitrit İndirgeme/ Gaz Oluşumu	Organik Nitrojeni Amonyağa Ayrıştırma (Amonifikasyon)
E37	*Phyllobacterium zundukense* strain WTB7 (MK240435.1) 98.4	4	+++	+	+-/-	+	-/-	++
E38	*Stenotrophomonas rhizophila* strain D81_CV1R (MK883184.1) 97.0	4	+++	+	-/-	+	-/-	+
E39	*Stenotrophomonas maltophilia* strain 262XG5 (KF818624.1) 98.8	1	-	-	+/-	+	-/-	++
E40	*Janthinobacterium lividum* strain V3 (KU144682) 99.1	9	-	+	-/-	-	-/-	+
F41	*Serratia quinivorans* strain D73_SO3R (MK883176.1) 99.3	3	-	+	++/-	+	-/-	+
F42	*Pseudomonas koreensis* strain NFSSTR-2 (MF079350.1) 98.8	1	-	+	-/-	+	-/-	+
F43	*Pseudomonas reinekei* strain LN32 (KC790246.1) 98.5	10	-	+	-/-	+	-/-	++
SP	*Sporosarcina pasteurii*	Üreme yok	+++	+	-/-	-	-/-	-

4.2. GEOPOLİMER HARCIN MAĞARA BAKTERİLERİYLE İYİLEŞTİRİLMESİ

4.2.1. Yüksek Dayanımlı Serilerin Belirlenmesi

7 farklı orana sahip seriler arasından dayanımı yüksek olan ilk iki serinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla serilerin üretiminden 28 gün sonra basınç dayanımı ve eğilme dayanımı testi yapılmıştır.

4.2.1.1. Basınç Dayanımları

7 farklı serinin üretiminden 28 gün sonra yapılan basınç dayanımı deneyinin sonuçları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. En yüksek basınç dayanımı değeri 52,96 MPa ile 25C75M serisi olmuştur. 49 MPa değeri ile C serisi en yüksek ikinci basınç dayanımını veren seri olarak belirlenmiştir. F sınıfı yerine C sınıfı uçucu kül kullanıldığından metakaoline kıyasla C sınıfı uçucu kül içeren seriler daha düşük dayanım değeri vermiştir.

Tablo 4.2: 7 farklı içeriğe sahip numunelerin basınç dayanımı sonuçları.

Seri Kodu	Karışım Oranları	Ortalama Dayanım (MPa)
C	%100 cüruf	49,00
75C25M	%75 cüruf + %25 metakaolin	31,35
75C25U	%75 cüruf + %25uçucu kül	29,17
50C50M	%50 cüruf + %50 metakaolin	41,26
50C50U	%50 cüruf + %50 uçucu kül	19,67
25C75M	%25 cüruf + %75 metakaolin	52,96
25C75M	%25 cüruf + %75 uçucu kül	15,62

4.2.1.2. Eğilme Dayanımları

7 farklı serinin üretiminden 28 gün sonra yapılan eğilme dayanımı deneyinin sonuçları Tablo 4.3'te belirtilmiştir. Basınç dayanımı deneyinde olduğu gibi 25C75M serisi 10,27 MPa ile en yüksek eğilme dayanımı değerini veren seri olmuştur. Bu sonucu 9,66 MPa değeriyle C serisi izlemiştir.

Tablo 4.3: 7 farklı içeriğe sahip numunelerin eğilme dayanımı sonuçları.

Seri Kodu	Karışım Oranları	Ortalama Dayanım (MPa)
C	%100 cüruf	9,66
75C25M	%75 cüruf + %25 metakaolin	5,82
75C25U	%75 cüruf + %25uçucu kül	5,07
50C50M	%50 cüruf + %50 metakaolin	8,06
50C50U	%50 cüruf + %50 uçucu kül	2,71
25C75M	%25 cüruf + %75 metakaolin	10,27
25C75M	%25 cüruf + %75 uçucu kül	3,50

Basınç dayanımı ve eğilme dayanımı sonuçları baz alınarak bakteri içeren iyileştirme çalışması için 25C75M ve C serileri, bakteri içermeyen iyileştirme çalışması için en yüksek dayanımları veren 25C75M ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.2.2. Bakteri İçeren Gepolimer Harç Serilerinin Dayanımları

Basınç ve eğilme dayanımları sonuçlarına göre en yüksek iki dayanımı veren C ve 75M25C serileri, 12 bakteri ilave edilerek ve bakteri içermeyen kontrol serileri ile üçer küp ve üçer prizma olacak şekilde üretilmiştir. 28 gün sonunda bakterilerin beton dayanımları ve su emme üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

4.2.2.1. Basınç Dayanımları

12 farklı bakterili serilerin ve kontrol serisinin küp numunelerine ait basınç dayanım sonuçları Tablo 4.4'te belirtilmiştir. Deney sonuçları her seriye ait üçer küp numunenin ortalamasını yansıtmaktadır. 75M25C serisinde B12 kodlu bakteriyi içeren numuneler kontrol numunelerine göre artış göstermiştir. C serisinde ise C13, C14, C15, C17, D25, E31, E34, E36 ve SP numuneleri kontrol numunelerine kıyasla artış göstermiştir.

Tablo 4.4: 75M25 ve C serilerine ait basınç dayanımları.

Kod	75M25C	C
	Ortalama (MPa)	Ortalama (MPa)
K	54,37	49,55
B12	54,8	43,73
C13	51,21	51,12
C14	52,66	51,07
C15	49,99	51,10
C17	45,34	51,28
C18	51,03	47,05
D25	48,27	51,24
E31	48,20	50,51
E34	43,75	52,82
E36	43,97	49,78
F42	38,16	49,12
SP	44,93	50,75

4.2.2.2. Eğilme Dayanımı

12 farklı bakterili seri ve kontrol serisinin prizma numunelerine ait basınç dayanım sonuçları Tablo 4.5'te belirtilmiştir. Deney sonuçları her seriye ait bir prizma numunenin değerini yansıtmaktadır. C serisinin B12, C13, C14 kodlu bakterileri içeren numuneleri kontrole göre artış göstermiştir. 75M25C serisinde kontrol numunesine kıyasla artış gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.5: 75M25 ve C serilerine ait eğilme dayanımları.

Kod	75M25C	C
	Ortalama (MPa)	Ortalama (MPa)
K	9,140	9,835
B12	7,56	10,123
C13	6,32	10,619
C14	7,85	10,480
C15	7,37	9,607
C17	8,09	9,240
C18	6,33	9,587
D25	7,24	9,061

Tablo 4.5 (devam): 75M25 ve C serilerine ait eğilme dayanımları.

E31	7,07	9,577
E34	8,10	8,962
E36	6,46	9,677
F42	6,96	9,587
SP	6,60	9,557

4.2.2.3. Ağırlıkça Su Emme

75M25C ve C serilerinin 12 farklı bakterili ve kontrol prizma numunelerine ait basınç dayanım sonuçları Tablo 4.6'da belirtilmiştir. Deney sonuçları her seriye ait ikişer prizma numunelerinin yüzdesel olarak hesaplanmış halini yansıtmaktadır. 75M25C ve C serilerinde kontrol numunelerine göre daha az su emme gerçekleşen numune C15 izolatını içeren numuneler olmuştur.

Tablo 4.6: 75M25 ve C serilerine ait ağırlıkça su emme yüzdeleri.

Kod	**75M25C**	**C**
	Su Emme Oranı (%)	**Su Emme Oranı (%)**
K	2,12	1,92
B12	1,84	1,67
C13	1,62	1,47
C14	2	1,81
C15	2,24	2,03
C17	1,80	1,63
C18	1,62	1,47
D25	1,47	1,33
E31	2,11	1,91
E34	2,04	1,85
E36	1,40	1,27
F42	2,04	1,85
SP	1,82	1,65

4.2.3. Bakteri İçermeyen Geopolimer Harcın Bakterilerle İyileştirilmesi

4.2.3.1. Betonların Çatlak Boyutlarının Ölçülmesi

Numunelerin çatlak genişlikleri 0,06 ile 0,126 mm arasında değişmektedir. Tablo 4.7'de her bakteri için kullanılan harç numunesine ait iki tekrarın ortalama çatlak genişlikleri verilmiştir.

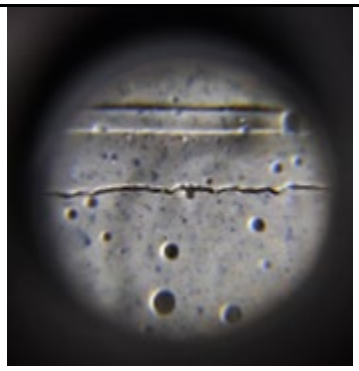
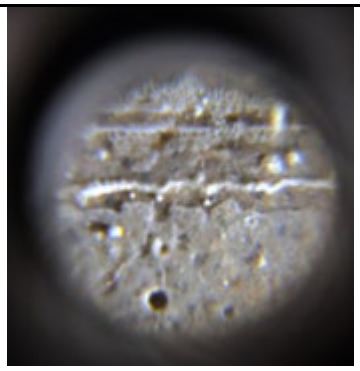
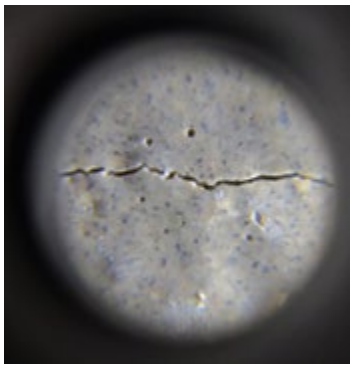
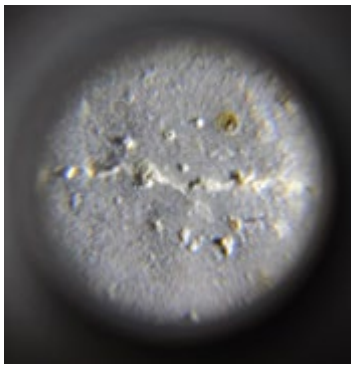
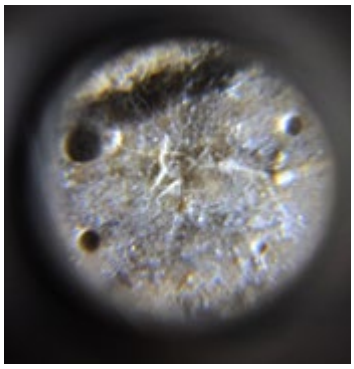
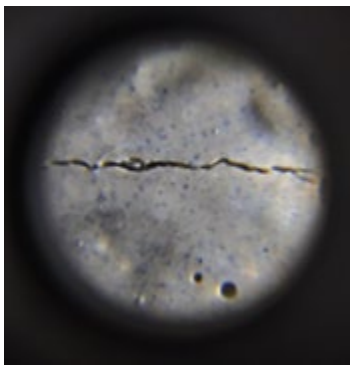
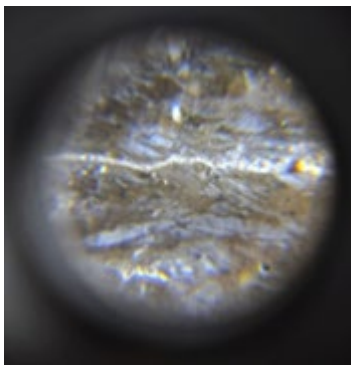
Tablo 4.7: Numunelere ait çatlak genişlikleri.

Numune Kodu	Çatlak Genişliği (mm)
B12 (1)	0,053
B12 (2)	0,066
C14 (1)	0,093
C14 (2)	0,060
C15 (1)	0,066
C15 (2)	0,080
C17 (1)	0,073
C17 (2)	0,066
D25 (1)	0,086
D25 (2)	0,066
SP (1)	0,106
SP (2)	0,1
K8 (Besiyeri + kalsiyum çözeltisi)	0,126
K16 (Besiyeri + kalsiyum çözeltisi)	0,133
K10 (Besiyeri)	0,093
K11 (Besiyeri)	0,133

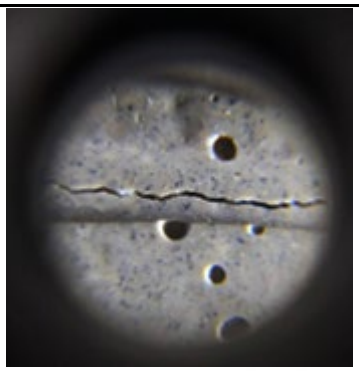
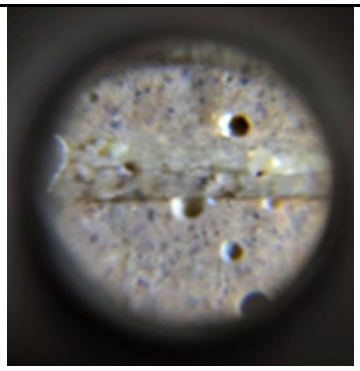
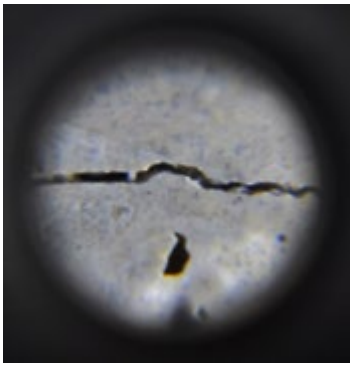
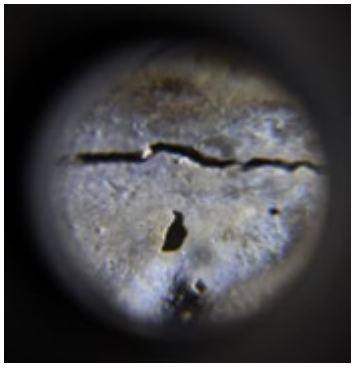
4.2.3.2. Betonların Çatlak İyileştirilmesinin Görüntülenmesi ve İyileşme Süreleri

Her gün enjeksiyon yapılarak iyileşmesi sağlanan numunelerde 21 günle en hızlı kapanmayı sağlayan bakteriler B12 ve C15 olmuştur. C17 ve D25 28 günde çatlakların kapanmasını sağlarken C14 49 gün, SP 63 günde iyileşmeyi tamamlamıştır. Kontrol numunelerinde ise herhangi bir iyileşme gözlemlenmemiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Numunelerin çatlak iyileşme süreleri.

Kod	İyileşme Öncesi	İyileşme Sonrası	İyileşmenin Tamamlanma Günü
B12			21 gün
C14			49 gün
C15			21 gün
C17			28 gün

Tablo 4.8 (devam): Numunelerin çatlak iyileşme süreleri.

Kod	İyileşme Öncesi	İyileşme Sonrası	İyileşmenin Tamamlanma Günü
D25			28 gün
SP			63 gün
K8 (Besiyeri + kalsiyum çözeltisi)			-
K10 (besiyeri)			-

4.2.3.3. Su Emme ve Eğilme Dayanımı Deneyleri

İyileşmenin tamamlanmasının ardından numunelere su emme ve eğilme dayanımı deneyleri yapılmıştır. Su emme deneyinde kontrol numunelerine göre en iyi sonucu SP ve D25 kodlu bakteriler vermiştir (Tablo 4.9). Eğilme dayanımında ise C17 ve C14 kodlu bakteriler kontrol numunelerine göre en iyi artışı göstermiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.9: Bakterilerle iyileştirilen çatlaklara ait numunelerin su emme yüzdeleri.

Kod	Su Emme Oranı (%)
K8 (Besiyeri + kalsiyum çözeltisi)	5,75
K16 (Besiyeri + kalsiyum çözeltisi)	5,44
K10 (Besiyeri)	6,06
K11 (Besiyeri)	5,98
B12	1,64
C14	3,46
C15	2,70
C17	4,6
D25	1,58
SP	0,81

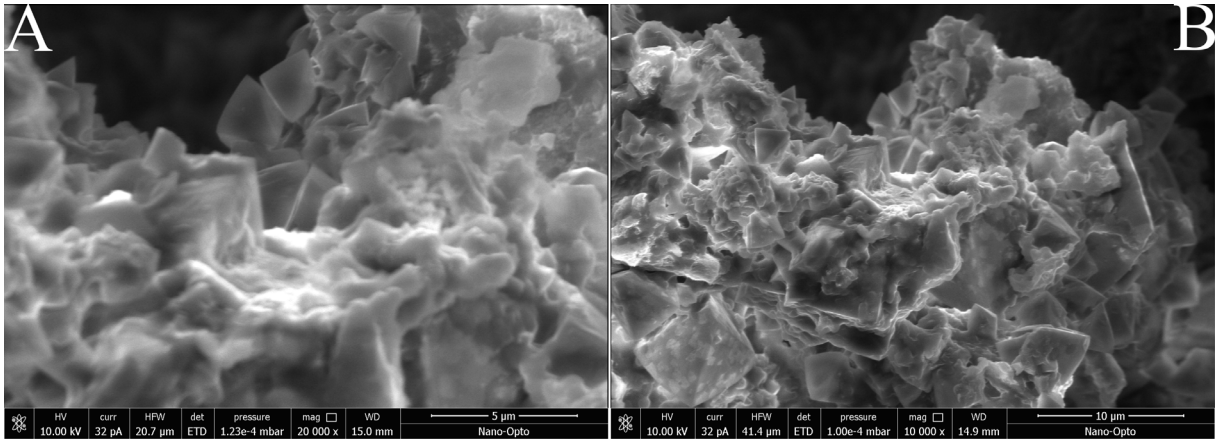
Tablo 4.10: Bakterilerle iyileştirilen çatlaklara ait numunelerin eğilme dayanımları.

Kod	Eğilme Dayanımı (MPa)
K8 (Besiyeri + kalsiyum çözeltisi)	0,58
K16 (Besiyeri + kalsiyum çözeltisi)	0,69
K10 (Besiyeri)	0,90
K11 (Besiyeri)	0,83
B12	1,04
C14	1,47
C15	1,17
C17	1,55
D25	1,41
SP	0,64

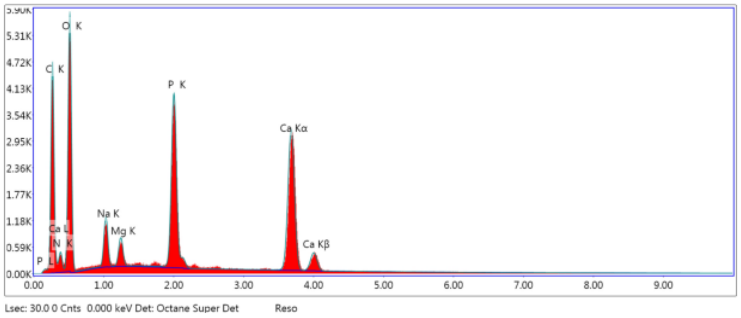
4.2.3.4. İyileşme Sonrası Numune Çatlaklarına Ait SEM-EDS Analizleri

İyileşmiş ve iyileşmemiş numunelerin çatlaklarından alınan örneklere mikro yapısının incelenmesi amacıyla SEM ve EDS analizleri yapılmıştır. SEM görüntüleri her numune için 5000x, 10000x, 20000x ölçeklerde alınmıştır. K8 ve K10 kontrol numuneleri hariç bakterilerle iyileştirme yapılan numunelerin SEM analizlerinde boşluklu yapının bulunmadığı gözlemlenmiştir.

EDS analizlerine göre K8 ve K10 kodlu kontrollere kıyasla bakterilerle iyileştirme yapılan numunelerde kalsiyum, oksijen ve karbon atomlarının miktarı daha fazla bulunmuştur. K8 ve K10 kontrol numunelerinde harç içeriğinde bulunan silisyum, alüminyum, sodyum gibi elementlerin baskın olduğu tespit edilmiştir. SEM analizlerinde boşluklu yapının kontrollere göre bulunmaması ve EDS analizinin sonuçlarına bağlı olarak çatlak kapanmalarının bakteri bazlı olduğunu düşündürmektedir.



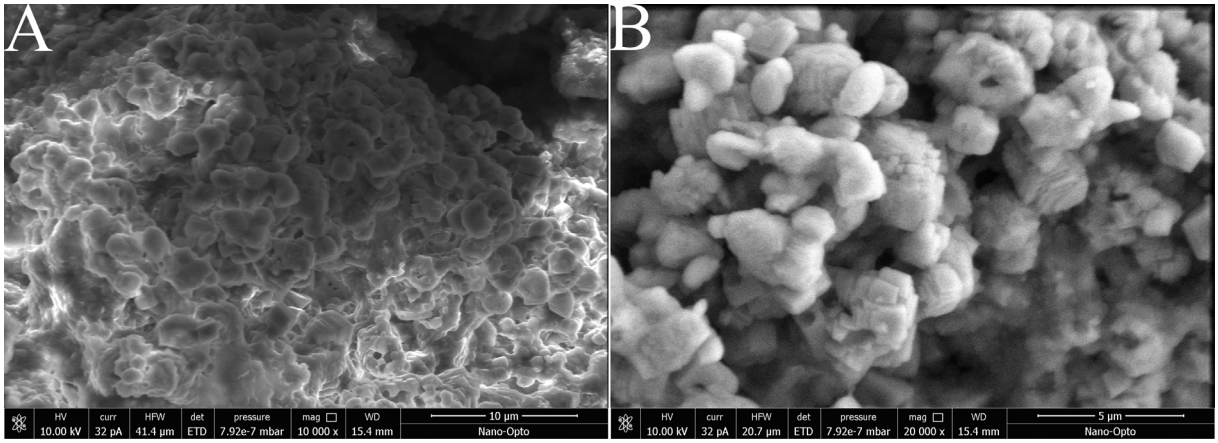
Şekil 4.1: C14'e ait SEM görüntüleri. A: 20000x B: 10000x



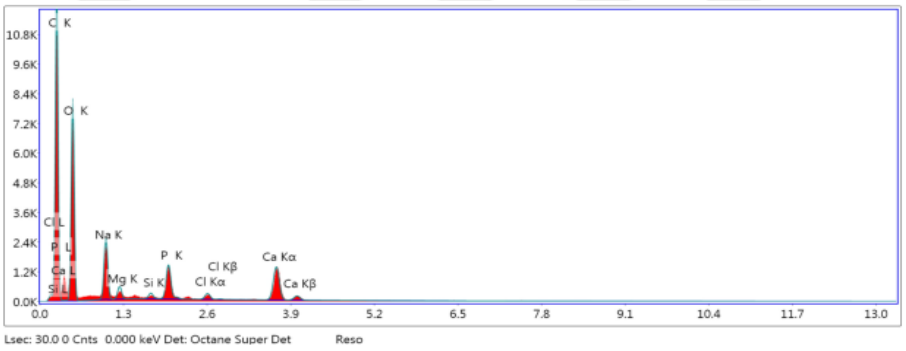
eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	27.8	38.82	1515.99	8.32	0.1016884	1.072549		0.3407495	1.000909	
N K	7.19	8.61	135.04	12.85	0.009639398	1.045093		0.1280427	1.001742	
O K	36.52	38.28	2167.08	9.61	0.07446301	1.021263		0.199605	1.000435	
NaK	3.16	2.31	507.47	7.64	0.01417986	0.9224323		0.48494	1.002764	
MgK	1.22	0.84	314.49	6.92	0.00721371	0.9367484		0.6264377	1.004731	
P K	8.5	4.6	2248.88	2.69	0.06925335	0.8818766		0.9143401	1.010529	
CaK	15.61	6.53	2329.88	2.09	0.1343298	0.8614947		0.9990955	1	

Şekil 4.2: C14'e ait EDS analizi.



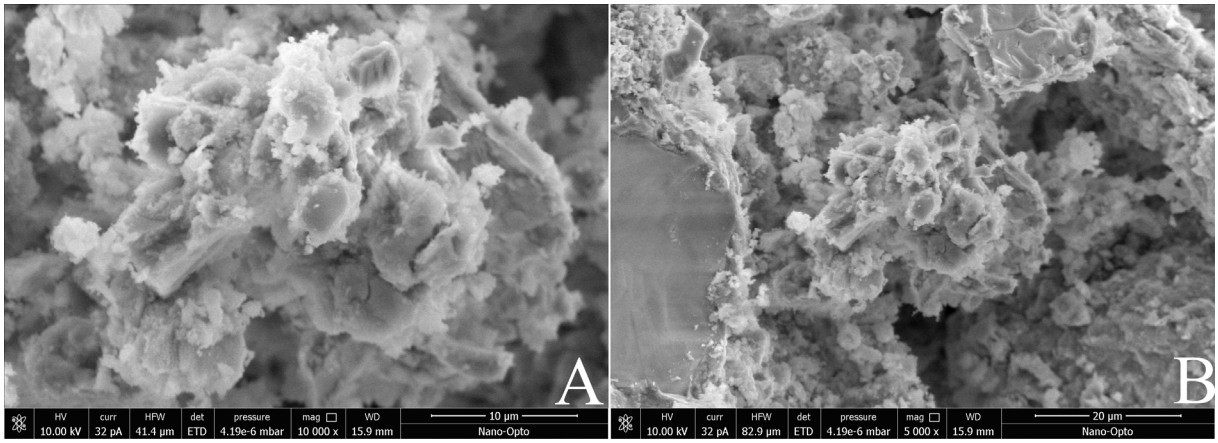
Şekil 4.3: C15'e ait SEM görüntüleri. A: 10000x B: 20000x



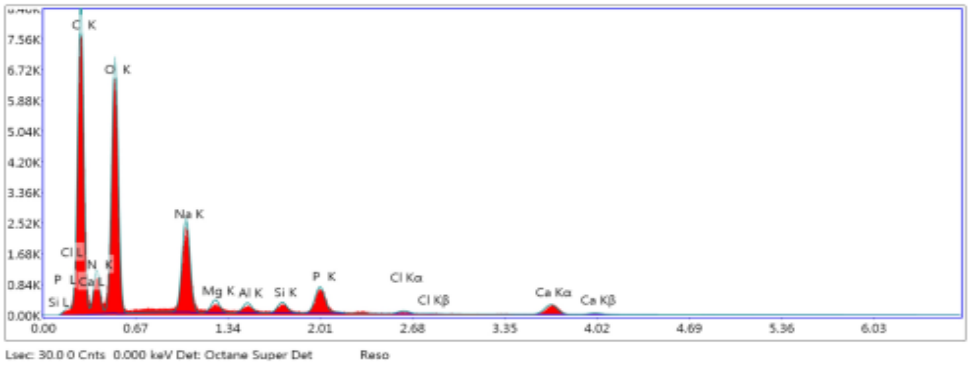
eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	49.35	58.8	4107.94	6.79	0.2241411	1.033196		0.4392228	1.000968	
O K	39.7	35.51	3041.17	9.47	0.06951465	0.9876315		0.1772644	1.000367	
NaK	5.28	3.29	1148.82	7.77	0.01809234	0.896043		0.3822287	1.000844	
MgK	0.67	0.4	249.68	7.9	0.003111173	0.9110604		0.5083546	1.001237	
SiK	0.23	0.12	126.2	7.93	0.001600351	0.8961105		0.7865134	1.003714	
P K	1.61	0.74	800.05	3.15	0.01218018	0.86051		0.8781375	1.003015	
ClK	0.33	0.13	158.34	8.66	0.002657354	0.8343467		0.96855	1.007038	
CaK	2.84	1.02	995.74	2.25	0.02451093	0.8450489		1.02023	1	

Şekil 4.4: C15'e ait EDS analizi.



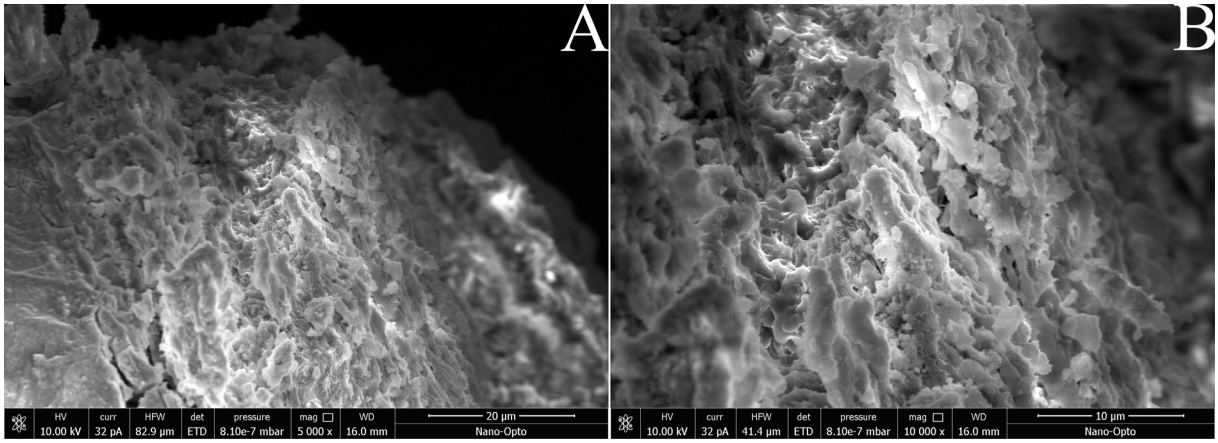
Şekil 4.5: C17'ye ait SEM görüntüleri. A: 10000x B: 5000x



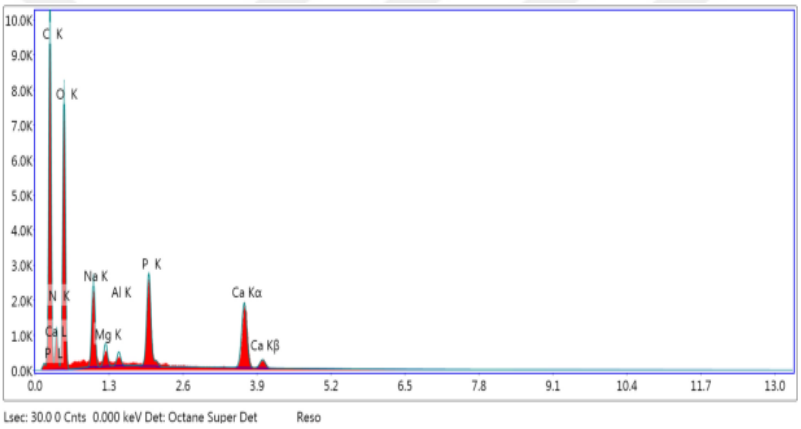
eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	35.68	44.69	2831.48	6.75	0.2022466	1.056348		0.5360222	1.001035	
N K	13.53	14.53	422.4	10.25	0.03710365	1.024539		0.2672512	1.00173	
O K	32.77	30.82	2639.59	8.44	0.1219761	0.997281		0.3729595	1.000529	
NaK	8.36	5.47	1180.14	5.45	0.05317185	0.8926197		0.7112701	1.001315	
MgK	0.9	0.56	164.93	6.66	0.006387342	0.9042403		0.785147	1.00209	
AlK	0.75	0.42	135.53	6.5	0.005640083	0.8675391		0.866904	1.003307	
SiK	0.9	0.48	159.34	6.25	0.00732198	0.8834885		0.9211659	1.004959	
P K	3.08	1.5	419.14	3.97	0.02495018	0.8457427		0.9549406	1.00286	
ClK	0.5	0.21	52.74	12.74	0.004039215	0.8149747		0.9856135	1.006844	
CaK	3.54	1.33	195.82	5.91	0.02903275	0.8166981		1.004187	1	

Şekil 4.6: C17'ye ait EDS analizi.



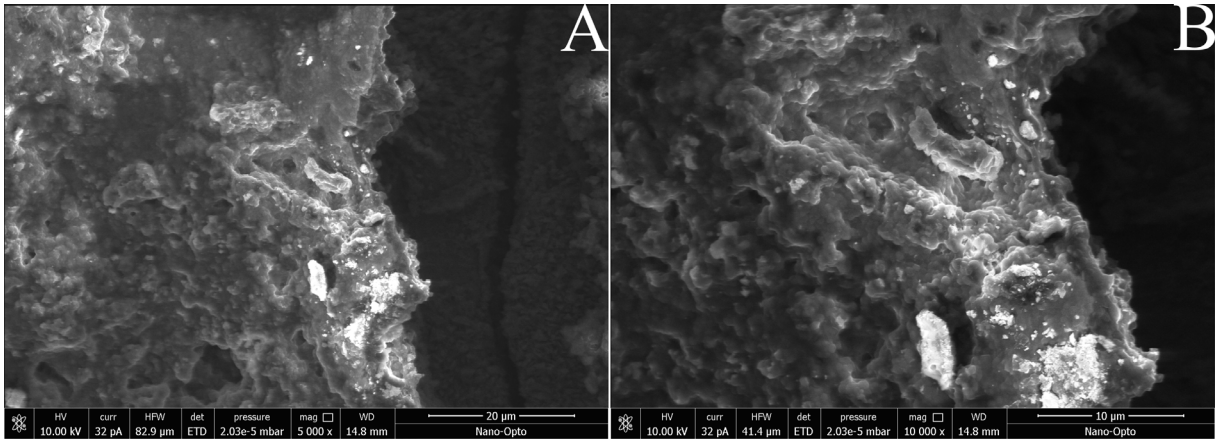
Şekil 4.7: D25'e ait SEM görüntüleri. A: 5000x B: 10000x



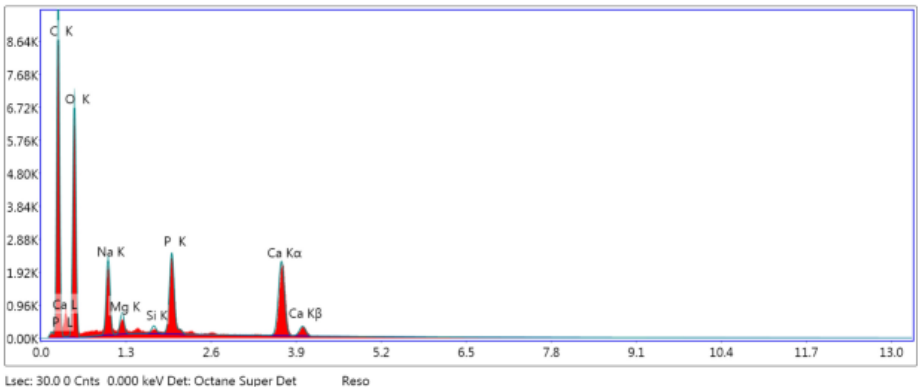
eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	36.74	44.81	3554.75	7.05	0.1588493	1.036999		0.4164181	1.001208	
N K	14.13	14.78	419.86	10.81	0.0177106	1.012586		0.123544	1.001954	
O K	37.55	34.38	3082.71	9.69	0.0577095	0.9913861		0.1549678	1.000349	
NaK	4.7	3	1213.53	7.88	0.01565203	0.8995419		0.3694856	1.001049	
MgK	0.74	0.44	331.56	7.63	0.003383589	0.91464		0.5007349	1.001601	
AlK	0.36	0.19	202.69	7.31	0.002056	0.8805479		0.6506659	1.002618	
P K	2.56	1.21	1551.6	2.89	0.01934621	0.8639324		0.8723769	1.00277	
CaK	3.23	1.18	1381.45	2.05	0.02785024	0.848439		1.017448	1	

Şekil 4.8: D25'e ait EDS analizi.



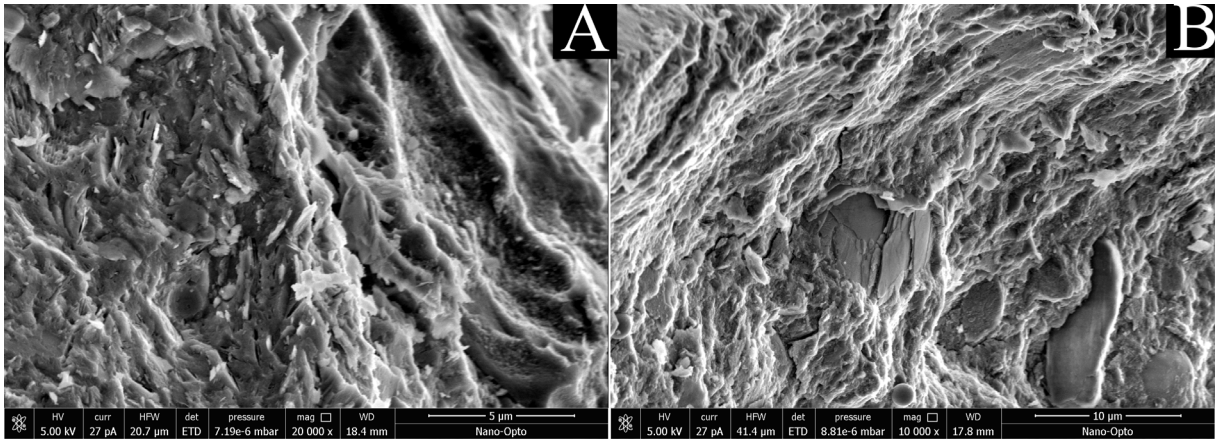
Şekil 4.9: B12'ye ait SEM görüntüleri. A: 5000x B: 10000x



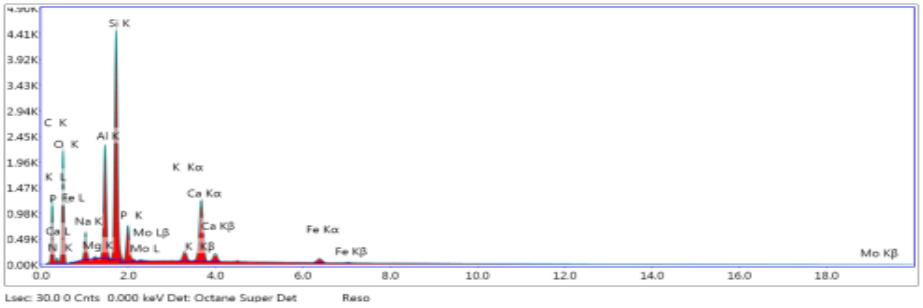
eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	46.68	57.02	3341.32	7.16	0.1969677	1.038308		0.4059572	1.000933	
O K	38.94	35.71	2695.65	9.55	0.06656991	0.9927747		0.1720999	1.000412	
NaK	5.28	3.37	1063.08	7.82	0.01808783	0.9009309		0.3796878	1.001281	
MgK	0.91	0.55	312.73	7.61	0.004210099	0.9160892		0.5053101	1.001944	
SiK	0.24	0.13	123.73	8.45	0.00169515	0.9011514		0.7807804	1.005988	
P K	2.96	1.4	1366.57	2.95	0.02247742	0.8653886		0.8731493	1.004231	
CaK	4.99	1.83	1621.96	1.95	0.04313556	0.8499767		1.016054	1	

Şekil 4.10: B12'ye ait EDS analizi.



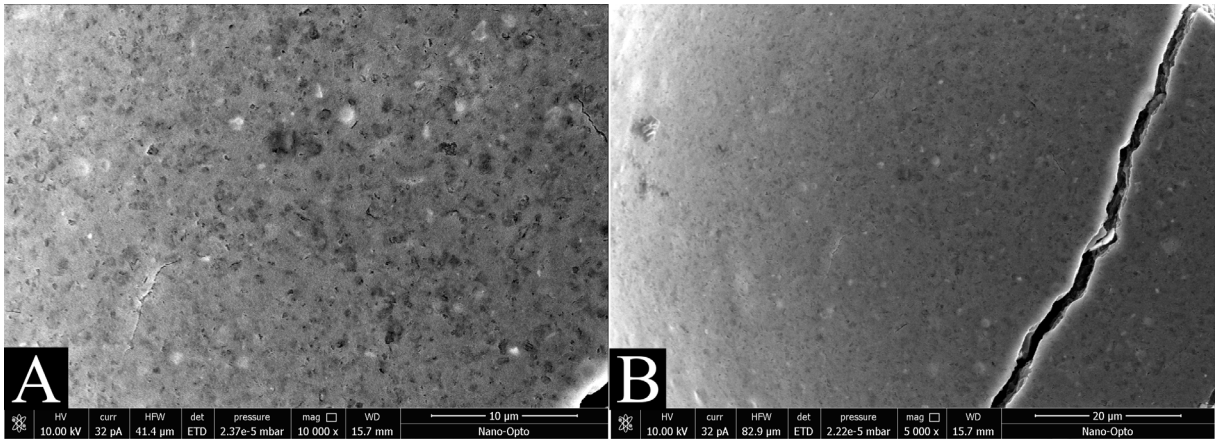
Şekil 4.11: SP'ye ait SEM görüntüleri. A: 20000x B: 10000x



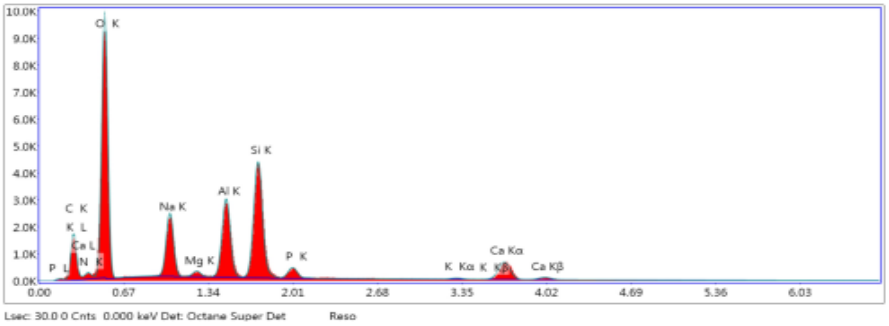
eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	32.01	42.55	418.5	9.29	0.08050527	1.045322		0.2403751	1.00105	
N K	5.2	5.93	34.89	15.68	0.005591831	1.0252		0.1046394	1.002279	
O K	37.47	37.39	835.43	9.92	0.05282643	1.007519		0.139843	1.000686	
NaK	3.8	2.64	261.12	10.13	0.008511596	0.9223449		0.2416361	1.004071	
MgK	0.19	0.12	26.03	27.26	0.0006287642	0.9400824		0.3487752	1.007552	
AlK	5.54	3.28	1127.93	6.37	0.02555951	0.9070345		0.5040952	1.008329	
SiK	9.7	5.51	2376.49	5.29	0.05236606	0.9286115		0.5796274	1.002848	
P K	1.75	0.9	360.92	6.64	0.009104225	0.8934275		0.5818177	1.002337	
MoL	0.02	0	2.1	58.78	0.0001175588	0.7339271		0.981446	1.010034	
K K	0.46	0.19	130.36	9.44	0.00378253	0.8676757		0.9256732	1.013124	
CaK	3.37	1.34	850.98	2.23	0.02867102	0.8848098		0.961792	1.000786	

Şekil 4.12: SP'ye ait EDS analizi.



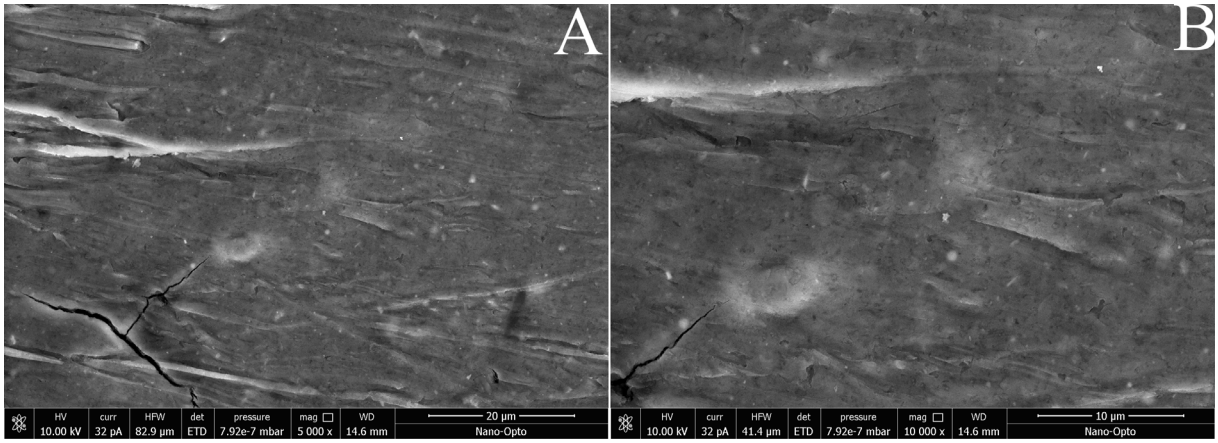
Şekil 4.13: K8'e ait SEM görüntüleri. A: 10000x B: 5000x



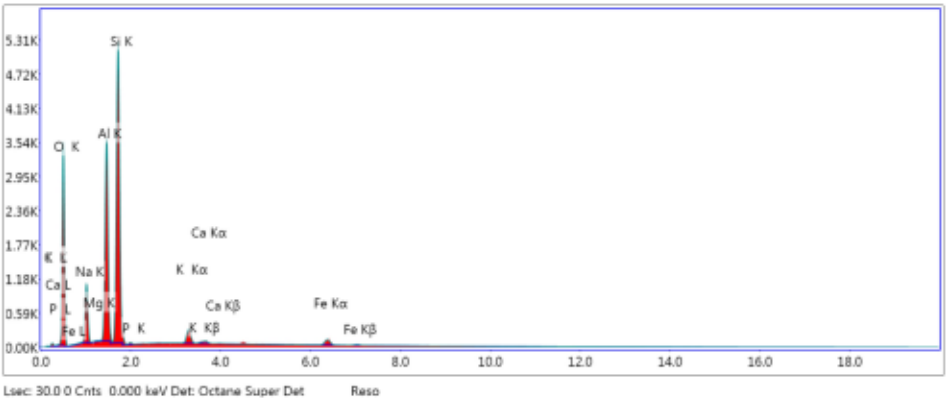
eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	13.07	20.49	542.26	9.67	0.04402645	1.111267		0.3028986	1.001051	
N K	2.11	2.84	65.25	13.47	0.006514839	1.078676		0.2851132	1.002658	
O K	40.24	47.37	3718.27	7.5	0.1953076	1.050584		0.4615284	1.000921	
NaK	8.32	6.82	1085.12	5.58	0.05557325	0.9414718		0.705837	1.005036	
MgK	0.57	0.44	97.25	9.86	0.004280956	0.9540166		0.7790395	1.009517	
AlK	8.89	6.21	1499.2	4.05	0.07091555	0.9155332		0.8622742	1.010288	
SiK	14.81	9.93	2346.64	3.7	0.1225697	0.9325784		0.8847353	1.003365	
P K	1.95	1.18	226.86	7.7	0.01534996	0.8929223		0.8804847	1.003726	
K K	0.43	0.21	29.34	22.43	0.003713378	0.8509319		0.9820997	1.031028	
CaK	9.62	4.52	487.68	4.6	0.08218901	0.8631771		0.9901423	1	

Şekil 4.14: K8'e ait EDS analizi.



Şekil 4.15: K10'a ait SEM görüntüleri. A: 5000x B: 10000x



eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F	KABFactor
C K	3	4.97	14.67	19.98	0.004531072	1.080772		0.1395204	1.001687	
O K	46.39	57.74	1305.58	8.44	0.1325741	1.042839		0.2735834	1.001573	
NaK	9.86	8.54	475.81	9.18	0.02490667	0.9556769		0.2622494	1.007656	
MgK	0.16	0.13	12.7	50.84	0.0004924753	0.9743169		0.3194521	1.013953	
AlK	15.03	11.1	1811.11	6.58	0.06590664	0.9402815		0.4605055	1.012336	
SiK	23.21	16.46	2794.06	6.62	0.09886912	0.962839		0.4421808	1.000502	
P K	0.1	0.07	8.93	64.45	0.000361726	0.9265167		0.3783592	1.000712	
K K	1.1	0.56	168.98	10.04	0.007873478	0.900246		0.7975856	1.001265	
CaK	0.21	0.1	30.42	23.99	0.001645839	0.9181027		0.8529127	1.001155	
FeK	0.94	0.33	92.84	11.36	0.00781574	0.827338		1.006103	1	

Şekil 4.16: K10'a ait EDS analizi.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrobiyal olarak indüklenen kalsiyum karbonat çökelmesi (MICP) yeryüzünün birçok farklı bölgesinde meydana gelmektedir. MICP yeteneği bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi, mekanizmaları ve MICP'ı etkileyen faktörler gibi konularda çok sayıda çalışma yapılmıştır (Frankel ve Bazylinski, 2003; Anbu ve diğ., 2016). Bu çalışmaların ardından MICP, doğadan ilham alınarak ağır metal giderimi, karbondioksitin ayrıştırılması, kalsiyumca zengin endüstriyel atıklardan kalsiyum uzaklaştırılması ve inşaat malzemelerinin iyileştirilmesi gibi sorunların çözümünde kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Torres-Aravena ve diğ., 2018; Yamasaki, 2003; Czaplicka ve Konopacka-Łyskawa, 2020; Whiffin ve diğ., 2007).

MICP temel olarak üre hidrolizi, denitrifikasyon, amonifikasyon, metan oksidasyonu, sülfat indirgenmesi, fotosentez mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir (Bhutange ve Latkar, 2020). MICP ile gerçekleştirilen biyoteknolojik çalışmaların çoğu üre hidrolizi yolağına odaklanmıştır (Xu ve diğ., 2018). Çalışmamızda Dupnisa Mağarası'ndan izole edilmiş bakterilere üre hidrolizi yolağı için üreaz aktiviteleri, aerobik denitrifikasyon için nitrat ve nitrit indirgeme yetenekleri, amonifikasyon için organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma potansiyellerini belirlemek için biyokimyasal testler yapılmıştır. Biyokimyasal testlerin yanında üreaz aktivitesi için *ureC* ve aerobik denitrifikasyon için *napA* genlerini bulundurup bulundurmamalarına da bakılmıştır. Böylece bakterilerin metabolik olarak negatif olsa bile ilgili yolakta etkili olan genlere sahip olup olmama durumları incelenmiştir.

43 mağara izolatından üreaz aktiviteleri yönünden pozitif olan 14 bakterinin hepsinde, negatif olan 29 bakterinin 11 tanesinde *ureC* geni varlığı tespit edilmiştir. Mağara aysütünden izole edilmiş *Streptomyces* türlerinin üreaz aktiviteleri ve üreaz yapısal alt birim proteinlerine Hidden Markov Model (HMM) profili oluşturularak bakılan bir çalışmada 31 bakterinin 16 tanesi üreaz negatif iken, genotipik bakımdan bakterilerin %90'ının tüm üreaz genlerini kodladığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar üreaz-negatif fenotip özellikteki suşların da üreaz aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Negatif fenotip gösterme sebeplerini üreaz aktivitesinin test edildiği koşulların gen ekspresyonuna elverişsiz olması veya aktiviteyi önleyen mutasyonları barındırıyor olmaları olarak açıklamışlardır (Maciejewska ve diğ., 2017).

Çalışmamızda incelediğimiz mağara izolatlarının tamamının organik nitrojeni amonyağa ayrıştırma yeteneklerinin (amonifikasyon) var olduğu belirlenmiştir. Mağaralardaki nitrojen

kaynaklarının yarasa guanosu, amberat birikintileri (mağara fare dışkısı ve idrarı), mağara yeraltı suyuna sızan organik maddeler, mağara üzerindeki organik maddelerin bakteriyel ayrışmasıyla nitrat iyonlarının salınımı ve çeşitli yollarla mağara içerisine transferi sonrası su buharlaşmasının etkisiyle nitrat birikiminin gerçekleşmesi olduğu düşünülmektedir (Northup ve Lavoie, 2001).

Beton ve harcın yüksek pH, besin azlığı, oksijen yetersizliği ve bakterilere mekanik olarak zarar verebilecek kadar az gözenekli olması gibi sebeplerden dolayı beton ve harçta kullanılacak bakteriler çeşitli yöntemlerle korunmaktadır (De Belie ve diğ., 2018). Çalışmamızda bakterilerin korunması amacıyla metakaoline emdirilmiş bakteriler geopolimer harç üretimi sırasında ilave edilmiştir. Ardından betonun kırılmaya karşı sergileyebileceği direnç yeteneğini ifade eden basınç dayanımı ve numunelerin eğilme etkisi altındaki mekanik özelliklerini gösteren eğilme dayanımı deneyleri yapılmıştır. Basınç ve eğilme dayanımı beton ve harcın dayanıklılığına dair kalitatif veri sağlamaktadır (Faulkner, 1975).

Çalışmamızda %75 metakaolin + %25 cüruf (75M25C) ve %100 cüruf (C) oranlı, içerisine bakterilerin metakaoline emdirilerek eklendiği harçlar üretilmiştir. 75M25C kodlu harçta basınç dayanımında yalnızca B12 kodlu *Viridibacillus arvi* içeren numuneler 54,8 MPa ile kontrol numunelerine göre %1,15 artış göstermiştir. Bu sonuçla B12, dört farklı *Bacillus* türü içerisinden (B12 *Viridibacillus arvi*, C14 *Bacillus mycoides,* C18 *Bacillus safensis,* D25 *Bacillus zhangzhouensis*) 75M25C kodlu harcın kontrol numunelerine kıyasla basınç dayanımında artış göstermesini sağlayan tek *Bacillus* türü olmuştur. Yapılan bir çalışmada çimento içerikli harçların herhangi bir koruma unsuru olmadan *Viridibacillus arenosii* eklenerek üretilmesinin ardından 28 gün sonunda basınç dayanımının 40,66 MPa olduğu tespit edilmiş ve kontrol numunelerine kıyasla %29 artış sağlanmıştır (Atashafrazeh, 2018). Çalışmamızdaki 54,8 MPa basınç dayanıma kıyasla yapılan çalışmada 40,66 MPa sonuç vermesinin birkaç sebebi olabilir. Atashafrazeh (2018) yaptığı çalışmada harç içerisine bakterileri herhangi bir koruma işlemi olmadan karışım suyuna direkt olarak eklemiş, harç kalsiyum laktat ilavesi ile üretilmiş ve bakteri yoğunluğu Mc Farland 1 (3×10^8 hücre/ml) standardına göre uygulanmıştır. Çalışmamızda *Viridibacillus arenosii* metakaoline emdirilerek harç üretimi sırasında bakteri canlılığını olumsuz yönde etkileyebilecek mekanik koşullar ve yüksek pH gibi durumlardan korunması amaçlanmıştır. Ayrıca kalsiyum kaynağı ilave yapılmayıp cürufun kalsiyum kaynağı görevi görmesi amaçlanmıştır. Bunun sebebi cürufun içeriğinin silika ile kalsiyumdan oluşmasıdır (Uysal ve Bahar, 2018). Ayrıca aynı çalışmada

(Atashafrazeh, 2018*) Sporosarcina pasteurii* bakterisi de uygulanmış ve basınç dayanımına etkisinin 50,28 MPa olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda *Sporosarcina pasteurii* bakterisinin 75M25C numunelerinde basınç dayanımına etkisi 44,93 MPa olarak tespit edilmiştir. Hem çalışmamızda hem de Atashafrazeh (2018) yaptığı çalışmada *Viridibacillus* türünün *Sporosarcina pasteurii* bakterisine göre basınç dayanımında daha etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

C kodlu harçta ise mağara izolatlarından E34 (*Serratia quinivorans)* %6,5, D25 (*Bacillus zhangzhouensis*) %3,5, C13 (*Bacillus mycoides*) %3,16, C17 (*Achromobacter pestifer*), C15 (*Streptomyces spororaveus*) %3,12, C14 (*Rhodococcus erythropolis*) %3,06, E31 (*Stenotrophomonas rhizophila*) %1,93, E36 (*Serratia proteamaculans)* %0,46 ve *Sporosarcina pasteurii* %2,42 ile kontrol numunelerine göre basınç dayanımında artış göstermiştir. 4 farklı türe ait *Bacillus* cinslerinde yalnızca C18 (*Bacillus safensis)* kontrol numunelerine göre artış göstermemiştir. Potansiyel izolatları bulmak için farklı coğrafi ve çevresel kaynaklardan alınan örneklerden izole edilmiş, konsantrasyonu 2.4 x 10^{10} olarak ve diyatomlu toprak ile immobilize edilerek çimentolu betona eklenen *Bacillus mycoides* bakterisi ile bir çalışma yapılmıştır (Abudoleh ve diğ., 2019). Bu çalışmada kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum laktat beton içerisine ilave edilmiş ve betonun basınç dayanımı 46,30 MPa olarak bulunmuştur (Abudoleh ve diğ., 2019). Çalışmamızda C14 kodlu *Bacillus mycoides* içeren numunelerin C kodlu harçta gösterdiği basınç dayanımı 51,12 MPa olarak bulunmuştur. Kontrol numunesine kıyasla 1,57 MPa artış sağlanmıştır. Abudoleh (2019) ise çalışmasında kontrol numunelerine kıyaslandığında 1,85 MPa artış gözlemiştir. Yapılan çalışma ile çalışmamız sonuçları arasında kontrol numunelerine kıyasla bakterili numunelerin basınç dayanımı artışında benzerlik görülmektedir. Araştırmacılar (Abudoleh ve diğ., 2019) daha yüksek bakteri konsantrasyonunun kalsiyum karbonat çökelmesinde olumlu etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca zorlu şartlara sahip bölgelerden potansiyel izolatlara ulaşabilmek için Lut Gölü (Amman, Ürdün) bölgesindeki balık göletinin çamurundan ve Lut Gölü çevresinden, Amman'daki tarım arazilerinin derin toprağından, baklagil toprağından ve Al Karak şehrindeki toprak örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. En iyi kaynağın baklagil toprağı olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan mağara izolatlarının kullanıldığı harçlardan elde edilen sonuçlar mağaraların da potansiyel izolatların kaynağı olduğunu göstermektedir.

Metakaolin gibi mineral katkı maddesi olan uçucu kül ile immobilize edilip çimentolu betona doğrudan eklenen *Bacillus subtilis* ile yapılan bir çalışmada kontrol numunelerine göre bakterili numunelerin basınç dayanımında 29,43 MPa ile %12 oranında artış gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Khaliq ve Ehsan, 2019). Literatürde bu ve bunun gibi mineral katkı maddeleriyle immobilize edilen bakterilerin vejetatif ve spor formlarının beton ve harcın basınç dayanımlarında önemli artışlara neden olduğu tespit edilmiştir (Sierra-Beltran ve diğ., 2014; Han ve diğ., 2020; Rauf ve diğ., 2020).

Erşan (2015) yaptıkları çalışmada üreolitik (*B. sphaericus)* ve denitrifiye edici (*D. nitroreducens)* bakterilerin çimento içerikli betona silisli toprak, metakaolin, granüler aktif karbon, genişletilmiş kil, ve zeolit gibi malzemelerle immobilizasyonu ile eklenmesine dayanan bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca beton içerisine üreolitik *B.sphaericus* için üre ve maya özütü, *D. nitroreducens* için kalsiyum format ve kalsiyum nitrat da eklemişlerdir (Erşan ve diğ., 2015). Silisli toprak ve metakaolinin etkisinin karşılaştırılabilir olduğu kabul edilerek *D. nitreducens* silisli toprak ile, *B. sphaericus* ise metakaolin ile test edilmiştir (Erşan ve diğ., 2015). 28 gün sonunda metakaolin ile immobilize edilmiş *B. sphaericus* içeren numunelerin kontrol numunelerine kıyasla basınç dayanımında %60 azalma görülmüştür (Erşan ve diğ., 2015). Silisli toprak ve *D. nitreducens* ile immobilize edilen numuneler 59.9 MPa basınç dayanımı, kontrol numuneleri ise 58.6 MPa değeri vermiş ve *D. nitreducens* içerikli numunelerin %2,21 artışa sebep olduğu görülmüştür (Erşan ve diğ., 2015). Bu çelişkili sonuçların sebeplerinin çökeltilen kalsiyum karbonatların kırılganlığı, farklı besin maddelerinin kullanımı ve çevresel koşullar olabileceği düşünülmüştür (Erşan ve diğ., 2015). Çalışmamızda da benzer şekilde her iki seri içinde (75M25C ve C) basınç dayanımında kontrol numunelerine kıyasla artış göstererek daha iyi sonuç veren mağara izolatlarının %30'u denitrifiye edici bakterilerdir. Bu izolatlardan D25 (*Bacillus zhangzhouensis*) %3,41, E34 (*Serratia quinivorans*) %6,6 ve E36 (*Serratia proteamaculans*) %0,50 artış göstermiştir. Bu izolatlar üreaz aktivitesi ve *ureC* geni bulunmayan ancak nitrat indirgeme ve *napA* geni bulunduran bakterilerdir. Her iki seri içinde basınç dayanımında kontrol numunelerine kıyasla artış göstererek daha iyi sonuç veren mağara izolatlarının %10'u (C14*, Rhodococcus erythropolis*) üreolitik bakterilerin oluşturduğu tespit edilmiştir. Üre aktivitesi pozitif ve *ureC* geni bulundururken, nitrat indirgeme yeteneği ve *napA* geni bakımından negatiftir. Eğilme dayanımında 75M25C kodlu seride kontrol numunelerine göre artış gösteren herhangi bir bakterili numune olmamıştır. C kodlu seride ise kontrol numunelerine göre C13 %8 (*Bacillus*

mycoides), C14 (*Rhodococcus erythropolis*) %6 ve B12 (*Viridibacillus arvi)* %3 artış göstermiştir.

Beton ve harcın uzun ömürlü olmasında basınç ve eğilme dayanımı kadar geçirgenlik de rol almaktadır. Geçirgenliğin az olmasıyla beton ve harcın zararlı gaz ve sıvıların olumsuz etkilerine maruz kalması engellenmiş olur (Dinarvand ve Rashno, 2022). Silisli toprakla *B. sphaericus* immobilize edilerek beton içeriğine eklenen bir çalışmada (Wang ve diğ., 2012) beton üretiminden sonra numunelere çatlak oluşturmuştur. Çatlak oluşturulmasının ardından numuneler iki farklı sıvıya batırılmış ve çatlak iyileştirilmesi sağlanmıştır (Wang ve diğ., 2012). İlk sıvı yalnızca su içerirken ikincisi ise üre + kalsiyum nitrat içermekteydi (Wang ve diğ., 2012). Silisli toprakla immobilize edilen *B. sphaericus* numuneleri batırıldıkları solüsyonlar fark etmeksizin kontrol numunelerine kıyasla %50 artış gerçekleşmiştir (Wang ve diğ., 2012). Çalışmamızda 75M25C kodlu ve C kodlu numuneler içinde *Bacillus* türlerinin hepsi gözeneklerin azalmasına sebep olarak su emme yüzdesini azaltmışlardır. Kontrol numunelerine göre gözenekliliği azaltarak su emme oranını düşürme yüzdeleri D25 (*Bacillus zhangzhouensis*)'de 75M25C için %65 ve C için %59, C18 (*Bacillus safensis*)'de 75M25C için %50 ve C için %45, B12 (*Viridibacillus arvi*)'de 75M25C için %28 ve C için %25 ve C13 (*Bacillus mycoides*)'de 75M25C için %12 ve C için %11 olmuştur.75M25C ve C serilerinin içerik oranları farklı olsa da her bir *Bacillus* türünün kontrol numunelerine kıyasla gösterdikleri su emme azaltma yüzdeleri birbirine çok yakındır. Wang ve diğ. (2018) yaptığı çalışmada kullandığı bakteri *B. sphaericus,* üreaz aktivitesi gösteren bir bakteriyken çalışmamızda 75M25C ve C serileri için en iyi su emme yüzdesini veren D25 (*Bacillus zhangzhouensis*) üreaz aktivitesi ve *ureC* geni bakımından negatif, nitrat indirgeme yeteneği ve *napA* geni bakımından pozitif özelliklere sahiptir.

Mağaradan izole edilen *B. subtilis,* çimento içerikli harç içerisine eklenmiş ve numunelerde oluşturulan 300 µm genişliğindeki çatlakların suya batırılarak onarılmasının amaçlandığı bir çalışma yapılmıştır (Schwantes-Cezario ve diğ., 2022). Çatlak onarımı 63 gün sonunda gerçekleşmiştir (Schwantes-Cezario ve diğ., 2022). Yapılan basınç dayanımında bakteri içermeyen kontrol numunelerine kıyasla %7 basınç dayanımı artışı gerçekleşmiştir (Schwantes-Cezario ve diğ., 2022). Benzer şekilde çalışmamızda E34 kodlu (*Serratia quinivorans)* bakteriyi içeren C oranlı harçta kontrol numunelerine kıyasla *%*6,5 basınç dayanımı artışı sağlanmıştır. Bu sonuçlar mağara izolatlarının kendi kendini iyileştiren beton ve harçlarda potansiyelinin var olduğunu göstermektedir.

Beton ve harcın kendi kendine iyileştirilme uygulamalarında MICP yeteneği bulunan bakterilerin beton ve harç matrisine direkt olarak eklenmesinin yanında, bakterilerin yüzey onarımını gerçekleştiren ajanlar olarak kullanıldığı uygulamalar da bulunmaktadır. Bu uygulamalar temelde besin, kalsiyum ve bakteri içeren solüsyonu çatlaklarla muamele ederek çatlakların onarımına dayanmaktadır. Onarım için bu iyileştirici solüsyon çatlaklara enjekte edilir, spreylenir veya numuneler aynı solüsyon içine daldırılır (Wang ve diğ., 2014; De Muynck ve diğ., 2011; Gupta ve diğ., 2017). Bu üç yöntemin uygulanarak çatlak onarımı yapıldığı bir çalışmada (Tanyıldızı ve diğ., 2022) en iyi yöntemin enjeksiyon olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamız kapsamında bakterilerin çatlaklara enjekte edilerek onarımın gerçekleştirildiği metotta literatürde kendi kendini iyileştirmede en çok kullanılan *Sporosarcina pasteurii* bakterisi ve daha önce uygulanmamış 5 mağara izolatı kullanılmıştır. 75M25C oranlı numuneler bakterisiz üretilerek 28 gün sonra 100 µm ile 53 µm genişliğinde çatlaklar oluşturulmuş ardından bakteri, kalsiyum laktat ve TSB (Tryptic Soy Broth) içerikli solüsyon çatlaklara enjekte edilmiştir. Çimento içerikli beton numunesinin Petri kabında kürlenerek hazırlandığı ve çatlak oluşturulduğu bir çalışmada *Rhodococcus erythreus* bakterisi çatlaklara enjekte edilerek çatlak onarımı gerçekleştirilmiştir (Choi ve diğ., 2021). Çatlak kapanması 6 günde tamamlanmıştır (Choi ve diğ., 2021). Çalışmamızda aynı türdeki C14 kodlu *Rhodococcus erythropolis* ise geopolimer harçtaki çatlağı 49 günde kapatmıştır. Metabolik olarak üreaz aktivitesi pozitiftir ve nitrat indirgemesi için hem fenotipik hem *napA* geni bulundurması bakımından ise negatiftir. Çalışmamıza kıyasla Choi ve diğ. (2021) yaptıkları çalışmada çatlakların daha kısa sürede kapanmasının sebebinin harcın demir kalıplara değil Petri kabına eklenmesinden ve çalışmamızdan farklı olarak çimento kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bacillus pseudofirmus ile yapılan bir çalışmada Portland uçucu kül çimentosunda oluşturulan çatlaklara bakteri içeren kalsiyum asetat, maya özütü ve glikoz solüsyonu her gün enjekte edilmiştir (Sharma ve diğ., 2017). 120 µm genişlikteki çatlaklar 8 günde kapanmıştır (Sharma ve diğ., 2017). Çalışmamızda D25 kodlu *Bacillus zhangzhouensis* 28 günde 86 µm genişlikteki çatlağı onarmıştır. Bu onarım zamanı farkı çatlak genişliğinden ve harç içeriğinden kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamızda D25'e ait su emme oranı kontrol numunelerine göre %75 azalmıştır. Eğilme dayanımında ise kontrol numunelerine göre yaklaşık 2,5 katlık bir artış olmuştur.

C17 kodlu *Achromobacter pestifer* ile 73 µm genişliğindeki çatlaklar 28 günde onarılmıştır. Bu onarımın harcın mekanik özelliklerine etkisi ise su emme oranı için kontrol numunelerine göre 1,25 katlık bir azalış, eğilme dayanımı içinse 2,5 kattan biraz fazla artış şeklindedir. Araştırmalarımız doğrultusunda *Achromobacter* cinsi bakterilerle kendi kendine iyileştirme çalışmasına rastlanılmamıştır.

B12 kodlu *Viridibacillus arvi* 66 µm genişliğindeki çatlakları 21 günde onararak en hızlı çatlak onarımı gerçekleştiren iki bakteriden biridir. Bu onarımın kontrol numunelerine göre su emme üzerindeki etkisi kontrollere göre 3,5 kat daha az su emmesiyle sonuçlanmıştır. Eğilme dayanımı içinse kontrol numunelerine göre az bir artış gerçekleşmiştir. Üre ve nitrat indirgeme bakımından metabolik olarak negatif olan bu izolat, iki yolağa ait *ureC* ve *napA* genlerini bulundurmaktadır. En hızlı çatlak onarımını gerçekleştiren ikinci bakteri ise C15 kodlu *Streptomyces spororaveus* olmuştur. *Streptomyces* türleri zorunlu aeroblar olmasına rağmen, genetik olarak sınırlı oksijenli koşullar altında hayatta kalma yeteneğine sahiptirler ve anaerobik paradoks olarak adlandırılan anaerobik solunumla ilgili genleri kodlarlar (Maciejewska ve diğ., 2017). Çatlak derinliklerinde oksijen miktarı azaldığından bakterinin bu özelliğiyle hayatta kalma şansı fazladır. Buna bağlı olarak kalsiyum karbonat çökeltme yeteneğini ifade etmesi kesintiye uğramadığından onarım etkililiği daha yüksek olmuş olabilir. Bu onarımın harcın su emme oranına etkisi kontrol numunelerine göre iki kat daha az su emmeyle sonuçlanmıştır. Benzer şekilde eğilme dayanımında da kontrol numunelerine kıyasla iki kat artış gerçekleşmiştir. *ureC* ve *napA* genlerini bulundururken, üreaz aktivitesi ve nitrat indirgeme fenotipi bakımından negatif özelliklere sahiptir.

Polipropilen elyaf içeren ve *Sporosarcina pasteurii* dahil edilerek üretilen ve çatlak oluşturulduktan sonra suya batırma ile kendi kendine iyileştirme gerçekleştirilen bir çalışma yapılmıştır (Su ve diğ., 2021). Eğilme mukavemetinin geri kazanımını %32 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ise *Sporosarcina pasteurii* ile çatlak onarımı gerçekleştirilen harcın kontrol numunelerine göre eğilme dayanımı iki kat artmıştır. *Sporosarcina pasteurii* ile yapılan başka bir çalışmada metakaolinle immobilize edilmiş bakteriler ilave edilerek numuneler üretilmiş ve çatlak oluşturulduktan sonra kalsiyum karbonat çökeltilmesini indükleyecek solüsyon (besin, üre ve kalsiyum kaynağı içeren) içerisine daldırılmıştır (Jadhav ve diğ., 2018). 25 µm genişliğindeki çatlaklar üç günde kapanmıştır. Çalışmamızda *Sporosarcina pasteurii* 100 µm genişliğindeki çatlağı 63 günde kapatmıştır. Bu fark çatlak genişliğinden ve beton içeriğinden kaynaklanmış olabilir.

Sporosarcina pasteurii mağara izolatlarıyla karşılaştırıldığında en geç çatlak kapanmasını gerçekleştiren bakteri olmuştur. Ancak mağara izolatlarına kıyasla su emiliminde kontrol numunelerine göre (yalnızca besiyeri enjekte edilen ve besiyeri+kalsiyum laktat enjekte edilen kontrol numunelerinin ortalaması) %85 azalmaya sebep olmuştur. Bunun sebebi çökeltilen $CaCO_3$ kristallerinin yapısıyla ilgili olabilir. Porter ve diğ. (2017) *Sporosarcina pasteurii* ile çimento ve metakaolin üzerinde MICP etkililiğini araştırmışlardır. Metakaoline kıyasla çimentoda *Sporosarcina pasteurii* bakterisinin basınç dayanımı ve su emme oranı daha iyi sonuç vermiştir (Porter ve diğ., 2017). Araştırmacılar kimyasal ve mikrobiyal sementasyon arasında sinerjistik bir ilişki öne sürmüşlerdir (Porter ve diğ., 2017).

Beton ve harcın kendi kendine iyileştirilmesinde çoğunlukla üreolitik bakteri olan *Sporosarcina pasteurii* kullanılmaktadır (Chen ve diğ., 2021). Literatürde kendi kendine iyileştirilen beton ve harcın *Sporosarcina pasteurii* bakterisinden daha etkili şekilde onarıldığını gösteren çalışmalar da yapılmıştır (Atashafrazeh, 2018). Gelecekte etkili olduğu belirlenen ve potansiyeli olan farklı türlerdeki bakterilerle yapılan çalışmalar arttırılabilir.

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelmesi gözenekliliği azaltarak beton ve harçların dayanımlarında olumlu etkilere sebep olmaktadır. Bakterilerin bu olumlu etkiyi optimum düzeyde gösterebilmeleri için beton ve harcın yüksek pH ve sıkı gözeneklilik gibi olumsuz koşullarında hayatta kalmalarının sağlanması gerekir. Bunun için hidrojel gibi kimyasal ve maliyetli malzemelerin (Fahimizadeh ve diğ., 2020; Wang ve diğ., 2015) kullanılmasının yanı sıra metakaolin, silisli toprak, uçucu kül gibi hafif agregalarda kullanılmaktadır. Metakaolin gibi mineral katkı maddelerinin kullanımı doğa dostu, maliyet açısından daha uygun olmasının yanında bakterilerin vejetatif ile spor formlarına etkili koruyucu katmanlar oluşturmaktadır. Bu koruyuculuk bakterilerin MICP potansiyellerini etkili şekilde gösterebilmelerini sağlamaktadır.

Harç matrisine bakteri ilavesine kıyasla bakterilerin oluşan çatlaklara enjekte edilmesiyle kontrol numunelerine göre özellikle su emme üzerinde daha etkili sonuçlar vermiştir. Bu durum literatürde harç ve beton üretimi sırasında büzülme ve sıkışmanın etkisiyle bakterilerin spor formlarının bile zamanla yok olabileceğini, beton ve harca enjekte edilen bakterilerin onarımda daha etkili olabileceği şeklinde belirtilmiştir (Lee ve Park, 2018).

Beton iyileştirilmesinde genellikle üreolitik bakteriler kullanılmaktadır. Kendi kendini iyileştirme verimliliği açısından üre hidrolizi, yüksek $CaCO_3$ çökelme oranı nedeniyle tüm mikrobiyal yolaklar arasında en yüksek olanıdır. Bu sebep üre hidrolizi yolağını betonun kendi

kendini iyileştirmesi için en olası aday yapar (Xu ve diğ., 2018). Üreaz aktivitesi pH'ı artırır ve nitrojen, bikarbonat ve hidroksitler oluşturur. Bununla birlikte, üre hidrolizi sürecinin iki ana dezavantajı vardır; sıcaklığa bağımlıdır ve çevresel açıdan önemli bir endişeye sebep olan her karbonat iyonu için aynı anda iki amonyum iyonu üretilir. Üreolizden üretilen amonyak, çimento yapılarının mekanik bütünlüğü için zararlı olabilmektedir (Lee ve Park, 2018). Nitrat indirgeyen $CaCO_3$ çökeltici bakterilerin de beton iyileştirilmesinde etkili oldukları bilinmektedir (Erşan ve diğ., 2016; Erşan ve diğ., 2016a). Bu dezavantajlara alternatif olarak nitrat indirgeyen bakteriler, eş zamanlı olarak NO^{2-} üreterek ve $CaCO_3$ çökelmesini indükleyerek korozyonu önleyebilir ve çatlak iyileşmesi sağlayabilir.

Nitrat indirgeme süreci organik karbonun oksidasyonu (anaerobik veya mikroaerofilik olarak) ve nitratların elektron alıcısı olarak kullanımıyla gerçekleşir. Bu süreçte yeterli miktarda alkalilik artar ve Ca^{2+} iyonları mevcutsa $CaCO_3$ çökelmesi meydana gelir. Oksijen ile sınırlı koşullar altında gerçekleşirken toksik yan ürünler de oluşmaz. Buna ek olarak, betonarme demiri için iyi bilinen bir korozyon inhibitörü olan nitrit iyonları da üretilir. Nitrat indirgemesinin bir başka avantajı da bazı temel organik maddelerin yokluğuna rağmen bakterilerin büyüyebilmesidir. Böylelikle çimentolu matriks ile uyumsuz olan organik maddelerin ilavesi azaltılabilir (Li ve diğ., 2018).

İnşaat yapılarında bakterilerle kendi kendine iyileşme çevre dostu, görece daha maliyetli, uzun ömürlü olması sebebiyle popüler bir konu haline gelmiştir. Kullanılacak bakterilerin beton matrisindeki çeşitli zorlu koşullara dirençli olması gerekmektedir. Bu açıdan mağara gibi ekstrem koşullar olarak sınıflandırılan ekosistemlerden izole edilen bakterilerin uygulanması verimlilik açısından daha fazla potansiyele sahiptir. Kendi kendini iyileştirmede bakterilerin canlılığı ve etkililiği birçok parametreye bağlı olduğundan özellikle moleküler yöntemlerle optimum sonucu vermeyi sağlayacak bakteriler geliştirilebilir. Ayrıca hem moleküler hem metabolik açıdan kalsiyum karbonat ekspresyonunu arttıran ve baskılayan durumlar belirlenebilir. Bunun yanında uygulanabilirlik açısından net bilgilere sahip olabilmek için daha fazla saha çalışmalarına yer verilerek verilere ulaşılmalıdır. Çalışmaların çoğu laboratuvar koşulları altında yapılmıştır ve gerçek inşaat yapıları üzerinde yalnızca Belçika ve Hollanda'da, çimentolu malzemelerde çatlak oluşumu olmadığının bildirildiği çalışmalar yapılmıştır (Mullem ve diğ., 2020; Jonkers, 2020). Çalışmamızdaki sonuçlara göre mağara izolatlarının harca ilavesine kıyasla enjeksiyon ile çatlak onarımında özellikle su emme oranında daha etkili sonuçlar elde edilmiştir. Enjeksiyon yöntemi mekanik özellikleri iyileştirdiği, uygulanmasının

kolaylığı ve maliyetin düşük olması sebepleriyle saha çalışmalarında uygulanabilir. Barajlar, deniz yapıları, beton döşemeler, köprüler, otoyollar ve bodrum duvarlarındaki çatlakların iyileştirilmesinde mağara izolatları kullanılarak enjeksiyon yönteminin uygulanması önerilebilir.

KAYNAKLAR

Abudoleh, S. M., Al Mahayreh, A., Al Frejat, A., Al Hulaisy, F. and Hamdan, S. O., 2019, Bioconcrete development using calcite-precipitating bacteria isolated from different sources in Jordan. *In MATEC Web of Conferences*, Vol. 278, p. 01011, EDP Sciences.

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

Arias, D., Cisternas, L. A. and Rivas, M., 2017, Biomineralization mediated by ureolytic bacteria applied to water treatment: A review. *Crystals*, 7(11), 345.

Atashafrazeh, M., 2018, *Viridibacillus Arenosii* ve *Bacillus Pasteruii* bakterilerinin kendi kendini onaran beton dayanımına etkisi, Doktora, Atatürk Üniversiesi Fen Bilimleri Enstirüsü.

Balam, N. H., Mostofinejad, D. and Eftekhar, M., 2017, Effects of bacterial remediation on compressive strength, water absorption, and chloride permeability of lightweight aggregate concrete. *Construction and Building Materials*, 145, 107-116.

Bánfalvi, G., 2011, Heavy metals, trace elements and their cellular effects. In *Cellular effects of heavy metals* (pp. 3-28). Springer, Dordrecht.

Barton, L. L. and Fauque, G. D., 2009, Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in applied microbiology*, 68, 41-98.

Bazylinski, D. A., Frankel, R. B. and Konhauser, K. O., 2007, Modes of biomineralization of magnetite by microbes. *Geomicrobiology Journal*, 24(6), 465-475.

Bernat, K. and Wojnowska-Baryła, I., 2007, Carbon source in aerobic denitrification. *Biochemical Engineering Journal*, 36(2), 116-122.

Bhattacharya, A., Naik, S. N. and Khare, S. K., 2018, Harnessing the bio-mineralization ability of urease producing *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* EMB19 for remediation of heavy metal cadmium (II). *Journal of Environmental Management*, 215, 143-152.

Bhattacharyya, S. S., Leite, F. F. G. D., Adeyemi, M. A., Sarker, A. J., Cambareri, G. S., Faverin, C., Tieri, M.P., Castillo-Zacarias, C., Melchor-Martinez, E.M., Iqbal, H.M.N., and Parra-Saldívar, R. (2021). A paradigm shift to CO_2 sequestration to manage global warming–With the emphasis on developing countries. *Science of the Total Environment*, 790, 148169.

Bhutange, S. P. and Latkar, M. V., 2020, Microbially induced calcium carbonate precipitation in construction materials. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 32(5), 03120001.

Boquet, E., Boronat, A. and Ramos-Cormenzana, A., 1973, Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, 246(5434), 527-529.

Braissant, O., Decho, A. W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K. M. and Visscher, P. T., 2007, Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*, 5(4), 401-411.

Canakci, H., Sidik, W. and Kilic, I. H., 2015, Effect of bacterial calcium carbonate precipitation on compressibility and shear strength of organic soil. *Soils and Foundations*, 55(5), 1211-1221.

Carlin, C. R., Liao, J., Hudson, L. K., Peters, T. L., Denes, T. G., Orsi, R. H., X., Guo and Wiedmann, M., 2022, Soil Collected in the Great Smoky Mountains National Park Yielded a Novel *Listeria sensu stricto* Species, *L. swaminathanii*. *Microbiology* Spectrum, e00442-22.

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

Chen, B., Sun, W., Sun, X., Cui, C., Lai, J., Wang, Y. and Feng, J., 2021, Crack sealing evaluation of self-healing mortar with *Sporosarcina pasteurii*: Influence of bacterial concentration and air-entraining agent. *Process Biochemistry*, 107, 100-111.

Choi, S., Park, S., Park, M., Kim, Y., Lee, K. M., Lee, O. M. and Son, H. J., 2021, Characterization of a Novel CaCO3-Forming Alkali-Tolerant *Rhodococcus erythreus* S26 as a Filling Agent for Repairing Concrete Cracks. *Molecules*, 26(10), 2967.

Czaplicka, N. and Konopacka-Łyskawa, D., 2020, Utilization of gaseous carbon dioxide and industrial ca-rich waste for calcium carbonate precipitation: A review. *Energies*, 13(23), 6239.

Davidovits, J., 1994, High-alkali cements for 21st century concretes. *Special Publication*, 144, 383-398.

De Belie, N., Gruyaert, E., Al-Tabbaa, A., Antonaci, P., Baera, C., Bajare, D., Darquennes, A., Davies, R., Ferrara, L., Jefferson, T., Litina, C., Miljevic, B., Otlewska, A., Ranogajec, J., Roig-Flores, M., Paine, K., Lukowski, P., Serna, P., Tulliani, J., Vucetic, S., Wang, J., and Jonkers, H. M., 2018, A review of self-healing concrete for damage management of structures. *Advanced materials interfaces*, 5(17), 1800074.

De Muynck, W., Leuridan, S., Van Loo, D., Verbeken, K., Cnudde, V., De Belie, N. and Verstraete, W., 2011, Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6808-6820.

DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C. and Nelson, D. C., 2010, Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*, 36(2), 197-210.

Dhami, N. K., Reddy, M. S., and Mukherjee, A., 2013, Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in microbiology*, 4, 314.

Dinarvand, P. and Rashno, A., 2022, Review of the potential application of bacteria in self-healing and the improving properties of concrete/mortar. *Journal of Sustainable Cement-Based Materials,* 11(4), 250-271.

E. Northup, Kathleen H. and Lavoie, D., 2001, Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal,* 18(3), 199-222.

Erşan, Y. Ç., 2019, Overlooked strategies in exploitation of microorganisms in the field of building materials. *In Ecological Wisdom Inspired Restoration Engineering*, 19-45, Springer, Singapore.

Erşan, Y. Ç., Da Silva, F. B., Boon, N., Verstraete, W. and De Belie, N., 2015, Screening of bacteria and concrete compatible protection materials. *Construction and Building Materials*, 88, 196-203.

Erşan, Y. Ç., Hernandez-Sanabria, E., Boon, N. and De Belie, N., 2016a, Enhanced crack closure performance of microbial mortar through nitrate reduction. *Cement and Concrete Composites*, 70, 159-170.

Erşan, Y. Ç., Verbruggen, H., De Graeve, I., Verstraete, W., De Belie, N. and Boon, N., 2016, Nitrate reducing $CaCO_3$ precipitating bacteria survive in mortar and inhibit steel corrosion. *Cement and concrete research*, 83, 19-30.

Fahimizadeh, M., Diane Abeyratne, A., Mae, L. S., Singh, R. R., & Pasbakhsh, P. (2020). Biological self-healing of cement paste and mortar by non-ureolytic bacteria encapsulated in alginate hydrogel capsules. *Materials*, 13(17), 3711.

Faulkner, D., 1975, A review of effective plating for use in the analysis of stiffened plating in bending and compression. *Journal of Ship Research*, 19(01), 1-17.

Fisher, K. A., Yarwood, S. A. and James, B. R., 2017, Soil urease activity and bacterial *ureC* gene copy numbers: Effect of pH. *Geoderma*, 285, 1-8.

Frankel, R. B. and Bazylinski, D. A., 2003, Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 95-114.

Ganendra, G., De Muynck, W., Ho, A., Arvaniti, E. C., Hosseinkhani, B., Ramos, J. A., Rahier H. and Boon, N., 2014, Formate oxidation-driven calcium carbonate precipitation by Methylocystis parvus OBBP. *Applied and environmental microbiology*, 80(15), 4659-4667.

Golovkina, D. A., Zhurishkina, E. V., Ivanova, L. A., Baranchikov, A. E., Sokolov, A. Y., Bobrov, K. S., Masharsky A.E., Tsvigun N.V., Kopitsa G.P. and Kulminskaya, A. A., 2020, Calcifying bacteria flexibility in induction of $CaCO_3$ mineralization. *Life*, 10(12), 317.

Gomaa, E. Z., 2018, Biosequestration of heavy metals by microbially induced calcite precipitation of ureolytic bacteria. *Rom Biotechnol Letters*, 24(1), 147-153.

González-Muñoz, M. T., Rodriguez-Navarro, C., Martínez-Ruiz, F., Arias, J. M., Merroun, M. L. and Rodriguez-Gallego, M., 2010, Bacterial biomineralization: new insights from

Myxococcus-induced mineral precipitation. *Geological Society, London, Special Publications,* 336(1), 31-50.

Gupta, S., Dai Pang, S. and Kua, H. W., 2017, Autonomous healing in concrete by bio-based healing agents–A review. *Construction and Building Materials*, 146, 419-428.

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., Seka, A., de Knijf, S. and Verstraete, W., 2003, A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater. *Water Research*, 37(3), 699-704.

Hammes, F., Seka, A., Van Hege, K., Van de Wiele, T., Vanderdeelen, J., Siciliano, S. D. and Verstraete, W., 2003, Calcium removal from industrial wastewater by bio-catalytic $CaCO_3$ precipitation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 78(6), 670-677.

Han, L., Li, J., Xue, Q., Chen, Z., Zhou, Y. and Poon, C. S., 2020, Bacterial-induced mineralization (BIM) for soil solidification and heavy metal stabilization: A critical review. *Science of The Total Environment*, 746, 140967.

Han, S., Jang, I., Choi, E. K., Park, W., Yi, C. and Chung, N., 2020, Bacterial self-healing performance of coated expanded clay in concrete. *Journal of Environmental Engineering*, 146(7), 04020072.

Jain, S., Fang, C. and Achal, V., 2021, A critical review on microbial carbonate precipitation via denitrification process in building materials. *Bioengineered*, 12(1), 7529-7551.

Jang, I., Son, D., Kim, W., Park, W. and Yi, C., 2020, Effects of spray-dried co-cultured bacteria on cement mortar. *Construction and Building Materials*, 243, 118206.

Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J. and Zhang, H., 2015, Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 20(4), 643-651.

Jindal, B. B., 2019, Investigations on the properties of geopolymer mortar and concrete with mineral admixtures: A review. *Construction and Building Materials*, *227*, 116644.

Jonkers, H. M., 2021, Bacteria-based self-healing concrete. *In-Genium*. *Romanian Biotechnological Letters*, 4 (2020), pp. 138-144.

Kalkan, E., 2020, A Review on the Microbial Induced Carbonate Precipitation MICP for Soil Stabilization. *International Journal of Earth Sciences Knowledge and Applications*, 2(1), 38-47.

Kandianis, M. T., Fouke, B. W., Johnson, R. W., Veysey, J. and Inskeep, W. P., 2008, Microbial biomass: A catalyst for $CaCO_3$ precipitation in advection-dominated transport regimes. *Geological Society of America Bulletin*, 120(3-4), 442-450.

Khaliq, W. and Ehsan, M.B., Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques, *Construction and Building Materials*, 102(Part 1), 349-357, 2016.

Kong, Q. X., Wang, X. W., Jin, M., Shen, Z. Q. and Li, J. W., 2006, Development and application of a novel and effective screening method for aerobic denitrifying bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 260(2), 150-155.

Koper, T. E., El-Sheikh, A. F., Norton, J. M., and Klotz, M. G., 2004, Urease-encoding genes in ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2342-2348.

Le Metayer-Levrel, G., Castanier, S., Orial, G., Loubiere, J. F. and Perthuisot, J. P., 1999, Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology*, 126(1-4), 25-34.

Lee, Y. S. and Park, W., 2018, Current challenges and future directions for bacterial self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3059-3070.

Li, P. and Qu, W., 2011, Bioremediation of historic architectural heritages by *Sporosarcina pasteurii*. *2011 International Conference on Electric Technology and Civil Engineering ICETCE,* 22-24 April 201 Lushan, China, IEEE, 1084-1087.

Li, W., Dong, B., Yang, Z., Xu, J., Chen, Q., Li, H. and Jiang, Z., 2018, Recent advances in intrinsic self-healing cementitious materials. *Advanced Materials*, 30(17), 1705679.

Lou, Y., Chang, W., Cui, T., Qian, H., Huang, L., Ma, L., Hao, X. and Zhang, D., 2021, Microbiologically influenced corrosion inhibition of carbon steel via biomineralization induced by *Shewanella putrefaciens*, *Materials Degradation*, 5(1), 1-11.

Ludwig, R., Al-Horani, F. A., De Beer, D. and Jonkers, H. M, 2005, Photosynthesis-controlled calcification in a hypersaline microbial mat. *Limnology and Oceanography*, 50(6), 1836-1843.

Maciejewska, M., Adam, D., Naômé, A., Martinet, L., Tenconi, E., Całusińska, M., Delfosse, P., Hanikenne, M., Baurain, D., Compere, P., Carnol, M., Barton, H.A. and Rigali, S., 2017, Assessment of the potential role of *Streptomyces* in cave moonmilk formation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1181.

Maity, J. P., Chen, G. S., Huang, Y. H., Sun, A. C. and Chen, C. Y., 2019, Ecofriendly heavy metal stabilization: microbial induced mineral precipitation (MIMP) and biomineralization for heavy metals within the contaminated soil by indigenous bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 36(7), 612-623.

Meyer, C., 2009, The greening of the concrete industry. *Cement and Concrete Composites*, *31*(8), 601-605.

Meyers, M. A. and Chawla, K. K., 2008, *Mechanical behavior of materials*. Cambridge university press, Unıted States of America, ISBN: 978-0-521-86675-0.

Millo, C., Dupraz, S., Ader, M., Guyot, F., Thaler, C., Foy, E. and Ménez, B., 2012, Carbon isotope fractionation during calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 98, 107-124.

Mizrahi, L. and Achituv, Y., 1989, Effect of heavy metals ions on enzyme activity in the Mediterranean mussel*, Donax trunculus. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology;(USA),* 42(6).

Naveed, M., Duan, J., Uddin, S., Suleman, M., Hui, Y. and Li, H., 2020, Application of microbially induced calcium carbonate precipitation with urea hydrolysis to improve the mechanical properties of soil. *Ecological Engineering*, 153, 105885.

Okyay, T. O., Nguyen, H. N., Castro, S. L. and Rodrigues, D. F., 2016, CO_2 sequestration by ureolytic microbial consortia through microbially-induced calcite precipitation. *Science of the Total Environment*, 572, 671-680.

Rauf, M., Khaliq, W., Khushnood, R. A. and Ahmed, I., 2020, Comparative performance of different bacteria immobilized in natural fibers for self-healing in concrete. *Construction and Building Materials*, 258, 119578.

Schwantes-Cezario, N., Cremasco, L. V., Medeiros, L. P., Teixeira, G. M., Albino, U. B., Lescano, L. E. A. M. and Toralles, B. M., 2022, Potential of cave isolated bacteria in self-healing of cement-based materials. *Journal of Building Engineering*, 45, 103551.

Seifan, M. and Berenjian, A., 2018, Application of microbially induced calcium carbonate precipitation in designing bio self-healing concrete. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(11), 1-15.

Seifan, M. and Berenjian, A., 2019, Microbially induced calcium carbonate precipitation: a widespread phenomenon in the biological world. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 4693-4708.

Seifan, M., Samani, A. K. and Berenjian, A., 2016, Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2591-2602.

Seifan, M., Sarabadani, Z. and Berenjian, A., 2020, Microbially induced calcium carbonate precipitation to design a new type of bio self-healing dental composite. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2029-2037.

Sharma, T. K., Alazhari, M., Heath, A., Paine, K. and Cooper, R. M., 2017, Alkaliphilic *Bacillus* species show potential application in concrete crack repair by virtue of rapid spore production and germination then extracellular calcite formation. *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), 1233-1244.

Sierra-Beltran, M. G., Jonkers, H. M. and Schlangen, E., 2014, Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair. *Construction and Building Materials*, 67, 344-352.

Silva, F. B., Boon, N., Belie, N. D. and Verstraete, W., 2015, Industrial application of biological self-healing concrete: Challenges and economical feasibility. *Journal of Commercial Biotechnology*, 21(1).

Soares, M. I. M., 2000, Biological denitrification of groundwater. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123(1), 183-193.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K. and Bang, S. S., 1999, Microbiological precipitation of $CaCO_3$. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563-1571.

Su, Y., Qian, C., Rui, Y., & Feng, J. (2021). Exploring the coupled mechanism of fibers and bacteria on self-healing concrete from bacterial extracellular polymeric substances (EPS*). Cement and Concrete Composites*, 116, 103896.

Talaiekhozani, A. and Abd Majid, M. Z., 2014, A review of self-healing concrete research development. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 2(1), 1-11.

Tanyildizi, H., Ziada, M., Uysal, M., Güngör, N. D. and Coşkun, A., 2022, Comparison of bacteria-based self-healing methods in metakaolin geopolymer mortars. *Case Studies in Construction Materials,* 16, e00895.

Torres-Aravena, Á. E., Duarte-Nass, C., Azócar, L., Mella-Herrera, R., Rivas, M. and Jeison, D., 2018, Can microbially induced calcite precipitation (MICP) through a ureolytic pathway be successfully applied for removing heavy metals from wastewaters?, *Crystals*, 8(11), 438.

Türkgenci, M. D. and Doğruöz Güngör, N., 2021, Profiling of bacteria capable of precipitating $CaCO_3$ on the speleothem surfaces in Dupnisa Cave, Kırklareli, Turkey. *Geomicrobiology Journal*, 38(9), 816-827.

Uysal, F. F. and Bahar, S., 2018, Cüruf Çeşitleri ve Kullanım Alanları, *Trakya Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 19(1), 37-52.

Van Mullem, T., Gruyaert, E., Caspeele, R. and De Belie, N., 2020). First large scale application with self-healing concrete in belgium: Analysis of the laboratory control tests. *Materials*, 13(4), 997.

Van Tittelboom, K., De Muynck, W., De Belie, N. and Verstraete, W., 2009, Bacteria protect and heal concrete and stone. *WTA Schriftenreihe*, 33, 439-57.

Wang, J. Y., De Belie, N. and Verstraete, W., 2012, Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 567-577.

Wang, J. Y., Snoeck, D., Van Vlierberghe, S., Verstraete, W., and De Belie, N., 2014, Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. *Construction and Building Materials*, 68, 110-119.

Wang, J., Van Tittelboom, K., De Belie, N. and Verstraete, W., 2012, Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and Building Materials,* 26(1), 532-540.

Wang, Z., Su, J., Hu, X., Ali, A. and Wu, Z., 2021, Isolation of biosynthetic crystals by microbially induced calcium carbonate precipitation and their utilization for fluoride removal from groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124748.

Weiner, S. and Dove, P. M., 2003, An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 1-29.

Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A. and Harkes, M. P., 2007, Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417-423.

Wiktor, V. and Jonkers, H. M., 2011, Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, 33(7), 763-770.

Xu, J., Wang, X. and Wang, B., 2018, Biochemical process of ureolysis-based microbial $CaCO_3$ precipitation and its application in self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3121-3132.

Yamasaki, A., 2003, An overview of CO_2 mitigation options for global warming—emphasizing CO_2 sequestration options. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 36(4), 361-375.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yağmur Avcı
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	07.08.2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Filimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Ednüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Makale ve Bildiriler
Doğruöz Güngör, N., & Avcı, Y., (2018). BACTERIAL COMMUNITY IN DUPNISA CAVE(KIRKLARELI-TURKEY). 4th Middle-East Speleology Symposium(MESS4), Akdeniz University, Antalya, Turkey (ss.56- 58)