



Kumlu Zeminlerin Mikrobiyal Yöntemle Güçlendirilmesi

Program Kodu: 3001

Proje No: 113Y568

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Erdal AKYOL

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Nazime Mercan DOĞAN
Prof. Dr. Ömer BOZKAYA

Bursiyerler:

Emre ERDOĞAN
Tuğba ŞENSOY
Kübra Betül SOLMAZ
Naime Nur BOZBEYOĞLU

ÖNSÖZ

Proje mikrobiyal yöntemler kullanılarak zeminlerin güçlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamında kalsiyum karbonat çökeli mi yapan *Bacillus* cinsi bakteri içeren sıvı, laboratuvar ortamında çeşitli hızlar altında kumlu zemine enjekte edilmiştir. Karbonat içeren bakterilerin kısmen kendi formlarını koruduğu ancak yaygın olarak kalsit ve vaterit mineralleri ile amorf kalsiyum karbonat kütleleri oluşturduğu gözlenmiştir. Taneler arasında meydana gelen biyolojik karbonat çökeli mi sonucu tek eksenli basma dayanımı deneyi ile P ve S dalga hız ölçümlerine tabi tutulan örneklerin mekanik ve dinamik özelliklerinde önemli artışlar görülmüştür. Projeden elden edilen bulgu ve sonuçlar bakteriyel kalsiyum karbonat uygulamasının kumlu doğal zeminlerin güçlendirilmesinde kullanma potansiyelinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma 113Y568 proje numarası ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	i
Şekil Listesi	ii
Özet	iii
Abstract.....	iv
1. GİRİŞ	1
2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI	4
2.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar	4
2.1.1. Örnek Hazırlama ve Yöntem	4
2.1.2. Kalsiyum Karbonat Mineralizasyonu Optimizasyonu	10
2.1.3. Optimizasyon Şartlarında CaCO ₃ Mineralizasyonu	12
2.1.4. <i>S. pasteurii</i> ATCC 6453'ün CaCO ₃ Çökelişi	14
2.2. Jeoteknik Çalışmalar	15
2.2.1. Deney Düzenekli ve Zemin Özellikleri	15
2.2.2. Jeoteknik Deneyler	19
2.2.3. Birim hacim ağırlık	21
2.2.4. Tek Eksenli Basma Dayanımı.....	25
2.2.5. Elastisite Modülü	28
2.2.6. Sismik Özellikler	31
2.3. Mineralojik Çalışmalar	38
2.3.1. Laboratuvar Koşullarında Üretilen Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Oluşumlarının Karakterizasyonu	38
2.3.1.1. X-Işınları Kırınımı (XRD) İncelemeleri.....	38
2.3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri.....	40
2.3.1.3. Termo Gravimetrik Analiz (TGA) İncelemeleri	42
2.3.2. Kumlu Zemine Uygulanan Bakteriyel Kalsiyum Karbonat Oluşumlarının Karakterizasyonu	45
2.3.2.1. Optik Mikroskop Uygulamaları	45
2.3.2.2. X-Işınları Kırınımı (XRD) İncelemeleri.....	45
2.3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri.....	49
3. TARTIŞMA.....	51
3.1. Mikrobiyolojik Bulguların Tartışılması.....	51
3.2. Jeoteknik Bulguların Tartışılması.....	53
3.3. Mineralojik ve Petrografik Bulguların Tartışılması.....	55
4. SONUÇLAR	57
5. KAYNAKLAR	59

TABLO LİSTESİ

Tablo1. Toprak örnekleri ve izole edilen mikroorganizmaların kodları

Tablo 2: İzolatların 16S rRNA sekans analiz sonuçları

Tablo 3: Bakterilerin maksimum kalsiyum karbonat miktarları (mg/ml)

Tablo 4: *Paenibacillus favisporus* U3'ün farklı üre konsantrasyonlarında kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml) (pH:6.5, sıcaklık:37 °C)

Tablo 5: Farklı üre konsantrasyonlarında *Lysinibacillus fusiformis* U5 bakterisinin kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml) (pH:6.5, sıcaklık:37 °C)

Tablo 6: Farklı üre konsantrasyonlarda *Bacillus mycooides* U10 bakterisinin kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml) (pH:6.5, sıcaklık: 37 °C).

Tablo7: Sıcaklığın kalsiyum karbonat mineralizasyonu üzerine etkisi (mg/ml) (pH: 6.5)

Tablo 8: Kalsiyum karbonat mineralizasyonuna başlangıç pH'sının etkisi

Tablo 9. Üreolitik bakterilerin en iyi kalsiyum karbonat mineralizasyon parametreleri

Tablo 10. *Paenibacillus favisporus* U3'ün optimal şartlarda kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml)

Tablo 11. *Bacillus mycooides* U10'un optimal şartlarda kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml)

Tablo 12. *Lysinibacillus fusiformis* U5'in optimal şartlarda kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml)

Tablo 13. Üreolitik izolatların *S. pasteurii* ATCC 6453 ile CaCO₃ üretimi açısından (mg/L) karşılaştırılması (a: 20 °C, pH 5.5, 300 mM üre, b: 37 °C, pH: 6.5, 100 mM üre, c: 37 °C, pH 5.0, 350 mM üre d: 42 °C, pH 5.0, 100 mM üre)

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Pozitif kontrol (pembe) olarak kullanılan *Proteus vulgaris* ATCC 33420 ve negatif kontrol (sarı) *Micrococcus flavus*'un Üreaz Agar besiyerindeki görünüşleri
- Şekil 2. Üre agara ekilen toprak örneklerinde üreaz aktivitesi olan koloniler
- Şekil 3. İzolatların CaCO₃ minerilizasyon ortamında karbonat üretim görünüşleri
- Şekil 4. Sterilize edilmiş #40 nolu elekten geçen ve #200 nolu elekte kalan tane boyu dağılımına sahip zemin örneği
- Şekil 5. Taslak deney düzeneği
- Şekil 6. Hazırlanan deney düzeneği ve zemin örneği ile deneye hazır hali
- Şekil 7. Plexiglass tüpler
- Şekil 8 Filtre sabitleme ve numune çıkartma aparatı
- Şekil 9. Peristaltik pompa
- Şekil 10. Serbest halde bakterili sıvının zemin örneğinden geçişi
- Şekil 11. 25d/d halinde bakterili sıvının zemin örneğinden geçişi
- Şekil 12. Basınç ölçümünde kullanılan manometre
- Şekil 13. Birim hacim ağırlığı hesaplanan örnekler
- Şekil 14. Örneklerin birim hacim ağırlıkları
- Şekil 15. Tek eksenli basma dayanımı deney düzeneği ve yenilmiş bir zemin örneği
- Şekil 16. Örneklerin tek eksenli basma dayanımı
- Şekil 17. İdeal elastisite modülü (gerilme-gerinme) grafiği ve göreceli elastisite modülü tanımları
- Şekil 18. Örneklerin statik elastisite modülü (Es)
- Şekil 19. Doğal ve güçlendirilmiş örneklerin hızlarının belirlenmesi için kullanılan düzenek
- Şekil 20. Örneklerin (V_P) hızları
- Şekil 21. Örneklerin (V_S) hızları
- Şekil 22. Bakteriyel kalsiyum karbonatlı ürünlerin X-ışınları kırınımı desenleri
- Şekil 23. U2, U3 ve U5 örnekleri için uygulanan farklı süre, konsantrasyon ve pH koşullarının kalsiyum karbonat konsantrasyonları (mg/ml) üzerine etkisi
- Şekil 24. Mikrobiyal karbonat oluşumlarının SEM mikrofotografı
- Şekil 25. Mikrobiyal karbonat oluşumlarının SEM mikrofotografı
- Şekil 26. U2 ve U5 nolu örneklerde gözlenen vaterit, bakteri, EPS, kalsit ve membran üzerinde gerçekleştirilen EDS analiz sonuçları
- Şekil 27. Bakteriyel karbonat ürünlerini TGA eğrileri
- Şekil 28. Bakteriyel karbonat uygulanan kumlu zeminlerin optik mikroskop görünüşleri
- Şekil 29. Doğal (DZ1) ve bakteriyel karbonat çimentolaması uygulanan (DZ2-5) kumlu zemin örneklerin serbest ve farklı basınç koşullarına göre mineralojik dağılımı.
- Şekil 30. Doğal (DZ1) ve bakteriyel karbonat çimentolaması uygulanan (DZ2-5) kumlu zemin örneklerin 0.075 mm elek altı tane boyunun serbest ve farklı basınç koşullarına göre mineralojik dağılımı.
- Şekil 31. Bakteriyel karbonat uygulaması yapılan kumlu zemin örneğinin 0.063 mm elek altı ve kil fraksiyonu (<0.002 mm, <2 µm) mineralojik bileşimleri
- Şekil 32. Kumlu zeminlerdeki bakteriyel karbonat çimentonun SEM-SE görünüşleri
- Şekil 33. Bakteriyel karbonat çimentonun SEM-BSE görünüşleri, EDS analizi ve element haritalamaları
- Şekil 34. Bakteriyel karbonat çimentonun kalsit ve kuvars taneleri arasındaki SEM-BSE görünüşleri, EDS analizi ve element haritalamaları
- Şekil 25. Bakterili sıvının akış yönüne göre karbonat miktarının değişimi
- Şekil 36. Karbonat miktarına bağlı yenilme ve deformasyonlar

ÖZET

Jeoteknik mühendisliğinde zeminlerin mühendislik parametrelerini iyileştirmek için son yıllarda çok sayıda çağdaş yöntem ve malzeme ortaya çıkmaktadır. Bunlar çevresel etki, nüfuz derinliği, iyileştirme homojenliği ve maliyet gibi konularda farklılıklar sunmaktadır. Başarılı bir bakteriyel zemin iyileştirmesi zemin-bakteri türü, besiyer, çevresel ve jeolojik faktörler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu projede bakteriyel kalsiyum karbonat çökelimi yardımı ile kumlu zeminlerin mühendislik özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu kapsamda bakteriyel kalsiyum karbonat oluşumlarının maksimum CaCO_3 konsantrasyonlarının koşullarının belirlenmesi amacıyla çeşitli bakteriler üzerinde farklı üre konsantrasyonları, inkübasyon süreleri ve başlangıç pH koşulları uygulanmıştır. U3 nolu örneği temsil eden bakteriler (*Paenibacillus favisporus*) tüm koşullarda en yüksek CaCO_3 üretimini sağlamıştır. Bu nedenle jeoteknik uygulamalarda U3 nolu örnek kullanılmış olup, optimum koşullar üre konsantrasyonu=100 mM, sıcaklık=37 °C, başlangıç pH=6.5, inkübasyon süresi=10 gün ve maksimum konsantrasyon=2805 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Polarizan mikroskop görüntüleri çimentolanmanın başlıca kalsit ve kuvars minerallerinden oluşan taneler arasında homojen biçimde dağıldığı gözlenmiştir. Optik mikroskopik verilere göre, kalsiyum karbonat çimento 0.5 mm ye ulaşan boşlukları doldurma kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymuştur. XRD incelemelerine göre taneleri tutturarak bakteriyel karbonat çimento vaterit içermemektedir. Taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri bakteriyel kalsiyum karbonat bağlayıcının gözenekli-süngerimsi görümlü amorf yapıda olduğunu göstermiştir. SEM element haritalama verileri de, optik mikroskop verilerine benzer biçimde bakteriyel karbonat çimentonun taneler arasında homojen bir dağılım sunduğunu göstermiştir.

Doğal zemin örneğinin birim hacim ağırlığı 14.4 kN/m^3 , güçlendirilmiş zeminin ise 14.5 kN/m^3 ile 14.6 kN/m^3 arasında değişmektedir. Güçlendirilmiş örneklerin tek eksenli basma dayanımı en yüksek 25 d/d'da 204.1 kPa olarak ölçülmüş, 50 d/d ve 100 d/d ise sırasıyla 142.9 kPa and 85.2 kPa elde edilmiştir. Görüldüğü kadarıyla peristaltik pompanın yüksek devirleri bakteri aktivitesini azaltmaktadır. Elastisite modülü değerleri de 23.9 MPa and 89.4 MPa arasında değişmektedir. Gözlenen en düşük ve en yüksek hızlar ise V_p için 601 m/s-985 m/s, V_s için 167 m/s-443 m/s arasında değişmektedir. Çimento ve kimyasal enjeksiyon gibi geleneksel zemin güçlendirme yöntemlerinin görece küçük sahalarda yaygın olarak uygulanmasına karşın, mikrobiyal güçlendirmenin ise ulaştırma projeleri gibi daha büyük sahaların güçlendirmesi çevresel ve ekonomik açıdan daha uygun görünmektedir. Proje, bakteri mineralizasyonu ile yapılan zeminin iyileştirmesi sonucu sağlanan mühendislik parametrelerindeki olumlu yöndeki değer artışlarının bu projeler için yeteri kadar iyi olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, proje kapsamında uygulanan yöntemin ilgili jeoteknik mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: bakteri, *Bacillus*, biyo-mineralizasyon, zemin güçlendirme

ABSTRACT

In recent years, a large number of contemporary methods and materials are available in geotechnical engineering to improve the engineering performance of soils. They are miscellaneous in the matter of environmental impact, penetration depth, treatment uniformity, cost etc. Naturally, they have benefits and drawbacks and researches are required on soil improvement to find out new materials and methods. A successful bacterial soil improvement application is dependent on some parameters including soil and bacteria types, media diversity, environmental and geological parameters. This study is targeted to improve the engineering properties of the sandy soils using bacterial carbonate precipitation.

In order to determine optimum bacteria breeding conditions to get maximum CaCO_3 , several urea concentrations, incubation periods and pH levels were tested on the selected bacteria. The bacteria coded U3 (*Paenibacillus favisporus*) was the best one among the tested ones for CaCO_3 production and it was employed for the geotechnical tests. The best conditions are; urea concentration=100 mM, temperature=37 °C, starting pH=6.5, incubation time=10 days and maximum concentration =2805 mg/ml.

Polarized microscopy images prove that the bacterial cementation was homogeneously distributed among the calcite and quartz minerals. It was also presented by SEM element mapping. It was able to fill the gaps up to 0.5 mm as seen on optical microscopy. XRD data suggest that there is not any vaterite in the bacterial calcium carbonate. The appearance of this carbonate on SEM is spongy, porous and amorphous.

The unit weight of the natural sand was 14.4 kN/m^3 . Bacterial treatment has not made a noticeable change on the core samples and the values lie between 14.5 kN/m^3 and 14.6 kN/m^3 . UCS of the tested core samples are varying in a quite large range from 66.8 kPa to 204.1 kPa. The UCS of the 25 rpm sample was the highest strength 204.1 kPa. Increasing the speed of the pump has not helped to obtain higher values. The strength is 142.9 kPa and 85.2 kPa for 50 rpm and 100 rpm respectively. The findings suggested that higher rotary speeds are increasing pressure in the test cell which causes slower bacterium activity. The young modulus data of the samples were parallel to the UCS values. The extreme values are 23.9 MPa and 89.4 MPa for free flow and 25 rpm respectively. Young modulus has decreased to 40.7 MPa for 50 rpm and 33.6 MPa for 100 rpm (Figure 6). In the same way, the sonic wave and mechanical test data are analogous. The lowest V_p was measured on natural soil sample as a 601 m/s while the highest one was on the 25 rpm, 985 m/s. The V_s value has bounced from 167 m/s (natural soil) to remarkable 443 m/s (25 rpm).

Microbial improvement seems to be more convenient in terms of economy and environment for large areas like transportation projects, factory sites etc. although the conventional soil improvement methods like cement and chemical grouting may be more common in relatively small areas. The improvement provided by the bacterial treatment is sufficient to support such project loads. The method can be employed in the associated geotechnical engineering applications.

Key words: bacteria, *Bacillus*, bio-mineralization, soil strengthening

BİLİMSEL GELİŞME RAPORU
(Proje No: 113Y568)

1. GİRİŞ

Artan nüfus ve buna bağlı olarak genişleyen kentsel alanlar nedeniyle problemlerle karşılaşma olasılığı artmakta ve bu tür zeminlerde iyileştirme yapma zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu tür zeminlerin üzerinde mühendislik yapılarının inşa edilebilmesi için iyileştirilmeleri ve/veya güçlendirilmeleri gerekmektedir. Zemin iyileştirme/güçlendirme yöntemleri yaygın olarak taşıma gücünün artırılması, sıvılaşma potansiyeli ve permeabilitenin azaltılması için uygulanmaktadır. Son yıllarda ülkemizde de uygulanması yaygınlaşan enjeksiyon yöntemi, zemin iyileştirme açısından başarılı biçimde uygulanmaktadır. Yapımı tamamlanmış binaların zeminlerinin güçlendirilmesi yüksek ekonomik maliyet oluşturmaktadır. Bununla birlikte, geleneksel zemin iyileştirme yöntemlerinin sınırlı etki yarıçapı, ağır iş makineleri gerektirmesi ve olumsuz çevresel etkileri gibi çeşitli zayıf yönleri de bulunmaktadır. Bu açıdan mikrobiyal yöntemlerin uygulanmasıyla yukarıda sıralanan olumsuzlukların önüne geçilmesi mümkün olabilmektedir (DeJong vd., 2006; Whiffin vd., 2007; Ivanov ve Chu, 2008; Qabany vd., 2012; Akyol, 2012).

Jeolojik süreçler ile mineral ve mikroorganizma arasındaki etkileşim jeomikrobiyolojinin çalışma alanını oluşturmaktadır. Adında da anlaşılacağı gibi jeomikrobiyoloji çok disiplinli bir çalışma alanı olup, mikrobiyal ekoloji, sedimanter jeoloji, jeokimya ve mineraloji gibi bilim dallarını içine almaktadır. Buna ilave olarak uygulama alanına göre çevreden jeotekniğe kadar çok geniş bir yelpazedeki çalışma disiplinleri kapsayabilmektedir. Mikroorganizmalar oksidasyon indirgeme reaksiyonlarının bir parçasıdır ve reaksiyon esnasında enerji elde ederek büyür, hareket eder ve diğer faaliyetlerini gerçekleştirirler. Bu reaksiyonlar aracılığı ile mikroorganizmalar minerallerin çökmesine, çözünmesine veya değişimine neden olabilir veya ortamın jeokimyasını değiştirerek bu süreçlere dolaylı olarak etki edebilirler (Karatat, 2008). 19. yüzyılın ikinci yarısında başlayan jeomikrobiyoloji çalışmalarında (Ehrlich, 2002) mikroorganizmaların sadece indirgeme (redoks) reaksiyonlarına katalizör olarak katılmadıklarını, aynı zamanda kalsiyum karbonat çökeltimi oluşturdukları da belirlenmiştir (Nadson, 1903). Sularda kalsiyum iyonları fazla olduğunda, kalsit mineralizasyonu doğal olarak oluşmaktadır (Fauriel ve Laloui, 2012). Üreaz aktivitesine sahip çok sayıda bakteri, eğer kalsiyum ve üre bulunan bir ortamda ise önemli ölçüde kalsiyum mineralizasyonu gerçekleştirirler. Bu nedenle, *B. pasteurii* ve *Bacillus* cinsine ait diğer üyeler, çeşitli ortamlarda kalsiyum karbonat mineralizasyonuna etki eden faktörleri belirlemek için yapılan çalışmalarda kullanılan model organizmadırlar (Stocks-Fischer et al. 1999). Mikroorganizmalar özellikle günümüzde su ve topraktaki çevresel kirliliğin etkilerinin azaltılmasında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Uygun ortamlarda mikroorganizmalar kimyasal reaksiyonları tetikleyerek çözünme ve çökme ile inorganik minerallerin çökmesine neden olabilmektedir. Mikrobiyal madde çökeli ile zeminlerin fiziko-mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla *Bacillus* türleri (Dick vd. 2006), *Myxococcus xanthus* (Rodriguez-Navarro vd. 2003), *Bacillus pasteurii* (Bang vd. 2001), *Halomonas eurihalina* (Rivadeneira vd. 1998), *Bacillus amyloliquefaciens* (Lee 2003), *Bacillus megaterium* (Achal vd. 2011a, Lian vd. 2006), *Kocuria flava* (Achal vd. 2011b), *Bacillus sphaericus* (Cheng ve Cord-Ruwisch 2012), *Sporosarcina pasteurii* (Whiffin vd., 2007; Qabany vd., 2012) *Bacillus pasteurii* (DeJong vd., 2006), *Caulobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arcobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* ve *Rhizobium* (Ivanov ve Chu, 2008) gibi bakterilerin kullanımına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlardaki mikrobiyal sıvı laboratuvar ortamında genellikle tüp içerisine yerleştirilen örnekler içerisinden belirli sürelerle geçirilmiş ve karbonat çökeli ile örneklerin dayanım, permeabilite gibi parametrelere etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, "biyoekseksiyon" olarak da adlandırılan biyolojik uygulamanın örneklerin dayanımını arttırdığı ve permeabilitesini azalttığı gözlenmiştir.

Mikroorganizmalar kalsiyum karbonat çökeli esnasında çeşitli formlarda kristaller oluşturmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olanları vaterit ve kalsit kristalleridir. Kalsitin aksine vaterit doğal ortamlarda çok yaygın olarak gözlenmemektedir. Bu minerallerin kristaller yapıları, büyüklükleri gibi bazı özellikleri birbirlerinden farklı olduğu için, çimentolanmada bazı farklar oluşturabilir. Bu nedenle oluşan kalsiyum karbonatın kimyasal ve fiziksel yapısı ile diğer mineralojik özelliklerinin belirlenmesi yararlı olacaktır.

Jeolojik süreçlerde mikrobiyolojik etkilerle mineral oluşumlarının varlığı (Ehrlich, 2002) ve drenaj malzemeleri ile boruların zamanla tıkanıp çok iyi bilinmesine rağmen bu oluşumun zeminin taşıma gücünün artırılması, sıvılaşma potansiyeli ve geçirimsizliğin azaltılması gibi mühendislik çalışmalarında kullanılması çok gündeme gelmemiştir.

Mikrobiyal kaynaklı karbonat çökeli ile zemin güçlendirme konusunda çeşitli çalışmalar ön plana çıkmaktadır (Muynck et al. 2008). Bunlar arasında DeJong vd. (2006), Whiffin vd. (2007), Karatas (2008), Ivanov & Chu (2008) ve Van Paassen (2009) sayılabilir. DeJong vd (2006) yaptığı çalışmada mikrobiyal olarak çimentolanmış gevşek kumların kesme dalgası hızlarının yaklaşık 200 m/s'den 540 m/s'ye ulaştığı belirtmişlerdir. Whiffin vd. (2007) kalsiyum karbonat çökeli için kum örnekleri içerisine üre, kalsiyum ve üre-hidroliz bakterisi enjekte etmişler, hidroliz sıvısının konsantrasyonuna bağlı olarak çimentolanma ve kesme dayanımında iyileşmeler gözlemişlerdir. Bu artışın kesme dayanımında 8 kat, rijitlikte ise 3 katına kadar olduğunu bildirmişlerdir. Karatas'ın (2008) çalışmaları sonucu mikrobiyal kökenli kalsiyum karbonat çökelinin kesme dayanımını arttırdığını ancak zeminin mineral bileşimi, yapısı, tane boyu ve organik madde oranı gibi

parametrelerin çok etkili olduğunu ve bunun ayrıca çalışılması gerektiğini ortaya koymuştur. Ivanov & Chu (2008) zemin enjeksiyonunun metreküp maliyetinin kimyasal maddeler kullanarak 2 ile 72 USD, mikrobiyal süreçle çimentolanma sağlandığında 0,5 ile 9,0 USD arasında olacağını ortaya koymuştur. Mikrobiyal yöntemlerle zeminlerin mühendislik özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik en kapsamlı çalışmalardan birisi arazi ölçeğinde Van Paassen (2009) yapılmıştır. Hızlı tren hatlarında zemin sıklığı ile tren hızı arasında doğrudan bir ilişki olduğu ve iyileşmenin trenleri %20 oranında hızlandırabileceği ortaya konulmuştur. Çalışmada ayrıca gözenekli kayalarda mikrobiyal iyileştirme yaparak oda-topuk yöntemiyle açılan madenlerde göçük riskinin azaldığını gözlemlemiştir.

Mitchell ve Santamarina (2005) jeoteknik mühendisliğinde biyolojik yöntemler ile mikroorganizmalar ve jeolojik süreçler arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Mikrobiyolojik iyileştirmelerin genellikle zemin geçirgenliği ve iletimi ile olduğunu ortaya koymuşlardır. Zemin içerisine ticari olarak temin edilebilen çeşitli biyofilm ve biyopolimerler ilave ederek zeminin hidrolik iletkenliği (Komlos vd., 1998; MacLeod vd., 1988; Karimi, 1988; Dutta vd., 2005), kesme dayanımını (Karimi, 1988; Perkins vd., 2000; Cabalar and Canakci, 2005) incelemiştir. Bu çalışmalarda hidrolik iletkenliğin dikkat çekici şekilde azaldığı ancak kesme dayanımında ciddi artışlar olmadığı sonucuna varılmıştır. Sadece Cabalar ve Canakci (2005) % 1 ve %5'lik biyolojik katkı sonrası ortalama kesme dayanımının 30 kPa ile 190 kPa arasında artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Ancak doğal zemine ait veriler olmadığı için iyileştirme sonrası karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır.

Bu çalışmada karbonatça zengin ortamlardan izole edilen *Bacillus* cinsi izolatların kalsiyum mineralizasyonu kullanılarak, kumlu zeminlerin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Proje bu alanda ülkemizde yapılan öncü çalışmalardan birisi olması nedeniyle sonraki çalışmalara temel oluşturacak niteliktedir.

2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

Çalışmanın ilk altı aylık döneminde çalışma takviminde belirtildiği gibi öncelikle gerekli olan cihaz ve kimyasal madde alımı yapılmış ve ekte sunulan çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar

2.1.1. Örnek Hazırlama ve Yöntem

Çalışmamızın ilk döneminde Denizli Karcı Dağı Bölgesindeki İsrail deresinden su örneği ve çevresinden de farklı derinliklerden aseptik koşullara uygun olarak alınan toprak numuneleri amber renkli steril cam şişeler içerisinde Bakterioloji laboratuvarına getirilmiştir. Örneklerden üreaz aktivitesi pozitif olan mikroorganizmalar belirlenmesi ve izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca üreaz pozitif izolatların kalsiyum karbonat mineralizasyon şartlarının optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon şartları olarak pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0) sıcaklık (20, 25, 30, 37, 42 °C) inkübasyon süresi (5, 7, 10 ve 14. gün)ve üre konsantrasyonu (100, 200, 250, 300, 333 ve 350 mM) belirlenmiştir.

Üreolitik bakteri izolasyonu

Kalsiyum karbonatça zengin toprak örneklerinden üreolitik aktiviteye sahip *Bacillus* cinsi bakteri izolasyonu için Üre Broth ve Üre Agar besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerindeki turuncudan pembeye renk değişikliği üre hidrolizini gösterir. İzolasyon aşamasında pozitif kontrol olarak *Proteus vulgaris* ATCC 33420 ve negatif kontrol olarak *Micrococcus flavus* suşu kullanılmıştır (Fujita et al. 2000).

Mikroorganizmaların tanımlanması

İzole edilen suşların 16S rRNA sekans analizleri Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yaptırılmıştır.

Kalsiyum karbonat mineralizasyonu

20 g/L üre ilaveli Nutrient Broth'ta geliştirilen hücreler %10'luk olacak şekilde ayarlanarak kalsiyum mineralizasyon ortamına inoküle edilmiştir.

Kalsiyum mineralizasyon ortamı, 3,0 g/l Nutrient Broth (Difco), 25 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ ve 333 mM üre ilave edilerek hazırlanmıştır (Ferris vd. 1996). Besiyerinin başlangıç pH'sı 6.5'a ayarlanmış ve filtre ile steril edilmiştir (Whiffin vd. 2007).

Kalsiyum karbonat içeriğinin belirlenmesi

Kültürdeki kalsiyum karbonat içeriği EDTA titrimetrik yöntemle göre belirlenmiştir (APHA 1989).

EDTA Titrimetrik Yöntemi:

a) Tampon Çözelti Hazırlanışı:

1,179 g Na₂EDTA.2H₂O ve 780 mg MgSO₄.7H₂O tartılır, 50 ml dH₂O'da çözülmesi sağlanır. 16,9 g NH₄Cl ve 143 ml yoğun NH₄OH (amonyum) çözeltiye ilave edilerek distile su (dH₂O) ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

b)İndikatör Çözelti:

0,5 g Eriochrome Black T ile 100 g NaCl karıştırılarak kullanıma hazırlanmıştır.

c)Standart EDTA Çözeltisi:

3,723 g EDTA disodyum tuzu dihidrat 1000 ml dH₂O içerisinde çözülür.

Titrasyon Basamakları:

- 25 ml numune üzerine 1 ml Tampon Çözelti ilave edilerek pH 10.00 ayarlanır.
- Numune içersine toz halinde olan indikatör karışımından spatül ucunda eklenir (İndikatör numunede pembe renk oluşturmaktadır).
- Standart EDTA Çözeltisi ile titrasyon işlemi yapılır.
- Pembe olan numune rengi mavi renge dönüşene dek titrasyona devam edilir.
- Harcanan EDTA miktarı alınarak aşağıda verilen formül ile CaCO₃ miktarı hesaplanır.

$$\text{Hesaplama: Mg CaCO}_3 = \frac{V1.M.1000}{V2}$$

V1: Harcanan EDTA

M: 1 ml EDTA= 0,96 mg CaCO₃

V2: Alınan numune miktarı (ml)

Kalsiyum karbonat mineralizasyonu optimizasyonu

İzole edilen bakteriler arasından en iyi sonuç veren bakterilerin farklı üre konsantrasyonu (100, 200, 250, 300, 333, 350 mM), başlangıç pH'sı (5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 7.5), sıcaklık (20, 25, 30, 42 °C) ve inkübasyon süresinin kalsiyum karbonat mineralizasyonuna etkisi araştırılmıştır.

Üreolitik bakteri izolasyonu

Çalışmada kullanılan bakteriler, Karcı dağı-İsrafil deresinden alınan su ve toprak örneklerinden izole edilmiştir. Aseptik koşullarda alınan toprak ve su örnekleri steril şişelere konularak laboratuarda buzdolabında +4 °C'de izole edilmek üzere muhafaza edilmiştir.

Bacillus cinsinin tüm türleri, endospor oluşturan bakterilerdir. Toprak ve su örneklerindeki diğer istenmeyen bakterilerin ölmesi amacıyla, örnekler bakteri izolasyonu öncesi sıcak su banyosunda 80 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. Örneklerdeki spor oluşturmeyen vejetatif formdaki bakterilerin ölmesi sağlanarak spor formların kalması sağlanmıştır. Daha sonra steril serum fizyolojik suda 10^{-1} - 10^{-10} oranında seyreltmeler yapılmıştır. Örnekler Üre Agar besiyerine ekilerek 37 °C de 24-48 saat inkübe edilmiş ve besiyerinde gelişen renkli koloniler mikroskopta incelenerek çubuk ve spor içeren izolatlar Nutrient Agar yatık besiyerinde stoklanmıştır.

Stoklanan tüm üre pozitif sporlu bakteriler daha sonra çalışılmak üzere *Bacillus sp.* olarak kaydedilmiştir. Bakterilerin izole edildiği toprak zonları ve izolatlar Tablo 1'de verilmiştir.

İzolasyon çalışmalarında *Proteus vulgaris* (pozitif) ve *Micrococcus flavus* (üre negatif) bakterileri kontrol olarak kullanılmıştır. Üre Agar'da gelişen pembe renkli koloniler ise üreaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1 ve 2). Pembe renkli kolonilerden rastgele koloniler, gram boyama yapılarak basil ve spor morfolojisindeki izolatlar Nutrient Agar'da stoklanarak +4 C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Tablo 1).

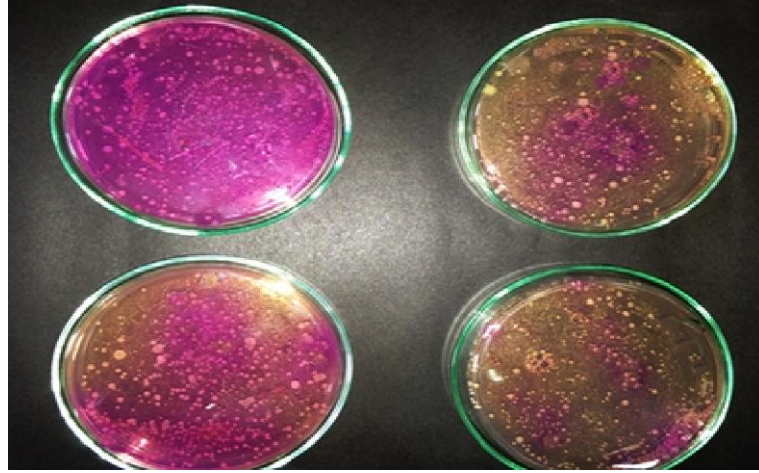


Sekil 1. Pozitif kontrol (pembe) olarak kullanılan *Proteus vulgaris* ATCC 33420 ve negatif kontrol (sarı) *Micrococcus flavus*'un Üreaz Agar besiyerindeki görünüşleri

Tablo1. Toprak örnekleri ve izole edilen mikroorganizmaların kodları

Alınan Toprak Özelliği	İzole Edilen Bakteri Kodu	Üreaz Aktivitesi
Dip zon toprağı (T1)	U3 (T1-3)	+++
	U10 (T1-11)	+
Doldurulmuş toprak alt zon (T2)	-	-
Su kenarı killi toprak (T3)	-	-
Doldurulmuş toprak üst zon (T4)	T4-5	+++
	T4-3	+++
	T4-12	++
	T4-7	+
Suya yakın toprak (T5)	T5-2	+
Üst zon toprağı(T6)	U5 (T6-7)	+++
	T6-4	++
	T6-52	+

+++ : çok iyi ++: iyi + : düşük



Sekil 2. Üre agara ekilen toprak örneklerinde üreaz aktivitesi olan koloniler

Mikroorganizmaların tanımlanması

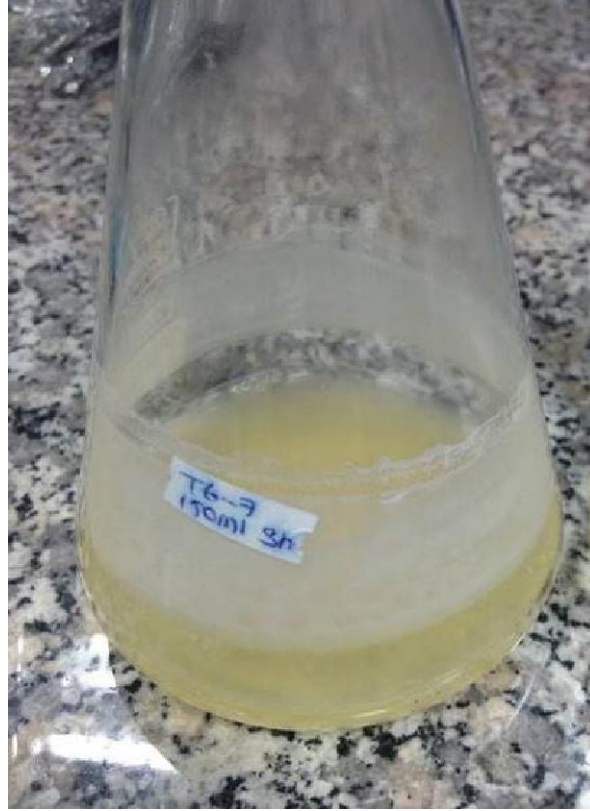
Kalsiyumca zengin topraklardan üreaz pozitif toplam 18 adet bakteri izole edilmiştir. İzolatlar içinde yüksek üreaz aktivitesine sahip olan ve sporlu bakterilerden 10 tanesi seçilerek Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde 16S rRNA sekans analizi yapılmıştır. Bakterilerin analiz sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Kalsiyum karbonat içeriğinin belirlenmesi

İzole edilen sporlu basil suşları Tablo 2' de olduğu gibi 5, 7, 10 ve 14. gün inkübasyon sürelerinde EDTA titrimetrik yöntemine dayalı olarak kalsiyum karbonat miktarı tespit edilmiştir. Bakterilerin sıvı kültür ortamında CaCO_3 ürettikleri gösteren erlenmeyerdeki görünümü Şekil 3'te verilmiştir.

Tablo 2: İzolatların 16S rRNA sekans analiz sonuçları

Bakteri kodu	Suş adı	Genk Bank No	Homoloji Yüzdesi (%)
T6-V22	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NR-042072.1	100
U2 (T4-5)	<i>Bacillus aerius</i>	KF861583.1	100
U3 (T1-3)	<i>Paenibacillus favisporus</i>	JN867753.1	99
T4-3	<i>Bacillus megaterium</i>	KF717514.1	99
U5 (T6-7)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	JQ900517.1	100
T6-V11	<i>Bacillus atrophaeus</i>	CP002207.1	99
T6-4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CP006952.1	100
T4-12	<i>Bacillus tequilensis</i>	JN205343.1	100
T6-52	<i>Bacillus licheniformis</i>	KF64695.1	99
U10 (T1-11)	<i>Bacillus mycoides</i>	EF210306.1	100



Şekil 3. İzolatın CaCO₃ minerilizasyon ortamında karbonat üretim görünüşleri

Tablo 3: Bakterilerin maksimum kalsiyum karbonat miktarları (mg/ml)

Bakteri kodu	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
U3 (T1-3)	920.448	1181.57	1474.56	1372.80
T4-3	442.36	513.792	623.23	480.00
U2 (T4-5)	1295.232	1160.45	1304.06	712.70
U5 (T6-7)	122.11	420.10	591.74	581.38
T6-4	1751.04	1153.92	1087.68	1277.76
T4-12	917.76	1037.12	1104.64	1129.76
T6-52	1027.84	1024.64	1120.64	736.00
T4-7	952.00	857.60	1038.08	1165.76
T5-2	1048.00	415.36	1104.00	1188.80
U10 (T1-11)	920.64	1044.80	1280.00	1397.44

Tablo 3'teki sonuçlara göre bu bakteriler içerisinde kalsiyum karbonat ürettiği tespit edilen *Paenibacillus favisporus* U3, *Lysinibacillus fusiformis* U5 ve *Bacillus mycoides* U10 bakterileri optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere rastgele seçilmiştir.

2.1.2. Kalsiyum Karbonat Mineralizasyonu Optimizasyonu

Üre konsantrasyonunun etkisi

Üre konsantrasyonunun bakteriyel kalsiyum karbonat mineralizasyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla beş farklı üre konsantrasyonu denenmiştir. Bakterilerin gelişme ortamına 100-350 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda steril üre ilave edilerek, arzu edilen üre konsantrasyonlarında bakteri tarafından üretilen kalsiyum karbonat miktarı değişimi incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4,5 ve 6'da verilmiştir.

Tablo 4: *Paenibacillus faavisporus* U3'ün farklı üre konsantrasyonlarında kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml) (pH:6.5, sıcaklık:37 °C)

Gün Üre	5. gün	7.gün	10. gün	14. gün
100 mM	2539,84	2630,4 mg	2805,12 mg	2794,4 mg
200 mM	2227,04 mg	2188,96 mg	2411,68 mg	2415,84 mg
250 mM	1744,16 mg	1532,51 mg	2229,6 mg	2075,04 mg
300 mM	1859,36 mg	1759,84 mg	2064,16 mg	2078,4 mg
333 mM	1933,76 mg	1889,92 mg	1807,68 mg	1708,32 mg
350 mM	1930,4 mg	1909,28 mg	1928,64 mg	1730,72 mg

Tablo 5: Farklı üre konsantrasyonlarında *Lysinibacillus fusiformis* U5 bakterisinin kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml) (pH:6.5, sıcaklık:37 °C)

Gün Üre	5. gün	7.gün	10. gün	14. gün
100 mM	722,88	741,28	756,64	847,04
200 mM	726,4	651,2	784,32	917,6
250 mM	665,12	675,04	503,68	790,72
300 mM	861,6	772,96	863,36	1056
333 mM	656	850,4	501,44	1120,96
350 mM	809,76	733,44	758,24	1189,76

Tablo 6: Farklı üre konsantrasyonlarda *Bacillus mycoides* U10 bakterisinin kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml) (pH:6.5, sıcaklık: 37 °C).

Üre miktarı \ Gün	5. gün	7.gün	10. gün	14. gün
100 mM	1595,04	1327,04	1334,4	1554,08
200 mM	1279,2	1156,48	1148,16	1431,84
250 mM	1512,32	1451,04	1314,56	1260,64
300 mM	1513,6	1180,64	1388,64	1496,96
333 mM	1572,48	1448	1213,12	1402,56
350 mM	1243,04	1280,64	1135,2	1297,44

Sıcaklığın etkisi

En iyi kalsiyum karbonat mineralizasyonunun saptandığı üre konsantrasyonu ve inkübasyon günlerinde dört bakteri suşu için sıcaklık taraması yapılmış ve ortam pH'ı 6.5'e ayarlanmıştır. Sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için bakteriler en iyi kalsiyum karbonat mineralizasyonu yaptıkları üre konsantrasyonunda ve sürelerde inkübe edilmişlerdir. Denenen sıcaklık parametreleri ise 20, 25, 30, 37 ve 42 C olup, ilgili sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo7: Sıcaklığın kalsiyum karbonat mineralizasyonu üzerine etkisi (mg/ml) (pH: 6.5)

Sıcaklık (°C)	20 °C	25 °C	30 °C	37 °C	42 °C
Bakteri					
<i>Paenibacillus favisporus</i> U3 (100 mM, 10 gün)	1376	1256	1184	2805,12	1584
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> U5 (350 mM, 14 gün)	193,28	198,08	259,2	1189,76	600,96
<i>Bacillus mycoides</i> U10 (100 mM, 5 gün)	1087,84	1002,24	1309,60	1595,04	1760,32

Başlangıç pH'sinin etkisi

En iyi kalsiyum karbonat mineralizasyonunun saptandığı üre konsantrasyonu, zaman ve sıcaklıkta dört bakteri suşunun, farklı başlangıç pH noktalarında (5.0, 5.5, 6.0, 7.0 ve 7.5) kalsiyum karbonat miktarları saptanmıştır. Kalsiyum karbonat çökelimine pH'nın etkisinin sonuçları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: Kalsiyum karbonat mineralizasyonuna başlangıç pH'sinin etkisi

pH Bakteri	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
<i>Paenibacillus favisporus</i> (U3)	1192	1753,6	1872	2805,12	1435,52	1272
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (U5)	1559,36	280	186,24	1189,76	135,36	812
<i>Bacillus mycoides</i> (U10)	1422,24	1278,72	1339,84	1595,04	934,56	905,6

Not: Her bakteri en iyi üre konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

2.1.3. Optimizasyon Şartlarında CaCO₃ Mineralizasyonu

Bakterilerin en iyi üre konsantrasyonu, en iyi sıcaklık ve en iyi pH değerlerinde kalsiyum mineralizasyonu araştırılmış ve karbonat çökelimi süreye bağlı olarak incelenmiştir. Her bakterinin optimum şartları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Üreolitik bakterilerin en iyi kalsiyum karbonat mineralizasyon parametreleri

Bakteri adı	Üre Konsantrasyonu	Sıcaklık	pH	İnkübasyon süresi
<i>Paenibacillus favisporus</i> U3	100 mM	37 °C	6.5	10. gün
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> U5	350 mM	37°C	5.0	14. gün
<i>Bacillus mycoides</i> U10	100 mM	42°C	5.0	14. gün

Optimum şartlarında kalsiyum minerilizasyonu çalışması sonuçları ise Tablo 10, 11 ve 12'de gösterilmiştir.

Tablo 10. *Paenibacillus favisporus* U3'ün optimal şartlarda kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml)

pH gün	5.0	5.5	6.0	6.5*	7.0	7.5
5. gün	1853,28	2476,48	2590,72	2539,84	1769,92	1280
7. gün	2148,32	2139,2	1900,64	2630,4	1258,4	1015,84
10. gün	2128,32	2144,48	2036,48	2805,1	1508,64	1221,44
14. gün	1192	1753,6	1872	2794,4	1427,2	1272

Tablo 11. *Bacillus mycoides* U10'un optimal şartlarda kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml)

pH gün	5.0	5.5	6.0	6.5*	7.0	7.5
5. gün	2089,28	1986,24	1453,12	2214,56	944,96	1064,32
7. gün	1884,16	1914,08	1709,12	1712,00	1173,92	1169,92
10. gün	1556,16	1601,44	1667,52	2159,84	1076,48	1064,48
14. gün	8925,00	6092,00	4465,00	2981,39	3935,00	4129,78

Tablo 12. *Lysinibacillus fusiformis* U5'in optimal şartlarda kalsiyum karbonat mineralizasyonu (mg/ml)

pH gün	5.0	5.5	6.0	6.5*	7.0	7.5
5. gün	63,52	65,12	64,00	809,76	55,36	100,32
7. gün	71,36	30,72	44,64	733,44	49,6	42,72
10. gün	107,84	74,40	95,04	758,24	107,68	79,84
14. gün	1559,36	280,00	186,76	1189,76	135,36	812,00

2.1.4. *S. pasteurii* ATCC 6453'ün CaCO₃ Çökeli mi

Çalışmanın bu aşamasında yerel izolatlarımızın kalsiyum karbonat çökeli mi miktar ile indikatör bir bakterinin kalsiyum karbonat çökeli mi miktarı kıyaslanarak, yerel izolatlarımızın karbonat çökeli mi yetenekleri hakkında bilgi edinilmesi hedeflenmiştir.

Çevre dostu bakteriyal çimento olarak kabul edilen bakteriyal kalsiyum karbonatın çevre korunmasına önemli katkılar sağlayacağı kabul edilse de, henüz hem maliyeti fazladır hem de tüm dünyada kabul gören üretici bir bakteri olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle kalsiyum karbonat çökeli mi ile ilgili araştırmalar, farklı mikroorganizmaların mineralizasyon yeteneği, farklı çevrelerden karbonat çökeli mi yapan yeni mikroorganizmaların izolasyonu, çökeli mi yaptığı bilinen mikroorganizmaların özelliklerinin iyileştirilip üretiminin artırılmasına ya da çeşitli optimizasyon şartlarının ortaya konduğu mikroorganizmaların seçimine yöneliktir.

Projede bu amaçla izolatlarımızın kalsiyum karbonat çökeli mi miktarları ile indikatör bir suş olan *S. pasteurii* ATCC 6453'ün karbonat çökeli mi miktarlarını karşılaştırdık. Çalışmada indikatör bakteri olarak kullanılan *S. pasteurii* ATCC 6453 bakterisi, üreaz pozitif bir bakteridir. Bakterinin çökeli mi yaptığı kalsiyum karbonat miktarı, her izolatın maksimum karbonat mineralizasyon yaptığı şartlar dikkate alınarak mukayese edilmiştir. Sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 13'te de görüleceği gibi *S. pasteurii* ATCC 6453 suşunun kalsiyum karbonat üretim miktarı yerel izolatlarımız olan U2, U3, U5 ve U10'un kalsiyum karbonat miktarından oldukça düşük seviyededir. Genel olarak tüm izolatların üretim miktarları indikatöre kıyasla fazla olmakla birlikte *P. favisporus* U3 bakterisi en iyi üretimin sağlandığı bakteri olmuştur.

P. favisporus U3 bakterisi 37 °C, pH: 6.5, 100 mM üre konsantrasyonunda geliştirildiğinde kalsiyum karbonat üretim aralığı 2539,84-2805,1 mg/L'dir. *S. pasteurii* ATCC 6453 bakterisi aynı şartlarda geliştirildiğinde 551,52-1135,8 mg/L miktarında kalsiyum karbonat çökeli mi yapmıştır. Yerel izolatın karbonat üretimi yaklaşık olarak 2 kattır. Bu durum diğer bakterilerin geliştiği şartlar için de geçerli olup, izolatlarımızın mineralizasyon yeteneklerinin daha detaylı çalışmalarda araştırmaya değer olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 13. Üreolitik izolatların *S. pasteurii* ATCC 6453 ile CaCO₃ üretimi açısından (mg/L) karşılaştırılması (a: 20 °C, pH 5.5, 300 mM üre, b: 37 °C, pH: 6.5, 100 mM üre, c: 37 °C, pH 5.0,

Zaman	Bakteri	<i>B. aerius</i> U2 ^(a)	<i>S. pasteurii</i> ATCC 6453 ^a	<i>P. favisporus</i> U3 ^(b)	<i>S. pasteurii</i> ATCC 6453 ^b	<i>L. fusiformis</i> U5 ^(c)	<i>S. pasteurii</i> ATCC 6453 ^c	<i>B. mycoides</i> U10 ^(d)	<i>S. pasteurii</i> ATCC 6453 ^d
5		2483	485,65	2539,84	551,52 ±20,4	63,52 ±2,72	112,08 ±0	2089,28 ±46,4	514,68 ±11,04
		±207,12	±78,05	±33,65					
7		2356,16	912,63	2630,4	935,4 ±24	71,36 ±32,64	75,72 ±10,44	1884,16 ±192,96	945,12 ±12,48
		±174,72	±52,7	±4,92					
10		1951,04	1089,3	2805,1	1135,8 ±196,32	107,84 ±48	191,4 ±109,56	1556,16 ±91,52	1142,76 ±49,92
		±10,08	±28,1	±136,7					
14		1825,76	1107,06	2794,4	700,92 ±149,04	1559,365 ±269,76	308,76 ±33,24	-	1447,32 ±39,84
		±308,40	±31	±15,87					

350 mM üre d: 42 °C, pH 5.0, 100 mM üre)

2.2. Jeoteknik Çalışmalar

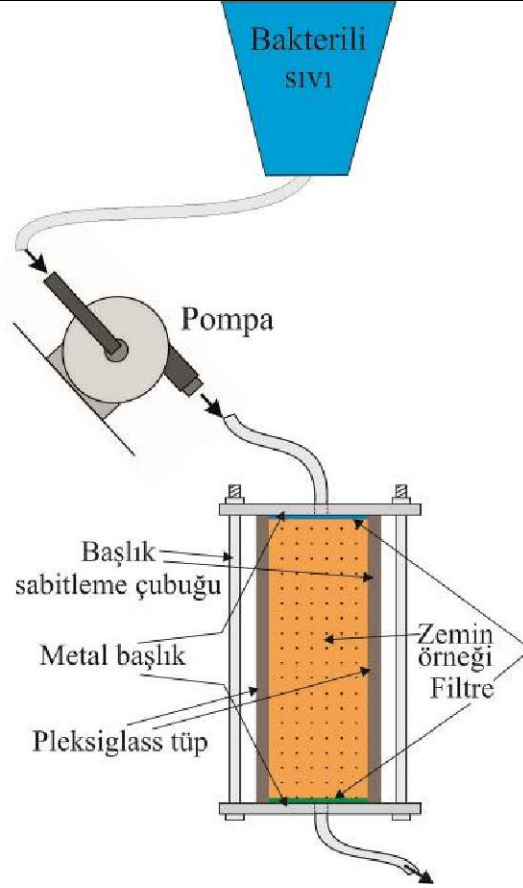
2.2.1. Deney Düzenegi ve Zemin Özellikleri

Deneyde kullanılacak zemin örnekleri Denizli kent merkezinde yaygın olarak bulunan kumlu birimlerden seçilmiştir. Bu tür zeminler Denizli kent merkezinin güneyinde bulunan metamorfik kayalardan türemekte olup oldukça geniş bir yayılıma sahiptir. Laboratuvar ortamında elek analizi yapılmış, #40 nolu elekten geçen ve #200 nolu elekte kalan tane boyu dağılımına sahip örnekler hazırlanmıştır. Bu örneklerin kullanılacak bakterilerle etkileşime girmemesi ve/veya başka bakterilerin ortamda bulunmaması için zemin örnekleri sterilize edilmiştir (Şekil 4). Bu örneklerden yaklaşık 10 kg hazırlanmıştır.



Şekil 4. Sterilize edilmiş #40 nolu elekten geçen ve #200 nolu ekte kalan tane boyu dağılımına sahip zemin örneği

Proje önerisinde taslak çizimi (Şekil 5) verilen deney düzeneği hazırlanmıştır (Şekil 6). Plexiglass tüpler 6 cm çapında ve 15 cm boyundadır. Filtreleme için konulan aparatlardan sonra zemin örneğinin yerleştirileceği uzunluk ortalama 12 cm'dir (Şekil 7). Filtre sabitleme ve diğer aparatlar bu tüplere uygun olarak yapılmıştır (Şekil 8). Sabit basıncın sağlanması için peristatik pompa kullanılmıştır (Şekil 9). Sonuç olarak jeoteknik deney aparatı ve zemin örnekleri hazır hale getirilmiş ve deney aşamasına gelinmiştir.



Şekil 5. Taslak deney düzeneği



Şekil 6. Hazırlanan deney düzeneği ve zemin örneği ile deneye hazır hali



Şekil 7. Plexiglass tüpler



Şekil 8 Filtre sabitleme ve numune çıkartma aparatı



Şekil 9. Peristaltik pompa

2.2.2. Jeoteknik Deneyler

Jeoteknik deneyler dört farklı gerilme altında yapılmıştır. İlk deney düzeneğinde sıvının serbest halde akabilmesi için bakteri haznesi deney düzeneğinden 50 cm yukarıda hazırlanmış ve 3 litre bakterili sıvı hazırlanan zemin örneğinden geçirilmiştir (Şekil 10). Bu deney düzeneğinde yükseklik farkından oluşan sıvı basıncı 5 kPa olmuştur. Daha sonraki deney düzeneklerinde bakterili sıvı haznesi ve deney düzeneği aynı konumda olacak şekilde yerleştirilmiş ve 3 litre bakterili sıvı sırasıyla 25 d/d (devir/dakika), 50 d/d ve 100 d/d altında zemin örneğinden geçirilmiştir (Şekil 11). Farklı devirlerde deney tüpünün çıkışında 5 kPa bölümlenmeli ve toplam kapasitesi 100 kPa olan manometre ile basınç ölçümü yapılmıştır (Şekil 12). Zemin oldukça geçirimli olduğu ve ucu açık bir sistem olduğu için tüpün çıkışında basınç oluşmamıştır. Ancak farklı devir/dakikalarda geçen sıvı miktarı aşağıdaki şekildedir:

Motor hızı (d/d)	Geçen sıvı miktarı (ml/d)
25	21
50	42
100	84

Örnekler 50°C'lik etüvde 48 saat kurulmuş ve aynı deney iki defa daha tekrarlanmıştır. Böylece her zemin örneğinden toplam 9 litre sıvı geçmiştir.

Aşağıda değerleri verilen jeoteknik deneyler üç defa tekrarlanmış ve ortalamaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ilgili grafiklerde 1, 2, 3 ve Ort. Biçiminde verilmiştir.



Şekil 10. Serbest halde bakterili sıvının zemin örneğinden geçişi



Şekil 11. 25d/d halinde bakterili sıvının zemin örneğinden geçişi



Şekil 12. Basınç ölçümünde kullanılan manometre

2.2.3. Birim hacim ağırlık

Zeminin birim hacim ağırlığı en temel fiziko-mekanik özelliklerden birisini oluşturmaktadır. Birimlerin hacim ağırlığı ile dayanım arasında genellikle doğrusal bir ilişki söz konusudur. Proje kapsamında yapılan deneylerde de doğal zemin ile içerisinde bakteri geçirilmiş zeminlerin birim hacim ağırlıkları ölçülmüştür (Şekil 13). Doğal zemin tüp içerisine yerleştirilmiş, hacim ve ağırlığı belirlenmiştir. Güçlendirilmiş zemin ise geometrik yapıya sahiptir ve aynı şekilde birim hacim ağırlığı hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 14'de gösterilmiştir. Bu değerlerin $13,5 \text{ kN/m}^3$ ile $14,6 \text{ kN/m}^3$ arasında değiştiği görülmektedir. En düşük değer $13,5 \text{ kN/m}^3$ ile bakterinin serbest halde akışına izin verilen örnektir.

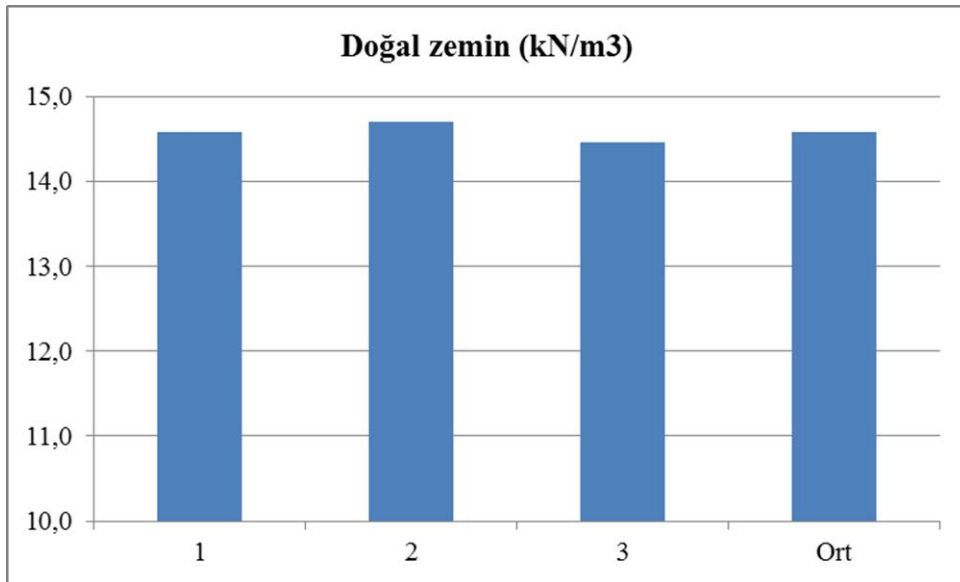


-a-

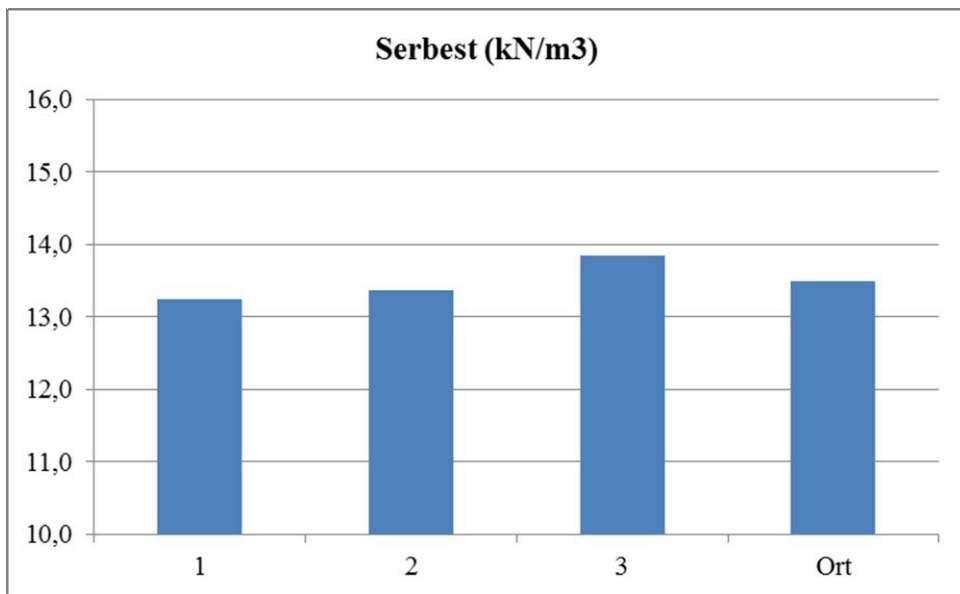


-b-

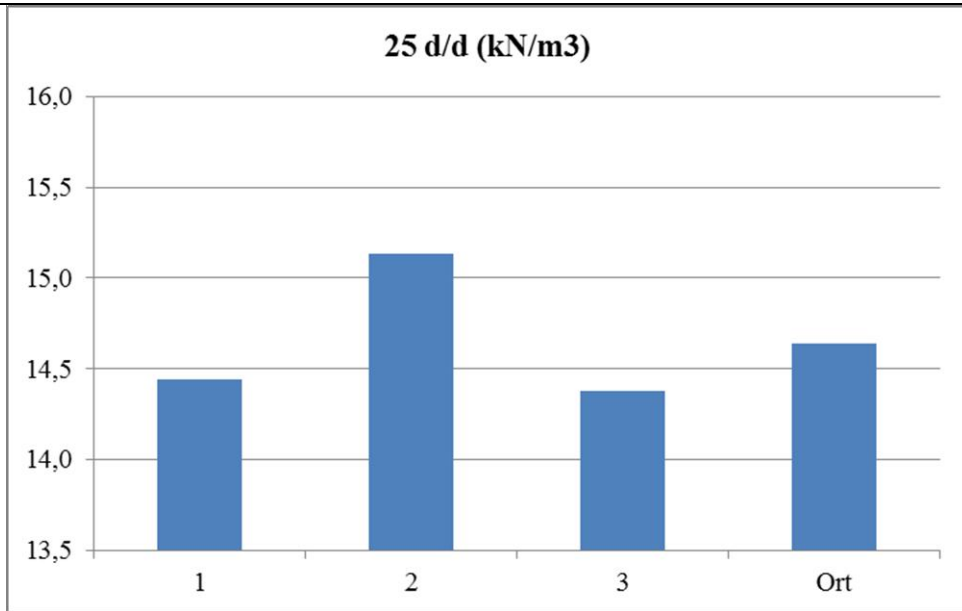
Şekil 13. Birim hacim ağırlığı hesaplanan örnekler a: doğal zemin, b: güçlendirilmiş zemin



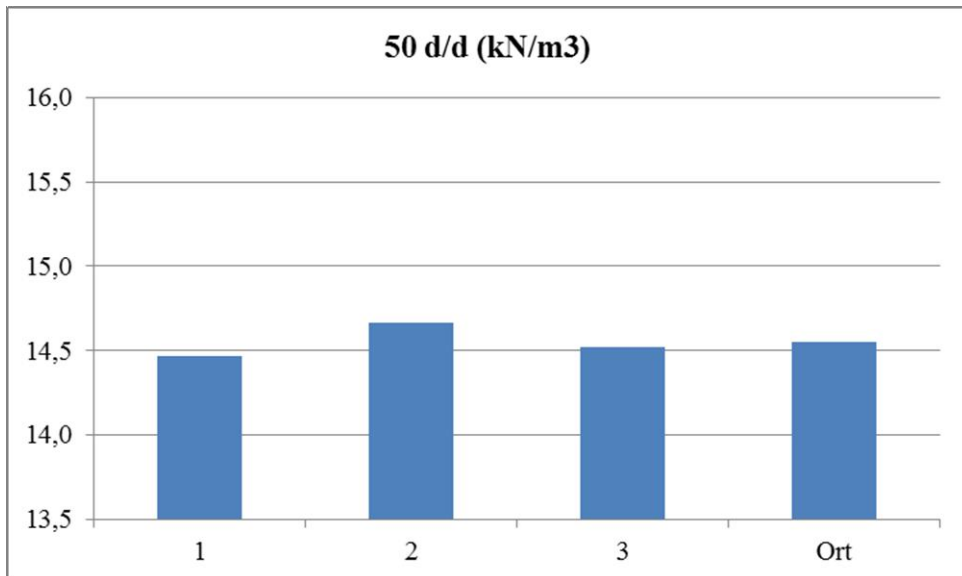
-a-



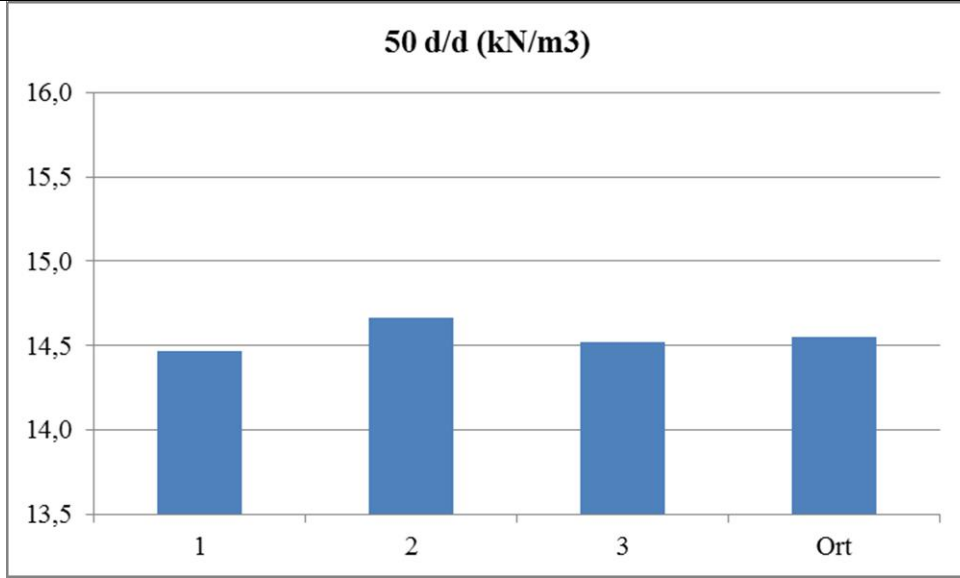
-b-



-c-



-d-



-e-

Şekil 14. Örneklerin birim hacim ağırlıkları: doğal zemin (a), serbest akış (b), 25 d/d (c), 50 d/d (d) ve 100 d/d (e)

2.2.4. Tek Eksenli Basma Dayanımı

Kaya ve zeminlerin bileşen, yapı ve dokularından dolayı özellikleri çok geniş bir aralıkta yer alır. Bunların tanımlanabilmeleri için indeks özellikleri denilen birçok ölçüm yapılması gerekir. Bunların arasında en yaygın olanlar porozite (boşluk ve katı kısımların birbirlerine göre göreceli oranları), yoğunluk (kütle miktarı), permeabilite (sıvı iletim yeteneği), dayanım (tanelerin bir arada tutunma yeteneği), elastisite modülü (deformasyon yeteneği) dır. Dayanım bu parametreler arasında en yaygın ve en çok kullanılanlardan birisidir. Dayanım tek eksenli ve üç eksenli şartlar altında elde edilebilir. Bu proje kapsamında ilgili düzencekle (Şekil 15) örneklerin tek eksenli basma dayanımının belirlenmesi hedeflenmiştir. Tek eksenli basma dayanımı (σ_c) aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$\sigma_c = \frac{P}{A}$$

burada

σ_c =Tek eksenli basma dayanımı,

P= Kuvvet,

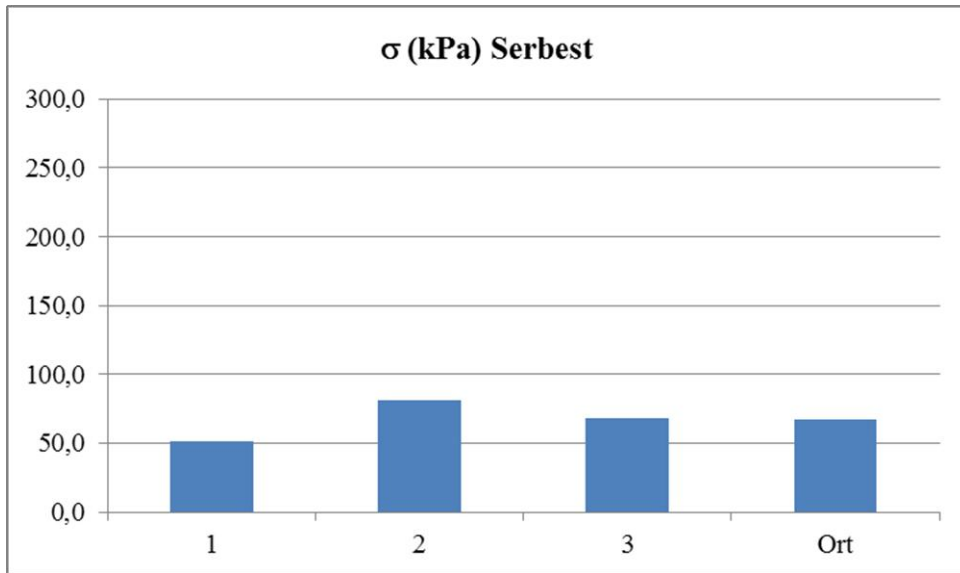
A= Alan.

Doğal deney örneğinin kohezyonsuz kumdan oluştuğu göz önüne alınırsa, bu birimin belirli bir katı

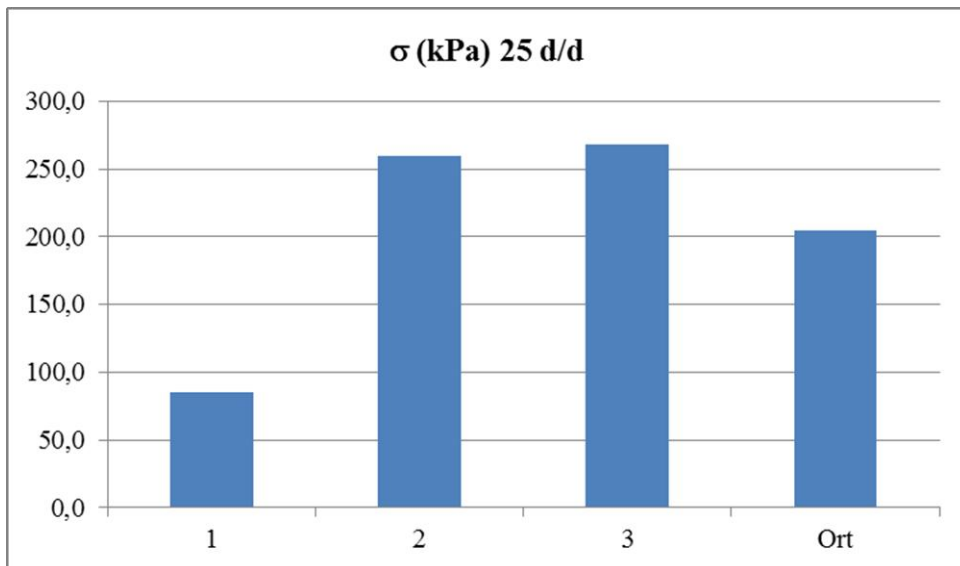
geometrik şekli olmadığı için (Şekil 10.a) laboratuvarında tek eksenli basma dayanımını belirlemek mümkün değildir. Bakteri işleminden sonra doğal zemin örneğinin katı bir geometrik forma girmesi bile tek başına kohezyonun arttığını ve dolayısıyla dayanımın da arttığını gösterecektir. Serbest akış, 25 d/d, 50 d/d ve 100 d/d altında elde edilen örneklerin tek eksenli basma dayanımı (σ_c) sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 16):



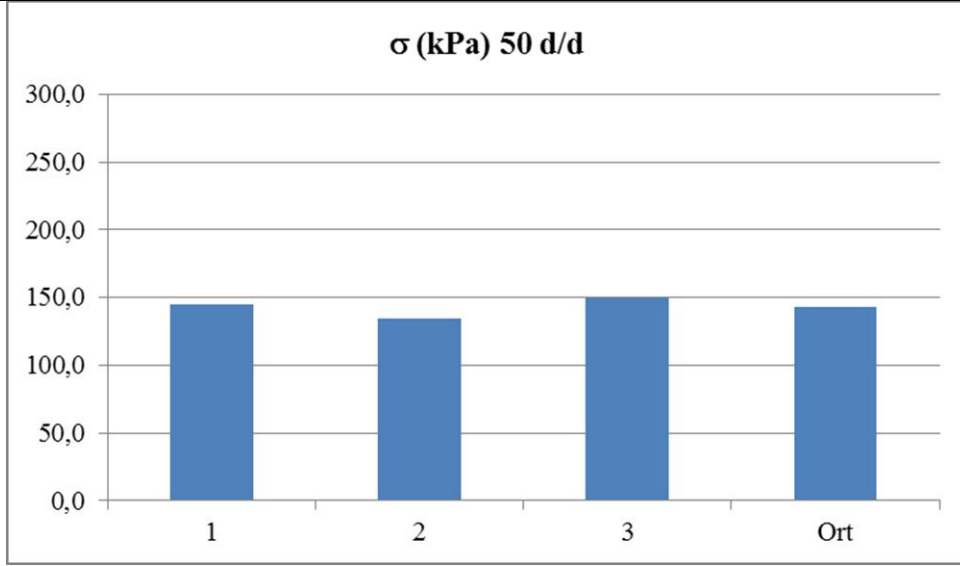
Şekil 15. Tek eksenli basma dayanımı deney düzeneği ve yenilmiş bir zemin örneği



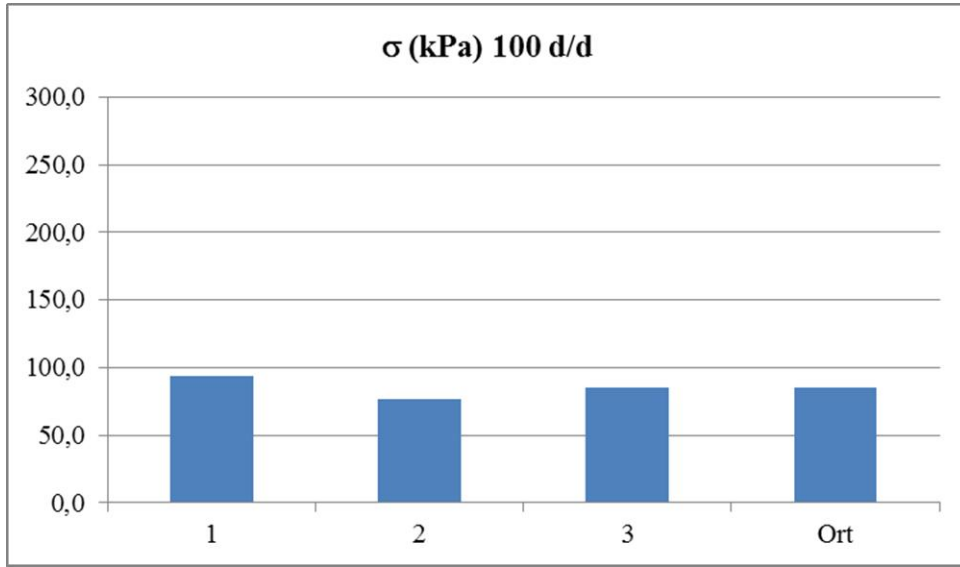
-a-



-b-



-c-



-d-

Şekil 16. Serbest akış (a), 25 d/d (b), 50 d/d (c) ve 100 d/d (d) altında elde edilen örneklerin tek eksenli basma dayanımı

2.2.5. Elastisite Modülü

Elastisite modülü (E) kaya ve zeminlerin deformasyon yeteneğini tanımlamada kullanılan en önemli indeks özelliklerinden birisidir ve aşağıdaki denklem ile ifade edilir:

$$E = \frac{\sigma_c}{\epsilon}$$

burada

E= Elastisite modülü

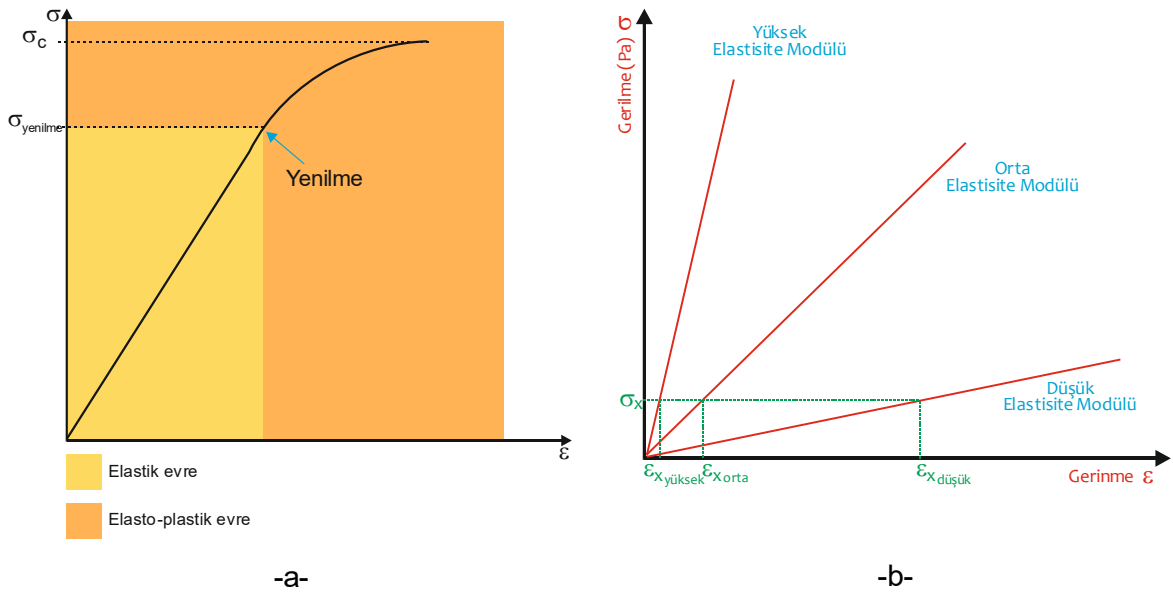
σ_c =Gerilme (tek eksenli basma dayanımı),

ϵ = Gerinme ($\epsilon = \Delta l/l$)

Δl = Boydaki değişim

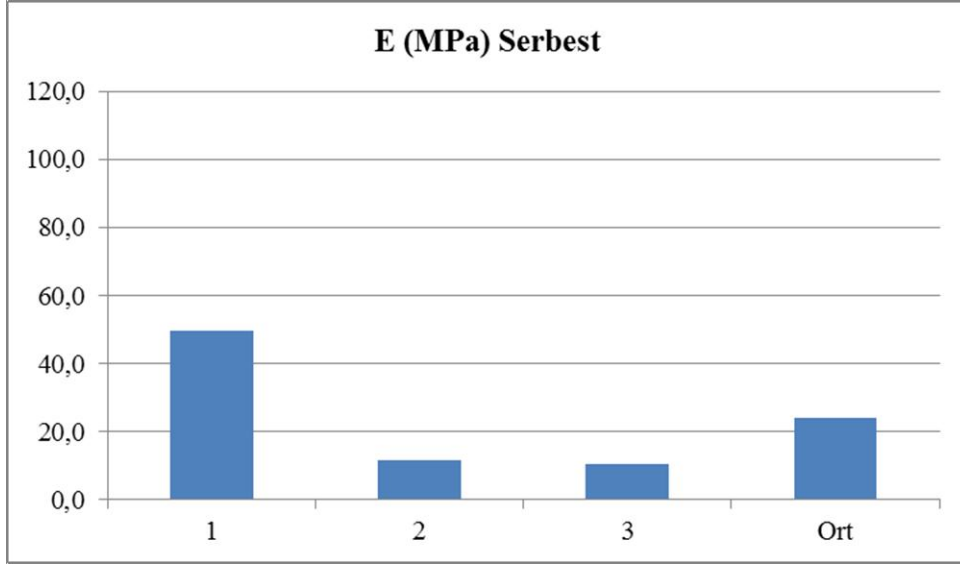
l = Deney öncesi orijinal boy

İdeal gerilme-gerinme grafiği aşağıdaki şekilde verilmiştir. Burada izlendiği gibi ilişki önce elastik ve doğrusaldır. Gerilme yenilme sınırını aştığında elasto-plastik evreye geçilir ve grafik doğrusallıktan uzaklaşır (Şekil 17.a). Göreceli elastisite modülü tanımları Şekil 17.b'de verilmiştir. Buna göre yüksek elastisite modülüne sahip birimlerde daha az şekil değiştirme ve/veya gerinme gözleneceği söylenebilir. Deneyde beklenen ise, deney örneğinin başlangıçta düşük, bakteri ile yapılan işlemde sonra daha yüksek elastisite modülüne sahip olmasıdır. Dolayısıyla zeminde yük miktarı değişmezse gerinme azalacak veya tersine ifade ile aynı gerinmeyi elde etmek için zemine daha fazla yükleme yapılabilecektir. Dolayısıyla mikrobiyal iyileştirmeden sonra test edilen örneğin elastisite modülünde artış olması beklenmelidir.

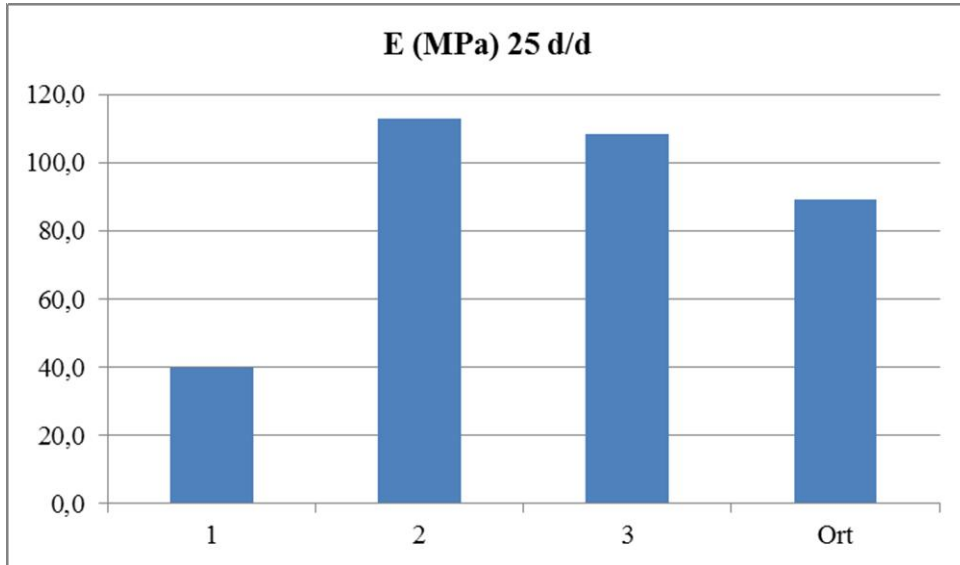


Şekil 17. a:İdeal elastisite modülü (gerilme-gerinme) grafiği, (b) göreceli elastisite modülü tanımları

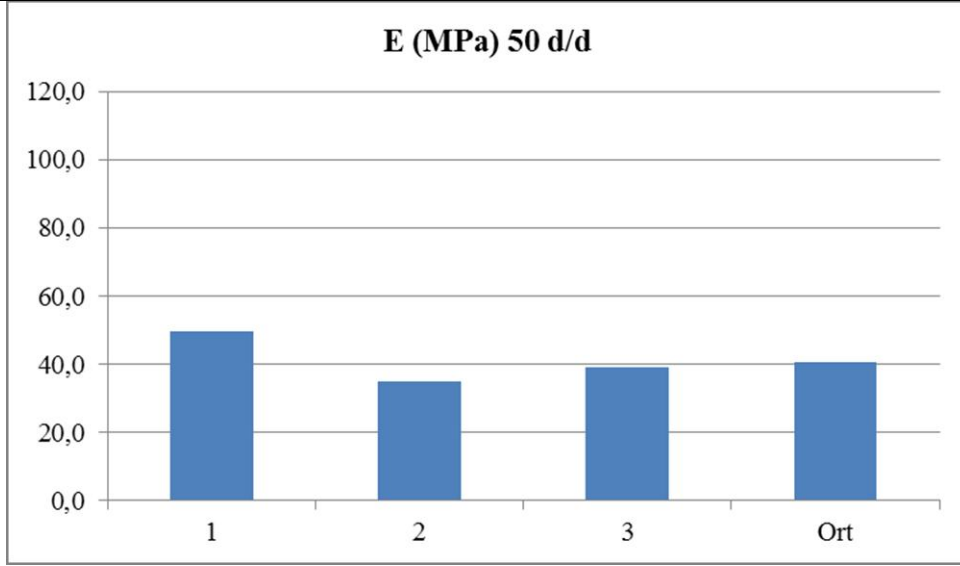
Serbest akış, 25 d/d, 50 d/d ve 100 d/d altında elde edilen örneklerin statik elastisite modülü (E_s) sonuçları aşağıda (Şekil 18) verilmiştir:



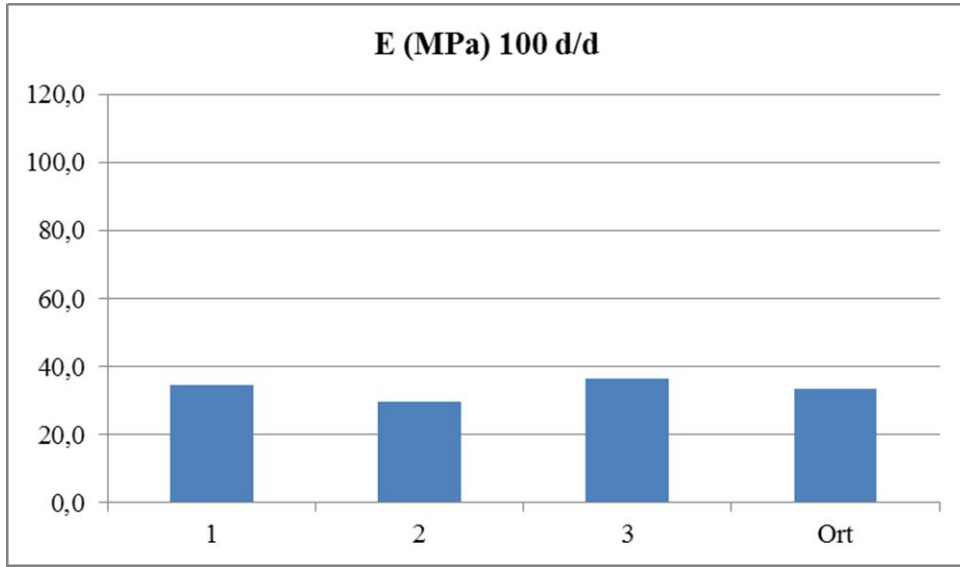
-a-



-b-



-c-



-d-

Şekil 18. Serbest akış (a), 25 d/d (b), 50 d/d (c) ve 100 d/d (d) altında elde edilen örneklerin statik elastisite modülü (Es)

2.2.6. Sismik Özellikler

Sismik yöntemler kayaların dinamik özelliklerinin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır (Sing ve Sarma, 2008). Kaya-zemin türü malzeme özelliklerinin tahribatsız yöntemlerle belirlenmesi örneklerin başka deneylerde de kullanılması açısından önemlidir. Kaya örneklerinin ultrasonik P (boyuna) ve S (enine) dalga hızları, kayanın yoğunluk ve doku özelliklerine bağlı olarak

değişmektedir. Laboratuvarında ölçülen P ve S dalga hızları ölçülerek kaya örneklerinin çeşitli dinamik özelliklerini belirlemek mümkün olmaktadır (D'Andre vd. 1965; Deere ve Miller 1966; Gardner vd.1974; Inoue ve Ohomi 1981; Gaviglio 1989).

Sonikmetre kullanılarak zemin örneklerinin P ve S dalga iletim hızları ölçülmüştür (Şekil 19). Doğal zemin bir tüp içerisine konulup çevresi yalıtımlı bir malzeme ile kapatılarak ölçümler yapılmıştır (Şekil 19.a). Diğer örneklerin ölçümü ise normal kaya karotlarının hız ölçümleri ile aynı olmuştur (Şekil 19.b). Örneklerin ölçülen P dalga boyu (V_P) (Şekil 20) ve enine dalga boyu (V_S) hızları (Şekil 21) aşağıda verilmiştir:

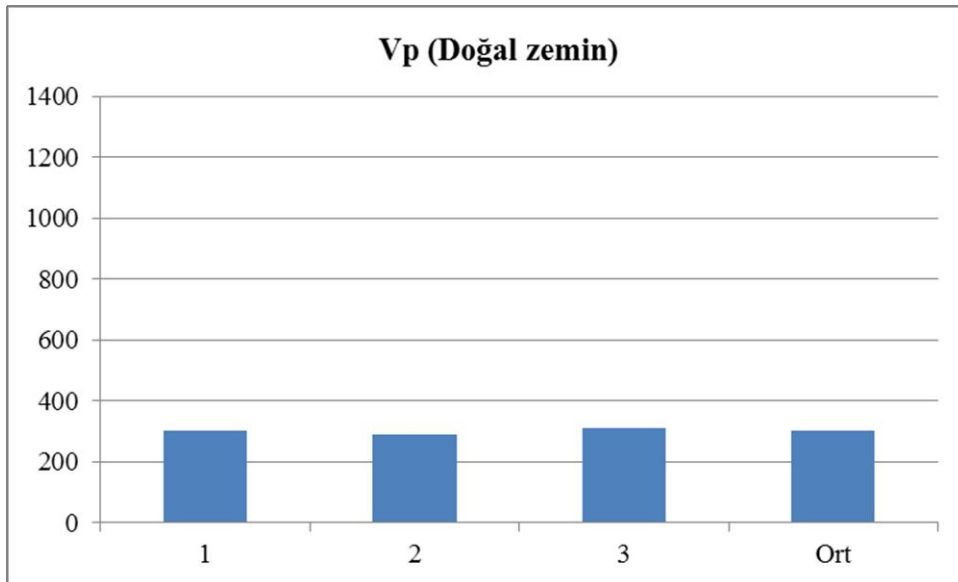


-a-

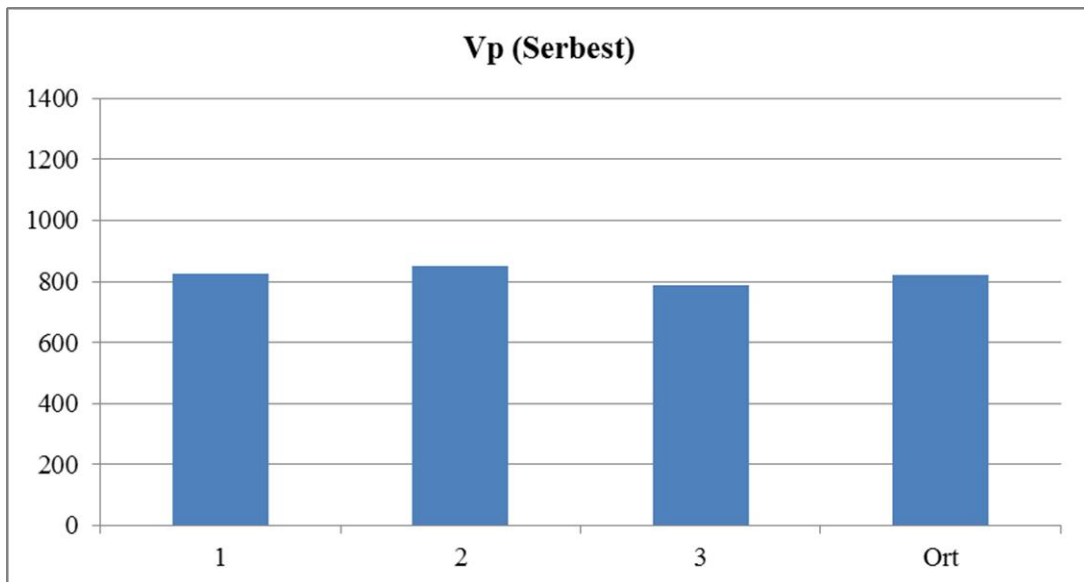


-b-

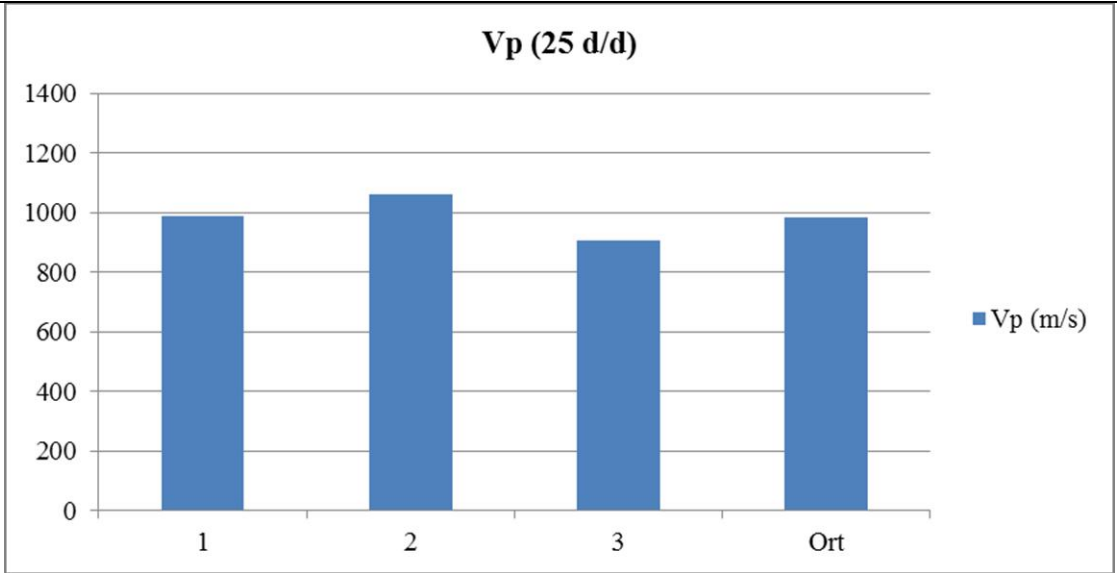
Şekil 19. Doğal ve güçlendirilmiş örneklerin hızlarının belirlenmesi için kullanılan düzenek



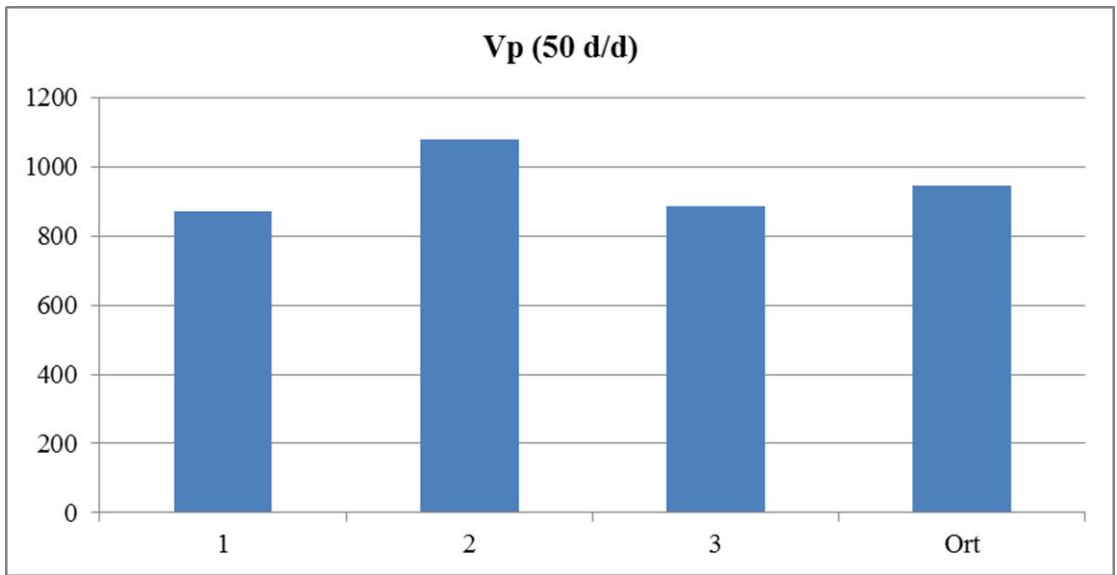
-a-



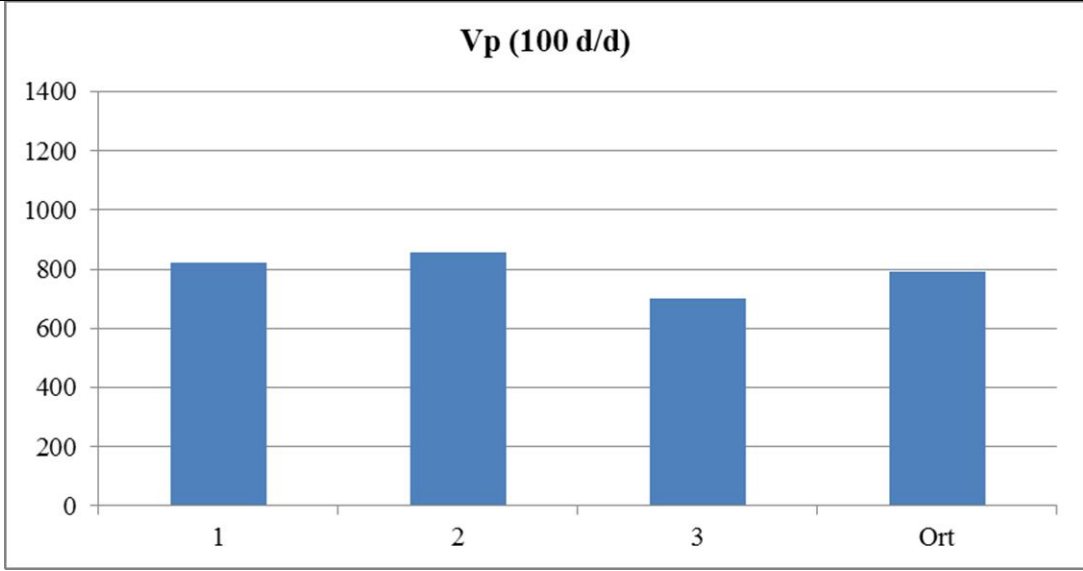
-b-



-c-

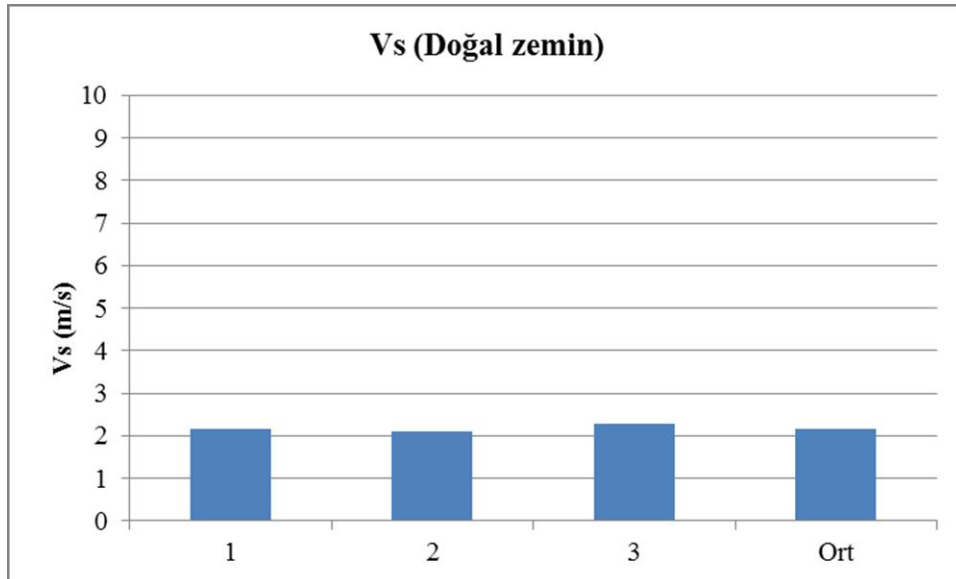


-d-

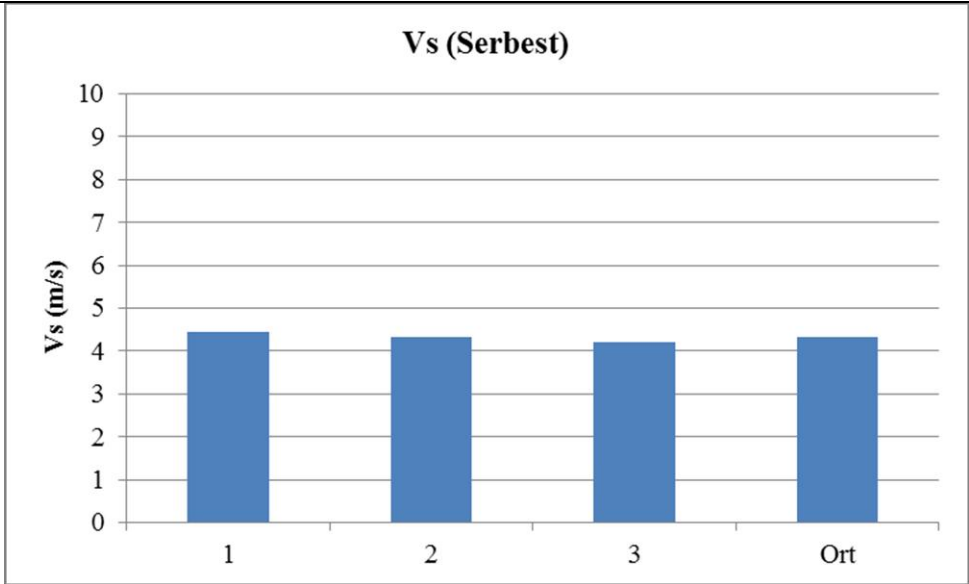


-e-

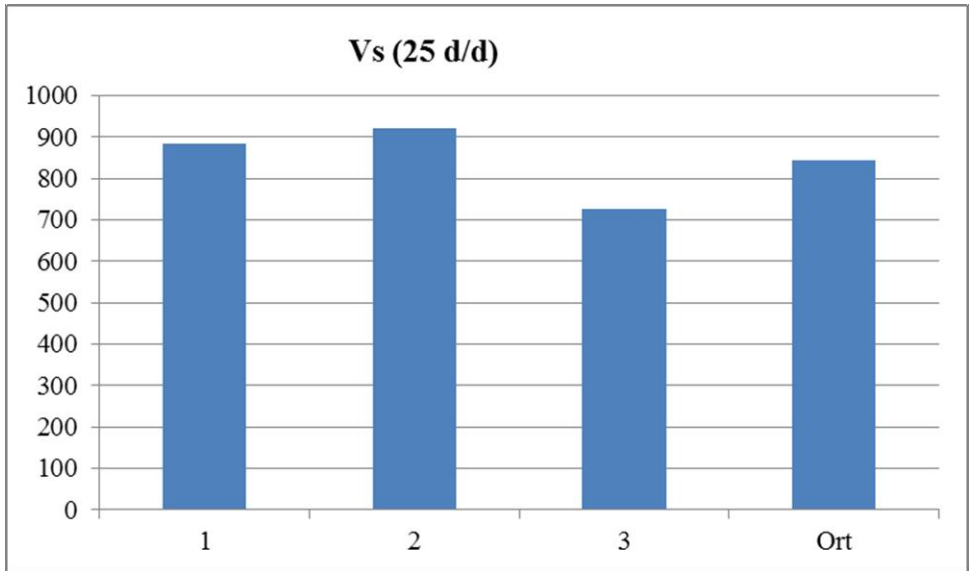
Şekil 20. Doğal zemin (a), serbest akış (b), 25 d/d (c), 50 d/d (d) ve 100 d/d (e) altında elde edilen örneklerin (V_p) hızları



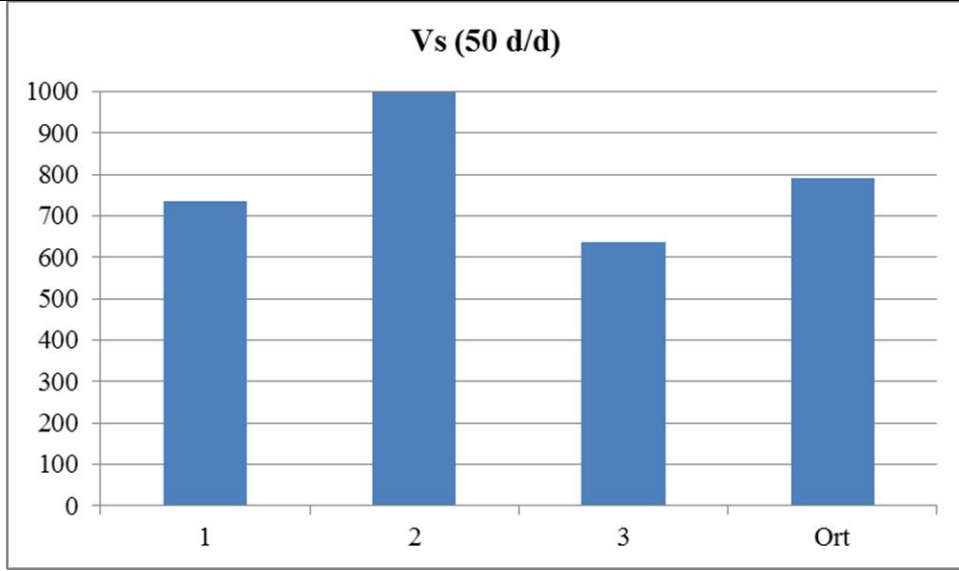
-a-



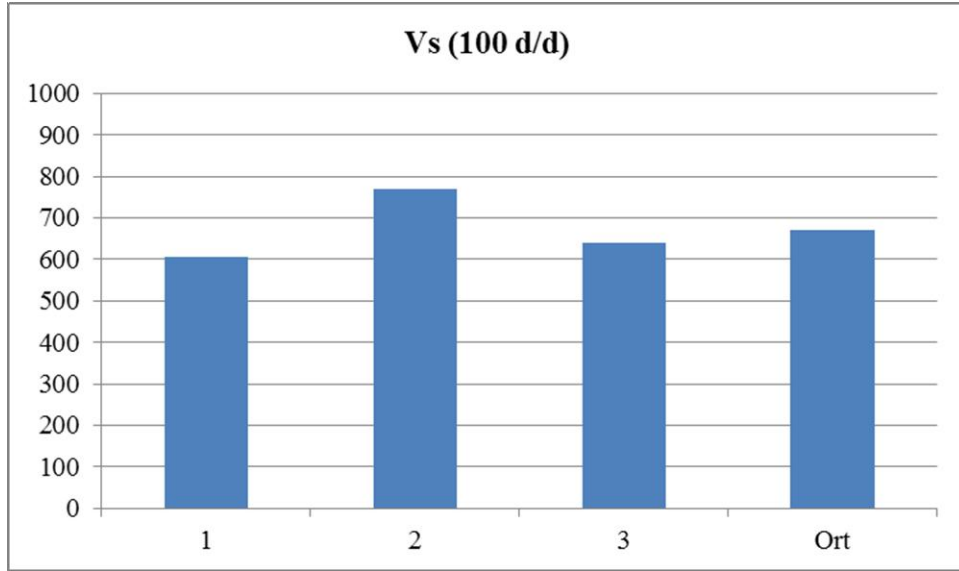
-b-



-c-



-d-



-e-

Şekil 21. Doğal zemin (a), serbest akış (b), 25 d/d (c), 50 d/d (d) ve 100 d/d (e) altında elde edilen örneklerin (V_s) hızları

2.3. Mineralojik Çalışmalar

2.3.1. Laboratuvar Koşullarında Üretilen Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Oluşumlarının Karakterizasyonu

2.3.1.1. X-Işınları Kırınımı (XRD) İncelemeleri

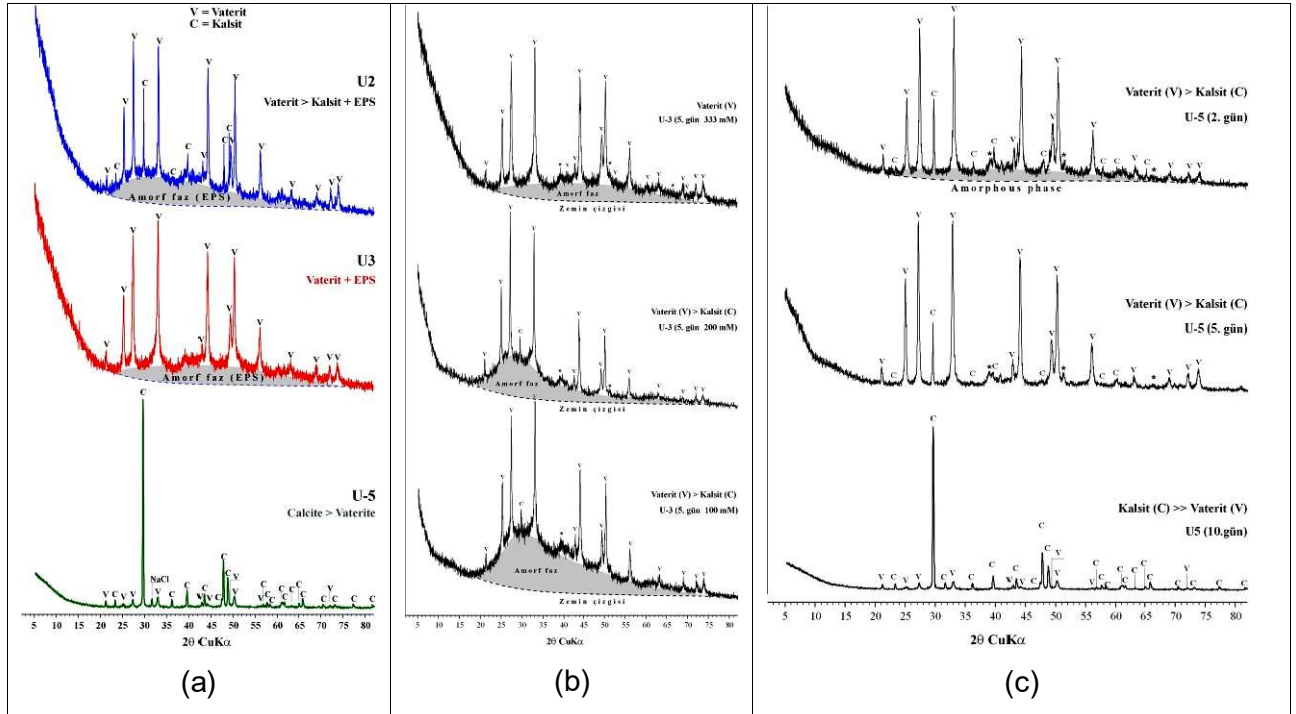
Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşumlarının kristal yapısını (kristalin, yarı-kristalin, amorf) ve mineralojik bileşimini incelemek amacıyla U2 (*Bacillus aerius*), U3 (*Paenibacillus favisporus*) ve U5 (*Lysinibacillus fusiformis*) numaralı örneklerin farklı üre konsantrasyonları ve süre koşullarında elde edilen ürünlerin XRD incelemeleri yapılmış ve bunların kristalin (kalsit ve vaterit) ve amorf (Ekstraselular Polimerik Substance: EPS) yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 22). XRD verilerine göre U5 bütünüyle kristalin malzemeden oluşmakta, buna karşın U2 ve U3 nolu örnekte amorf fazı temsil eden EPS oluşumları gözlenmektedir. Karbonat mineral bileşimi açısından U3 tümüyle vaterit, U2 ve U5 vaterit + kalsit bileşimine sahiptir. U3 örneğinde yaygın olarak gözlenen vaterit; doğada ender gözlenen kalsiyum karbonat (CaCO_3) polimorfu olup, sulu doğal ve laboratuvar ortamlarında kalsit ile birlikte bakteri kökenli (mikrobiyal) oluşumlar şeklinde yaygın olarak bilinmektedir (Örn: Giralt vd. 2001; Mann, S., 2001; Braissant ve Verrecchia, 2002; Lee, 2003; Tong, 2004; Xu vd., 2004; Rautaray, 2005; Jimenez-Lopez vd., 2007; Rodriguez-Navarro vd., 2007; Ouhenia, 2008; Qiao vd., 2008; Soldati vd., 2008; Leng et al., 2010; Chahal, 2011; Njegić-Džakula vd., 2011; Achal, 2014).

Mikrobiyolojik çalışmalar bölümünde ayrıntılı olarak belirtildiği gibi, bakteriyel kalsiyum karbonat oluşumlarının maksimum (veya optimum) CaCO_3 konsantrasyonlarının koşullarının belirlenmesi açısından farklı üre konsantrasyonları, inkübasyon süreleri ve başlangıç pH koşulları uygulanmıştır (Şekil 23). CaCO_3 konsantrasyonunu etkileyen en önemli parametre bakteri türü olup, süre, konsantrasyon ve pH koşulları ikinci derecede rol oynamaktadır. Üre konsantrasyonu en önemli parametre konumunda olup, özellikle U3 örneğinin CaCO_3 konsantrasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir (Şekil 23a). İnkübasyon süresi U3, sıcaklık ise U2 ve U5 nolu örneklerde önemli olmaktadır (Şekil 23b-c). pH etkisi daha az olup, U3 ve U5 nolu örneklerde CaCO_3 konsantrasyonunu kısmen de olsa etkilemektedir.

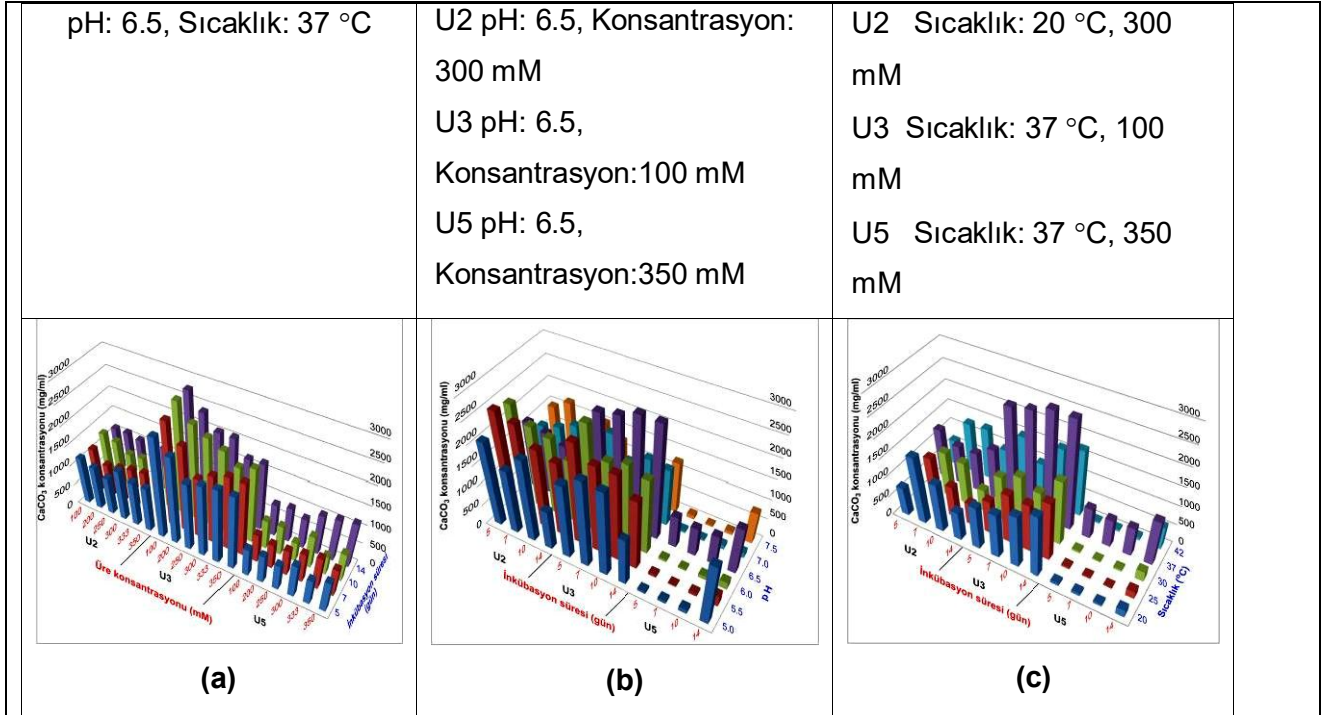
U3 nolu örneği temsil eden bakteriler (*Paenibacillus favisporus*) tüm koşullarda en yüksek CaCO_3 üretimini sağlamıştır. Bu nedenle jeoteknik uygulamalarda U3 nolu örnek (*Paenibacillus favisporus*) kullanılmış olup, optimum koşullar aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

Parametre	Değer
Üre konsantrasyonu	100 mM
Sıcaklık	37 °C
Başlangıç pH	6.5
İnkübasyon süresi	10 gün
Maksimum konsantrasyon	2805 mg/ml

Uygulanan farklı parametrelerin mineralojik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla ek XRD incelemeleri gerçekleştirilmiştir. (Şekil 22a-c). U3 nolu örnekte, artan üre konsantrasyonu ile birlikte, amorf faz azalmış ve büyük ölçüde vaterit ile temsil olunan kristalin faz artmıştır (Şekil 22b). U5 nolu örnekte ise artan süre ile birlikte hem amorf faz azalmış, buna karşın kalsitle temsil edilen kristal oranı artmıştır (Şekil 22c). Mineralojik bileşim açısından üre konsantrasyonu ve inkübasyon süresi kristalin fazın artışına ek olarak kalsit/vaterit oranını da etkilemektedir. Azalan üre konsantrasyonu ve artan inkübasyon süresi kalsit oranında bir artışa vaterit oranında ise azalmaya neden olmaktadır.



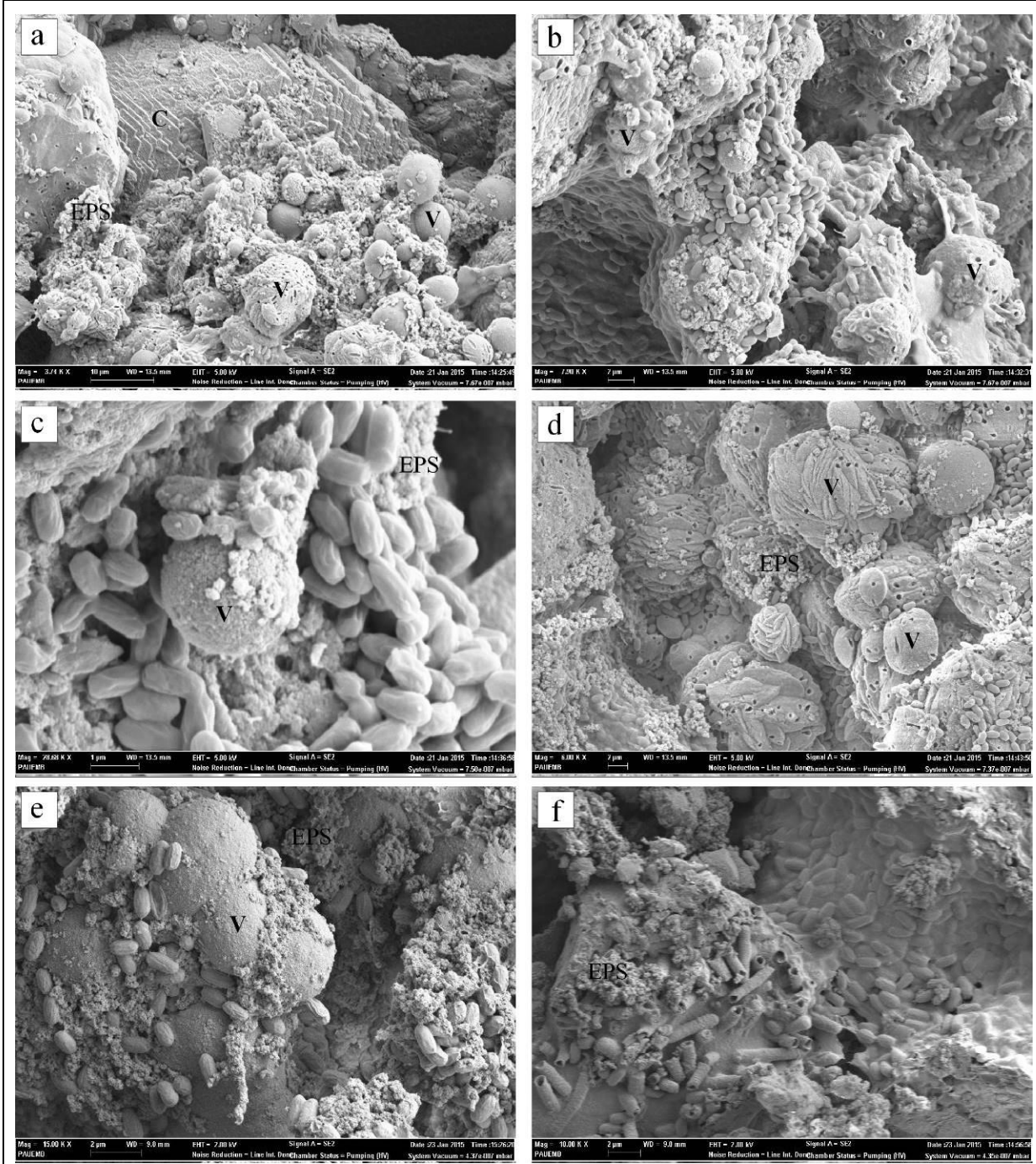
Şekil 22. Bakteriyel kalsiyum karbonatlı ürünlerin X-ışınları kırınımı desenleri. a) U2, U3 ve U5 nolu örneklerin mineralojik bileşimleri, b) U3 nolu örneğin farklı üre konsantrasyonları (100, 200 ve 330 mM) koşullarındaki değişimleri (gri alanlar amorf fazı-EPS temsil etmektedir), (c) U5 nolu örneğin farklı sürelerdeki (2, 5, 10 gün) mineralojik değişimleri.



Şekil 23. U2, U3 ve U5 örnekleri için uygulanan farklı süre, konsantrasyon ve pH koşullarının kalsiyum karbonat konsantrasyonları (mg/ml) üzerine etkisi (a) Üre konsantrasyonu ve inkübasyon süresi etkisi, (b) İnkübasyon süresi ve pH etkisi, (c) İnkübasyon süresi ve sıcaklık etkisi.

2.3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri

Mikrobiyal kalsiyum karbonatlı oluşumların kristalin ve amorf doğasını, dokusal ve kimyasal özelliklerini incelemek amacıyla U2, U3 ve U5 numaralı örneklerin SEM incelemeleri yapılmıştır (Şekil 24 ve 25). SEM görünümüne göre U2 nolu örnek küremsi vaterit, rombohedral kalsit ve özşekilsiz-süngerimsi amorf topluluklar (Ekstraselular Polimerik Substance, EPS) gözlenmektedir (Şekil 3.3). Kalsiyum karbonat üretici bakteriler de yoğun olarak gözlenmektedir (Şekil 24b, c, e, f). U3 nolu örnekte ultra-mikrokristalin vateritlerin küresel oluşumlar sergiledikleri gözlenmiştir (Şekil 25a-c). Küremsi (sferulitik) vaterit oluşumlarının üzerinde veya arasındaki boşluklarda ise ince taneli (< 0.1 µm) amorf veya zayıf-kristalin topluluklar izlenmiştir. Bu oluşumlar, XRD incelemelerindeki amorf faz olarak belirtilen EPS oluşumları şeklinde tanımlanabilir. Nitelik bakteriyel EPS oluşumları literatürde yaygın olarak bilinmektedir (Örneğin, Tourney vd., 2008; Tourney ve Ngwenya, 2009; Mota vd., 2013). Amorf veya zayıf-kristalin topluluklar olarak tanımlanan oluşumlarda çok ince kristalin vaterit veya ender olarak kalsitlerinde bulunabilmesi de mümkündür. U5 nolu örnek büyük ölçüde iri ve özşekli kristalin kalsit oluşumlarıyla karakteristik olup, ince taneli kristal oluşumları daha azdır (Şekil 25d-f).



Şekil 24. Mikrobiyal karbonat oluşumlarının SEM mikrofotografaları. (a) Yuvarlağımsı-küresel vaterit (V), kristalin (tirgonal piramidal) kalsit (C) ve ince taneli polimerik (EPS) oluşumları, (b-e) 1 mikron boyutlu bakteriler ile yuvarlağımsı-küresel vaterit (V) ve ince taneli polimerik (EPS) oluşumları (f) Bakteriler, bakterilerce oluşturulan tüpsü oluşumlar ve EPS ürünleri.

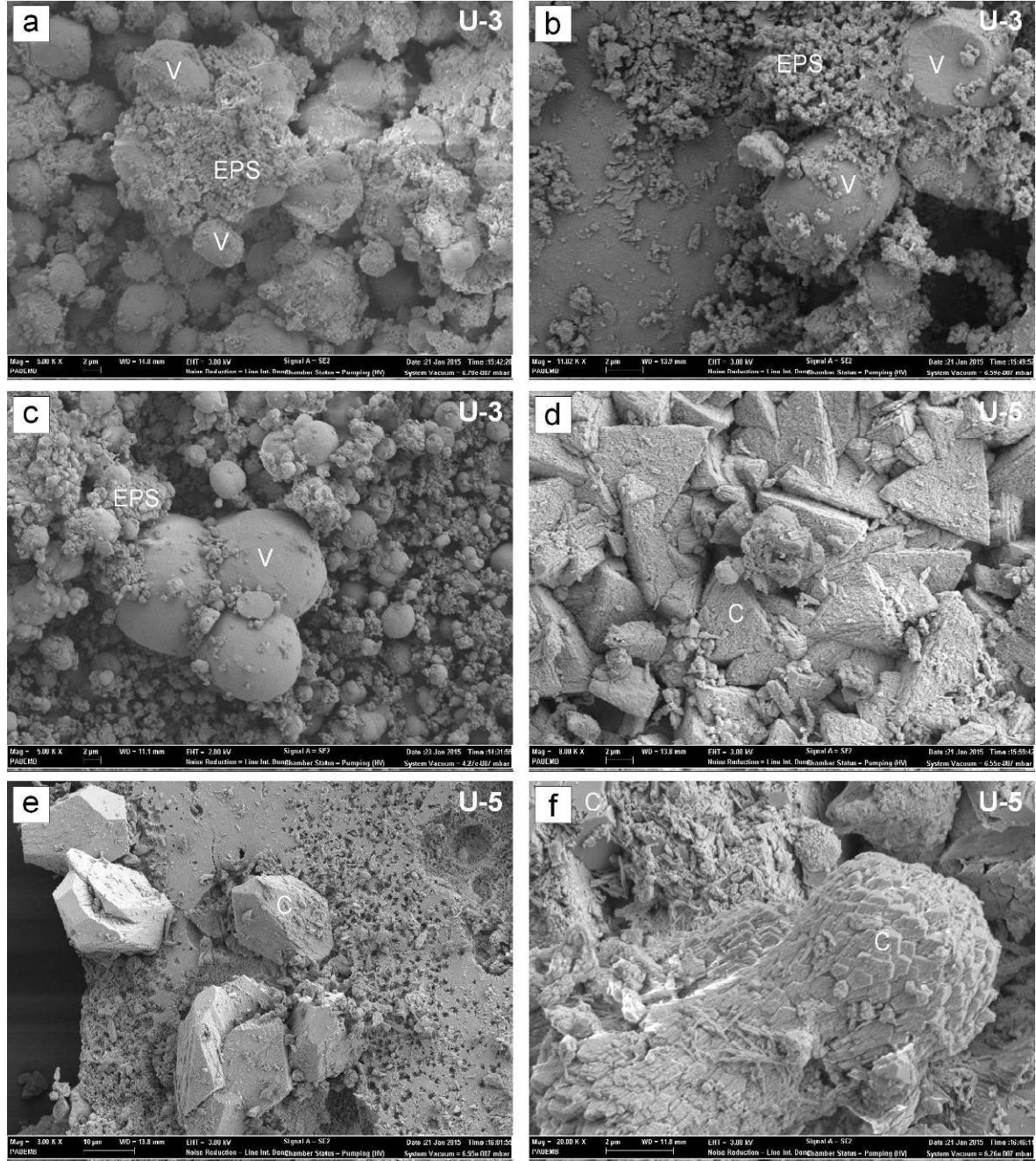
U5 nolu örneğin SEM incelemeleri XRD incelemelerine göre kalsit olarak belirlenen oluşumların üç farklı kristal şekli (trigonal piramit: Şekil 25d; trigonal prizma: Şekil 25e ve romboeder: Şekil 25f) sergilediklerini göstermiştir. Eser miktarda gözlenen vateritlerin ise küresel topluluklar oluşturan

ince kristallerle temsil olunduğu düşünölmektedir.

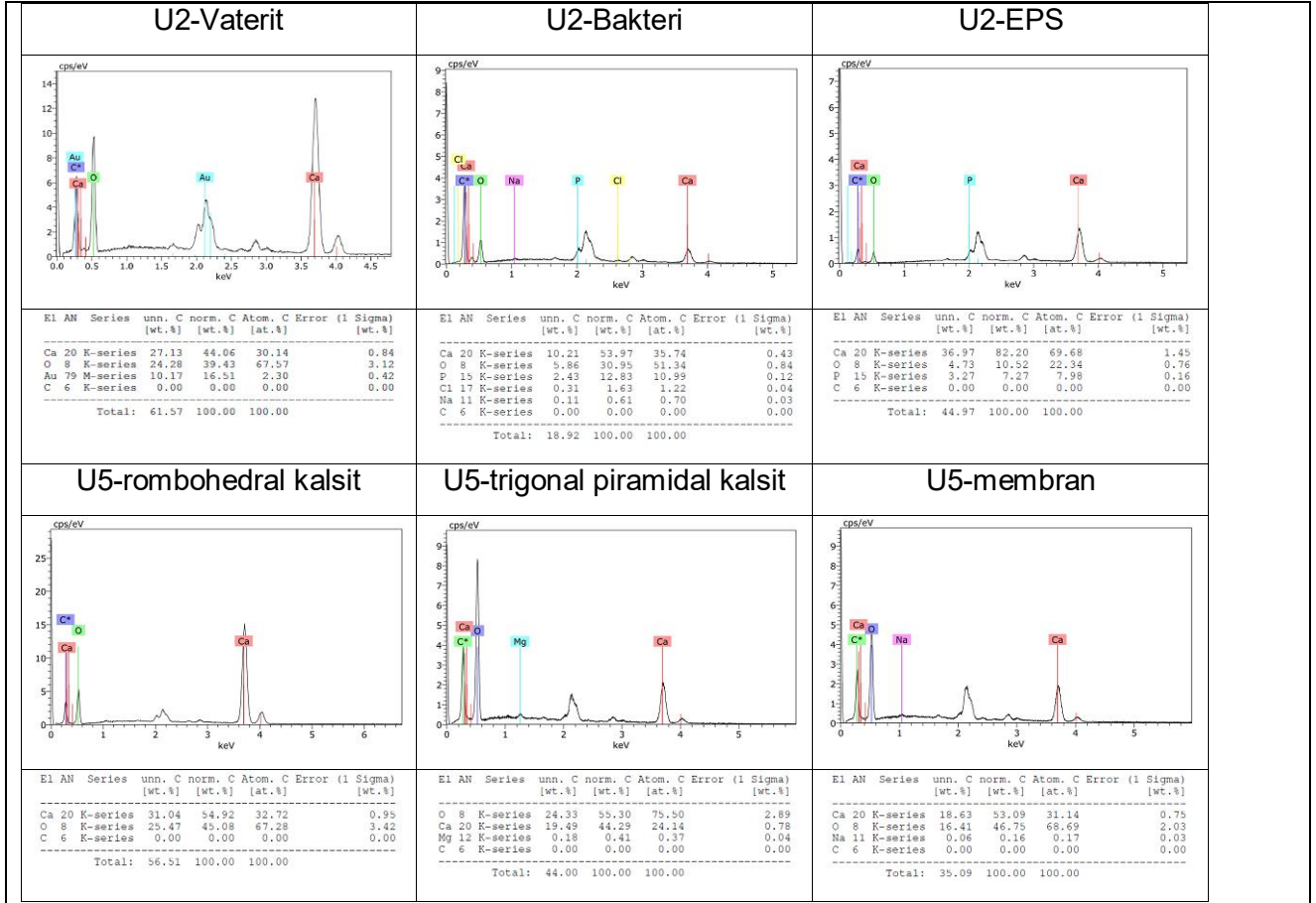
Kalsiyum karbonat oluşumlarının kimyasal bileşimlerinin belirlenmesi ve doğrulanması amacıyla SEM görünömleri elde edilen bileşenlerin EDS analizleri yapılmıştır. EDS analizleri bakteri, vaterit, kalsit ve EPS bileşenleri üzerinde gerçekleştirilmiş ve baskın olarak bunların CaCO_3 bileşimine sahip oldukları saptanmıştır (Şekil 26). Elde edilen bileşimler, farklı bileşenlere göre az da olsa farklılıklar sunmaktadır. U2 örneğindeki vaterit ve kalsitler tümüyle CaCO_3 bileşimli iken, kalsiyum karbonata dönüşmüş bakteriler ve EPS ürünleri ek olarak fosfat içermektedir. U5 nolu örnekte, farklı kristal şekilleri sunan kalsitlerin de farklı bileşimler sunduğu belirlenmiştir. Rombohedral kalsitler CaCO_3 bileşimli, buna karşın piramidal kalsitler ilave olarak az miktarda Mg içermektedir.

2.3.1.3. Termo Gravimetrik Analiz (TGA) İncelemeleri

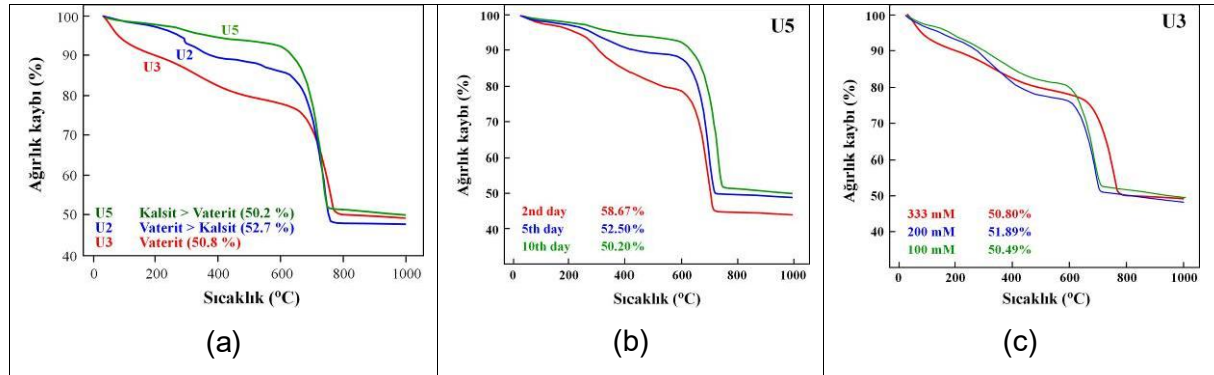
Thermogravimetrik analiz (TGA), sabit hızla artan sıcaklıkla birlikte maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki değişimlerin termal analiz yöntemidir. Bu yöntem maddelerin oksitlenmesi, yıkılmasıyla ilişkili kütle (veya ağırlık) kayıp ve kazanımları veya uçucuların kaybı şeklinde amorf ve kristalin maddelerde yaygın kullanım alanı bulmaktadır. İkinci ara rapor döneminde XRD ve SEM incelemesi yapılan U2, U3 ve U5 nolu örneklere ait bakteriyel karbonat ürünlerinin arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla TGA incelemeleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). TGA eğrilerine göre örnekler 30-600 °C ile 600-800 °C olmak üzere iki farklı ağırlık kaybı sunmaktadır. Amorf ve yarı-kristalin fazların (EPS) yıkılmasını işaret eden 30-600 °C arasında, U3 en çok, U5 ise en az ağırlık kaybına uğramıştır (Şekil 27a). 600-800 °C arasında gelişen ani ağırlık kaybı kristalin fazların ((kalsit ve vaterit) yıkılmasına karşılık gelmektedir. İnkübasyon süresindeki artışla birlikte 30-600 °C arasında ağırlık kaybı belirgin biçimde azalmaktadır (Şekil 27b). Üre konsantrasyonundaki değişimler TGA eğrileri açısından önemli farklılıklar sunmamakla birlikte, azalan üre konsantrasyonu ile birlikte ağırlık kaybı çok az da olsa azalmaktadır (Şekil 27c). TGA incelemelerine göre farklı bakteri türleri ve üreme koşulları EPS miktarındaki farklılıklar, ağırlık kaybı farklılıklarına yansımaktadır.



Şekil 25. Mikrobiyal karbonat oluşumlarının SEM mikrofotografaları. (a-c) Yuvarlağımsı vateritler (V) ve ince taneli polimerik (EPS) oluşumlar, (d-f) trigonal piramit, trigonal prizma ve romboedrik şekillere sahip özşekilli kalsit kristalleri ve ince taneli vateritler.



Şekil 26. U2 ve U5 nolu örneklerde gözlenen vaterit, bakteri, EPS, kalsit ve membran üzerinde gerçekleştirilen EDS analiz sonuçları.



Şekil 27. Bakteriyel karbonat ürünlerini TGA eğrileri. (a) Farklı bakteriyel karbonatlı ürünlerin ağırlık kayıpları, (b) U5 nolu örnekte inkübasyon süresiyle ağırlık kaybı ilişkisi, (c) U3 nolu örnekte üre konsantrasyonu ile ağırlık kaybı ilişkisi.

2.3.2. Kumlu Zemine Uygulanan Bakteriyel Kalsiyum Karbonat Oluşumlarının Karakterizasyonu

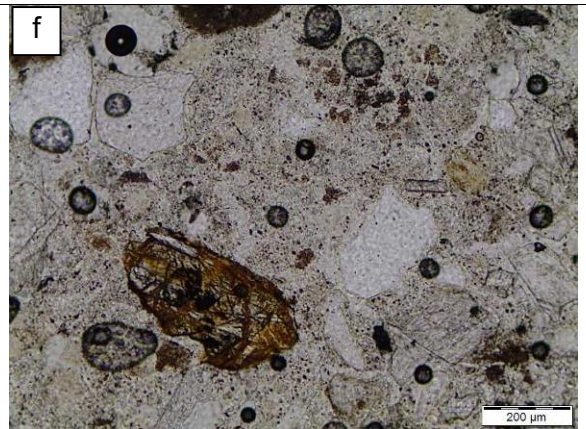
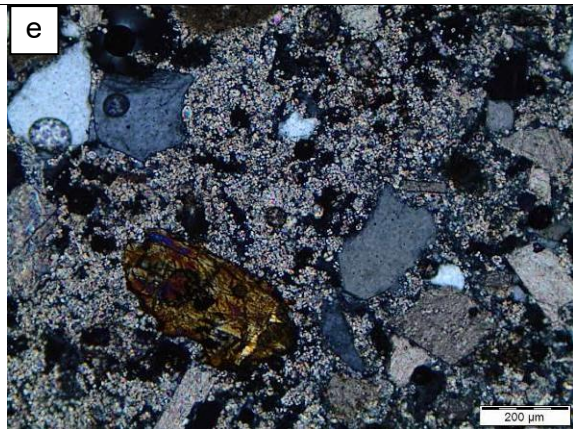
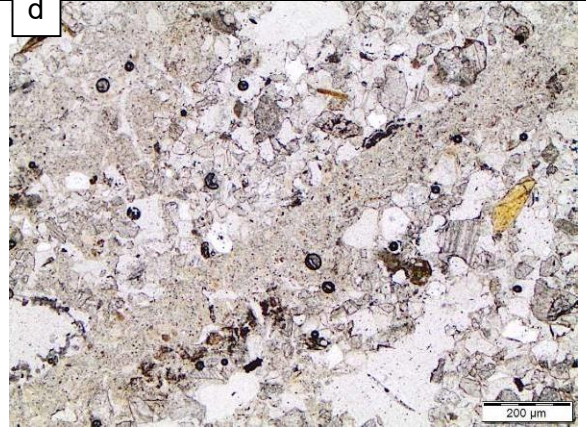
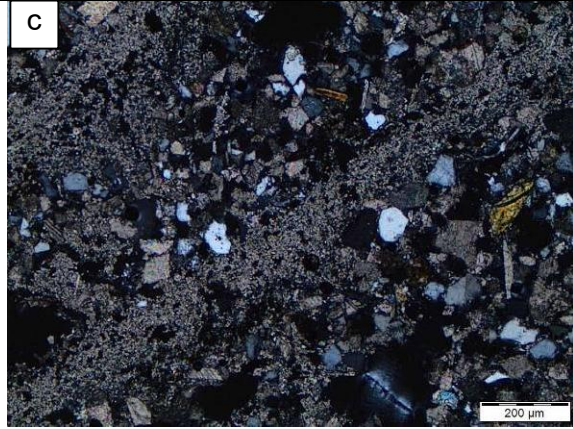
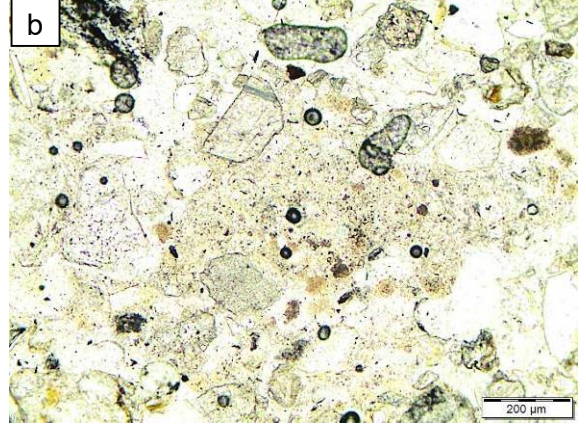
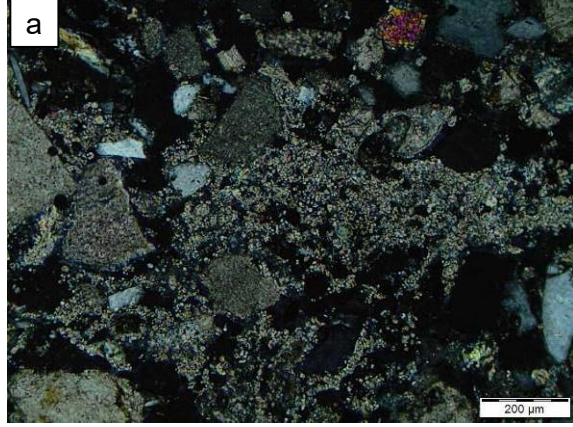
2.3.2.1. Optik Mikroskop Uygulamaları

Bakteriyel karbonat uygulanan kumlu zeminlerin karbonat çimentolanmasının belirlenmesi amacıyla, karbonat çimentolu örneklerden ince-kesitler hazırlanarak alttan aydınlatmalı polarizan mikroskopta incelenmiştir. İnce-kesitlerin hazırlanmasında karbonat çimentonun orijinal dokusunun korunması için epoksi yapıştırıcı kullanılmıştır. 25 rpm basınç altında bakteriyel solüsyon uygulanan kumlu zeminlerin optik mikroskop görünüşleri, çimentolanmanın taneler arasında homojen biçimde dağıldığını göstermektedir (Şekil 28). Tanelerin büyük bir bölümünü kalsit ve kuvars mineralleri oluşturmakta, bu minerallere eser miktarda mika ve piroksen mineralleri eşlik etmektedir. Kalsiyum karbonat çimento 0.5 mm ye ulaşan boşlukları doldurma kapasitesine sahip gözükmekte olup, çimento malzemesinin homojen dağılımı; 25 rpm basınçlı ortamda bakteriyel sıvının zerk edilmesi sırasında tanelerin çeşitli alanlarda birikmesi problemine neden olmamış gözükmektedir.

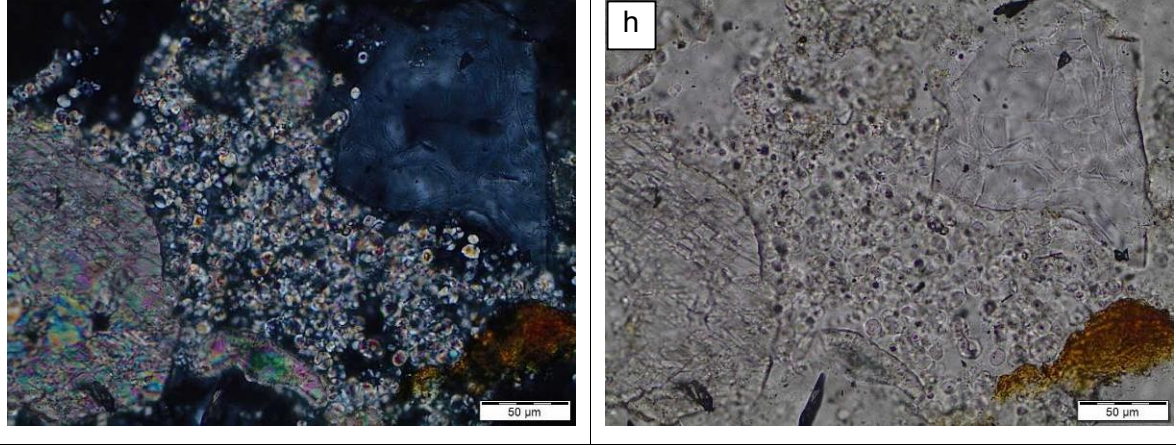
2.3.2.2. X-Işınları Kırınımı (XRD) İncelemeleri

Karbonat çimentolu örneklerdeki çimentonun tanımlanabilmesi amacıyla, karbonat çimentolanmış örneklerde XRD incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Farklı basınç uygulamalarının neden olacağı muhtemel farklılıkların belirlenmesi amacıyla karbonat çimentolanma uygulanmamış doğal zemin (DZ1), basınçsız ortamda (serbest) bakteriyel çözelti uygulaması yapılmış (DZ2) ve 25, 50, 100 rpm basınç altında bakteriyel çözelti uygulaması yapılmış (sırasıyla D3, D4, D5) örneklerin XRD çekimleri yapılmıştır (Şekil 29). XRD verileri karbonat mineralleri olarak kalsit ve dolomit gözlenmiş olup, bütünüyle kırıntı bileşenleri temsil etmektedir. Çimentolanma uygulanmamış zemin ile çimentolu zemin arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Çimento bileşenlerinin ince taneli olması nedeniyle çimento bileşenlerinin zenginleştirilmesi amacıyla örnekler 0.075 mm elekten geçirilmiştir. 0.075 mm elek altı örneklerinin XRD verileri (Şekil 30), yukarıda elde edilen verilere benzer sonuç vermiştir. Karbonat çimentolu örneğin daha ince taneli elek altı (<0.063 mm) bileşenler başlıca kalsit, kuvars, dolomit ve kil/fillosilikatlardan oluşmaktadır. Doğal zemin örneğinden ayrılan kil fraksiyonunu bolluk sırasına göre illit, klorit, smektit paragonit ve pirofillit oluşturmaktadır (Şekil 31). Kil fraksiyonun oluşturan bileşenlerin karbonat çimento ile birlikte bağlayıcı rol oynadığı düşünülmektedir. Kumlu zemin örneklerinin kalsiyum karbonat bileşeninin XRD yöntemiyle belirlenememesi iki nedenden kaynaklanmış gözükmektedir. Birincisi çimento miktarının % 5'in altında olması ve muhtemelen kalsitten oluşması nedeniyle çimentolanma

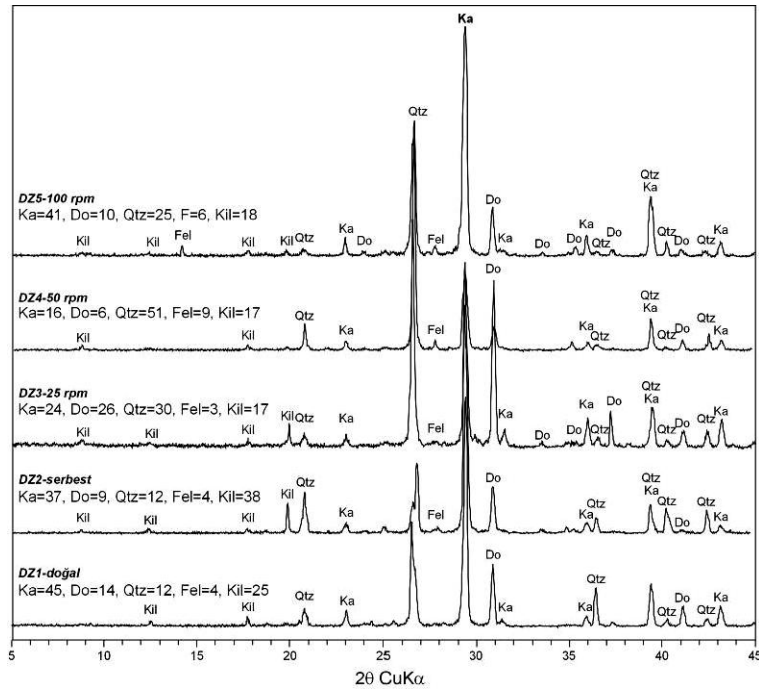
uygulanmamış zemin örneğindeki kalsitten ayırt edilememesidir. İkincisi ise az miktardaki çimentonun amorf karakterde olması ve bu nedenle herhangi bir pik vermemesidir. Optik mikroskop incelemeleri bağlayıcının kristalden ziyade amorf karaktere sahip görünüm sergilediğine işaret etmektedir. Bu sorunun yanıtı elektron mikroskop incelemeleriyle yanıt bulacaktır.



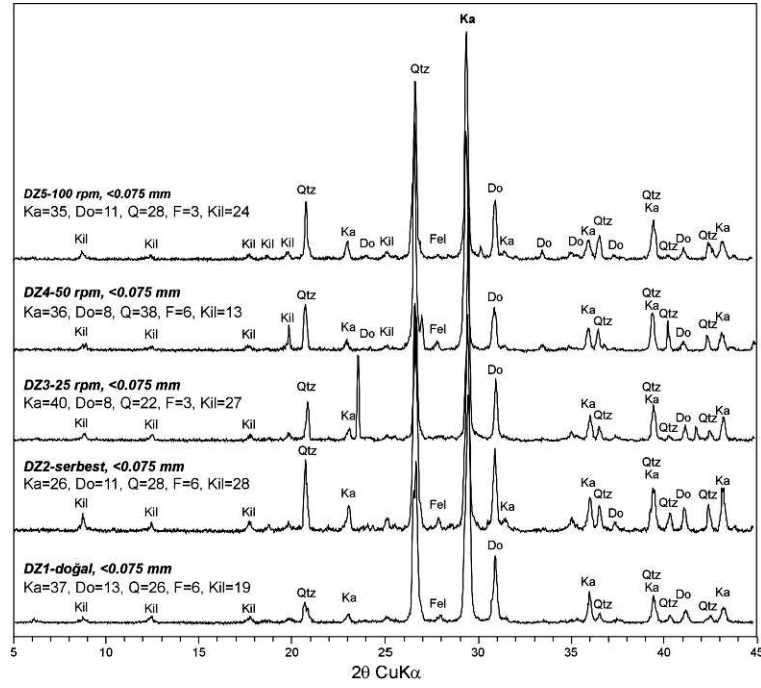
g



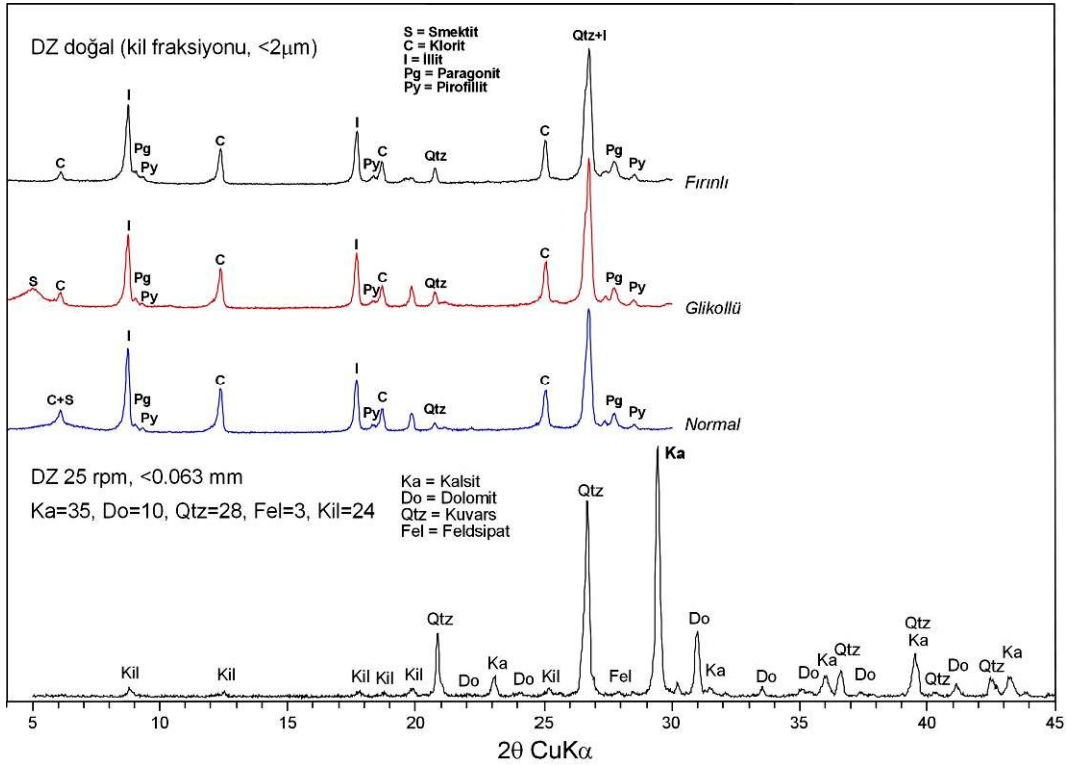
Şekil 28. Bakteriye karbonat uygulanan kumlu zeminlerin optik mikroskop görünüşleri. (a-b) Kum taneleri arasında homojen biçimde dağılmış sparitik görünümlü kalsiyum karbonat çimento (a-çift nikol, b-tek nikol), (c-d) Çatlak dolgusu görünümlü dağılmış kalsiyum karbonat çimento (c-çift nikol, d-tek nikol), (e-f) Kuvars, kalsit ve piroksen tanelerini tutturarak homojen dağılmış kalsiyum karbonat çimento (e-çift nikol, f-tek nikol), (g-h) Kalsit, kuvars ve biyotit tanelerinin arasındaki kalsiyum karbonat çimento (g-çift nikol, h-tek nikol).



Şekil 29. Doğal (DZ1) ve bakteriye karbonat çimentolaması uygulanan (DZ2-5) kumlu zemin örneklerinin serbest ve farklı basınç koşullarına göre mineralojik dağılımı.



Şekil 30. Doğal (DZ1) ve bakteriyel karbonat çimentolaması uygulanan (DZ2-5) kumlu zemin örneklerin 0.075 mm elek altı tane boyunun serbest ve farklı basınç koşullarına göre mineralojik dağılımı.

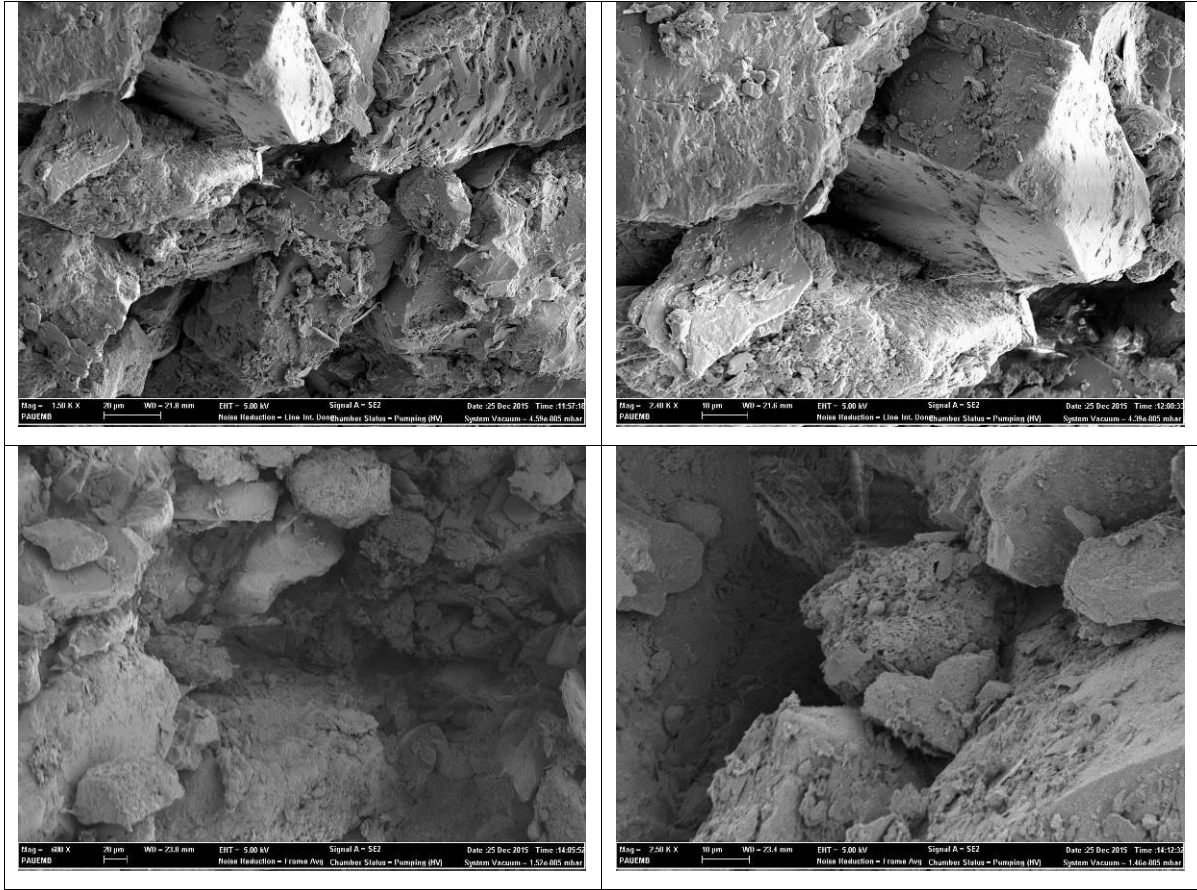


Şekil 31. Bakteriyel karbonat uygulaması yapılan kumlu zemin örneğinin 0.063 mm elek altı ve kil fraksiyonu (<0.002 mm, <2 µm) mineralojik bileşimleri.

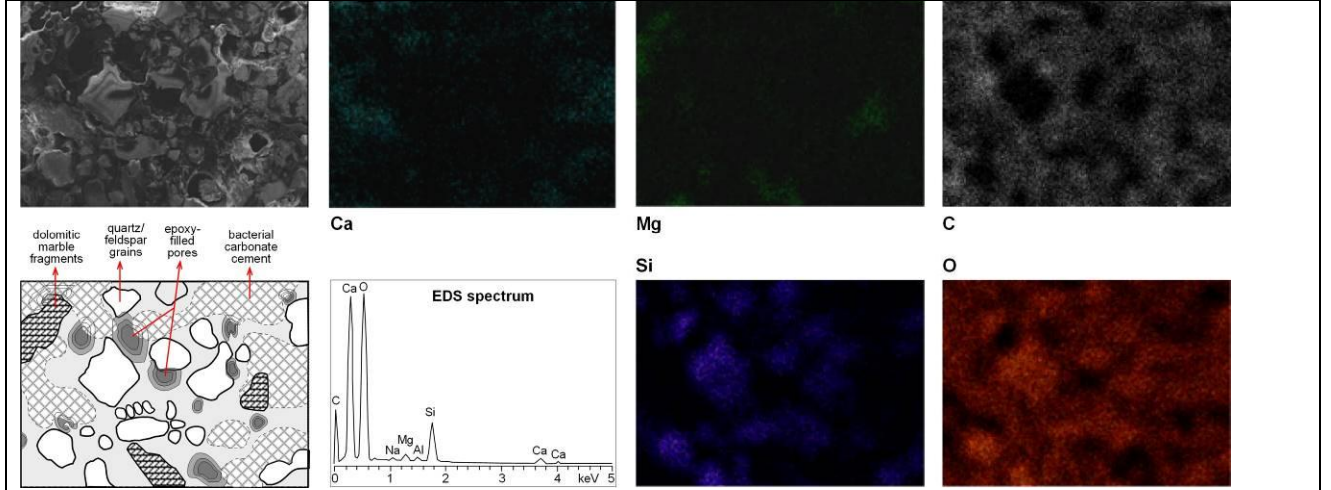
2.3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri

Çimentolanma uygulanan örneklerin taramalı elektron mikroskop-ikincil elektron görüntüleri (SEM-SE), bakteriyel kalsiyum karbonat bağlayıcının gözenekli-süngerimsi görünümlü amorf yapıda olduğunu göstermiştir (Şekil 32). Taneler yarı özşekilli ve özşekilli kristallerden oluşmakta ve süngersi karbonat çimento ile birbirine bağlanmış görünüm sunmaktadır.

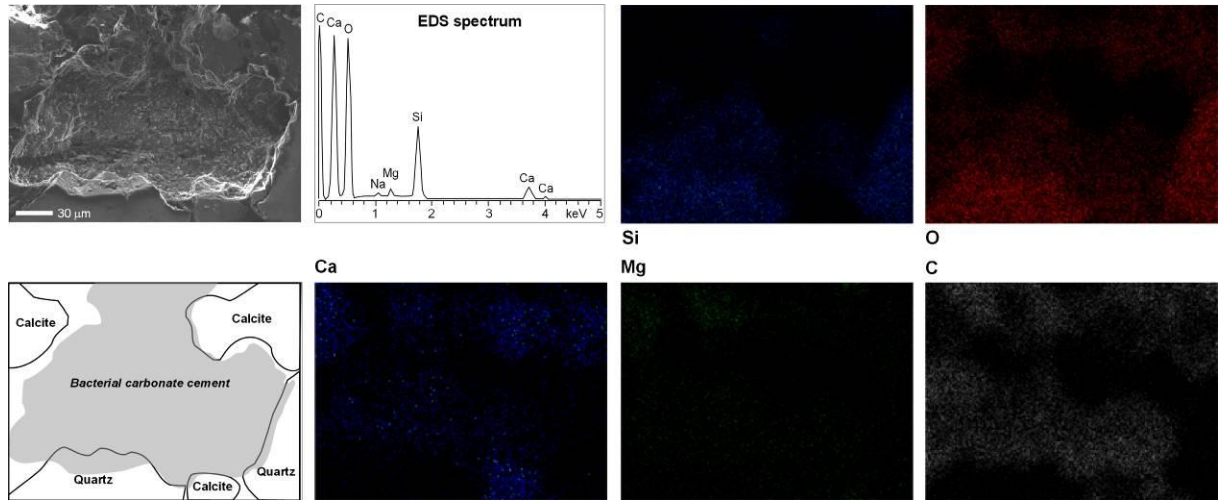
Karbonat çimentonun taneler arasındaki görünümlerinin ve elementsel bileşimlerinin ayrıntılı incelenmesi amacıyla, yüzeyi parlatılmış örnekler üzerinde taramalı elektron mikroskop-geri saçınımlı elektron görüntü (SEM-BSE) incelemeleri yapılmıştır (Şekil 33 ve 34). Bu incelemeler hem iki boyutlu düzlemde tane-çimento ilişkisinin incelenmesine, hem de çimentonun kimyasal karakteri de ortaya konulmuştur. Bileşenlerin görünümü ve element haritalama verilerine göre karbonat çimento taneler arasında homojen bir dağılım sunmaktadır (Şekil 33). Bakteriyel karbonat çimentonun yakın görünümü bunların yuvarlağımsı biçimli amorf karakterli olduğunu göstermiştir.



Şekil 32. Kumlu zeminlerdeki bakteriyel karbonat çimentonun SEM-SE görüntüleri.



Şekil 33. Bakteriyel karbonat çimentonun SEM-BSE görünümleri, EDS analizi ve element haritalamaları.



Şekil 34. Bakteriyel karbonat çimentonun kalsit ve kuvars taneleri arasındaki SEM-BSE görünümleri, EDS analizi ve element haritalamaları

3. TARTIŞMA

3.1. Mikrobiyolojik Bulguların Tartışılması

Kalsiyum karbonat mineralizasyonu yapan üreolitik bakteriler Denizli iline bağlı Karcı dağı-İsrafil deresinden alınan su ve toprak örneklerinden izole edilmiştir. İzolasyon ve bakteri stoklama çalışmalarında Üre Agar besiyeri kullanılmıştır. Üre pozitif olan renkli koloniler mikroskopta incelenmiş; çubuk formunda ve endospor içeren bakteriler üreolitik izolatlar *Bacillus* sp. olarak Nutrient Agar yatık besiyerinde +4 C'de buzdolabında stoklanmıştır (Bknz. Tablo 1). *Proteus vulgaris* pozitif kontrol ve *Micrococcus flavus* ise negatif kontrol olarak izolasyon aşamasında kullanılmıştır (Bknz. Şekil 1 ve 2).

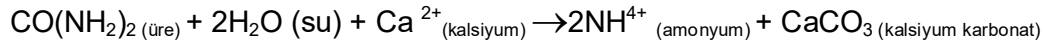
Çalışmamızda kalsiyumca zengin topraklardan üreaz pozitif toplam 18 adet bakteri izole edilmiştir. İzolatlar arasından yüksek üreaz aktivitesine sahip endospor içeren 10 suş seçilerek, tür teşhis ve tanımlaması için Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde 16S rRNA sekans analizi yaptırılmıştır. Suşların tür teşhis ve tanımlamaları için kullanılan Gen Banka Numaraları ve Homoloji yüzdeleri Tablo 2'de gösterilmiştir. 10 bakterinin 6'sı %100, 4'ü ise %99 doğruluk payı ile *Bacillus* cinsine ait farklı türler olarak teşhis edilmişlerdir. İzolatlarımızın *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus aerius*, *Paenibacillus favisporus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus mycooides* türlerinden oluşmaktadır.

İzole edilen *Bacillus* cinsi bakteri türlerinin Kalsiyum Mineralizasyon Ortamı'nda (KMO) 5, 7, 10 ve 14 günlük inkübasyon sürelerinde EDTA titrimetrik yöntemine dayalı olarak kalsiyum karbonat çökelim miktarları tespit edilmiştir (Bknz Tablo 3). Kalsiyum karbonat üretim miktarları ve gelişim avantajları gibi kriterler göz önünde bulundurularak, *Paenibacillus favisporus* U3, *Lysinibacillus fusiformis* U5 ve *Bacillus mycooides* U10 bakteri türleri kalsiyum karbonat üretimi için seçilmişlerdir.

Tüm mikroskobik canlılar doğal veya laboratuvar ortamlarında gelişimleri sırasında, kimyasal, fiziksel ve/veya çevresel faktörlerden etkilenirler. Çoğunlukla endüstriyel üretim için ilgi duyulan tüm biyolojik ürünler olan sekonder veya primer metabolitler, bakterilerin gelişme şartlarını etkileyen çevresel etmenlerin etkisi altındadır. Özellikle bu tür metabolitlerin üretimini etkileyen tüm çevresel faktörlerin anlaşılması, mikrobiyal aktivitelerin anlaşılması, kontrol edilmesi ya da artırılmasına olanak sağlamaktadır. Özellikle ürün üretimi için önemli üretim stratejilerinin doğru olarak belirlenmesi en uygun optimizasyon şartlarının ortaya konmasıyla doğrudan ilişkilidir.

Bu amaçla seçilen 4 türün kalsiyum karbonat üretimini etkileyen sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve üre konsantrasyonunun optimizasyon şartları araştırılmıştır.

Ürenin kalsiyum karbonat mineralizasyonunda önemli bir etken olduğu bilinmektedir. Aşağıda verilen denklemden de anlaşılacağı gibi bakterinin bulunduğu gelişme ortamına fazladan üre ilave edilecek olursa, bakteri enzimatik bir reaksiyon ile ortamdaki fazla kalsiyum iyonlarını amonyum ve kalsiyum karbonat şeklinde çökeltmektedir.



Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda, bakteriye ait ve kalsiyum karbonat çökelişini gerçekleştirdiği bilinen üreaz enzimin substratı olan ürenin farklı konsantrasyonlarda bakteri gelişim ortamına ilavesi ile yüksek miktarlarda karbonat çökelişini sağlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 100-350 mM üre konsantrasyonları kullanılmıştır. *Paenibacillus favisporus* U3 bakterisi 100-200-250-300-333 ve 350 mM üre konsantrasyonları varlığında maksimum kalsiyum karbonat mineralizasyonuna 10. günde 100 mM'da ulaşmış olup bakteri 2805.12 mg karbonat çökeltmiştir (Bknz. Tablo 4). Diğer taraftan, *Lysinibacillus fusiformis* U5 bakterisinin en iyi kalsiyum karbonat mineralizasyonu 14. gün 350 mM' da 1189.76 mg olarak saptanırken, *Bacillus mycoides* U10 bakterisinin en iyi kalsiyum karbonat mineralizasyonu 5.gün 100 mM'da 1595,04 mg olmuştur (Bknz Tablo 5 ve 6). *Paenibacillus favisporus* U3 ve *Bacillus mycoides* U10 bakterilerinin kalsiyum karbonat mineralizasyonlarında üre konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azalma gösterirken yani bakteriler düşük üre konsantrasyonlarında daha iyi kalsiyum karbonat mineralizasyonu yaparlarken, *Lysinibacillus fusiformis* U5 türünün yüksek üre konsantrasyonunu tercih ettiği gözlenmiştir.

Sıcaklık genel olarak canlı organizmalarda enzimatik ve kimyasal tepkimelerin daha hızlı olmasına neden olmaktadır. Belli bir sıcaklık aralığında üreme ve metabolik işlemler artar. Dolayısıyla optimizasyon şartlarında sıcaklık araştırılması gerekli bir diğer parametredir.

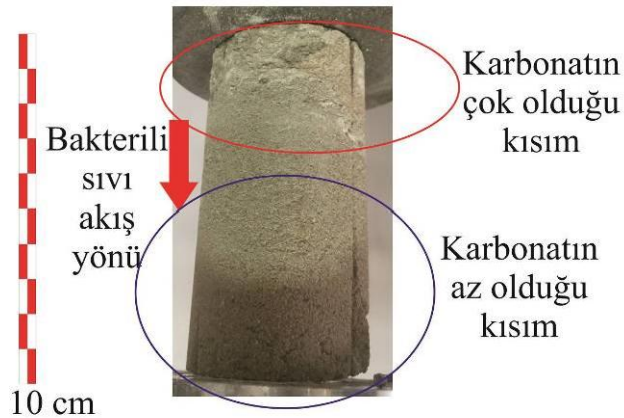
En iyi kalsiyum karbonat mineralizasyonunun saptandığı üre konsantrasyonu ve inkübasyon günlerinde seçilen bakteri türleri için sıcaklık taraması yapılmış ve ortam pH'ı 6.5'e ayarlanmıştır. Sonuç olarak en iyi kalsiyum karbonat miktarı U10 bakterisi için 42 C de elde edilirken, diğer iki bakteri 37 °C' de en iyi mineralizasyonu sağlamıştır (Tablo 7). Sıcaklığın, mineralizasyon üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada inkübasyon süreleri, bakterilerin en iyi üretim gerçekleştirdikleri inkübasyon süreleri olarak belirlenmiştir. Buna göre U3 izolatı için 10. gün, U5 izolatı için 14. gün ve U10 izolatı için ise 5. günlerde ölçüm yapılmıştır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, kalsiyum karbonat mineralizasyonunda farklı parametreler tespit edilmiştir (Bknz. Tablo 9). Parametreler veya türler arasında doğrudan bir ilişki tespit edilememiştir. Örneğin, U3 bakterisi ve U10 bakterisi düşük üre konsantrasyonunu tercih etmelerine rağmen, sıcaklık ve pH'larda ayrılmıştır. U3 ile aynı sıcaklık (37 C) değerinde maksimum mineralizasyon yapan U5 bakterisi U3'ün aksine yüksek konsantrasyonda maksimum mineralizasyon gerçekleştirmiştir. U3 bakterisi başlangıç pH'sı olarak 6.5 tercih ederken, diğer iki bakteri pH 5 gibi oldukça asidik ortamda karbonat üretmiştir. Bu durum bakterilerin tür farklılığından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla bu sonuçlar bize bakterilerin her birinin farklı ortamlarda kullanılabilirliğini göstermektedir. Örneğin, pH 5 gibi oldukça asidik ortamda mineralizasyon yapan iki bakterinin asit yağmurlarının yoğun görüldüğü topraklarda veya bölgelerde, biyoremediasyon çalışmalarında kullanım potansiyeli olduğu fikrini vermektedir.

3.2. Jeoteknik Bulguların Tartışılması

Deneylerden elde edilen sonuçların bir kısmı beklendiği şekilde gerçekleşirken bazı ilginç sonuçlar da elde edilmiştir. Bu sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

Deney düzeneği içerisinde bakterili sıvının giriş bölgesinde 3-4 cm'lik bölümde yüksek oranda kalsiyum karbonat çökelişi olurken, çıkış bölgesinde bu miktar oldukça düşük gerçekleşmiştir (Şekil 35). Bu yapı doğal olarak örneklerin tek eksenli basma dayanımı ve statik elastisite modüllerini doğrudan etkilemiştir. Çünkü örneklerin yenilmesi, karbonatın daha az olduğu bölgede gerçekleşmiştir (Şekil 36). Bu sonuç oldukça ilginç görünmektedir. Çünkü mühendislik uygulamasında iyileştirilebilecek zemin kalınlığı hakkında temel oluşturmaktadır.



Şekil 25. Bakterili sıvının akış yönüne göre karbonat miktarının değişimi



Şekil 36. Karbonat miktarına bağlı yenilme ve deformasyonlar

Deney yapılan örneklerin ortalama birim ağırlığı $13,5 \text{ kN/m}^3$ iken bakteri iyileştirmesine maruz kalan örneklerin birim hacim ağırlığının $13,5 \text{ kN/m}^3$ ile $14,6 \text{ kN/m}^3$ arasında değiştiği görülmektedir. En düşük değerin $13,5 \text{ kN/m}^3$ ile bakterinin serbest halde akışına izin verilen örnek olmuştur. Diğer tüm örneklerde $14,6 \text{ kN/m}^3$ değeri ölçülmüştür. Bu değerlere bakıldığında farklı değerlerin sadece bir örnek grubunda olduğu anlaşılmaktadır. Normal şartlarda en düşük değerlerin karbonat eklemesi yapılmamış doğal zeminde olması beklenmelidir. Bu farklılığın laboratuvarında yapılan ölçümlerden kaynaklandığı düşüncesi öne çıkmaktadır. Diğer örneklerdeki değerlere bakıldığında birim ağırlığın $14,6 \text{ kN/m}^3$ olduğu ve bakteriyel sürecin ise birim hacim ağırlık üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

Tek eksenli basma dayanımı ortalama değerlerinin $66,8 \text{ kPa}$ ile $204,1 \text{ kPa}$ arasında değişmektedir. En düşük değer serbest bakteri akışının olduğu örnekte $66,8 \text{ kPa}$ olarak ölçülmüştür. Normal şartlar altında peristaltik pompadaki artan devir sayısına bağlı olarak gittikçe artan basma dayanımı değerlerinin elde edilmesi beklenmelidir. Ancak yapılan deneylerde tek eksenli basma dayanımının 25 d/d altında $204,1 \text{ kPa}$ iken 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla $142,9 \text{ kPa}$ ve $85,2 \text{ kPa}$ değerleri elde edilmiştir. Bu değerler dikkate alındığında en yüksek değerlerin 25 d/d altında elde edildiği görülmektedir. Daha yüksek hızlardaki sıvı akışının bakteri aktivitesini azaltmış olabileceği ve buna bağlı dayanım azalmasının olduğu düşünülmektedir.

Statik elastisite modülü değerleri incelendiğinde tek eksenli basma dayanımı değerlerine paralel olarak en düşük değerlerin serbest akış halindeki örneklerde ortalama $23,9 \text{ MPa}$, 25 d/d altında en yüksek değer olan $89,4 \text{ MPa}$ 'a ulaşmıştır. 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla $40,7 \text{ MPa}$ ve $33,6 \text{ MPa}$ değerleri elde edilmiştir. Tek eksenli basma dayanımında etkili olan faktörler statik elastisite modülü üzerinde de etkili olmuştur.

Örneklerin yoğunluğu ve dayanımındaki artışa paralel olarak sismik değerlerinin de artış göstermesi beklenmelidir. Vp hızları beklendiği gibi doğal haldeki zeminde en düşük 301 m/s olarak ölçülmüştür. En yüksek Vp hızı ise 25 d/d akış hızının sağlandığı örneklerde görülmüş ve ortalama 985 m/s olmuştur. 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla 945 m/s ve 793 m/s değerleri elde edilmiştir. Bu değerler tek eksenli basma dayanımı ve statik elastisite modülü değerleri ile uyumludur. Vs hızları da tıpkı Vp hızlarında olduğu gibi beklenen uyumda gözlenmiş, en düşük değer doğal zeminde 217 m/s ve 25 d/d akış altında en yüksek değer olan 843 m/s değerine ulaşmıştır. 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla 790 m/s ve 672 m/s değerleri ölçülmüştür.

3.3. Mineralojik ve Petrografik Bulguların Tartışılması

Zemin iyileştirme için kullanılması planlanan mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşumları, ilk aşamada laboratuvar ortamında üretilmiş olup, bunların kristalin (kalsit ve vaterit) ve amorf yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Vateritler; doğada ender gözlenen kalsiyum karbonat (CaCO₃) polimorfu olup, sulu doğal ve laboratuvar ortamlarında kalsit ile birlikte bakteri kökenli (mikrobiyal) oluşumlar şeklinde oluşumları bilinmektedir (Örn: Giralt vd. 2001; Mann, S., 2001; Braissant ve Verrecchia, 2002; Lee, 2003; Tong, 2004; Xu vd., 2004; Rautaray, 2005; Jimenez-Lopez vd., 2007; Rodriguez-Navarro vd., 2007; Ouhenia, 2008; Qiao vd., 2008; Soldati vd., 2008; Leng et al., 2010; Chahal, 2011; Njegić-Džakula vd., 2011; Achal, 2014). Bakteriyel kalsiyum karbonat oluşumlarının bakteri türü, üre konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve pH koşulları ilişkisi açısından ele alındığında, CaCO₃ konsantrasyonunu etkileyen en önemli parametrenin bakteri türü olduğu; inkübasyon süresi, konsantrasyon ve pH koşullarının ikinci derecede rol oynadığı belirlenmiştir. Karbonat mineral bileşimi açısından U3 (*Paenibacillus favisporus*) tümüyle vaterit, U2 (*Bacillus aerius*) ve U5 (*Lysinibacillus fusiformis*) vaterit + kalsit oluşturmuştur. Üre konsantrasyonu diğer bir önemli parametre olup, artan üre konsantrasyonu ile birlikte, amorf faz azalmış ve büyük ölçüde vaterit ile temsil olunan kristalin faz artmıştır. Üre konsantrasyonu ve inkübasyon süresi mineral bileşimlerini de etkilemiş olup, azalan üre konsantrasyonu ve artan inkübasyon süresi kalsit oranında bir artışa vaterit oranında ise azalmaya neden olmuştur. Vateritler küremsi biçimli, kalsitler özşekilli trigonal piramit, rombohedral ve trigonal prizma formları sergilemekte, amorf (EPS) bileşenler süngerimsi topluluklar şeklinde gözlenmiştir. Bakteriyel EPS oluşumları literatürde de yaygın olarak bilinmektedir (Örneğin, Tournay vd., 2008; Tournay ve Ngwenya, 2009; Mota vd., 2013). EDS analizleri bakteri, vaterit, kalsit ve EPS bileşenlerinin baskın olarak CaCO₃ bileşimine sahip olduklarını göstermiştir. Karbonatlaşmış bakteriler ve EPS ürünleri az miktarda fosfat içermektedir. U5 nolu örnekte, rombohedral kalsitler CaCO₃ bileşimli iken piramidal kalsitler ilave olarak az miktarda Mg içermektedir. Bu durum kristal formlarındaki farklılıkların kimyasal bileşim farklılıklarına da yansıtıldığını göstermiştir. Termogravimetrik analiz (TGA) verilerine göre bakteriyel

kalsiyum karbonat ürünleri amorf fazların (EPS) yıkılmasını işaret eden 30-600 °C ile kristalin fazların ((kalsit ve vaterit) yıkılmasına karşılık gelen 600-800 °C olmak üzere iki farklı ağırlık kaybı sunmaktadır. Artan üre konsantrasyonu ile birlikte ağırlık kaybı çok az da olsa artmıştır. TGA incelemeleri, farklı bakteri türleri ve üreme koşulları EPS miktarındaki farklılıkların ağırlık kaybı farklılıklarına yansıdığını göstermiştir.

Bakteriyel karbonat uygulanan kumlu zeminlerin karbonat çimentolanması polarizan mikroskopta incelenmiş ve çimentolanmanın başlıca kalsit ve kuvars minerallerinden oluşan taneler arasında homojen biçimde dağıldığı gözlenmiştir. Optik mikroskopik verilere göre, kalsiyum karbonat çimento 0.5 mm ye ulaşan boşlukları doldurma kapasitesine sahip olup, zemin iyileştirme çalışmaları için son derece uygundur. XRD incelemelerine göre taneleri tutturarak bakteriyel karbonat çimento vaterit içermemekte, olasılıkla amorf karakter sergilemektedir. Nitekim taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri bakteriyel kalsiyum karbonat bağlayıcının gözenekli-süngerimsi görünümlü amorf yapıda olduğunu göstermiştir. SEM element haritalama verileri de, optik mikroskop verilerine benzer biçimde bakteriyel karbonat çimentonun taneler arasında homojen bir dağılım sunduğunu göstermiştir.

Proje sonuçları mühendislik uygulamaları açısından büyük bir potansiyel vaat etmektedir. Böyle bir uygulama için endüstriyel ölçekte ekipmana ihtiyaç vardır. Bunlar fermantör, sterilizasyon sistemi ve aparatları ile besiyer/kimyasal malzemelerden oluşmaktadır. Bunların yaklaşık maliyeti 650.000 TL'dir. Bu maliyet ile ortalama 50.000 m² alanın güçlendirilmesi mümkün olabilecektir. Aynı büyüklükteki alanın geleneksel yöntemlerle güçlendirilmesi halinde maliyet yaklaşık üç kat fazla olacaktır. Tesis maliyeti sonraki uygulamalarda olmayacağı bu nedenle sadece besiyer/kimyasallar dikkate alındığında maliyet farkı on kata kadar çıkacaktır. Bu nedenle yöntemin oldukça ekonomik olacağı söylenebilir.

4. SONUÇLAR

Bakteriyel kalsiyum karbonat oluşumlarının maksimum (veya optimum) CaCO_3 konsantrasyonlarının koşullarının belirlenmesi amacıyla U2 (*Bacillus aerius*), U3 (*Paenibacillus favisporus*) ve U5 (*Lysinibacillus fusiformis*) bakterileri üzerinde farklı üre konsantrasyonları, inkübasyon süreleri ve başlangıç pH koşulları uygulanmıştır. CaCO_3 konsantrasyonunu etkileyen en önemli parametre bakteri türü olup, inkübasyon süresi, konsantrasyon ve pH koşulları ikinci derecede rol oynamaktadır. Üre konsantrasyonu ikinci derecede en önemli parametre konumunda olup, CaCO_3 konsantrasyonunu önemli ölçüde etkilemiştir.

Zemin iyileştirme için kullanılması planlanan mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşumları, ilk aşamada laboratuvar ortamında üretilmiş olup, bunların kristalin (kalsit ve vaterit) ve amorf yapıya (EPS) sahip olduğu belirlenmiştir. Karbonat mineral bileşimi açısından U3 (*Paenibacillus favisporus*) tümüyle vaterit, U2 (*Bacillus aerius*) ve U5 (*Lysinibacillus fusiformis*) vaterit + kalsit oluşturmuştur. Üre konsantrasyonu diğer bir önemli parametre olup, artan üre konsantrasyonu ile birlikte, amorf faz (EPS) azalmış ve büyük ölçüde vaterit ile temsil olunan kristalin faz artmıştır. Üre konsantrasyonu ve inkübasyon süresi mineral bileşimlerini de etkilemiş olup, azalan üre konsantrasyonu ve artan inkübasyon süresi kalsit oranında bir artışa vaterit oranında ise azalmaya neden olmuştur. U3 nolu örneği temsil eden bakteriler tüm koşullarda en yüksek CaCO_3 üretimini sağlamıştır. Bu nedenle jeoteknik uygulamalarda U3 nolu örnek kullanılmış olup, optimum koşullar üre konsantrasyonu=100 mM, sıcaklık=37 °C, başlangıç pH=6.5, inkübasyon süresi=10 gün ve maksimum konsantrasyon=2805 mg/ml olarak belirlenmiştir.

EDS analizleri bakteri, vaterit, kalsit ve EPS bileşenlerinin baskın olarak CaCO_3 bileşimine sahip olduklarını göstermiştir. Karbonatlaşmış bakteriler ve EPS ürünleri az miktarda fosfat içermektedir. Bakteriyel kalsiyum karbonat ürünleri amorf fazların (EPS) yıkılmasını işaret eden 30-600 °C ile kristalin fazların ((kalsit ve vaterit) yıkılmasına karşılık gelen 600-800 °C olmak üzere iki farklı ağırlık kaybı sunmaktadır. Artan üre konsantrasyonu ile birlikte ağırlık kaybı çok az da olsa artmıştır. TGA incelemeleri, farklı bakteri türleri ve üreme koşulları EPS miktarındaki farklılıkların ağırlık kaybı farklılıklarına yansıdığını göstermiştir. Polarizan mikroskop görüntüleri çimentolanmanın başlıca kalsit ve kuvars minerallerinden oluşan taneler arasında homojen biçimde dağıldığı gözlenmiştir. Optik mikroskopik verilere göre, kalsiyum karbonat çimento 0.5 mm ye ulaşan boşlukları doldurma kapasitesine sahip olup, zemin iyileştirme çalışmaları için son derece uygundur. XRD incelemelerine göre taneleri tutturarak bakteriyel karbonat çimento vaterit içermemektedir. Taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri bakteriyel kalsiyum karbonat bağlayıcının gözenekli-süngerimsi görünümlü amorf yapıda olduğunu göstermiştir. SEM element

haritalama verileri de, optik mikroskop verilerine benzer biçimde bakteriyel karbonat çimentonun taneler arasında homojen bir dağılım sunduğunu göstermiştir.

Deney yapılan örneklerin ortalama birim ağırlığı $13,5 \text{ kN/m}^3$ ile $14,6 \text{ kN/m}^3$ arasında değişmektedir. En düşük değerin $13,5 \text{ kN/m}^3$ ile bakterinin serbest halde akışına izin verilen örnekte gözlenirken diğer tüm örneklerde $14,6 \text{ kN/m}^3$ değeri ölçülmüştür. Tek eksenli basma dayanımı ortalama değerlerinin $66,8 \text{ kPa}$ ile $204,1 \text{ kPa}$ arasındadır. En düşük değer serbest bakteri akışının olduğu örnekte $66,8 \text{ kPa}$ olarak ölçülmüştür. Tek eksenli basma dayanımı 25 d/d altında $204,1 \text{ kPa}$ iken 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla $142,9 \text{ kPa}$ ve $85,2 \text{ kPa}$ değerleri elde edilmiştir. Statik elastisite modülü değerleri incelendiğinde tek eksenli basma dayanımı değerlerine paralel olarak en düşük değerin serbest akış halindeki örneklerde ortalama $23,9 \text{ MPa}$, 25 d/d altında en yüksek değer olan $89,4 \text{ MPa}$ 'a ulaşmıştır. 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla $40,7 \text{ MPa}$ ve $33,6 \text{ MPa}$ değerleri elde edilmiştir. Örneklerin yoğunluğu ve dayanımındaki artışa paralel olarak sismik değerlerinde de artış olmuş ve V_p hızları beklediği gibi doğal haldeki zeminde en düşük 301 m/s olarak ölçülmüştür. En yüksek V_p hızı ise 25 d/d akış hızının sağlandığı örneklerde görülmüş ve ortalama 985 m/s olmuştur. 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla 945 m/s ve 793 m/s değerleri elde edilmiştir. Bu değerler tek eksenli basma dayanımı ve statik elastisite modülü değerleri ile uyumludur. V_s hızları da tıpkı V_p hızlarında olduğu gibi beklenen uyumda gözlenmiş, en düşük değer doğal zeminde 217 m/s ve 25 d/d akış altında en yüksek değer olan 843 m/s değerine ulaşmıştır. 50 d/d ve 100 d/d altında sırasıyla 790 m/s ve 672 m/s değerleri ölçülmüştür.

Çimento ve kimyasal enjeksiyon gibi geleneksel zemin güçlendirme yöntemlerinin görece küçük sahalarda yaygın olarak uygulanmasına karşın, mikrobiyal güçlendirmenin ise ulaştırma projeleri gibi daha büyük sahaların güçlendirmesi çevresel ve ekonomik açıdan daha uygun görünmektedir. Proje, bakteri mineralizasyonu ile yapılan zeminin iyileştirmesi sonucu sağlanan mühendislik parametrelerindeki olumlu yöndeki değer artışlarının bu projeler için yeteri kadar iyi olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, proje kapsamında uygulanan yöntemin ilgili jeoteknik mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur. Proje sonuçları mühendislik uygulamaları açısından büyük bir potansiyel vaat etmektedir. Yöntem geleneksel çimento enjeksiyonu ile yapılan uygulamalara göre kıyaslandığında oldukça ekonomik olacağı söylenebilir.


5. KAYNAKLAR

- Achal, V., Pan, X. 2014. "Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2", *Appl Biochem Biotechnol*, 173, 307–317.
- American Public Health Association (APHA), 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (17th ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- Braissant, O., Verrecchia E. P. 2002. "Microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan) – Discussion", *Journal of Sedimentary Research*, 72, 944–946.
- Cabalar, A.F., Canakci, H. 2005. "Ground improvement by bacteria", *Proceedings of the Third Biot Conference on Poromechanics*, Norman, Oklahoma, Editors: Abousleiman, Y.N., Cheng, A.H.-D, and Ulm, F.-J.
- Chahal, N., Rajor, A., Siddique, R. 2011. "Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains", *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8359-8372.
- Deere, D. U., Miller, R. P. 1966. "Engineering classification and index properties for intact rock", *Air Force Weapons Lab. Technical Report, AFWL-TR65–116*, KirtlandBase, NewMexico
- DeJong, J.T., Fritzges, M.B., Nusslein, K. 2006. "Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear", *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 132(11), 1381-1392.
- Dutta, L., Nuttall, H.E., Cunningham, A.I., James, G., Hiebert, R. 2005. "In-situ biofilm barriers: case study of a nitrate groundwater plume, Albuquerque, New Mexico", *Remediation Journal*, 15(4), 101-111.
- Ehrlich, H.L. 2002. *Geomicrobiology*, (Fourth Edition), New York: Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc.,.
- Fauriel, S., Laloui, L. 2012. "A bio-chemo-hydro-mechanical model for microbially induced calcite precipitation in soils", *Computers and Geotechnics*, 46, 104-120.
- Ferris, F.G., Stehmeier, L.G., Kantzas, A., Mourits, F.M. 1996. "Bacteriogenic mineral plugging", *J Can Pet Technol.*, 35(8), 56–61.
- Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F.S., Smith, R.W. 2000. "Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria", *Geomicrobiol J.*, 17(4), 305–18.
- Gardner, G.H.F., Gardner, L.W., Gregory, A.R. 1974. "Formation velocity and density: the diagnostic basis for stratigraphy", *Geophysics*, 39, 770–780.
- Gaviglio, P. 1989. "Longitudinal wave propagation in a limestone: the relationship between velocity and density", *Rock Mech. Rock. Eng.*, 22, 299–306
- Giralt, S., Julia, R., Klerkx, J. 2001. "Microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan)", *J. Sediment. Res.*, 71, 430–435.
- Inoue, M., Ohomi, M. 1981. "Relation between uniaxial compressive strength and elastic wave velocity of soft rock", *Proceedings of the International Symposium on Weak Rock*, Tokyo, 9–

13.

- Ivanov, V., Chu, J. 2008. "Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ", *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(2), 139-153.
- Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Rodríguez-Gallego, M., Arias, J. M., Gonzalez-Muñoz, M.T., 2007. "Biomineralization induced by Myxobacteria, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology", (A. Méndez-Vilas, Ed.), 143-153.
- Karatas, I. 2008. "Microbiological Improvement of the Physical Properties of Soils", PhD Thesis, Arizona State University, 215.
- Karimi, S. 1998. "A study of geotechnical applications of biopolymer treated soils with an emphasis on silt", Ph.D. Dissertation, University of Southern California, 167.
- Komlos, J., Cunningham, A.B., Warwood, B., Lames, G. 1998. "Biofilm barrier formation and persistence in variable saturated zones", *Proceedings of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research*.
- Lee, N.Y. 2003. "Calcite Production by *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01", *J. Microbiol.*, 41(4), 345-348.
- Leng, B., Jiang, F., Lu, K., Ming, W., Shao, Z. 2010. "Growth of calcium carbonate mediated by slowly released alginate", *Crystal Engineering Communications*, 12(3), 730-736.
- MacLeod, F.A., Lappin-Sott, H.M., Costerton, J.W. 1988. "Plugging of a model rock system by using starved bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, 1365-1372.
- Mann, S. 2001. "Biomineralization: Principles and concepts in Bioinorganic materials chemistry", Oxford University Pres.
- Mitchell, J.K., Santamarina, J.C. 2005. "Biological considerations in geotechnical engineering", *Journal of Geotech. and Geoenvr. Engineering*, 131(10), 1222-1233.
- Mota, R., Guimarães, R., Büttel, Z., Rossi, F., Colica, G., Silva, C. J. 2013. "Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp, CCY 0110", *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1408–1415.
- Muynck, D.W., Cox, K., De Belie, N., Verstraete, W. 2008. "Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete", *Construction and Building Materials*, 22, 875–885.
- Nadson, G.A. 1903. "Microorganisms as geologic agents", *Tr Komisii Isslect Min Vodg St, Petersburg, Slavyanska*.
- Njegić-Džakula, B., Brečević, L., Falini, G., Damir Kralj, D., 2011. "Kinetic Approach to Biomineralization: Interactions of Synthetic Polypeptides with Calcium Carbonate Polymorphs", *Croat. Chem. Acta*, 84(2), 301–314.
- Ouhenia, S., Chateigner, D., Belkhir, M.A., Guilmeau, E., Krauss, C., 2008. "Synthesis of calcium

- carbonate polymorphs in the presence of polyacrylic acid", *Journal of Crystal Growth*, 310, 2832–2841.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K., Bang, S.S. 1999. "Microbiological precipitation of CaCO₃", *Soil Biol Biochem*, 31(11), 1563–71.
- Perkins, S.W., Gyr, P., James, G. 2000. "The influence of biofilm on the mechanical behavior of sand", *Geotechnical Testing Journal*, 23(3), 300-312.
- Rautaray, D., Sanyal, A., Bharde, A., Ahmad A., Sastry, M. 2005. "Biological synthesis of stable vaterite crystals by the reaction of calcium ions with germinating chickpea seeds", *Cryst. Growth Des.*, 5, 399–402.
- Rodriguez-Navarro, C., Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A., Gonzalez-Munoz, M. T., Rodriguez-Gallego, M. 2007. "Bacterially mediated mineralization of vaterite", *Geochim. Cosmochim. Acta*, 71, 1197–1213.
- Soldati, A. L., Jacob, D. F., Wehrmeister, J., Hofmeister W. 2008. "Structural characterization and chemical composition of aragonite and vaterite in freshwater cultured pearls", *Mineral. Mag.*, 72, 579–592.
- Qiao, L., Feng, Q. L., Liu, Y. 2008. "A novel bio-vaterite in freshwater pearls with high thermal stability and low dissolubility", *Mater. Lett.*, 62, 1793–1796
- Tong, H., Ma, W., Wang, L, Wan, P., Hu, J, Cao, L. 2004. "Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via a l-aspartic acid inducing process", *Biomaterials*, 25, 3923–3929.
- Tourney, J., Ngwenya, B.T. 2009. "Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism", *Chemical Geology*, 262, 138–146.
- Tourney, J., Ngwenya, B.T., Mosselmans, J.W.F., Tetley, L., Cowie, G.L. 2008. "The effect of extracellular polymers on the proton adsorption characteristics of the thermophile *Bacillus licheniformis* S-86", *Chemical Geology*, 247, 1–15.
- Van Paassen, L.A. 2009. "Biogrout: Ground Improvement by Microbially Induced Carbonate Precipitation", PhD Dissertation, Delft University of Technology.
- Xu, X., Tark Han, J, Cho, K. 2004. "Formation of Amorphous Calcium Carbonate Thin Films and Their Role in Biomineralization", American Chemical Society, doi: 10.1021/cm035183d.
- Whiffin, V.S., Van Paassen., L.A., Harkes, M.P.,2007. "Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique", *Geomicrobiology Journal*, 24, 417–423.

Proje Yürütücüsünün Adı Soyadı	İmzası	Tarih
Erdal AKYOL		06.06.2016

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ERDAL AKYOL
Proje No:	113Y568
Proje Başlığı:	Kumlu Zeminlerin Mikrobiyal Yöntemle Güçlendirilmesi
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	ÖMER BOZKAYA, NAZİME MERCAN DOĞAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2014 - 15/04/2016
Onaylanan Bütçe:	80998.0
Harcanan Bütçe:	63371.07
Öz:	<p>Jeoteknik mühendisliğinde zeminlerin mühendislik parametrelerini iyileştirmek için son yıllarda çok sayıda çağdaş yöntem ve malzeme ortaya çıkmaktadır. Bunlar çevresel etki, nüfuz derinliği, iyileştirme homojenliği ve maliyet gibi konularda farklılıklar sunmaktadır. Başarılı bir bakteriyel zemin iyileştirmesi zemin-bakteri türü, besiyer, çevresel ve jeolojik faktörler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu projede bakteriyel kalsiyum karbonat çökelişi yardımı ile kumlu zeminlerin mühendislik özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır.</p> <p>Bu kapsamda bakteriyel kalsiyum karbonat oluşumlarının maksimum CaCO₃ konsantrasyonlarının koşullarının belirlenmesi amacıyla çeşitli bakteriler üzerinde farklı üre konsantrasyonları, inkübasyon süreleri ve başlangıç pH koşulları uygulanmıştır. U3 nolu örneği temsil eden bakteriler (Paenibacillus favisporus) tüm koşullarda en yüksek CaCO₃ üretimini sağlamıştır. Bu nedenle jeoteknik uygulamalarda U3 nolu örnek kullanılmış olup, optimum koşullar üre konsantrasyonu=100 mM, sıcaklık=37 °C, başlangıç pH=6.5, inkübasyon süresi=10 gün ve maksimum konsantrasyon=2805 mg/ml olarak belirlenmiştir.</p> <p>Polarizan mikroskop görüntüleri çimentolanmanın başlıca kalsit ve kuvars minerallerinden oluşan taneler arasında homojen biçimde dağıldığı gözlenmiştir. Optik mikroskopik verilere göre, kalsiyum karbonat çimento 0.5 mm ye ulaşan boşlukları doldurma kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymuştur. XRD incelemelerine göre taneleri tuturan bakteriyel karbonat çimento vaterit içermemektedir Taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri bakteriyel kalsiyum karbonat bağlayıcının gözenekli-süngerimsi görünümü amorf yapıda olduğunu göstermiştir. SEM element haritalama verileri de, optik mikroskop verilerine benzer biçimde bakteriyel karbonat çimentonun taneler arasında homojen bir dağılım sunduğunu göstermiştir.</p> <p>Doğal zemin örneğinin birim hacim ağırlığı 14.4 kN/m³, güçlendirilmiş zeminin ise 14.5 kN/m³ ile 14.6 kN/m³ arasında değişmektedir. Güçlendirilmiş örneklerin tek eksenli basma dayanımı en yüksek 25 d/d'da 204.1 kPa olarak ölçülmüş, 50 d/d ve 100 d/d ise sırasıyla 142.9 kPa and 85.2 kPa elde edilmiştir. Görüldüğü kadarıyla peristaltik pompanın yüksek devirleri bakteri aktivitesini azaltmaktadır. Elastisite modülü değerleri de 23.9 MPa and 89.4 MPa arasında değişmektedir. Gözlenen en düşük ve en yüksek hızlar ise V_p için 601 m/s-985 m/s, V_s için 167 m/s-443 m/s arasında değişmektedir. Çimento ve kimyasal enjeksiyon gibi geleneksel zemin güçlendirme yöntemlerinin görece küçük sahalarda yaygın olarak uygulanmasına karşın, mikrobiyal güçlendirmenin ise ulaştırma projeleri gibi daha büyük sahaların güçlendirmesi çevresel ve ekonomik açıdan daha uygun görünmektedir. Proje, bakteri mineralizasyonu ile yapılan zeminin iyileştirmesi sonucu sağlanan mühendislik parametrelerindeki olumlu yöndeki değer artışlarının bu projeler için yeteri kadar iyi olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, proje kapsamında uygulanan yöntemin ilgili jeoteknik mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur.</p>
Anahtar Kelimeler:	bakteri, Bacillus, biyo-mineralizasyon, zemin güçlendirme

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu
Mu?:

Hayır

TÜBİTAK