MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜROLİTİK BAKTERİLERİN ZEMİN İYİLEŞTİRME UYGULAMALARINDA KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI

NAZLIHAN YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. N. Cenk SESAL

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. Yeşim GÜRTUĞ

İSTANBUL, 2016

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜROLİTİK BAKTERİLERİN ZEMİN İYİLEŞTİRME UYGULAMALARINDA KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI

NAZLIHAN YILDIRIM
(520114004)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. N. Cenk SESAL

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. Yeşim GÜRTUĞ

İSTANBUL, 2016

MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES

INVESTIGATION OF APPLICATION OF SOIL IMPROVEMENT BY UREOLYTIC BACTERIA

NAZLIHAN YILDIRIM

MASTER THESIS
Department of Biology
Biology Program

Thesis Supervisor
Doç. Dr. N. Cenk SESAL

Thesis CO- Supervisor
Doç. Dr. Yeşim GÜRTUĞ

ISTANBUL, 2016

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen, yaptığım çalışmalarda her zaman yol gösterici olan ve yardım eden sevgili danışmanlarım Doç. Dr. Cenk SESAL ve Doç. Dr. Yeşim GÜRTUĞ'a destekleri ve bana kattıklarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim sırasında beni bilgi ve deneyimleri ile aydınlatan değerli hocalarım Prof. Dr. Meral ÜNAL, Doç. Dr. Filiz VARDAR, Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN, Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU, Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI, ve Ar. Gör. Salim SÜNER'e emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Gerek eğitim hayatım gerek sosyal hayatımda varlıkları ve dostuklarıyla her zaman yanımda olan, yardımlarını asla esirgemeyen ve paylaştığım her anımı unutamayacağım canım dostlarım Şevval Maral ÖZCAN, Ezgi UÇARKUŞ, Buse BERBER, Busecan AKSOYDAN ve Orçun TOKSÖZ'e ve tez çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Barış GÖKALSIN ve Birkan AÇIKGÖZ'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Lisans eğitimimden beri yanımda olan, hiçbir zaman sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen, bu tez çalışmamda gerek maddi gerek manevi yardımlarıyla beni yalnız bırakmayan, bazen bir abla bazen bir kardeş gibi ailemin bir parçası olmuş birtanem, can dostum Nazlı TUNCER'e sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her seçiminde arkamda duran, beni büyüten, her tökezlediğimde beni ayağa kaldıran, sevgisini ve sabrını asla esirgemeyen canım babam Kazım YILDIRIM, canım annem Fatime YILDIRIM, canım ablam Nilhan İMREK, birtanecik yeğenlerim Ceylin ve Hira İMREK ve canım teyzem Esin KÖSE'ye her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim. Ayrıca hayatımın her anında beni güldürmeyi başaran ve yükek lisans eğitimim sırasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen neşe kaynağım, küçüğüm, canım kuzenim Hilal DALKILIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez kapsamındaki çalışmalara FEN-C-YLP-100615-0274 no'lu proje ile destek olan BAPKO'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eylül, 2016 **NAZLIHAN YILDIRIM**

İÇİNDEKİLER/ TABLE OF CONTENTS **SAYFA**

TEŞEKKÜRLER (ACKNOWLEDGMENT) i
İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS ii
ÖZET viii
ABSTRACT ix
SEMBOLLER / SYMBOLS x
KISALTMALAR / ABBREVIATIONS xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES xv
TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES xxi
1. **GİRİŞ / INTRODUCTION** 1
1.1. Genel Bilgi 1
1.1.1. Mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu 3
1.1.1.1. Biyoçimentolama 3
1.1.1.2. Ağır metallerin çöktürülerek uzaklaştırılması 5
1.1.1.3. Biyolojik onarım 6
1.1.2. Üre hidrolizi ve üreaz aktivitesi 7
1.1.3. Biyoçimentolamanın mukavemet, su geçirgenliği, şişme ve sağlamlaştırma üzerine etkisi 8
1.2. Bakterilerin Geliştirilmesi ve Çoğaltılması, Bakterilerin Üreaz Aktivite Testleri ve Farklı Sıcaklık pH ve Besin (Maya Özütü) Kosantrasyonunda Aktivitenin Belirlenmesi 11
1.3. Farklı Üre ve $CaCl_2$ Kosantrasyonlarında Mikrobiyal $CaCO_3$ Oluşumu ve Mikroskobik Olarak İncelenmesi 13
1.4. Kum Kolonlarında $CaCO_3$ Oluşturulması ve SEM ile İncelemesi 16
1.5. Kum Örneklerinde Konpenetrasyon Testi (CPT) ve Bernard-Scheibler Kalsimetre Metodu ile $CaCO_3$ Miktar Tayini ve Karşılaştırılması 18
1.6. Kolonlarda Konsolidasyon Testi 19
1.7. Free Swell Testi 21
2. MATERYAL 25
2.1. Bakteri Suşları 25
2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar 25
2.3. Kullanılan Cihazlar 27
2.4. Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar 28
2.4.1. Çoğaltma ve gelişim ortamının hazırlanması 28
2.4.2. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) 29
2.4.3. Üre broth hazırlanması 30
2.4.4. Nikel tuzu (Nikel Asetilasetonat) stok I, stok II ve test çözeltisi hazırlanması 30
2.4.5. Plakada $CaCO_3$ oluşturma için solüsyonların hazırlanması 31
2.4.5.1. 500 ml 1 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi 31
2.4.5.2. 200 ml 1 M $CaCl_2$ çözeltisi 31
2.4.6. Kum örneklerinde bakteri için gelişim ortamının hazırlanması 31
2.4.7. Çimentolama ve fiksatif solüsyonlarının hazırlanması 31

2.4.7.1. 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimentolama solüsyonunun hazırlanması 31
2.4.7.2. 0,5 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimentolama solüsyonunun hazırlanması 32
2.4.7.3. 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimentolama solüsyonunun hazırlanması 32
2.4.7.4. 0,05 M $CaCl_2$ içeren fiksatif solüsyonunun hazırlanması 32
2.4.8. Renklendirilmiş 0,1 N H_2SO_4 hazırlanması 32
2.4.9. 6 N HCl hazırlanması 33
2.4.10. Free swell testinde bakteri gelişme ortamının hazırlanması 33
2.4.11. Free swell testinde çimento solüsyonunun hazırlanması 33
3. YÖNTEM 34
3.1. Bakterilerin Geliştirilmesi ve Çoğaltılması, Bakterilerin Üreaz Aktivite Testleri ve Farklı Sıcaklık pH ve Besin (Maya özütü) Kosantrasyonunda Aktivitenin Belirlenmesine Yönelik Kullanılan Yöntemler 34
3.1.1 Üreaz enzimi için standart eğrinin çizilmesi 34
3.1.2. Mikroorganizmalar ile üreaz aktivite testi 34
3.1.3. Farklı stres koşullarında mikroorganizmalar ile üreaz aktivite testi 34
3.1.3.1. Sıcaklık stresi 34
3.1.3.2. pH stresi 35
3.1.3.3. Besin (Maya özütü) stresi 35
3.1.3.4. Nikel iyon stresi 35
3.2. Farklı Üre ve $CaCl_2$ Kosantrasyonlarında Mikrobiyal $CaCO_3$ Oluşumu ve Mikroskobik Olarak İncelenmesine Yönelik Kullanılan Yöntemler 36
3.2.1. 6 kuyucuklu plakalarının hazırlanması 37
3.2.2. Şırınga içerisinde lam düzeneğinin hazırlanması 38
3.2.3. Ortam sıvılarının süzülmesi ve lam yüzeylerinin inceleme için hazırlanması 39
3.3. Kum Kolonlarında $CaCO_3$ Oluşturulması ve SEM ile İncelemesine Yönelik Kullanılan Yöntemler 41
3.3.1 Kum kolonlarının hazırlanması 41
3.3.2. Kum örneklerinin bakteri ve çimentolama solüsyonu ile muamelesi 42
3.3.2.1. 2 günlük iyileştirme prosedürü 42
3.3.2.2. 4 günlük iyileştirme prosedürü 42
3.3.2.3. 6 günlük iyileştirme prosedürü 43
3.3.3. SEM için örneklerin hazırlanması 44
3.3.3.1. SEM analizi için örnek hazırlanması 44
3.4. Kum Örneklerinde Konpenetrasyon Testi (CPT) ve Bernard-Scheibler Kalsimetre Metodu ile $CaCO_3$ Miktar Tayini ve Karşılaştırılmasına Yönelik Kullanılan Yöntemler 45
3.4.1. Koni penetrasyon testi 45
3.4.2. Bernard-Scheibler kalsimetre metodu 46
3.5. Kolonlarda Konsolidasyon Testine Yönelik Kullanılan Yöntemler 49

3.5.1. Konslidasyon ringlerinin hazırlanması 49
3.5.2. Kum örneklerinin ortamlar ile muamelesi 49
3.5.3. Konsolidasyon testi 50
3.6. Free Swell Testine Yönelik Kullanılan Yöntemler 50
3.6.1. Bentonitin Atterberg (kıvam) limitlerinin belirlenmesi 50
3.6.2. Bentonit ve kum karışımının hazırlanması 51
3.6.3. Bakteri süspansiyonunun hazırlanması 52
3.6.4. Bentonit – kum karışımının bakteri süspansiyonu, gelişme ortamı ve çimento solüsyonu ile muamele edilmesi 52
3.6.4.1. Bentonit – kum karışımının bakteri süspansiyonu ve gelişme ortamı ile muamele edilmesi 52
3.6.4.2. Bentonit – kum karışımının bakteri süspansiyonu ve çimento solüsyonu ile muamele edilmesi 53
3.6.4.3. İşlem görmüş bentonit – kum karışımının kurutulması 53
3.6.4.4. Free swell testi 53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 56
4.1. Bakterilerin Geliştirilmesi ve Çoğaltılması, Bakterilerin Üreaz Aktivite Testleri ve Farklı Sıcaklık pH ve Besin (Maya özütü) Kosantrasyonunda Aktivitenin Belirlenmesi 56
4.1.1. Üreaz enziminin absorbans ve standart eğri grafiğinin çizilmesi 56
4.1.2. Mikroorganizmalar ile üreaz aktivite testi 58
4.1.3. Sıcaklık Stresi 62
4.1.4. pH Stresi 64
4.1.5. Besin (Maya özütü) Stresi 65
4.1.6. Nikel iyonu etkisi 70
4.2. Farklı Üre ve $CaCl_2$ Kosantrasyonlarında Mikrobiyal $CaCO_3$ Oluşumu ve Mikroskobik Olarak İncelenmesi 80
4.2.1. Plakada $CaCO_3$ oluşturma ve mikroskobik inceleme 80
4.2.2. Şırıngada $CaCO_3$ oluşturma ve mikroskobik inceleme 80
4.3. Kum Kolonlarında $CaCO_3$ Oluşturulması ve SEM ile İncelemesi 83
4.3.1. Kum kolonlarının SEM görüntüleri 83
4.4 Kum Örneklerinde Konpenetrasyon Testi (CPT) ve Bernard-Scheibler Kalsimetre Metodu ile $CaCO_3$ Miktar Tayini ve Karşılaştırılması 90
4.4.1. Koni penetrasyon testi 90
4.4.1.1. 2 günlük uygulama sonucunda kum örneklerinde mukavemet sonuçları 90
4.4.1.2. 4 günlük uygulama sonucunda kum örneklerinde mukavemet sonuçları 99
4.4.1.3. 6 günlük uygulama sonucunda kum örneklerinde mukavemet sonuçları 108
4.4.2. Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile $CaCO_3$ miktar tayini 121
4.4.2.1. 2 günlük iyileştirme uygulaması 121
4.4.2.2. 4 günlük iyileştirme uygulaması 124
4.4.2.3. 6 günlük iyileştirme uygulaması 129

4.5. Kolonlarda Konsolidasyon Testi 136
4.5.1. Grup 1 için konsolidasyon sonuçları 136
4.5.2. Grup 3 için konsolidasyon sonuçları 138
4.5.3. Grup 4 için konsolidasyon sonuçları 139
4.5.4. Grup 5 için konsolidasyon sonuçları 140
4.5.5. Grup 6 için konsolidasyon sonuçları 142
4.6. Free Swell Testi 145
4.6.1. %100 kum içeren örneklerde serbest şişme indeksi 145
4.6.2. %75 kum ve %25 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi 146
4.6.3. %50 kum ve %50 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi 146
4.6.4. %25 kum ve %75 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi 147
4.6.5. %100 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi 148
5. SONUÇLAR 152
KAYNAKLAR 155
ÖZGEÇMİŞ 163

ÖZET

ÜROLİTİK BAKTERİLERİN ZEMİN İYİLEŞTİRME UYGULAMALARINDA KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI

Dünyada her geçen gün hızlı nüfus artışına bağlı olarak konut, fabrika ve sanayi bölgeleri gibi iş ve yerleşim alanlarının sayısı artmaktadır. Bu bağlamda, artan nüfusun ihtiyacına cevap oluşturabilmek için, zemin yapısı uygun olmayan kumlu ve killi bölgelerin iyileştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu bölgelerde geçmişten günümüze kadar inşaat mühendisliğinde çeşitli iyileştirme yöntemleri gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda ise bu yöntemlere ek olarak zemin özelliklerini değiştirmek için özellikle biyolojik süreçler kullanılarak mikrobiyal çimento oluşturmaya yönelik yeni teknikler geliştirilmeye başlanmıştır.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, özellikle zemin iyileştirme tekniklerine alternatif olarak kullanılabilecek, biyoçimentolama işlemi için literatür taraması yapılmıştır. Toprak içerisinde kullanılabilecek ürolitik bakteri türleri belirlenmiştir. Belirlenen bakteri türlerinin üreaz aktivitesi tespit edilip, pH, sıcaklık, besin (maya özütü), kofaktör, üre ve Ca miktarı gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Bu parametrelere bağlı olarak, toprak içerisindeki por dağılımı, zeminin mukavemeti ve şişme derecesinin deney süresince değişimleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlarda, incelenen bakteri türlerinden yukarıda belirtilen parametrelere bağlı olarak en yüksek üreaz aktivitesine sahip bakterinin *B. sphaericus* CECT 5905 olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bakteri ile mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun gerçekleşebilmesi için en uygun üre-$CaCl_2$ konsantrasyonu 0,5 M olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, *B. sphaericus* CECT 5905 süspansiyonu ve 0,5 M üre – 0,5 M $CaCl_2$ içeren solüsyonu eklenen kum örneğinde, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile mukavemet ve konsolidasyon değerinde artış görülürken, şişme değerini ise önemli derecede azalttığı gözlenmiştir. Bu bağlamda, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun zemin iyileştirme tekniklerine alternatif olarak kullanılabilecek doğa ile dost ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu öngörülmüştür.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF UREOLYTIC BACTERIA UTILIZATION IN GROUND IMPROVEMENT APPLICATIONS

The World population increases rapidly everyday and accordingly, commercial and residential areas including housing, factories and industrial districts also increase. Therefore, to sustain the needs of the population increase, the necessity to improve sandy and clay grounds have arisen. On these grounds, several improvement methods are utilized in civil engineering. In recent years however, in addition to these methods, new biological processes are employed and developed to change ground properties and form microbial cement.

In the light of these information, in our study, a literature survey was performed for biocementing that can be used as an alternative ground improvement method. Ureolytic bacteria species were determined to use in soil. Urease activites of determined bacteria were established and effects of parameters such as pH, temprature, nutrition (malt extract), cofactor, urea and Ca were evaluated. Accordingly, pore distribution in soil, ground strength and swelling degrees were analyzed in experiments.

As a result of this study, *B. sphaericus* CECT 5905 was determined to have the highest urease activity. For this bacteria, optimum urea- $CaCl_2$ concentration for $CaCO_3$ formation was determined as 0,5 M. Therefore, in sand samples with *B. sphaericus* CECT 5905 suspension and 0,5 M urea-0,5 M $CaCl_2$ solution; an increase in $CaCO_3$ formation, strenght and consodilation values, and a significant decrease in swelling. Consequently, microbial $CaCO_3$ formation is foreseen as an alternative ground improvement method that is cost and nature friendly.

SEMBOLLER / SYMBOLS

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat derece
g	:	Gram
ml	:	Mililitre
l	:	Litre
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
M	:	Molar
mg	:	Miligram
nm	:	Nanometre
ng	:	Nanogram
mm	:	Milimetre
cm	:	Santimetre
N	:	Normal
Mn	:	Mangan
Mg	:	Magnezyum
TiO_2	:	Titanyum dioksit
m^3	:	Metreküp

$	:	Dolar
$CaCO_3$	:	Kalsiyum karbonat
$CaCl_2$	:	Kalsiyum Klorür
Hg	:	Cıva
Pb	:	Kurşun
As	:	Arsenik
Cd	:	Kadmiyum
Zn	:	Çinko
Se	:	Selenyum
Cu	:	Bakır
$ZnSO_4$	:	Çinko sülfat
Zn^{2+}	:	Çinko iyonu
Ca^{2+}	:	Kalsiyum iyonu
Sr^{2+}	:	Stronsiyum iyonu
$SrCl_2$	:	Stronsiyum klorür
$SrCO_3$	:	Stronsiyum karbonat
pH	:	Potansiyel hidrojen
NH_3	:	Amonyak
CO_2	:	Karbondioksit

H_2CO_3	:	Karbonik asit
NH_4^+	:	Amonyum
HCO_3^-	:	Bikarbonat iyonu
Co	:	Kobalt
KH_2PO_4	:	Potasyum dihidrojen fosfat
K_2HPO_4	:	Dipotasyum hidrojen fosfat
Na_2HPO_4	:	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	:	Sodyum klorür
KCl	:	Potasyum klorür
$Ni(C_5H_7O_2)_2$	:	Nikel asetilasetonat
NH_4Cl	:	Amonyum klorür
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
U	:	Unit
s	:	Saat
Ni	:	Nikel
$Ca(OH)_2$	:	Kalsiyum hidroksit
$CaCO_3.H_2O$	:	Monohidro kalsit
$CaCO_3.6H_2O$	:	İkait
N	:	Azot

C	:	Karbon
$CaCl_2.2H_2O$	:	Kalsiyum klorür dihidrat
kV	:	Kilovolt
mbar	:	Milibar
cm^2	:	Santimetrekare
qc	:	Koni ucunda oluşan direnç
fs	:	Sürtünme direnci
u	:	Boşluk suyu basıncı
H_2SO_4	:	Sülfirik asit
Cl^-	:	Klor iyonu
CO_3^-	:	Karbonat iyonu
Cc	:	Sıkışma indisi
Cr	:	Yeniden sıkışma indisi
kPa	:	Kilopaskal

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

CPT	:	Conic penetration test
ADNKS	:	Adrese dayalı nüfus kayıt sistemi
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope)
UV	:	Ultraviyole (Ultraviolet)
LB	:	Luria - Bertani
TÜBİTAK	:	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES **SAYFA**

Şekil 1.1. $CaCO_3$ kimyasal yapısı 17

Şekil 3.1. Plakada $CaCO_3$ oluşumu için kullanılan 1, 0,75, 0,5 ve 0,25 M olmak üzere dört farklı konsantrasyon şeması 38

Şekil 3.2. Şırıngada $CaCO_3$ oluşumu için kullanılan 1, 0,75, 0,5 ve 0,25 M olmak üzere dört farklı konsantrasyon şeması 39

Şekil 3.3. A,B; Ortam sıvılarının falkon tüplere alınması, C,D; şırınga içindeki lamların distile su-aseton-metanol karışımı ile yıkanması, E,F; Sıvıların süzülmesi, G,H; Filtre kağıdı ve lamların oda sıcaklığında kurutulması 40

Şekil 3.4. Kumun dane boyutu dağılım grafiği 41

Şekil 3.5. Kum kolonlarının ortamlar ile muamelesi 44

Şekil 3.6. A; Örneğin karbon banta yapıştırılması, B; Örneklerin kaplanması, C; SEM cihazı ile örneklerin görüntülenmesi 45

Şekil 3.7. BROOKFİELD CT3 cihazı ile modifiye CPT deneyinin uygulanması 46

Şekil 3.8. Farklı konsantrasyonlardaki $CaCO_3$ eğrisi 47

Şekil 3.9. A; Kum örneğinin tartılması ve erlene konması, B; Küçük cam tüpe 6 ml HCl konulması, C; HCl tüpünün erlen içine konması, D; İçinde HCl tüpü bulunan erlenin çalkalanması, E; CO_2 gazının basıncı ile sıvının hareketi, F; Büretteki sıvı ile ayırma hunisindeki sıvının dengelenmesi 48

Şekil 3.10. Konsolidasyon ringi içersinde bulunan kum örneklerinin iyileştirme ortamları ile muamelesi 50

Şekil 3.11. Bentonitin Atterberg (kıvam) limitleri 51

Şekil 3.12. A; Bentonit ve kum karışımının kurutulması, B; gelişme ortamı ve bakteri süspansiyonu ile muamele edilmiş bentonitin 30°C'de inkübasyonu 54

Şekil 3.13. A; Çimento solüsyonu eklenmiş bentonit – kum karışımı, B; bentonit – kum karışımının kurutulması 54

Şekil 3.14. A; Çimento solüsyonu eklenmiş bentonit – kum karışımı, B; bentonit – kum karışımının kurutulması, C; şişme sabitlenene kadar beklenmesi 55

Şekil 4.1. Jack Bean üreaz enziminin farklı konsantrasyonlardaki aktivitesinin 60 dakika boyunca 560 nm'de absorbans grafiği 57

Şekil 4.2. Jack Bean üreaz enziminin farklı konsantrasyonlardaki aktivitesinin 60 dakika boyunca 560 nm'de standart eğri grafiği 57

Şekil 4.3. Mikroorganizmaların 18. saatte ürettiği üreaz enzimi miktarlarının karşılaştırma grafiği 60

Şekil 4.4. *B. sphaericus* CECT 5905, *B. megaterium* CECT 4096, *B. thuringiensis* CECT 4497, *B. thuringiensis* CECT 4454, *B. megaterium* CECT 370 türlerinin 20 saat boyunca 560 nm'de üreaz enzim miktarı değişim grafiği 61

Şekil 4.5. Mikroorganizmaların 30°C'de 1 gece inkübasyon sonucu plakada sarıdan pembeye renk değişimi 63

Şekil 4.6. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 5, 2,5, 0,5, 0,1, 0,075 ve 0,05 g maya özütü içeren ortamlarda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişimlerin karşılaştırma grafiği 67

Şekil 4.7. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 5 g maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği 67

Şekil 4.8. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 2,5 g maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği 68

Şekil 4.9. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,5 g maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği 68

Şekil 4.10 *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,1 g maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği 69

Şekil 4.11. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,075 g maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği 69

Şekil 4.12. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,05 g maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği 70

Şekil 4.13. Nikel iyonu içeren üre Broth'da, bakterilerin 30 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası gösterdikleri üreaz aktivite görüntüsü 71

Şekil 4.14. *B. sphaericus* CECT 5905'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği 73

Şekil 4.15. *B. megaterium* CECT 4096'nın aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği 75

Şekil 4.16. *B. megaterium* CECT 370'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği 76

Şekil 4.17. *B. thurungiensis* CECT 4497'nin aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği 78

Şekil 4.18. A; 0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 lam stereo mikroskop görüntüsü, B;0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 lam ışık mikroskobu görüntüsü, C; 0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 kuyucuk stereo mikroskop görüntüsü, D; 0,5 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam ışık mikroskobu görüntüsü, E; 0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam ışık mikroskobu görüntüsü, F; 0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 lam stereo mikroskop görüntüsü, G; 1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam stereo mikroskop görüntüsü, H; 1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam ışık mikroskobu görüntüsü 81

Şekil 4.19. A; 0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi çözeltisi ile muamele edilen lam grupları, B; 0,5 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi çözeltisi ile muamele edilen lam grupları, C; 0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi çözeltisi ile muamele edilen lam grupları, D; 1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi çözeltisi ile muamele edilen lam grupları 82

Şekil 4.20. A, B; Partikül yüzeyine tutunmuş kalsit kristalleri 84

Şekil 4.21. Düzensiz formdaki kalsit yapıları 84

Şekil 4.22. Partikül yüzeylerine tutunmuş düzensiz formdaki $CaCO_3$ kristalleri 85

Şekil 4.23. A; aragonit ve kalsit formlarının birleşmesi, B; yığın halde bulunan kalsit formları 85

Şekil 4.24. A; düzenli ve kırılmamış kalsit formları, B; vaterit ve kalsit formları, C; iki partikül arasındaki bağlantı köprüleri 86

Şekil 4.25. A; yığın oluşturmuş düzensiz kalsit formları, B; kalsit formları 87

Şekil 4.26. A; partiküller arasında $CaCO_3$ ile oluşan bağlantı köprüleri, B; partikül üzerindeki kalsit formları 87

Şekil 4.27. A; partikül yüzeyinde düzenli yığın oluşturmuş kalsitler, düzensiz yığın halindeki $CaCO_3$ birikintileri 88

Şekil 4.28. A; Plaka yüzeyine tutunmuş dambıl şeklindeki kalsit yapıları 88

Şekil 4.29. A; 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği, B; 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 91

Şekil 4.30. A; Grup 1‘de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 1‘de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 92

Şekil 4.31. A; Grup 2‘de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 2‘de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 93

Şekil 4.32. A; Grup 3‘te 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 3‘te 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 94

Şekil 4.33. A; Grup 4‘te 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 4‘te 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 95

Şekil 4.34. A; Grup 5‘te 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 5‘te 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 96

Şekil 4.35. A; Grup 6‘da 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 6‘da 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 97

Şekil 4.36. A; Grup 7‘de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 7‘de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 98

Şekil 4.37. A; Grup 8‘de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 8‘de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 99

Şekil 4.38. A; 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği, B; 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 100

Şekil 4.39. A; Grup 1‘de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 1‘de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 101

Şekil 4.40. A; Grup 2‘de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 2‘de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 102

Şekil 4.41. A; Grup 3‘te 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 3‘te 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 103

Şekil 4.42. A; Grup 4‘te 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 4‘te 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 104

Şekil 4.43. A; Grup 5‘te 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 5‘te 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 105

Şekil 4.44. A; Grup 6‘da 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 6‘da 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 106

Şekil 4.45. A; Grup 7‘de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 7‘de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 107

Şekil 4.46. A; Grup 8‘de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 8‘de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 108

Şekil 4.47. A; 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği, B; 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 109

Şekil 4.48. A; Grup 1‘de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 1‘de 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 110

Şekil 4.49. A; Grup 2‘de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği 111

Şekil 4.50. A; Grup 3‘te 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 3‘te 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 112

Şekil 4.51. A; Grup 4‘te 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 4‘te 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 113

Şekil 4.52. A; Grup 5‘te 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 5‘te 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 114

Şekil 4.53. A; Grup 6‘da 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 6’da 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 115

Şekil 4.54. A; Grup 7‘de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 7‘de 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 116

Şekil 4.55. A; Grup 8‘de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 8‘de 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği 117

Şekil 4.56. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 122

Şekil 4.57. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 124

Şekil 4.58. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 126

Şekil 4.59. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 128

Şekil 4.60. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 130

Şekil 4.61. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği 132

Şekil 4.62. Grup 1 için log pressure-boşluk oranı grafiği 137

Şekil 4.63. Grup 3 için log pressure-boşluk oranı grafiği 139

Şekil 4.64. Grup 4 için log pressure-boşluk oranı grafiği 140

Şekil 4.65. Grup 5 için log pressure-boşluk oranı grafiği 141

Şekil 4.66. Grup 6 için log pressure-boşluk oranı grafiği 143

Şekil 4.67. Grup 1, 3, 4, 5 ve 6 için sıkışma indisi değerleri 143

Şekil 4.68. Grup 1, 3, 4, 5 ve 6 için yeniden sıkışma indisi değerleri 144

Şekil 4.69. Grup 1, 3, 4, 5 ve 6 için şişme yüzdesi değerleri 144

Şekil 4.70. 1. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi 145

Şekil 4.71. 2. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi 146

Şekil 4.72. 3. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi 147

Şekil 4.73. 4. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi 148

Şekil 4.74. 5. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi 149

Şekil 4.75. 5 farklı serideki Deney grubunun Kontrol 1 grubu ile karşılaştırılması sonucu elde edilen serbest şişme indeks değeri grafiği 151

Şekil 4.76. 5 farklı serideki Kontrol 2 grubunun Kontrol 1 grubu ile karşılaştırılması sonucu elde edilen serbest şişme indeks değeri grafiği 151

TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES **SAYFA**

Tablo 1.1. Farklı mikrobiyal yolaklarla gerçekleştirilen $CaCO_3$ oluşum mekanizmaları 15

Tablo 2.1: Mikroorganizmaların çoğaltılıp geliştirilmesi için gerekli olan malzemeler ve miktarları 28

Tablo2.2: Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PBS) içeriği 29

Tablo 2.3: Üre Broth'un madde içeriği ve miktarları (Sigma-Aldirch) 30

Tablo 3.1. Nikel iyonunun üreaz aktivitesindeki etkisini incelemek için kullanılan mikroorganizmalar 36

Tablo 3.2. Kum kolonlarına eklenen solüsyonlar ve gruplara göre eklenme miktarları 43

Tablo 3.3. Konsolidasyon testi için seçilmiş gruplar ve ortamları 49

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılmak üzere oluşturulan kum-bentonit karışım oranları 51

Tablo 4.1. Üreaz aktivitesi incelenen mikroorganizmaların 3. ve 18. saatlerde üreaz aktivitelerinin ortamdaki renk değişimine bağlı 560 nm'de absorbans değerleri, +: açık pembe, ++: koyu pembe 59

Tablo 4.2. *B. sphaericus* CECT 5905 türünün en fazla aktivite gösterdiği zaman ve değerler 62

Tablo 4.3. Üreaz aktivitesi gösteren bakterilerde 24 saat inkübasyon sonrası 42°C ve 30°C'deki aktivite değişim değerleri 63

Tablo 4.4. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında *B. sphaericus* CECT 5905'in mikrobiyal aktivitesi ile üretilen üreaz enzim miktar değerleri 66

Tablo 4.5. *B. sphaericus* CECT 5905'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri 72

Tablo 4.6. *B. megaterium* CECT 4096'nın aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri 74

Tablo 4.7. *B. megaterium* CECT 370'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri 76

Tablo 4.8. *B. thurungiensis* CECT 4497'nin aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri 77

Tablo 4.9. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. ve 28. günde CPT sonuçları 90

Tablo 4.10. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. ve 28. günde CPT sonuçları 99

Tablo 4.11. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. ve 28. günde CPT sonuçları 108

Tablo 4.12. Grup 1'e göre 28 gün sonunda deney gruplarının mukavemet değerlerindeki kat artış ve azalış değerleri 118

Tablo 4.13. Grup 2'ye göre 28 gün sonunda deney gruplarının mukavemet değerlerindeki kat artış ve azalış değerleri 118

Tablo 4.14. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış Ca_{CO3} miktarı sonuçları 122

Tablo 4.15. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları 124

Tablo 4.16. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları 126

Tablo 4.17. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları 128

Tablo 4.18. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları 130

Tablo 4.19. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları 132

Tablo 4.20. Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile kolonlarda belirlenen $CaCO_3$ miktarları 133

Tablo 4.21. Grup 1 için konsolidasyon parametre değerleri 137

Tablo 4.22. Grup 1 için konsolidasyon katsayısı değeri 137

Tablo 4.23. Grup 3 için konsolidasyon parametre değerleri 138

Tablo 4.24. Grup 3 için konsolidasyon katsayısı değeri 138

Tablo 4.25. Grup 4 için konsolidasyon parametre değerleri 139

Tablo 4.26. Grup 4 için konsolidasyon katsayısı değeri 140

Tablo 4.27. Grup 5 için konsolidasyon parametre değerleri 141

Tablo 4.28. Grup 5 için konsolidasyon katsayısı değeri 141

Tablo 4.29. Grup 6 için konsolidasyon parametre değerleri 142

Tablo 4.30. Grup 6 için konsolidasyon katsayısı değeri 142

Tablo 4.31. Seriler ve gruplarının şişme mesafeleri ve free swell indexleri 149

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ / INTRODUCTION

1.1. Genel Bilgi

Dünyada her geçen gün insanların çoğu ekonomik nedenlerden dolayı kentsel bölgelere göç etmekte ve buna bağlı olarak konut, fabrika ve sanayi bölgeleri gibi iş ve yerleşim alanlarının sayısı artmaktadır (Achal, 2011). Örneğin; özellikle Hindistan ve Çin'de yaklaşık 10 milyon insanın büyük şehirlerde yaşamaya başladığı ve yapı ihtiyaçlarına karşı binaların inşa edileceği zemin koşullarının elverişsiz olduğu belirtilmektedir (DeJong, 2010). Özellikle ülkemizde de, ADNKS'de (Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi) ve TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) "vizyon 2023" kapsamında belirtilen demografik durum raporunda, nüfus artışı yıllık ortalama hızı, %1,87 oranında artmaktadır. Bu bağlamda, yapılaşma için zemin yapısı uygun olmayan yumuşak killi ve gevşek kum oranının yüksek olduğu yerler gibi bölgelerin iyileştirilmesinin gerekliliği ortaya çıkmıştır. Özellikle ülkemizde, bu özellikteki zemin üzerine inşa edilmiş yapıların birçoğu, 17 Ağustos 1999'da meydana gelen depremde yıkılmış veya zarar görmüştür. Bunun en büyük sebebi olarak, zemin yapısının kil-silt formasyonlu toprak partiküllerinden oluşması ve zemin üzerine kurulan yapıların altyapısının iyileştirilmemesi gösterilmiştir (Dalgıç, 2009). Böyle toprak yapısına sahip bölgelerin düzenlenmesi için zemin iyileştirme teknikleri uygulanmaktadır. Kompaksiyon, zeminde yer değiştirme, ısıtıp dondurma ve jet grouting gibi enjeksiyon teknikleri zemin iyileştirilmesinde kullanılan uygulamalardır (Paassen, 2009).

İyileştirme teknikleri, özellikle toprağın kayma mukavemeti, sıkışabilirliği ve su geçirgenliği gibi özelliklerini geliştirerek mukavemeti artırmak amacı ile yapılmaktadır (Nicholson, 2015). Fakat uygulanan iyileştirme teknikleri, zeminin özelliklerinin yanında başka faktörlere göre değişmekte ve yöntemin sonucunu etkilemektedir. İyileştirilecek zeminin bulunduğu ortamın büyüklüğü, kullanılacak malzemelerin çevreye etkisi, yöntemden önce gerçekleştirilen zemin analizlerinde yapılan hatalar gibi faktörler yöntemin yanlış belirlenmesine sebebiyet vermekte ve çok daha yüksek bir maliyetle sonuçlanmaktadır (Özdemir, 2010).

Uygulanan teknikler birbirleri ile karşılaştırıldığında, çoğu, her zemin için uygun olmamakta ve kullanılan malzemelerin maliyeti de bu bakımdan artmaktadır. Belirtilen yöntemler arasında, en düşük maliyetli ve genellikle her zemine uygulanabilen teknik, jet grouting yöntemidir. Fakat teknik yeni geliştirildiği için uygun bir prosedür ve kontrol testleri kesinleşmemiştir (Özdemir, 2010). Teknikte çimento-su karışımı, zemin özelliğine göre farklı yüksek basınç miktarları ve bu basınçlara bağlı olarak oluşan hız yardımıyla püskürtülürken, zemini darbeleyerek bir karışım oluşturulmaktadır (Shen ve ark., 2013). Ayrıca burada kullanılan karışımdaki su ve çimento miktarlarının doğru hesaplanması zemin yapısı ve sağlamlaştırılması için büyük önem arz etmektedir (Tinoco ve ark., 2011). Bunun yanında kullanılan çimentonun bileşenleri toprağın doğal özelliklerini değiştirmekte ve ortama yüksek miktarda Mn (Mangan), Mg (Magnezyum), TiO_2 (Titanyum dioksit) gibi maddelerin girmesine sebebiyet vermektedir. Ayrıca çimento hariç, akrilamid, epoksi, poliüretan gibi çimentolama maddeleri de çevreye zararlı maddelerdendir. Buna bağlı olarak maddeler, ortamda bulunan mikroorganizma, bitki, hayvan ve hatta insan sağlığı üzerine olumsuz etkide bulunmaktadır (Karol, 2003, Hooda ve ark., 2014).

Zemin iyileştirme tekniklerinin en çok uygulandığı bölgeler killi ve kumlu bölgelerdir. Bu zeminlerin özellikleri incelendiğinde, özellikle şişme değerlerinin ve su geçirgenliklerinin fazla olduğu görülmüştür. Bu parametre değerlerinin yüksek olması, zeminin, basınç ve mukavemetini azaltmaktadır. Belirlenen zeminin toprak yapısı analizlerinde, bu parametre değerlerinin yüksek olmasının sebebi olarak, zeminde, bir toprak bileşeni ve yüksek şişme özelliğine sahip yumuşak bir kil olan bentonit gösterilmektedir. Bentonit suya karşı olan afinitesinden dolayı özellikle zemin mühendisleri tarafından üzerinde araştırma yapılmasına olanak sağlamaktadır. Fakat araştırmacılar şişme değerinin çok yüksek olması ve bu nedenle değerdeki sabitlenmenin uzun sürmesi ve hesaplamalardaki hatalardan dolayı, bentonitin araştırılması konusunda zorluk çekmektedir. Zemin analizlerinde bentonit içeriğinin fazla olmasına bağlı olarak, zeminde bir süre sonra su alarak şişme ve zemindeki çimentolama yapılarında çatlamalar ve kırılmalar yaşanabilmektedir. Belirtilen sebeplerden dolayı bentonit gibi yumuşak kil içeren zeminlerin iyileştirilmesi konusunda problemler yaşanmaktadır.

Yumuşak killi bölgelerin yanında ayrıca gevşek kumlu bölgelerde de zemin iyileştirilmesi konusunda birçok problemle karşılaşılmakta ve uzun süredir bu konu üzerinde çalışılmaktadır. Özellikle denize kıyısı olan ülkelerde gevşek kumlu zeminler bulunduğu için, bu bölgelerde kurulan yapılar, iyileştirmeden bir süre sonra zarar görmektedir. Zeminde çatlama, şişme, korozyon ve kayma gibi durumlar başlıca problemler arasında yer almaktadır. Aynı zamanda sahil bölgelerinde yapılan yapılarda meydana gelen korozyon, özellikle kıyı kesinlerde zeminin tuzlu olasından dolayı artmaktadır. Korozyona bağlı olarak, yapı içerisindeki demirlerin aşınmasına ve kırılmasına sebebiyet vermektedir. Belirtilen sebeplerden dolayı, iyileştirme tekniklerinin belirlemesi zorlaşmakta ve yanlış uygulamalardan dolayı maddi kayıplara neden olmaktadır.

Son yıllarda ise belirtilen teknikler haricinde zemin iyileştirilmesinde özellikle yukarıda belirtilen bölgelerdeki zemin özelliklerini değiştirmek için biyolojik süreçler kullanılarak yeni teknikler ortaya çıkmıştır (Dejong, 2010). Özellikle teknik malzemeler ve inceleme yöntemleri açısından düşük maliyetli ve doğal bir süreç sonucu oluştuğu için doğal ortama zarar vermeyen mikrobiyolojik zemin iyileştirilmesi önem kazanmıştır. Literatürde iyileştirme tekniklerinde kullanılan çimento enjeksiyonu için gerekli kimyasal malzemelerin fiyatının, toprakta her m^3 başına 2-72 $ arasında değişirken, mikrobiyal çimentolama için gerekli olan malzemelerin yine toprakta her m^3 başına 0,5-9 $ arasında değiştiği belirtilmektedir (Chu ve Ivanov, 2008). Bu nedenle, özellikle bir toprağın jeotekniksel özelliklerini geliştirmek için biyolojik çimentolama olan mikrobiyal kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) oluşumu çalışmaları hızla artmaktadır (Rodriguez-Navarro ve ark., 2003, Ural, 2011, Martinez ve Dejong, 2009).

1.1.1. Mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu

1.1.1.1 Biyoçimentolama

Biyoçimentolama, toprak içerisindeki alkalofilik bakteriler tarafından salgılanan üreaz enziminin, üre ve ortamdaki Ca^{2+} iyonu ile reaksiyona girmesi $CaCO_3$ oluşturulması olayı olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik çimentolamada en önemli sürecin $CaCO_3$ oluşumu olduğu belirtilmektedir. Biyokimyasal reaksiyonlar doğal ortamda $CaCO_3$ oluşumuna katkı sağlamaktadır. Genellikle biyokimyasal süreçlerle oluşmuş mineral

çökeltilerin, su veya asitle çözünmelerinin daha zor olduğu belirtilmektedir.(Gonzalez-Munoz ve ark., 2000).

$CaCO_3$'ın, su ve yeraltı sularının temizlenmesinde; boya, kağıt gibi endüstri alanlarında; erozyonun önlenmesi gibi jeoteknoloji alanlarında önemli bir inorganik bileşik olduğu literatürde yer almaktadır (Öner, 2013). Literatürde çoğunlukla zemin iyileştirmesi ve tarihi eserlerin restorasyonu gibi alanlarda biyoçimentolama ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Mikrobiyal çimentolama süreci, yaygın olarak toprak, su ve deniz çökeltilerinde görülen bir oluşumdur (Canaveras ve ark., 2001). Ancak bu yolaklardan $CaCO_3$ oluşumunun en fazla, özellikle toprak içerisinde bulunan ve ortamda salgıladığı üreaz enzimi ile üre hidrolizine sebep olan ürolitik bakteriler tarafından gerçekleştirildiği yer almaktır (Achal ve ark., 2015, Achal ve ark., 2013, Dejong, 2013, De Muynck, 2010). Örneğin, bir toprak bakterisi olan *Bacillus sp.*'nin bazı türleri, üreyi hidroliz ederek $CaCO_3$ kristalleri oluşturmaktadır.

$CaCO_3$ çökelmesinde 4 önemli faktör vardır (De Muynck, 2010):

1) Ca^{2+} iyonlarının konsantrasyonu

2) Çekirdeklenme alanları

3) pH

4) Çözünmüş inorganik karbon konsantrasyonu

Literatürde biyoçimentolama ile ilgili yapılan çalışmalarda yaygın olarak *Nitrosomonas, Lactobacillus* (*Lactobacillus reuteri, L. fermentum*), *Bacillus* (*B. sphaericus, B. pasteurii, B. megaterium vs.), Desulfovibrio desulfuricans, Myxococcus xanthus,* siyanobakterler (*Anabaena cycadae*) gibi bakteriler kullanılmaktadır. Ancak çoğunlukla kullanılan mikroorganizmalar aerobik, Gram-pozitif ve üreaz aktivitesi olan ürolitik bakterilerdir. Yukarıda belirtilen bakteriler içerisinde en fazla *Bacillus* cinsi bakteriler ile literatürdeki çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

Literatürde yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda *B. pasteurii* içeren süspansiyonlar ile muamele edilen çimento harçları 28 günlük süreç tamamlandıktan

sonra, bakteri süspansiyonu ile muamele edilmemiş örneklerle karşılaştırıldığında, mukavemet değerinin yaklaşık % 33 oranında bir artışı gösterdiği belirlenmiştir (Abo-El-Enein ve ark., 2012). De Muynck ve ark. (2010) yaptığı çalışmada, *B. sphaericus* bakterisinin, farklı üre-$CaCl_2$ konsantrasyonları içeren solüsyonlara batırılmış kireç taşı kalıpları üzerinde, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunu gözlemlemiş ve en fazla oluşumun 20 gr/l üre ve 50 gr/l $CaCl_2$ içeren solüsyonda olduğunu belirlemiştir. Ayrıca bu solüsyondaki mikrobiyal üreaz aktivitesinin zamana bağlı değişimini inceleyerek, toplam nitrojen oranının arttığını ve solüsyon içindeki Ca^{2+} iyonlarının azaldığını belirlemiştir.

Dejong ve ark. (2014), çeşitli bölgelerden alınan toprakları, bakteri süspansiyonu ve içerisinde kalsiyum ve üre kaynağı bulunan solüsyon ile muamele etmiştir. Uygulama tamamlandıktan sonra, toprak örneklerinin su geçirgenliklerinde belirgin derecede bir azalma olduğunu belirlemiştir. Mukavemet testleri yapılan diğer çalışmalarda, biyokimyasal $CaCO_3$ oluşumunun sağlandığı toprakların daha dayanıklı olduğu ve ayrıca bakteri konsantrasyonunun artmasının mukavemeti de artırdığı belirlenmiştir (DeJong ve ark., 2014). Ayrıca DeJong ve ark.'nın (2014) yaptığı çalışmalarda, hücreler ve onların hücre dışı polimerik madde birikimiyle oluşan biyofilmlerin, üreaz aktivitesi sonucu oluşturdukları $CaCO_3$ çökeltisi ile toprağın su geçirgenlik oranını düşürdüğü ve bununla birlikte kum partikülleri arasında bağlantı köprülerinin oluşmasını sağlayarak poroziteyi azalttığını gözlemlemiştir.

1.1.1.2. Ağır metallerin çöktürülerek uzaklaştırılması

Son yıllarda endüstri ve sanayide görülen gelişmelerle birlikte bu alanların çevredeki canlı ve cansız ortamlarda oluşturdukları kirlilik artmakta ve bu kirlilik doğal yaşamı olumsuz yönde etkilemektedir. Bu kirliliğin en önemli sebeplerinden birinin fabrikalardan doğal ortama karışan ağır metaller olduğu bilinmektedir. Endüstriyel atıklar ile doğaya salınan cıva (Hg), arsenik (As), kurşun (Pb), bakır (Cu), selenyum (Se), çinko (Zn), kadmiyum (Cd), gibi ağır metaller doğal ortama karışarak insan ve çevre üzerinde alerjenik, mutajenik ve kanserojen etkiler yaratmaktadır. Yukarıda belirtilen ağır metallerin bazıları toprak içerisinde eser miktarda bulunmaktadır. Ancak olması gereken miktarın üstüne çıkıldığında, ortamın kimyasal ve fiziksel dengesini bozmakta ve ortam içerisindeki canlı yaşamın yok olmasına sebebiyet vermektedir. Belirtilen bu problemlerin önüne geçilmesi için, kullanılan rutin yöntemlere alternatif olarak son

yıllarda mikrobiyal mineralizasyon ile çevredeki ağır metallerin uzaklaştırılmasına ilişkin çalışmalar hız kazanmıştır. (Coelho ve ark., 2015, Warren ve ark., 2001, Hammes ve ark., 2003).

Zhan ve Qian (2016), çevre kirliliğine sebep olan Zn^{2+} iyonlarının ortamdan uzaklaştırılmasına ilişkin çalışmasında, çeşitli kosantrasyonlarda $ZnSO_4$ içeren solüsyonlarda Zn^{2+} iyonlarının, *P. Mucilaginosus* adlı bakterinin mikrobiyal aktivitesi sonucu, mikroorganizma yüzeyine tutunmuş CO_3^- iyonları ile çinko karbonat şeklinde çökelerek biriktiğini gözlemlemiştir. Başka bir çalışmada, çimento üretimi sırasında açığa çıkan kireç fırın tozu ve çimento fırın tozu atıklarının yeniden kullanılabilmesi için, *Sporosarcina pasteurii* bakterisini üreaz aktivitesi kullanarak mikrobiyal $CaCO_3$ oluşum mekanizması araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, bu mekanizma ile atıkların geri dönüştürülerek çevre kirliliğinin önüne geçilebileceği bildirilmiştir (Cuzman ve ark. 2015). Nancharaiah ve Lens (2015) yaptığı çalışmada, Se ağır metalinin biyolojik mineralizasyon mekanizması ile atık sulardan uzaklaştırılmasına ilişkin olumlu sonuçlar elde etmiştir.

Diğer bir çalışmada, üreaz aktivitesi gösteren *Myrothecium gramineum* ve *Pestalotiopsis* sp. adlı mantar türleri kullanılarak, atık sulardaki Sr^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının uzaklaştırılması üzerine incelemeler yapılmıştır. Belirtilen mantar türleri farklı konsantrasyonlarda $SrCl_2$ ve $CaCl_2$ içeren üreli solüsyonlar içerisine inoküle edilmiş ve $CaCO_3$ ve $SrCO_3$ kristallerinin oluşum şekilleri ve mineralizasyonu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ortamdan Ca^{2+} ve Sr^{2+} iyonlarının belirgin derecede çöktürülerek ortamdan uzaklaştırıldığı belirlenmiştir (Li ve ark., 2015).

1.1.1.3. Biyolojik onarım

İnşaat mühendisliğinde, yapılarda oluşan çatlaklar, yapının uzun süre zemin üzerinde yıkılmadan durabilmesi için önem arz etmektedir. Yapının inşası sırasında kullanılan beton gibi inşaat malzemelerinde, zamanla sıkışma ve büzülmeler meydana gelmekte ve yapının yüzeyinde bu durumlar sonucunda derin veya derin olmayan çatlaklar oluşmaktadır. Meydana gelen çatlakların onarılması için, tekrardan bir çimentolama işlemine gerek duyulmakta, bu ise yine bir maliyet artışına sebep olmaktadır. Son yıllarda özellikle inşaatlarda çatlakların onarılması için araştırmacıların,

mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile alakalı çalışmalar gerçekleştirdiği literatürde belirtilmektedir.

Kireç suyu tekniği genellikle zemin iyileştirmede porlar arasında $CaCO_3$ oluşumu sağlayarak yüzeysel bir onarım sağlamasının yanında, bu teknikte $CaCO_3$ birikiminin çok az gerçekleştiği literatürde belirtilmektedir (Clifton ve Frohndorff, 1982). Bir mikroorganizma boyutu genellikle zemin içerisindeki por boyutundan daha küçük olduğu için, toprak partikülleri arasında kolayca hareket edebilmektedir Bu bağlamda, kullanılacak mikroorganizmanın $CaCO_3$ oluşumunu gerçekleştirebilmesi halinde porlar arasında hareket ederek $CaCO_3$ birikimine sebep olacağı bilinmektedir (Mitchell ve Santamarina, 2005). Buna bağlı olarak, zemin içerisinde meydana gelen çatlakların mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile onarılabileceği belirtilmektedir (Jyothsna ve ark., 2015).

Literatürde yapılan diğer bir çalışmada, üzerinde yapay çatlaklar oluşturulan beton örnekleri üzerine bakteri süspansiyonu enjekte edilerek zamanla gerçekleşen mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu incelenmiştir. Uygulama tamamlandıktan sonra SEM ve XRD analizleri yapılarak çatlaklardaki belirgin derece kapanma durumları gözlenmiştir (Qıan ve ark., 2015). Khaliq ve Ehsan (2016) yaptıkları çalışmada, *B. subtilis* bakterisini kullanarak, mikrobiyal aktivite sonucunda yine beton örneklerinde basınç dayanımı değerlerinin arttığını gözlemlemiştir. Oluşan $CaCO_3$ kristalleri SEM analizi ile incelenerek mineral formasyonları belirlenmiştir. Belie ve Muynck (2008) yaptıkları çalışmada, *B. sphaericus* bakterisini kullanarak iyileştirme yaptıkları çatlaklarda, ultrases iletimi ölçümlerinde ve su geçirgenlik testlerinde belirgin bir düşüş gözlemlemiştir. Çatlak inceleme mikroskopisi ile çatlaklarda $CaCO_3$ kristalleri ile oluşturulmuş bağlantı köprüleri incelenmiştir. Wang ve ark (2014), *B. sphaericus* sporlarını mikroenkapsüle ederek beton harcı içerisine inoküle etmiş ve çatlak onarımının zamanla mikrobiyal aktivite sonucu gerçekleşen $CaCO_3$ kristalleri ile gerçekleşmesini SEM analiziyle görüntülemiştir. Bununla birlikte su geçirgenlik değerinin de belirgin derecede azaldığını gözlemlemiştir.

1.1.2. Üre hidrolizi ve üreaz aktivitesi

Üre, mikrobiyal aktivite sonuncunda üreaz enzimi ile amonyak (NH_3) ve karbondioksite (CO_2) parçalamaktadır (Hammes ve ark., 2003, Reddy, 2013). Oluşan

CO_2, ortamdaki su ile birleşerek kolay ayrışan karbonik asit (H_2CO_3) oluştururken, NH_3 ise amonyuma (NH_4^+) dönüşmektedir (Achal, 2011). Bu süreçler sonucunda pH artmakta ve buna bağlı olarak ortamdaki Ca^{2+} iyonu, negatif yüklü bakteri hücresi ile birleşmekte ve alkali ortamda ayrışmış bikarbonat iyonları (HCO_3^-) da oluşan yapıyla birleşerek çökelmektedir (Hall-stoodley ve ark., 2004, Patro ve ark.,2015). Süreç içinde alkaliliğin artmasının yanı sıra tuz konsantrasyonu, sıcaklık gibi çevresel faktörler de önem arz etmektedir (Rivadeneyra ve ark., 2004). Whiffin (2004), yaptığı çalışmada üreaz aktivitesinin 25-60°C arasında arttığını, 70°C üzerinde ise aktivitenin hemen azaldığını gözlemlemiştir.

Dhami ve ark.'nın (2012) yaptığı çalışmada, bir toprak bakterisi olan *B. megaterium* türünü kullanmış ve 3 haftalık uygulama sonucunda, ortamdaki üre varlığında belirgin derecede $CaCO_3$ miktarının arttığını gözlemlemiştir. Oluşan $CaCO_3$ kristallerini ise XRD ile analiz ettiği belirtilmektedir. Yine yapılan diğer bir çalışmada mikrobiyal solüsyon ile muamele edilen çimento örneklerinde 20 saatlik inkübasyon sonucunda üre hidrolizi ile $CaCO_3$ kristallerinin morfolojisi arasında yakın bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Paassen, 2009).

1.1.3. Biyoçimentolamanın mukavemet, su geçirgenliği, şişme ve sağlamlaştırma üzerine etkisi

Literatürde, çimentoda basınç ve kayma mukavemetinin $CaCO_3$ birikimi ile arttığı belirtilmektedir. Abdel - Gawwad (2012) yaptığı çalışmada çeşitli konsantrasyonlardaki bakteri hücreleri ile muamele edilen çimento harçlarının 28 günlük iyileştirmesi sonucu örnekler, herhangi bir işleme tabi tutulmayan örneklerle karşılaştırıldığında, yaklaşık % 33 lük bir mukavemet artışı olduğunu göstermiştir. Paassen (2009), çalışmada kum içeren 5 metrelik sütunları bakteri süspansiyonu ile muamele etmiş ve deney sonunda enjeksiyon noktasından yaklaşık 1. metresinde $CaCO_3$ miktarının en fazla olduğunu ve buna bağlı olarak mukavemetin arttığını belirlemiştir. Yine beton ve harçlarla yapılan deneylerde ürolitik bakterilerin üreaz aktivitesi sonucunda oluşan $CaCO_3$'ın, örneklerin sıkışabilirlik gücünü artırdığını ve SEM ile yapılan örnek analizlerinde bakteri hücrelerinin karbonat kristalleri ile birleşmiş halde bulunduğu belirtilmiştir (Achal, 2011). Ayrıca mukavemet testlerinin yapıldığı çalışmalarda mikrobiyal $CaCO_3$ sürecine tabi tutulan toprakların daha

dayanıklı olduğu ve bununla birlikte mikroorganizma sayısı arttıkça mukavemetin de arttığı belirlenmiştir (DeJong ve ark., 2014).

Zemin iyileştirmelerinin önemli hedeflerinden olan kayma mukavemeti, literatürde çoğu çalışmada yer almaktadır. Dejong ve ark. (2006), silisli zeminlerde kayma mukavemetini belirlemek için kayma dalgası hızı testleri yapmış, mikrobiyal süreçle biyoçimentolanmış silisli zeminlerin, işlem görmemiş silisli zeminlere göre %33 daha yüksek bir mukavemete sahip olduğunu gözlemlemiştir.

Bazı araştırmalarda, mikrobiyal çimentolama sonucu $CaCO_3$ çökelmesinin, su iletkenliğini ve poroziteyi azalttığı belirlenmiştir (Chou ve ark., 2010). Achal (2011) yaptığı çalışmada harç örneklerinin yüzeyinde ve porlar arasında mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu sonucu, porozite ve su geçirgenliğinde 33-41 mm'den 9-20 mm'ye kadar bir azalma olduğunu belirtmektedir. Bunun yanında DeJong ve ark.'nın (2014) yaptığı çalışmalarda hücreler ve hücredışı polimerik madde birikiminden oluşan biyofilmlerin, toprak içerisindeki su geçirgenliğini düşürdüğü, aynı zamanda oluşturduğu $CaCO_3$ çökeltisi ile partiküller arasında bağlantı kurarak toprak porozitesini azalttığı gözlenmiştir.

Literatürde, zemin iyileştirmelerinde bazen su geçirgenliğinin çok fazla azalmasının, iyileştirmeden bir süre sonra zemin altındaki suyun süzülememesinden dolayı zeminde baskı yaratarak zeminin zarar görmesine sebep olabildiği belirtilmektedir. Bu nedenle bazı araştırıcılar bunu engellemek için su geçirgenliğini düzenleyici sistemler ortaya koymuşlardır (Whiffin, 2007). Bazı zemin iyileştirmeleri, içerisinde zararlı maddelerin bulunduğu ve su içeriği yüksek endüstriyel atıkların depolanması için özel havuz benzeri çukurların yapılmasına yöneliktir (Uygunoğlu, 2012). Bu bağlamda, zeminde inşa edilecek atık çukurlarının biyoçimentolama işlemi ile gerçekleştirilmesi sonucu zeminin dayanıklılığı artarken, su geçirgenlik direncinin de arttığı belirtilmektedir (Shackelford ve Jefferis, 2000, Edil ve Aydilek, 2001).

Genellikle zemin iyileştirmede yüzeysel teknik olarak kullanılan kireç suyu tekniğinde, porlar arasında $CaCO_3$ birikiminin çok az olduğu literatürde belirtilmiştir (Clifton ve Frohndorff, 1982). Mikroorganizmalar toprak içerisindeki por boyutlarından daha küçük oldukları için, toprak içerisinde kolaylıkla hareket edip, daha fazla $CaCO_3$

birikimine sebep olabilmektedir (Mitchell ve Santamarina, 2005). Buna bağlı olarak zeminde oluşabilecek çatlaklar mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile onarılabilmektedir (Jyothsna ve ark., 2015). Ramachandran ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada betonda bakteri aşılanmış kum karışımı uygulanan 25,4 mm derinlikteki çatlak ile bakteri aşılanmamış 25,4 mm derinlikteki çatlak karşılaştırıldığında mukavemetin yaklaşık %61 oranında arttığı gözlemlemiştir.

Yapılan çalışmalarda mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile zemindeki su içerisinde bulunan ağır metallerin giderildiği (Warren ve ark., 2001) ve atık sulardan Ca^{+2} iyonlarının arındırıldığı belirtilmiştir (Hammes ve ark., 2003). Mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun özellikle heykel taşlarının korunmasında çevreyle dost bir süreç olduğu çoğu literatürde gösterilmektedir (De Muynck, 2010). Sağlamlaştırma işlemlerinde uygulanan organik iyileştirmelerin, yapının yüzeyinde zararlı filmler oluşturduğu ve kullanılan organik çözücüleri çevreye zarar verdiği bulunmuştur (Rodriguez-Navarro ve ark., 2003).

Bu bilgiler ışığında özellikle yetersiz alt yapıya sahip gevşek kumlu ve yumuşak killi (bentonit) toprak içeren bölgelerde, daha sağlam, mukavemeti yüksek ve çevresel faktörlere karşı dayanıklı, doğal özelliklerini koruyabilen zemin oluşturabilme amaçlanmaktadır. Her geçen gün artan nüfus ve buna bağlı olarak özellikle altyapısı uygun olmayan alanların mukavemetinin bu artışa dayanamaması, killi-siltli bölgelerde çeşitli zemin iyileştirme tekniklerinin uygulanmasına ve bu alanların tekrar kullanıma açılmasına sebebiyet vermiştir. Jeomühendislik teknikleri ile yapılan zemin uygulamaları, zemin özelliğine bağlı olarak değişmektedir. Bu bağlamda, zemine uygun yöntemin belirlenmesi, yönteme uygun prosedürün çıkarılması ve uygulamayı yapacak kişinin, koşulları en iyi şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Ancak çoğu jeomühendislik uygulamasında bu şartlar sağlanmadığı için uygulamadan bir süre sonra zeminde kayma, su birikmesi, basınç sonucu dağılma gibi olaylar görülebilmekte, ilaveten yüksek maliyetle uygulanan tekniklerin, tekrar edilmesinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca böyle problemlerle sık karşılaşıldığı için yeni teknikler geliştirilmektir. Yeni tekniklerde de teorik bilgi eksikliğinden dolayı uygulama sonrası zemindeki değişikliğin gözlemlenmesi ve kontrol testlerinin yapılması da zorlaşmaktadır. Belirtilen nedenlerden dolayı henüz akademisyenler ve uygulayıcılar tarafından kabul gören kesin bir uygulama metodu belirlenememiştir. Bu nedenle yeni tekniklerden rutin

uygulamalara alternatif olarak, mikroorganizmalarla gerçekleştirilen uygulama tekniklerine olan ilgi hızla artmaktadır.

Biyoçimetolama olarak adlandırılan teknikte, özellikle toprak içerisinde bulunan bakteriyel ajanlar, çimentolama sürecinde kimyasal yollarla oluşan $CaCO_3$ oluşumunu, biyokimyasal olarak gerçekleştirerek daha hızlı bir süreç oluşturmaktadır. Aynı zamanda bakteriler zemin içerisinde bulunan porlardan boyutları ve şekilleri yardımıyla rahatça geçebilmektedir. Böylelikle, normal çimentolama işleminde belirli yerlerde oluşan $CaCO_3$'ı zeminin neredeyse her bölgesinde oluşturmaktadır. Böylece basınç mukavemeti ve su geçirgenliği bakımından sağlam bir zemin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Uygulanan biyoçimentolama işlemi yardımıyla, yukarıda bahsi geçen zemin uygulamalarında görülen problemler minimuma indirilip, hem ekonomik hem de doğayla dost bir çözüm bulunabileceği düşünülmektedir.

1.2. Bakterilerin Geliştirilmesi ve Çoğaltılması, Bakterilerin Üreaz Aktivite Testleri ve Farklı Sıcaklık pH, Kofaktör ve Besin (Maya Özütü) Kosantrasyonunda Aktivitenin Belirlenmesi

Üreaz, üre hidrolizinde kullanılan ve nitrojen kaynağının eldesinde önemli bir yere sahip amidohidrolaz ve fosfotriesteraz grubundan bir enzimdir. Enzimin aktif bölgesinin kofaktörü çoğunlukla nikel iyonu (Ni^{2+})'dur (Ciurli ve ark., 1999). Bunun yanında Mg ve kobalt (Co) gibi metallere de ihtiyaç duyabilmektedir. Üreaz enzimi, bazı bakteriler, mantar, alg ve bitkilerde bulunmaktadır (Stingl ve Reuse, 2005, Mobley ve Jones, 1989, Olszewsk ve ark., 2004, Berns, 1966, Abe ve Kawashima, 2015) ve çoğunlukla toprak enzimi olarak bilinmektedir. Üre, toprak içerisindeki nitrojen döngüsünün gerçekleşmesi için önemli bir kaynaktır. Toprakta biyolojik olarak üretilen üreaz enzimi aracılığı ile parçalanan üre, toprağın ve canlıların nitrojen ihtiyacını karşılamaktadır. Bu nedenle, üreaz enzimi yaygın olarak tarımda nitrojen kaynağı olarak kullanılacak ürenin parçalanması için önemli yer tutmaktadır (Saggar ve ark., 2013).

Üreaz enzimi, tarımdaki kullanılmasının yanında, tıp alanında insan ve hayvanlarda peptik ülser gibi hastalıkların oluşmasında, ağır metallerin çöktürülmesini sağlayarak çevre korunmasında, biyomineralizasyon süreci ile $CaCO_3$ oluşturulması ile zemin mühendisliğinde kullanımı ile ilgili çalışmalar literatürde yer almaktadır (Matongo ve Nwodo, 2014). Özellikle ürolitik bakteriler tarafından üretilen üreaz enzimi üreyi

hidroliz ederek NH_3 ve CO_2 açığa çıkarmaktadır. NH_3'ün oluşmasına bağlı olarak ortamın pH'ı artmaktadır (Krajewska, 2016, Özdemir ve ark., 2016). Yukarıda bahsedilen alanlarda yapılan çalışmaların artması ile birlikte özellikle mikroorganizmaların üreaz aktivitelerinin belirlenmesi de önemli hale gelmiştir.

Toprak içerisindeki mikrobiyal yaşam, bitki ve hayvan gibi diğer organizmaların hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirmek için gerekli olan elementer kaynakların oluşumunu etkilemektedir. Şöyle ki, nitrojen, karbon (C) gibi hayatsal önem taşıyan maddeler, organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından parçalanması ile oluşmaktadır. Bu nedenle mikrobiyal aktivitenin fazla olması, oluşacak inorganik maddeleri de etkilemektedir. Bu durum araştırmacıları, mikrobiyal enzim aktivitelerinin belirlenmesine yönlendirmiştir. Yukarıda bahsedilen tarım sektörü, çevre kirliliğinin önlenmesi, biyomineralizasyon ile inşaat yapılarında onarım gibi alanlarda üreaz enzimi aracılığı ile mikrobiyal aktivitenin kullanılması, mikrobiyal üreaz aktivitesinin araştırılmasına ışık tutmuştur.

Üreaz aktivitesinin belirlenmesi için birçok yöntemden literatürde bahsedilmektedir. Yöntemlerin prensibi, toprak veya sucul ortamdaki NH_4^+ miktarının belirlemesi esasına dayanmaktadır. Nessler metodu, distilasyon metodu, iyon seçici elektrot metodu ve indofenol metodu gibi birçok yöntem ile NH_4^+ miktarı ve dolayısıyla üreaz aktivitesi belirlenebilmektedir (Kandeler ve Gerber, 1988, Gomez-Taylor, 2001). En çok kullanılan yöntem Nessler Metodudur. Nessler Metodunda, alınan örnekler deneyde kullanılmadan önce çeşitli reaktörler ile hazırlanmaktadır. Örnekteki NH_4^+ ile reaksiyona giren reaktörler belli bir süre bekletildikten sonra 425 nm'de ölçülmektedir (Koroleff, 1966, Jeong ve ark., 2013). Belirtilen tüm aşamalar deneyin sonuçlarını etkilemekte ve hassasiyet azalmaktadır. Çünkü örnekler deney aşamasına kadar havayla temas ettikçe yapısı bozulmaktadır. Örneğin, üre solüsyonu deney aşamasındayken taze olmalıdır. Havayla çok fazla temas ettiğinde, parçalanmaya başlamaktadır. Bu durum ise deney sonucunu olumsuz yönde etkilemektedir. Fakat son yıllarda, Rodrigues metodu, ölçüm için çok fazla deney basamaklarından oluşmayan, hassas ve hızlı sonuçlar veren bir yöntem olarak literatürde belirtilmektedir (Okyay ve Rodrigues, 2013).

Üreaz enzimi protein yapısındadır ve bu nedenle sıcaklık, pH, aktif bölge kofaktörü gibi parametrelerden etkilenmektedir. Sıcaklığın artması üreaz enziminin

yapısını bozarken, üreaz enzimi için Ni^{2+} iyonlarının olup olmaması aktiviteyi etkilemektedir. Bunun yanında bakterilerin bu enzimi üretebilmek için gösterdikleri aktivite ortamdaki besin miktarına göre değişebilmektedir.

1.3. Farklı Üre ve $CaCl_2$ Kosantrasyonlarında Mikrobiyal $CaCO_3$ Oluşumu ve Mikroskobik Olarak İncelenmesi

$CaCO_3$, doğada çoğunlukla kayaçlar ve deniz kabukluları içinde bulunan ve yer kabuğunun %4'ünü oluşturan, kalsiyumlu karbonik asit tuzudur (Chaurasia ve Verma, 2014). Doğada tebeşir, mermer, kireç taşı, traverten ve çeşitli deniz kabuklularının yapılarının içerisinde bulunmaktadır (Sinha ve Rez, 2015). Doğada oluşumu ise kendiliğinde kimyasal veya biyokimyasal yollarla gerçekleşmektedir (Morse ve ark., 2007, Ruiz-Agudo, 2012). Kimyasal olarak kendiliğinden pozitif yüklü Ca^{2+} iyonlarının negatif yüklü HCO_3^- iyonları ile birleşmesiyle oluşmaktadır. Bunun yanında yapay olarak örneğin özellikle endüstriyel alanda $CaCO_3$'ın saf olarak elde edilmesi için mermer içeren taş ocakları kaynak olarak kullanılıp öğütülmüş $CaCO_3$ oluşumu sağlanabilmektedir. Ayrıca kireç taşının ayrıştırılıp kalsiyum hidroksite ($Ca(OH)_2$) dönüşmesi ve yeniden karbonatlaştırma ile $CaCO_3$'ın çöktürülmesi sağlanabilmektedir (EPA, 1974).

Son yıllarda ise yukarıda belirtilen fiziksel ve kimyasal yolların yanında biyokimyasal olarak mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşumu, yaygın olarak toprak, su ve deniz çökeltilerinde görülen bir oluşumdur (Canaveras ve ark., 2001). Literatürde bu oluşumla ilgili olarak yapılan çalışmalar ile farklı yolaklardan bahsedilmektedir (Achal ve ark., 2015, Dhami ve ark., 2013) (**Tablo 1.1**). Bu yolaklardan bazıları aşağıda sıralanmıştır:

- Fotosentetik mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen siyanobakteriyel fotosentez (Rahman ve Halfar, 2014, Mavromatis ve ark., 2012, Vaithiyalingam ve ark., 2014)
- Ürolitik bakteriler tarafından gerçekleştirilen üre hidrolizi (Hall-stoodley ve ark., 2004, Patro Sanjaya ve ark., 2015, Tobler ve ark., 2011, Kim ve ark., 2013, Mahanty ve ark., 2014)
- Sülfat indirgeyen bakteriler tarafından sülfat indirgenmesi (Braissant ve ark., 2007, Baumgartner ve ark., 2006, Almahamedh, 2013)

- Nitrat indirgeyen bakteriler tarafından denitrifikasyon (Del Río ve ark., 2015, Ivanov ve Chu, 2008, Erşan ve ark., 2015)
- Amonifikasyon (Rodriguez-Navarro ve ark., 2003, Jimenez-Lopez ve ark., 2007)

Tablo 1.1. Farklı mikrobiyal yolaklarla gerçekleştirilen $CaCO_3$ oluşum mekanizmaları

Bakteri Grubu	Metabolizma	Bakteri Çeşitleri	Reaksiyon
Siyanobakter ve Alg	Fotosentez	*Nostoc calcicola* *Oscillatoria willei* *Anabaena cycadae*	$2HCO_3^- + Ca^{2+} \rightarrow CH_2O +$ **$CaCO_3$**$+ O_2$
Ürolitik Bakteriler	Üre hidrolizi	*B. pateurii* *B. sphaericus* *B. megaterium*	$CO(NH_2)_2 + 2H_2O + Ca^{2+} +$ Cell $\rightarrow 2NH_4^+ +$ Cell-**$CaCO_3$**
Nitrat İndirgeyen Bakteriler	Denitrifikasyon	*Diaphorobacter nitroreducens* *Nitrosomonas* türleri *Nitrobakter* türleri	$CH_2COO^- + 2{,}6H^+ + 1{,}6NO_3^- \rightarrow 2CO_2 + 0{,}8N_2 + 2{,}8H_2O$ $Ca^{2+} + CO_{2(aq)} + 2OH^- \rightarrow$ **$CaCO_{3(s)}$** $+ H_2O$
Miksobakteriler	Amonifikasyon	*Myxococcus xanthus*	$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$ $Ca^{2+} + HCO_3^- \rightarrow$ **$CaCO_3$**$+ H^+$
Sülfat İndirgeyen Bakteriler	Sülfat İndirgenmesi	*Desulfovibrio desulfuricans* *Desulfobacterium autotrophicum*	$SO_4^{2-} + 2[CH_2O] + OH^- + Ca^{2+} \rightarrow$ **$CaCO_3$** $+ CO_2 + 2H_2O + HS^-$

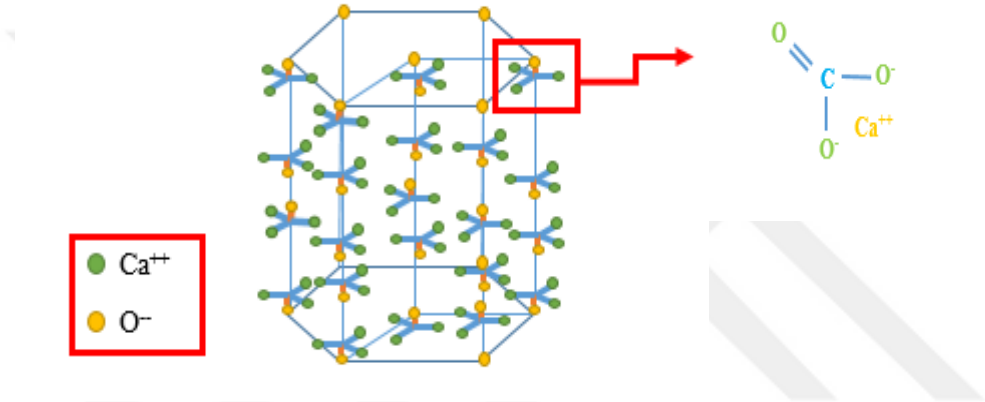
Üre hidrolizi, belirtilen yolaklardan üzerinde en çok çalışma yapılan yolaktır. Ağır metallerin çöktürülmesi (Achal ve ark., 2012), biyolojik onarım (Nugroho ve ark., 2015), çimento esaslı inşaat malzemelerinin sağlamlaştırılması (Muynck ve ark., 2008), zemin iyileştirmeleri (Dejong ve ark., 2006), yapılarda korozyonun önlenmesi (Almahamedh, 2013), tarihi eserlerin restorasyonu (Tiano P. ve ark.; 1999), boya endüstrisi alanlarında çoğunlukla mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu için ürolitik bakterilerin aktivitesi ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Ürolitik bakterilerin çoğunluğunun toprakta yaşaması, spor formlarının olması ve aerobik solunum yapmaları sebebiyle literatürde bu yolakla alakalı araştırmalar yer almaktadır (Belie N. ve ark.; 2014). Üre hidrolizi için literatürde model organizma olarak çoğunlukla *Bacillus* cinsi bakteriler ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Kim ve ark. (2013) çalışmalarında, yukarıda belirtilen *B. sphaericus* ve *Sporosarcina pasteurii* (*B. pasteurii*) model organizmalarını kullanarak, kalsiyum karbonat oluşturma ve dayanıklılık farklılıklarını belirlemiştir. Beton örneklerini bu bakteri süspansiyonları ile muamele etmiş ve ortamdaki kalsiyum karbonat kristallerini XRD analizi ve SEM ile görüntülemiştir.

Bu bakterilerden en çok bilinenleri *B. sphaericus* ve *S. pasteurii*'dir. Ürolitik bakterilerin üreaz aktivitesi göstererek $CaCO_3$ oluşumunu sağlamaları için ortamda üre ve Ca^{2+} iyonu kaynağının olması gerekmektedir. Bu nedenle literatürde yapılan çalışmalarda, üreaz aktivitesini sağlamak için üre ve $CaCl_2$ kullanıldığı belirtilmektedir. Bakteriler ortamdaki üreyi, ürettikleri üreaz enzimi ile parçalayarak NH_3 ve CO_2'e ayrıştırmaktadır. NH_3, pH'ın artmasını sağlarken, CO_2 ise HCO_3^- iyonlarına dönüşmektedir. $CaCl_2$ ise su ile reaksiyona girerek iyonlarına ayrışmakta ve ortama Ca^{2+} iyonu sağlamaktadır. Ca^{2+} iyonu ise kararsız HCO_3^- iyonları ile birleşerek $CaCO_3$ oluşturmaktadır.

1.4. Kum Kolonlarında $CaCO_3$ Oluşturulması ve SEM ile İncelemesi

$CaCO_3$, doğada çoğunlukla kayaçlar ve deniz kabukluları içinde bulunan ve yer kabuğunun %4'ünü oluşturan, kalsiyumlu karbonik asit tuzudur (BCCF). Doğada çeşitli formlarda bulunmaktadır. Normal koşullarda kayaçların içerisinde bulunan formu tetragonal veya heksagonal β-$CaCO_3$ yapısına sahip kalsittir (Ropp, 2012) (**Şekil 1.1)**. $CaCO_3$ amorf yapısından dolayı kolaylıkla diğer formlarına dönüşebilmektedir. Örneğin; sıcaklığın etkisiyle bu form ortorombik λ-$CaCO_3$ yapısındaki aragonit şekline veya μ-

$CaCO_3$ yapısındaki vaterit formuna dönüşebilmektedir (Nan ve ark., 2008, Wang ve Becker, 2009). Bu formlar suyun bağlı olmadığı formlardır. Bunun yanında suyun bağlı olduğu amorf $CaCO_3$, monohidro kalsit ($CaCO_3.H_2O$) ve ikait ($CaCO_3.6H_2O$) formlarının da olduğu literatürde yer almaktadır (Gopi ve ark., 2013). Susuz formların en kararsız şekli vaterit iken, en kararlısı kalsittir. Vaterit daha çok polikristalli karmaşık sferulit yapılardan oluşmaktadır. Aragonit formu ise iğne benzeri yapılar şeklinde meydana gelmektedir. Vaterit en kararsız formu olduğu için, sıcaklık faktörüne bağlı olarak, sıcaklık 30°C'nin altında ise kalsit formuna, 40°C ve üstünde ise aragonit formuna dönüşmektedir (Singh ve ark., 2016).



Şekil 1.1. $CaCO_3$ kimyasal yapısı

Mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunda ise (Rodriguez-Navarro ve ark., 2012) çoğunlukla kalsit ve vaterit formunun oluştuğu literatürde belirtilmektedir. Özellikle *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların üreaz aktiviteleri sonucunda kalsit ve vaterit formunu oluşturduğu belirlenmiştir.

Zeminde bulunan toprak yapısı, kayaçların zamanla aşınması ile oluştuğu için içerisinde $CaCO_3$ kristallerini veya onun iyonlaşmış hallerini barındırabilmektedir. Bunun yanında toprak içerisinde mikroorganizmalar tarafından, N (azot) ve C gibi elementlerin kullanılması ile de biyokimyasal $CaCO_3$ oluşumu gerçekleşebilmektedir. Bu oluşum önceki bölümlerde açıklandığı gibi, çoğunlukla ürolitik bakterilerin üreaz aktivitesi sonucu oluşmaktadır. Özellikle zemin yapısının kumlu ve killi olduğu bölgeler, inşaat mühendisliği alanında problemli bölgeler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, böyle bölgelerde iyileştirme yöntemlerinde $CaCO_3$ oluşumu önemli bir yer tutmaktadır. Zeminin üzerine yapılan inşayı taşıyabilmesi için mukavemetinin, sağlamlığının ve şişme basıncının değişmesinde $CaCO_3$ oluşumu olumlu yönde etkilemektedir.

Mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu, mikroorganizma yoğunluğuna bağlı olarak değişebilmektedir (Rowshanbakht ve ark., 2016). Aynı zamanda mikrobiyal aktivitenin gerçekleşmesi için gerekli olan ürenin miktarı ve $CaCO_3$ oluşumunun gerçekleşmesi için gerekli $CaCl_2$ miktarı önem arz etmektedir. Üre, enzime bağlanacak substrat görevi görürken, $CaCl_2$ ise Ca kaynağı olarak görev almaktadır. Bu nedenle, üreaz enzimi substrat miktarının bitmesine bağlı olarak aktifliğini durdururken, buna bağlı olarak da ortamdaki HCO_3^- iyonları azalacağı için $CaCO_3$ oluşumu azalacaktır. Bunun yanında yine Ca kaynağının az olması, HCO_3^- iyonları ile birleşme oranını da düşüreceği için $CaCO_3$ kristallerinin çökelme miktarı az olacaktır.

1.5. Kum Örneklerinde Konpenetrasyon Testi (CPT) ve Bernard-Scheibler Kalsimetre Metodu ile $CaCO_3$ Miktar Tayini ve Karşılaştırılması

Zeminin mukavemeti zemin üzerine yapılan inşaat yapısının uzun yıllar kalıcı olmasını etkilemektedir. Bu nedenle, zemin iyileştirme yöntemlerini uygulanmadan önce, arazinin mukavemeti hakkında bilgi edinmek gerekmektedir. Arazinin sahip olduğu yapıyı en iyi şekilde belirlemek için, numunelerin deformasyona uğratılmadan alınması ve laboratuvara zarar vermeden taşınabilmesi elde edilecek verileri etkilemektedir. Koni Penetrasyon Deneyi (CPT), arazinin zemin özelliklerinin belirlenmesinde, laboratuvar çalışması gerektirmeyen ve direkt arazide kullanılan deneydir (Gopinath, 2016). Koni penetrasyon deneyi, gevşek, ince daneli, killi zemin yapılarından, kumlu, iri taneli çakıl içeren zeminlere kadar neredeyse tüm zeminlerde, istenilen kesit boyutuna kadar, zemin yapısına zarar vermeden, zeminin özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır. CPT ile zemin tabakalarının geoteknik özellikleri, zemin profilinin tanımlanması ve özellikle üzerine yapılacak inşayı taşıma mukavemetinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. CPT deneyinde, 20 mm/s sabit hızla zemine itilen, konik uç açısı 600 ve kesit alanı 10 cm^2 olan silindir şeklinde bir sonda yardımı ile zeminin özellikleri belirlenmektedir (Elaty ve Ghazy, 2014). Sondanın ilerlemesi sırasında konik uçta oluşan direnç, silindirik gömlekte oluşan sürtünme direnci ve konik ucun farklı kısımlarında penetrasyon sırasında meydana gelen boşluk suyu basınçları bir cihaz yardımı ile ölçülmekte ve elde edilen sayısal değerler ile zeminin özellikleri belirlenebilmektedir. (Sert ve ark., 2013, Janda ve Ooi, 2016). Bu deneyde elde edilen sonuçlar zeminin sertliği ile bağlantılıdır. Bu bağlamda, elde edilen sonuçlar ile zemin içerisinde sertleşmeye sebep olan $CaCO_3$ birikiminin

miktarının da ilişkili olduğu söylenebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, CPT'den sonra $CaCO_3$ miktar tayini yapılmıştır.

Kireç, toprağın ana yapı maddelerindendir. Topraklarda heterojen bir dağılım göstermektedir (Orman Toprak ve Ekoloji Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 2014). Topraktaki kireç miktarı, oluşum koşullarına, ana materyale ve bölgenin iklimine bağlı olarak çok az miktarlardan % ile ifade edilebilecek miktarlara kadar değişmektedir. CPT testinden sonra 14 ve 28 gün sonunda deney ve kontrol gruplarında oluşmuş $CaCO_3$ miktarını belirlemek için Bernard-Scheibler kalsimetre metodu kullanılmıştır ve % kireç miktarı $CaCO_3$ cinsinden ifade edilmektedir. Metod prensip olarak, HCl ile muamele edilen örnek içerisindeki $CaCO_3$, asit ile reaksiyona girerek CO_2 oluşturur. Oluşan CO_2 gazı dereceli büret içerisinde toplanır. Burada oluşan CO_2 gazı, reaksiyona giren $CaCO_3$ ile eşdeğerdir. Böylelikle bürette okunan CO_2 gazı değeri aynı zamanda $CaCO_3$ miktarıdır. Analiz edilecek toprakların iyi öğütülüp karıştırılması gerekir. Çünkü kirecin topraktaki dağılımı heterojen olduğundan iyi öğütülüp karıştırılmazsa yanlış sonuçlar elde edilir. Toprak içerisindeki $CaCO_3$ miktarı aşağıda verilen denklem **1.1** ile hesaplanmaktadır (Gafta, 2003):

$$\% \, CaCO_3 = \frac{V.100}{T \, .2.W} \qquad \textbf{(1.1)}$$

Bu formülde V; örneklerin bürette okunan CO_2 (ml) değerini, T; standart olarak kabul edilen 0,1 g $CaCO_3$'dan oluşan CO_2'in (ml) bürette okunan değerini, W; örnek ağırlığı (g) ifade etmektedir.

1.6. Kolonlarda Konsolidasyon Testi

Zeminlerin ince daneli ve kum yapısında olması, çeşitli karakteristik özelliklerin dikkate alınmasını gerektirmektedir. Kompresebilite ve konsolidasyon karakteristikleri, özellikle arazinin zemin özelliklerinin belirlenmesi ve sağlamlığının artırılması için uygun yöntemlerin bulunması adına büyük önem arz etmektedir. Günümüzde zeminlerdeki çökme ve oturma durumlarının test edilmesi için Terzaghi tarafından geliştirilen ödometre deneyi kullanılmaktadır. Deney temel olarak su ile doymuş, disk biçiminde ve deformasyona uğramamış bir zemin numunesinin alt ve üst yüzeylerinden drenaj sağlanarak, konsolidasyon hızı ve konsolidasyon miktarının eksensel ve düşey basınç altında ölçümüne dayanmaktadır.

Bir zemin yapısındaki kum ve kil derecesi, zeminin konsolidasyon miktarını da etkilemektedir. Çünkü, konsolidasyon gerilme artışına bağlı olarak değişen bir değerdir. Gerilme, mekanikte gerilme, birim alana uygulanan yükün şiddeti olarak tanımlanmaktadır. Gerilme artışı kumlu zeminlerde kısa sürede gerçekleşirken, killi zeminlerde çok uzun sürede gerçekleşmektedir. Gerilme artışı ile birlikte, numunedeki hacim de değişmektedir. Bunun en önemli sebebi, taneler arasında boşluk suyunun gerilme ile birlikte dışarı taşması ve böylece hacimde gerçekleşen azalmadır. Bu nedenle Terzaghi tarafından bulunan ödometre deneyi zeminlerin konsolidasyon değerlerini belirlemek için kullanılmaktadır. Deneyde zeminden alınan numune, yatay genişlemeyi engellemek için çelik bir halka içerisine yerleştirilir ve numunenin alt ve üst yüzeylerine porö taşlar konur. Daha sonra numune üzerine uygulanan sabit yük sonucu meydana gelen deformasyonlar zamana bağlı olarak ölçülür. Yararlanılan çeşitli parametreler vardır. Konsolidasyon deneyinde yer alan parametreler önemli bir yere sahiptir. Burada C_c; e - logσ eğrisinde, verimsiz sıkışma bölgesinin doğrusal kısmının eğimini, C_r; e - logσ eğrisinde, boşaltma (veya yeniden yükleme) bölgesinin doğrusal kısmının eğimini, σ_c; zeminin jeolojik geçmişte almış olduğu en büyük gerilmeyi ve C_c ise konsolidasyon katsayısını ifade etmektedir. Buradan elde edilen sonuçlara göre, zeminindeki oturma yüzdelerini en aza indirmek için çeşitli inşaat mühendisliği uygulamaları yapılmaktadır. Fakat bu teknikler yüksek maliyetli oldukları ve çok etkili olmadıkları için, zamanla zeminde oturmalar meydana gelmektedir. Bunun önüne geçebilmek için, iyileştirme tekniklerine gerek kalmadan, zeminin konsolidasyonunu artırma işleminde başlangıçta uygulanabilecek bir metod geliştirme gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Özellikle son yıllarda mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile ilgili çalışmaların artması, araştırmacıları bu oluşumun konsolidasyon üzerine etkisini incelemeye yönlendirmiştir. Toprak yapısındaki $CaCO_3$ miktarının artmasının, zeminin su geçirgenlik özelliğini azalttığı, toprak partiküllerinin birbirine tutmasını sağlayarak sıkışmayı artırdığı ve oturma riskini azalttığı bilinmektedir. Bu bağlamda, belirtilen parametreler konsolidasyon testlerinde incelendiği için, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun konsolidasyon üzerine olumlu yönde bir etkisi olabileceği öngörülmektedir.

1.7. Free Swell Testi

Her bölgenin kendine özgü bir zemin toprağı ve bu toprağında sahip olduğu fiziksel ve kimyasal yapısı vardır. Örneğin fiziksel bakımdan toprağın tanecik çapları önem arz etmektedir. Bu nedenle temel olarak toprakta tane boyutu kum, toz ve kil olmak üzere 3 farklı yapı bulunmaktadır (Çepel, 1988). Toprak yapısında bulunan kum iri taneli olduğu için, çok fazla su ya da mineralleri tutabilecek kapasiteye sahip değildir. Kil yapısı ise çok ince yapıya sahip olduğu için yüzeylerinde negatif yüklü iyonları barındırmaları ile çekim gücü yüksek özellik taşımaktadır (Velde ve Meunier, 2008) .

Zemindeki kil yapısı özellikle suyu tutabilme özelliğine göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, kaolin su ile çok az afinitesi olan bir kil türü iken, bentonit su ile bağlanmasından dolayı yüksek derecede şişme özelliğine sahiptir (Sridharan ve Gürtuğ, 2004). Bu nedenle araştırmacıların üzerinde çalışma yaptığı alanlar arasında yer almaktadır. Bentonit oranı yüksek olan bölgeler, çok fazla şişebilme özelliklerinden dolayı inşaat mühendisliğinde problemli bölgeler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, problemli bölgelerin iyileştirilmesi için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu bağlamda, araştırmacılar tarafından zemin üzerine yapıyı inşa etmeden önce, zemin şişme özelliğini belirten bir formül geliştirilmiştir (Prakash ve Shridharan, 2004). Formül **1.2**'de gösterilmektedir.

$$\text{Serbest Şişme İndeksi } \% = \frac{Vd - Vk}{Vk} \, x \, 100 \qquad \textbf{(1.2)}$$

Bu formülde su ile muamele edilen toprak örneğinin şişme derecesi (V_d) ile şişmeye bir etkisi olmayan kimyasal ile muamele edilen aynı toprak örneği (V_k) karşılaştırılmaktadır.

Bu formülden yola çıkılarak toprak içerisinde bulunan kil türlerinin şişme dereceleri hesaplanmıştır. Sonuçlara göre, en yüksek şişme özelliğine sahip kil olarak bentonit iken, en düşük şişme derecesine sahip kil türü ise kaolindir (Tripathy ve ark. 2004, Tewatia ve ark, 2007, Spagnoli ve ark., 2012).

Yapı inşa edildikten belli bir süre sonra, zeminde kile bağlı meydana gelen şişme, yapının zarar görmesine hatta yıkılmasına sebep olabilmektedir. Bu problemin önüne geçebilmek için çeşitli inşaat mühendisliği teknikleri kullanılmasına rağmen çok fazla etkili olamamaktadır. Bu nedenle, son yıllarda mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile ilgili

çalışmalar göz önüne alındığında, eğer bentonit içerikli zemin yapısı, $CaCO_3$ ile birbirine bağlanırsa, su ile bağlantılarının azalacağı öngörülmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında yapılacak olan bu tez çalışması ile biyolojik ve kimyasal çimentolama sürecinde önemli bir yer tutan $CaCO_3$ oluşumunu hızlandıran ve çevreye zarar vermeyen bakteriyel ajanların etkinliğinin ve buna bağlı olarak kullanılan metotların uygulanabilirliğinin araştırılması ve belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu tez çalışmasında belirlenen diğer hedefler aşağıda belirtildiği gibidir:

- Zemin iyileştirmelerinde doğayla dost ve çevreye herhangi bir zarar oluşturmayan yöntemler geliştirmek,

- Uygulanan iyileştirme tekniklerinde yüksek maliyetle sonuçlanan yöntemler yerine daha düşük maliyetli yöntemler araştırmak,

- Zemin iyileştirmelerinde sağlamlık, dayanıklılık ve maliyet açısından günümüzde özellikle yurtdışında araştırılmaya başlanmış biyolojik çimentolama uygulamalarını araştırmak,

- Zemin iyileştirmelerinde kullanılan tekniklere alternatif olarak toprak içerisindeki bakteriyel ajanlarla doğal bir çözüm üretmek için çalışmak,

- Biyolojik çimentolama işleminde kullanılan çeşitli prosedürleri uygulayarak birbirleri arasında karşılaştırma yapıp, en etkin yöntemi belirlemek,

- Biyolojik çimentolama işleminde bakteriyel aktivite sonucu oluşan $CaCO_3$ ile kimyasal olaylar sonucu oluşan $CaCO_3$ kristallerini morfolojik ve dayanma gücü gibi özellikleri bakımından karşılaştırmak,

- Özellikle ülkemizde bu alanda yapılan çalışmaların azlığından dolayı hem yurtiçi hem de yurtdışı için belirtilen uygulama ile ilgili literatüre ülkemiz adına katkıda bulunmak, hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda;

'Bakterilerin geliştirilmesi ve çoğaltılması, bakterilerin üreaz aktivite testleri ve farklı sıcaklık pH ve besin (maya özütü) kosantrasyonunda aktivitenin belirlenmesi' başlıklı bölümde, *Bacillus*'un bazı türlerinin üreaz aktivitelerini belirlemek ve sıcaklık, pH, aktif bölge kofaktörü ve besin konsantrasyonu gibi parametreler etkisini incelemek için hızlı, hassas ve düşük maliyetle sonuçlanan Rodrigues metodu kullanılması hedeflenmiştir.

‘Farklı üre ve $CaCl_2$ kosantrasyonlarında mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ve mikroskobik olarak incelenmesi’ başlıklı bölümde, bir önceki çalışmada, araştırılan türler içerisinde en iyi üreaz aktivitesi gösteren bakteri olarak *B. sphaericus* CECT 5905 türü olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, bu çalışmada, *B. sphaericus* CECT 5905 türü kullanılarak, dört farklı konsantrasyonda üre-$CaCl_2$ içeren sıvı ortamda, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu sağlanması ve stereo mikroskop ve optik mikroskopta kristal oluşumları incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca üre-$CaCl_2$’nin farklı konsantrasyonlarının $CaCO_3$ oluşumu üzerine etkisi belirlenecektir.

‘Kum kolonlarında $CaCO_3$ oluşturulması ve SEM ile incelemesi’ başlıklı bölümde, problemli bir bölge olarak kabul edilen yapay kumlu zemin numuneleri hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler bir önceki bölümlerde elde edilen sonuçlara göre, 3 farklı üre-$CaCl_2$ konsantrasyonunda (0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$, 0,5 M üre-0,5 M $CaCl_2$, 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$), 3 farklı bakteri konsantrasyonunda (30 ml, 45 ml ve 60 ml bakteri süspansiyonu) ve 3 farklı iyileştirme gününde (2,4 ve 6 gün) *B. sphaericus* CECT 5905 türünün üreaz aktivitesi ile $CaCO_3$ oluşumu sağlanması ve bu parametrelere bağlı olarak $CaCO_3$ formlarında değişim olup olmadığı SEM analizi ile gözlemlenmesi hedeflenmiştir.

‘Kum örneklerinde konpenetrasyon testi (CPT) ve Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile $CaCO_3$ miktar tayini ve karşılaştırılması’ başlıklı bölümde, mikrobiyal iyileştirme uygulaması yapılmış örneklerin, modifiye edilmiş konpenetrasyon testi ile mukavemeti belirlenenecektir. Ayrıca 3 farklı iyileştirme günü, 3 farklı üre-$CaCl_2$ konsantrasyonu ve 3 farklı bakteri konsantrasyonunun, bu mukavemete etkisi incelenecektir. Modifiye edilmiş konpenetrasyon testi yapıldıktan sonra, numuneler içerisindeki $CaCO_3$ miktarı Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile tayin edilecektir.

‘Kolonlarda konsolidasyon testi’ başlıklı bölümde, bir önceki çalışmada mukavemet ve $CaCO_3$ birikim oranı belirlenen kum örneklerinin, konsolidasyon testleri yapılacak ve sertleşme durumu belirlenecektir. Elde edilen veriler karşılaştırılarak, en iyi sonucun elde edildiği grup ve bu gruba uygulanan prosedür belirlenecektir.

‘Free swell testi’ başlıklı bölümde, problemli bölge olarak kabul edilen kumlu ve killi bölgeler taklit edilerek, yapay zemin örnekleri oluşturulacak ve bu örnekler oluşturulurken 5 farklı konsantrasyondaki kum ve kil oranları kullanılacaktır. Örneklere,

önceki bölümlerde belirlenen $CaCO_3$ oluşturma ortamı kullanılarak, bakteriyel iyileştirmeye tabi tutulduktan sonra, free swell testi uygulanacak ve şişme dereceleri belirlenecektir. Elde edilen sonuçlar ile farklı konsantrasyonlarda bentonit içeren örnekler üzerinde, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun etkisi incelenecektir.

BÖLÜM 2

2. MATERYAL

2.1. Bakteri Suşları

1. *B. sphaericus* CECT 5905
2. *Bacillus sp.* CECT 4511
3. *B. sphaericus* CECT 4512
4. *B. megaterium* CECT 4096
5. *B. megaterium* CECT 370
6. *B. megaterium* CECT 4477
7. *B. thuringiensis* CECT 4497
8. *B. thuringiensis* CECT 4454
9. *B. huringiensis* CECT 4495
10. *B. thuringiensis* CECT 197
11. *B. cereus* CECT 193
12. *B. subtilis* CECT 498
13. *B. atrophaeus* CECT 38
14. *Lysinibacillus sphaericus* CECT 33
15. *B. pumilus* CECT 152
16. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
17. *Escherichia coli* ATCC 25922
18. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

1. LB (Luria – Bertani) Broth Besiyeri (Sigma-Almanya)
2. NH_4Cl (Amonyum Klorür, SRL)
3. $CaCl_2.2H_2O$ (Kalsiyum Klorür dihidrat, Merck)
4. Maya Özütü (Merck)
5. PBS (Fosfat Tamponu)
6. KH_2PO_4 (Potasyum Dihidrojen Fosfat, Merck)
7. K_2HPO_4 (Dipotasyum Hidrojen Fosfat, Merck)
8. Na_2HPO_4 (Disodyum hidrojen Fosfat, Merck)
9. NaCl (Sodyum Klorür, Riedel De Haen)

10. KCl (Potasyum Klorür, Merck)

11. Fenol Kırmızısı (Merck)

12. Üre (Merck)

13. HCl (Hidrojen klorür, Merck)

14. Jack Bean Tip III Üreaz Enzimi (Sigma-Aldrich)

15. $Ni(C_5H_7O_2)_2$ (Nikel asetilasetonat, Merck)

16. Distile Su

17. 0,45 µm Membran Filtre (Sartorius)

18. Santrifüj Tüpü (Eppendorf)

19. 96 Kuyucuklu Mikroplaka (TPP)

20. Cam Deney Tüpleri

21. Platin Öze

22. Portüp

23. 100, 250, 500 ve 1000 Mililitrelik Laboratuvar Şişesi

24. Spatül

25. Eküvyon

26. Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen-ABD)

27. Quartz Spektrofotometre Küveti (1400 µl) (Hellma-Almanya)

28. Lam

29. Lamel

30. 6 Kuyucuklu Mikroplaka (TPP)

31. Destek ve Kelepçe

32. Şırınga (60 ml)

33. Deniz Kumu (≤ 0,850 dane çapı)

34. Plastik Kap

35. H_2SO_4 (Merck)

36. Pens

37. Cam Petri

38. Konsolidasyon Ringi

39. Delikli Karton

40. Mezür (100 ml)

41. Beher

42. Cam Baget

43. Cam Pipet (10 ml-25 ml)

44. Puar

45. Delikli Akrilik Plaka

2.3. Kullanılan Cihazlar

1. **Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Cytation 3-Biotek-ABD):** Bakterilerin büyüme eğrileri ve üreaz aktivite oranlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.
2. **Microsantrifüj (Beckman-Coulter-ABD):** Bakteri süspansiyonunda, bakteri pelletinin eldesi ve bakterinin atık maddelerden arındırılması için kullanılmıştır.
3. **Ultra Derin Dondurucu (Esco-Singapur):** Suşların -86ºC'de uzun süreli saklanmasında kullanılmıştır.
4. **UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD):** Sıvı bakteri kültürlerinin optik yoğunluklarının ölçümünde kullanılmıştır.
5. **Dijital Hassas Terazi (Ohaus-ABD):** Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
6. **İnkübatör (Memmert-Almanya):** Besiyerlerine ekilen suşların inkübasyonu için kullanılmıştır.
7. **Vorteks (Heidolph-Almanya):** Sıvı bakteri kültürlerinin ve kimyasalların çalkalanmasında kullanılmıştır.
8. **Otoklav (Nüve-Türkiye):** Besiyeri hazırlama ve tüm sterilizasyon işlemleri sırasında kullanılmıştır.
9. **Mikropipetler (1000µl, 100µl, 10µl) (Thermo/ Finnpipette-ABD):** Besiyerleri, sıvı bakteri kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.
10. **Mikrodalga Fırın (Phillips-ABD):** Besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
11. **Class II Ayaklı Steril Güvenlik Kabini (Esco ve Faster-Singapur ve İtalya):** *In vitro* süreçte yapılan bütün deneylerin gerçekleştirilmesi ve kimyasalların hazırlanması için kullanılmıştır.

12. **pH Metre (Thermo Orion):** Hazırlanan solüsyonların pH değerlerini ölçmek amacıyla kullanılmıştır.
13. **Brookfield CT3 Texture Analyzer:** CPT testinin yapılması için kullanılmıştır.
14. **Bernard - Scheibler kalsimetre düzeneği:** $CaCO_3$ miktarını tayin etmek için kullanılmıştır.
15. **Çeker Ocak:** Asit solüsyonu hazırlarken zararlı gazların ortama yayılmasını önlemek amacıyla kullanılmıştır.
16. **Konsolidasyon Cihazı:** Kum örneklerindeki konsolidasyon değerlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

2.4. Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

2.4.1. Çoğaltma ve gelişim ortamının hazırlanması

Bu çalışmada CECT ve ATCC'den satın alınan bakterilerin üreaz aktivitelerini belirlemek amacıyla çoğaltma ve geliştirme işlemi uygulanmıştır. Çoğaltma ortamı olarak LB Broth kullanılmıştır. Gelişim ortamı olarak 10 g/l NH_4Cl ve 20 g/l maya özütü içeren bir besiyeri (pH: 6,8) hazırlanmıştır (**Tablo 2.1**).

Tablo 2.1: Mikroorganizmaların çoğaltılıp geliştirilmesi için gerekli olan malzemeler ve miktarları

ÇOĞALTMA ORTAMI		**GELİŞİM ORTAMI**	
Madde	**Miktar**	**Madde**	**Miktar**
LB Broth	25 g	**NH_4Cl**	10 g
Distile Su	1000 ml	**Maya Özütü**	20 g
		Distile Su	1000 ml

Mikroorganizmaların çoğaltılma ve geliştirme basamakları aşağıda sıralanmıştır:

- Genel besiyeri olan LB (Luria-Bertani) Broth içerisinde 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.

- Elde edilen bakteri kültürlerinden 1'er ml alınarak 1,5 ml'lik santrifüj tüplerinin içerisine konulmuş ve 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

- Santrifüjleme sonucu süpernatantlar atılmış ve bakteri pelletleri 3 kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS; pH:7,4) (**Tablo 2.2**) ile yıkanmıştır.

- Elde edilen yıkanmış kültürlerin 1 ml'si, 10 ml gelişim ortamı içeren tüplere eklenmiştir.

- 1 gece boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir.

-Bakteri kültürleri üreaz aktivite testlerinde kullanılmak üzere +4°C buzdolabında saklanmıştır.

2.4.2. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)

Tablo 2.2'de belirtilen maddelerden gerekli miktarlarda alınarak 800 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra pH:7,4 oluncaya kadar HCl eklenmiştir. İstenilen pH değerine ulaşıldığında çözelti 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 121°C'de 15 dakika boyunca otoklav ile steril edilmiştir.

Tablo2.2: Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PBS) içeriği

Madde	Miktar (g/l)
NaCl	8
KCl	0,2
Na_2HPO_4	1,44
KH_2PO_4	0,24

2.4.3. Üre Broth hazırlanması

Üre Broth yaygın olarak üreaz pozitif ve üreaz negatif olan bakterileri ayırmak amacı ile kullanılmaktadır. Bu çalışmada Sigma-Urea Broth prosedürüne göre ortam hazırlanmıştır. Ortamın içeriği **Tablo 2.3**'te verilmektedir.

Tablo 2.3'te belirtilen K_2HPO_4, KH_2PO_4, fenol kırmızısı ve maya özütü gerekli miktarlarda tartılıp 0,9 litre distile su içerisinde çözülmüş ve 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır. %20'lik üre çözeltisi 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiş ve otoklavlanmış solüsyonun içerisine, solüsyon sıcaklığı 40°C'nin altına düştüğünde eklenmiştir. pH 6,8 olarak ayarlanmıştır.

Tablo 2.3: Üre Broth'un madde içeriği ve miktarları (Sigma-Aldirch)

Madde	Miktar (g/l)
Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4)	9,5
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	9,1
Fenol Kırmızısı	0,01
Maya özütü	0,1
Üre	20

2.4.4. Nikel tuzu (Nikel Asetilasetonat) stok I, stok II ve test çözeltisi hazırlanması

*Stok I için;

- 48 mg nikel asetilasetonat 10 ml steril distile su içerisinde iyice çözdürülmüştür. Daha sonra 0,45 µm membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Bu çözeltinin konsantrasyonu 4,8 mg/ml dir.

*Stok II için;

-Hazırlanan Stok I çözeltisinden 100 µl alınıp 1 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin konsantrasyonu 0,048 mg/ml dir.

* Nikel tuzu test çözeltisi için;

-Hazırlanan Stok II çözeltisinden 10 µl alınıp 1 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin konsantrasyonu 0,48 µg/ml dir.

2.4.5. Plakada $CaCO_3$ oluşturma için solüsyonların hazırlanması

2.4.5.1. 500 ml 1 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi

-200 ml steril distile su içerisinde 30 g üre çözülmüş ve 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiştir.

-200 ml steril distile su içerisinde 73,5 g $CaCl_2$ çözülmüş ve 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiştir.

-100 ml steril distile su içerisine bu çözeltiler eklenerek 500 ml'ye tamamlanmıştır.

2.4.5.2. 200 ml 1 M $CaCl_2$ çözeltisi

-200 ml steril distile su içerisinde 29,4 g $CaCl_2$ çözülmüş ve 0,45 µm filtre ile steril edilmiştir.

2.4.6. Kum örneklerinde bakteri için gelişim ortamının hazırlanması

10 g NH_4Cl ve 25 g LB Broth 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir.

2.4.7. Çimentolama ve fiksatif solüsyonlarının hazırlanması

2.4.7.1. 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimentolama solüsyonunun hazırlanması

55 g $CaCl_2.2H_2O$ 800 ml distile su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. 200 ml distile su içerisinde 30 g üre çözülmüş ve 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiştir. $CaCl_2$ solüsyonunun sıcaklığı 40°C'nin altına düştüğünde, steril 200 ml üre çözeltisi bu solüsyonun içerisine yavaşça eklenmiş ve

karıştırılmıştır. Hazırlanan üre-$CaCl_2$ solüsyonu deneyde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

2.4.7.2. 0,5 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimentolama solüsyonunun hazırlanması

75 g $CaCl_2.2H_2O$ 800 ml distile su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. 200 ml distile su içerisinde 30 g üre çözülmüş ve 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiştir. $CaCl_2$ solüsyonunun sıcaklığı 40°C'nin altına düştüğünde, steril 200 ml üre çözeltisi bu solüsyonun içerisine yavaşça eklenmiş ve karıştırılmıştır. Hazırlanan üre-$CaCl_2$ solüsyonu deneyde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

2.4.7.3. 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimentolama solüsyonunun hazırlanması

75 g $CaCl_2.2H_2O$ 800 ml distile su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. 200 ml distile su içerisinde 20 g üre çözülmüş ve 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiştir. $CaCl_2$ solüsyonunun sıcaklığı 40°C'nin altına düştüğünde, steril 200 ml üre çözeltisi bu solüsyonun içerisine yavaşça eklenmiş ve karıştırılmıştır. Hazırlanan üre-$CaCl_2$ solüsyonu deneyde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

2.4.7.4. 0,05 M $CaCl_2$ içeren fiksatif solüsyonunun hazırlanması

7,5 g $CaCl_2.2H_2O$ 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Hazırlanan $CaCl_2$ solüsyonu deneyde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

2.4.8. Renklendirilmiş 0,1 N H_2SO_4 hazırlanması

%96 saflıktaki H_2SO_4 çözeltisinden 2,78 ml alınmıştır. 500 ml distile suyun üzerine dikkatli ve yavaş bir şekilde eklenmiştir. Ekleme yapılırken çözeltinin ısısı sürekli kontrol edilmiştir. Daha sonra çözelti 497,22 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan asit çözeltisi üzerine, pH indikatörü olan metil oranj solüsyonu eklenmiştir.

Metil oranj, asidik ortamlarda kırmızı renk oluştururken, bazik ortamlarda sarı renk oluşturmaktadır. Asit çözeltisi, deney sırasında değerlerin kolay ve net bir şekilde okunması için metil oranj ile renklendirilmiştir.

2.4.9. 6 N HCl hazırlanması

539,08 ml %36 saflıktaki HCl, 460,92 ml distile su içerisine yavaş ve dikkatli bir şekilde eklenmiştir. Deneyde kullanılmak üzere karanlık bir ortamda saklanmıştır.

2.4.10. Free swell testinde bakteri gelişme ortamının hazırlanması

10 g maya özütü, 5 g LB Broth ve 10 g NH_4Cl 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir.

2.4.11. Free swell testinde çimento solüsyonunun hazırlanması

30 g/l üre, 75 g/l $CaCl_2$ ve 10 g/l LB Broth içeren solüsyon hazırlanmıştır. Bunun için, 75 g $CaCl_2$ ve 10 g LB Broth 900 ml distile su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Solüsyon sıcaklığı 40°C'nin altına düştüğünde, 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiş 100 ml %30'luk üre çözeltisi, solüsyon üzerine eklenmiştir.

BÖLÜM 3

3. YÖNTEM

3.1. Bakterilerin Geliştirilmesi ve Çoğaltılması, Bakterilerin Üreaz Aktivite Testleri ve Farklı Sıcaklık Ph ve Besin (Maya Özütü) Kosantrasyonunda Aktivitenin Belirlenmesine Yönelik Kullanılan Yöntemler

3.1.1 Üreaz enzimi için standart eğrinin çizilmesi

Bakterilerin üreaz aktivitelerini test etmeden önce üreaz enzimi (Type III from Jack Bean, Sigma-Aldrich) ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu deneyde 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 µl üre broth ve 20 µl %100-90-80-70-60-50-40-30-20-10-0 konsantrasyonlarındaki üreaz enzimi eklenmiştir. Üre broth ortamındaki sarıdan pembeye oluşan renk değişimini belirli bir dalga boyunda gözlemleyebilmek için plaka, öncelikle UV-görünür spektrum taraması ile okunmuştur. Tarama sonucu 430 nm ve 560 nm'de pikler gözlenmiştir. Tarama sonrası plaka bir saat boyunca 430 ve 560 nm'de Cytation 3 cihazı ile okunmuştur.

3.1.2. Mikroorganizmalar ile üreaz aktivite testi

Bir gece inkübasyona bırakılmış kültürler deneyde kullanılmadan önce 10000 rpm de 5 dakika santrifüjlenmiş ve pelletler Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PBS; pH:7,4) ile yıkanmıştır. Bu çalışmada 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 µl üre broth ve $OD_{625\ nm}$:0,58 (3 McFarland) olarak ayarlanmış bakteri kültürlerinden 20 µl olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubu olarak bakteri inoküle edilmemiş ortam kullanılmıştır. Kör olarak üre broth içeriği ile aynı olan fakat üre içermeyen ortam kullanılmıştır. Plaka, 30°C'de 24 saat boyunca 30 dakikada bir 430, 560 ve 625 nm'de Cytation 3 cihazı ile okunmuştur. Deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.1.3. Farklı stres koşullarında mikroorganizmalar ile üreaz aktivite testi

3.1.3.1. Sıcaklık stresi

2.2.4 te uygulanan prosedür kullanılmıştır. Fakat burada sıcaklık değişimi olarak maksimum 45°C ve minimum 25°C seçilmiştir. Plakalar aynı prosedürde hazırlanarak seçilen 2 farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Plaka 30°C'de 24 saat boyunca 15 dakikada bir 430, 560 ve 625 nm'de Cytation 3 cihazı ile okunmuştur. Deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.1.3.2. pH stresi

2.2.4 te uygulanan prosedür kullanılmıştır. Fakat burada üre broth'un pH'ı maksimum 7,5 ve minimum 5,5 olarak seçilmiştir. Plakalar aynı prosedürde hazırlanarak 30°C'de inkübe edilmiştir.

3.1.3.3. Besin (maya özütü) stresi

Bu çalışmada üre broth içerisindeki maya özütü miktarı farklı konsantrasyonlarda değiştirilmiştir. Ortam içerisine 5 g/l, 2,5 g/l, 0,5 g/l, 0,1 g/l, 0,075 g/l ve 0,05 g/l olacak şekilde maya özütü eklenmiştir. 24 kuyucuklu plaka içerisine 2 ml üre broth ve 200 µl $OD_{625\ nm}$:0,58 (3 McFarland) bakteri kültürlerinden konulmuş ve 150 rpm'de 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Örnekler UV spektrofotometre ile 430 ve 560 nm'de, 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde ölçülmüştür.

3.1.3.4. Nikel iyon stresi

Ürolitik bakteriler tarafından oluşturulan üreaz enziminin kofaktörü Nikel iyonudur. Bu nedenle deneyde, üreaz aktivitesi göstermeyen ve az gösteren 11 farklı bakteri türü kullanılarak nikel iyonu içeren Nikel asetilasetonat tuzunun farklı konsantrasyonlarının aktiviteye etkisi incelenmiştir. İncelenen bakteriler ve nikel konsantrasyonları **Tablo 3.1**'de verilmektedir. Çalışmada 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Kuyucuklar içerisine 10 µl bakteri süspansiyonu ve test nikel çözeltisinden (0,48 µg/ml) 50, 40, 30, 25, 20, 10, 5 ve 0 µl olacak şekilde eklenmiştir. Toplam hacim 220 µl olacak şekilde üre broth ile tamamlanmıştır. Deneyde pozitif kontrol olarak üreaz aktivitesi yüksek olduğu için *B. sphaericus* CECT 5905 ve negatif kontrol olarak ise *S. aureus* ATCC 25923 ve bakteri inoküle edilmemiş üre broth kullanılmıştır. Kör olarak üre broth içeriği ile aynı olan fakat üre içermeyen ortam kullanılmıştır. Plaka 30°C'de 24 saat boyunca 30 dakikada bir 430, 560 ve 625 nm'de Biotek Cytation 3 cihazı ile okunmuştur.

Tablo 3.1. Nikel iyonunun üreaz aktivitesindeki etkisini incelemek için kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma isimleri
Bacillus sphaericus CECT 4511
B. sphaericus CECT 4512
Lysinibacillus sphaericus CECT 33
B. thuringiensis CECT 4454
B. atrophaeus CECT 38
B. sphaericus CECT 5905
B. megaterium CECT 4096
B. megaterium CECT 4477
B. megaterium CECT 370
B. thuringiensis CECT 4497
S. aureus ATCC 25923

3.2. Farklı Üre ve $CaCl_2$ Kosantrasyonlarında Mikrobiyal $CaCO_3$ Oluşumu ve Mikroskobik Olarak İncelenmesine Yönelik Kullanılan Yöntemler

Önceki çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde, en iyi üreaz aktivitesi gösteren bakteri olarak *B. sphaericus* CECT 5905 belirlenmiştir. Bu ve bundan sonraki tüm çalışmalar bu bakteri türü ile gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde, *B. sphaericus* CECT 5905 türü kullanılarak, onun üreaz aktivitesi ile $CaCO_3$ oluşumu, kristal şekilleri ve mikroskobik inceleme işlemleri yapılmıştır.

Bu çalışmada 4 farklı konsantrasyondaki üre-$CaCl_2$ çözeltisinin (1 M, 0,75 M, 0,5 M, 0,25 M) üreaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca her bir üre-$CaCl_2$ çözeltisi için 1 deney grubu (A1, A2, A3) ve 3 kontrol grubu (B1, C1, D1) olmak üzere toplam 4 farklı grup oluşturulmuştur. Deney gruplarının 3 tekrarı yapılmıştır. Gruplarda yer alan solüsyonlar ise şöyledir:

- *Deney grubu (A1, A2, A3);* Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, bakteri, LB Broth

- *Kontrol B1;* Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, LB Broth

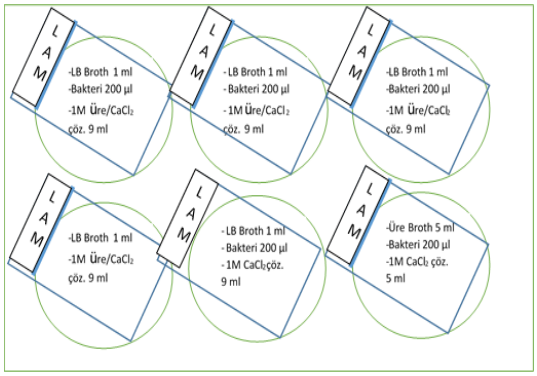
- *Kontrol C1;* $CaCl_2$ çözeltisi, LB Broth, bakteri

- *Kontrol D1;* $CaCl_2$ çözeltisi, Üre Broth, bakteri

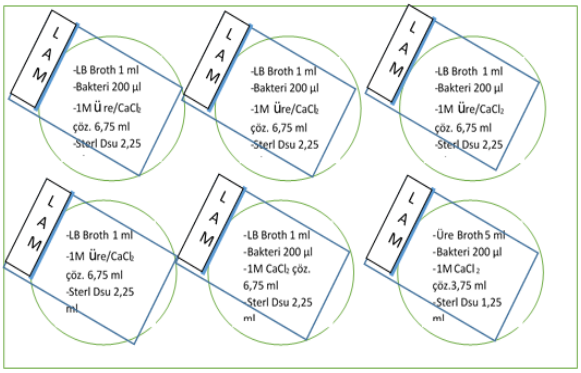
Bu çalışma, hem plastik yüzeye hem de cam yüzeye tutunarak $CaCO_3$ oluşumunu gözlemlemek için 6 kuyucuklu plaka ve 60 ml hacimli şırınga içerisinde gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu plaka, plastik yüzeye tutunan $CaCO_3$ kristallerini stereomikroskopta görmeyi kolaylaştırırken, şırınga içerisine daldırılarak bekletilen cam lam yüzeyi ise, ışık mikroskobunda zamanla oluşan $CaCO_3$ kristallerini görmeyi sağlayacaktır.

3.2.1. 6 kuyucuklu plakalarının hazırlanması

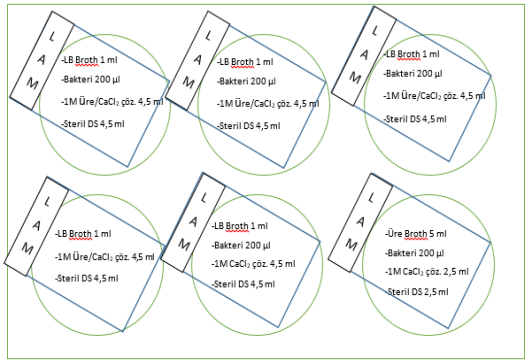
Deneyde 6 kuyucuklu steril plakalar kullanılmıştır. Kuyucuklardaki toplam hacim 10,2 ml olarak belirlenmiştir. Deney grubunda, kuyucuklara standart olarak 200 µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Deney süresi boyunca bakterilerin besin ihtiyacını karşılayabilmek için 1 ml LB Broth konulmuştur. Bununla birlikte $CaCO_3$ oluşumunu sağlamak için gerekli olan üre-$CaCl_2$ çözeltisi toplamda 9 ml olarak eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki üre-$CaCl_2$ çözeltileri için, toplamda 9 ml olacak şekilde 1 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile steril distile su kullanılarak kuyucuklarda seyreltme işlemi yapılmıştır. Kontrol B1 grubunda ise bakteri solüsyonu kullanılmamış ve 1,2 ml LB Broth ve 9 ml üre-$CaCl_2$ çözeltisi eklenmiştir. Kontrol C1 grubunda yukarıdaki şekillerde belirtildiği gibi gerekli malzemeler eklendikten sonra lamlar 45 derecelik açı ile yerleştirilmiştir. Lamlar kullanılmadan önce otoklavlanmıştır. Plakalar 3 gün süre ile 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 1 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile kuyucuklar **Şekil 3.1'**deki gibi doldurulmuştur.



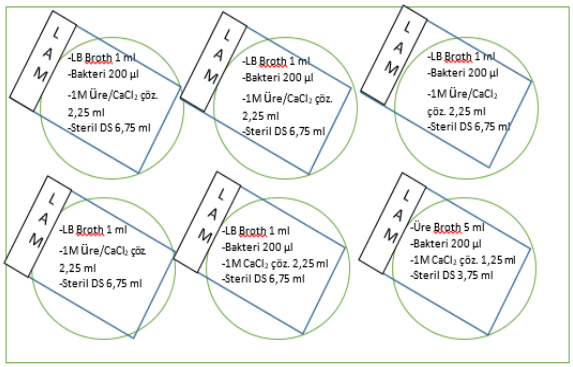
1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren plaka



0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren plaka



0,5 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren plaka



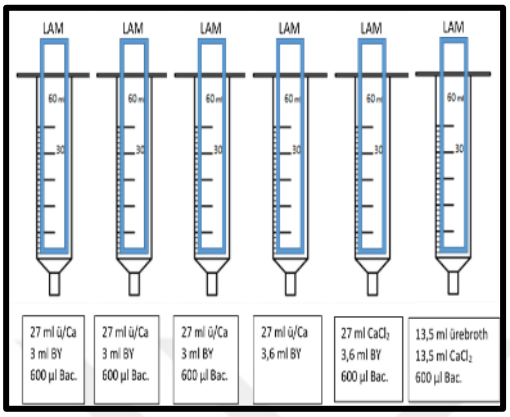
0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren plaka

Şekil 3.1. Plakada $CaCO_3$ oluşumu için kullanılan 1, 0,75, 0,5 ve 0,25 M olmak üzere dört farklı konsantrasyon şeması

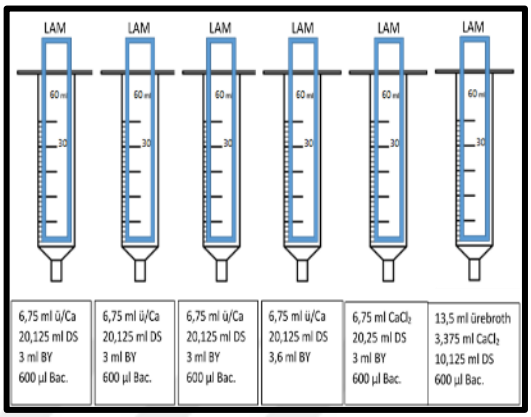
3.2.2. Şırınga içerisinde lam düzeneğinin hazırlanması

Deneyde 60 ml hacimli steril şırıngalar kullanılmıştır. Şırıngalardaki toplam hacim 30,6 ml olarak belirlenmiştir. Şırıngaların uç kısımları, deneyde kullanılmadan önce silikon ile 1 gece önceden kapatılıp kurumaya bırakılmıştır. Deney grubunda, şırıngalara 600 µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Bakteri olarak OD_{625nm}= 0,38'de (2 McFarland) *B. sphaericus* CECT 5905 kullanılmıştır. Deneyde kullanılmadan önce kontaminasyon riskine karşı üreaz testine tabi tutulmuştur. Deney süresi boyunca bakterilerin besin ihtiyacını karşılayabilmek için 3 ml LB Broth konulmuştur. Bununla birlikte $CaCO_3$ oluşumunu sağlamak için gerekli olan üre-$CaCl_2$ çözeltisi toplamda 27 ml olarak eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki üre-$CaCl_2$ çözeltileri için, toplamda 27 ml olacak şekilde 1 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile steril distile su kullanılarak şırıngalarda seyreltme işlemi yapılmıştır. Kontrol B1 grubunda ise bakteri solüsyonu kullanılmamış ve 3,6 ml LB Broth ve 27 ml üre-$CaCl_2$ çözeltisi eklenmiştir. Kontrol C1 grubunda yukarıdaki şekillerde belirtildiği gibi gerekli malzemeler eklendikten sonra lamlar dik

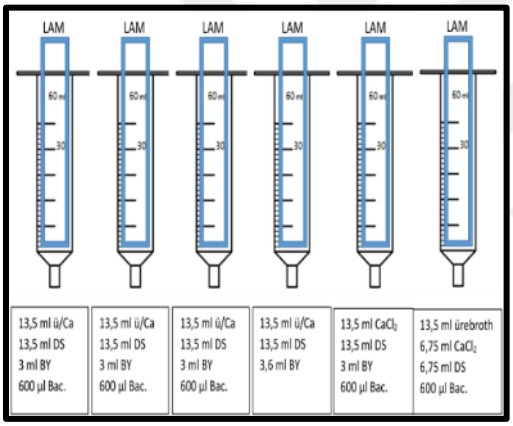
şekilde yerleştirilmiştir. Lamlar kullanılmadan önce otoklavlanmıştır. Şırıngalar 3 gün süre ile 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 1 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile şırıngalara **Şekil 3.2'**deki gibi doldurulmuştur.



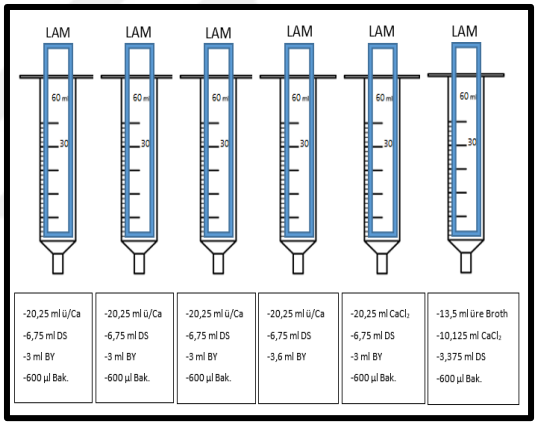
1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren şırınga



0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren şırınga



0,5 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren şırınga



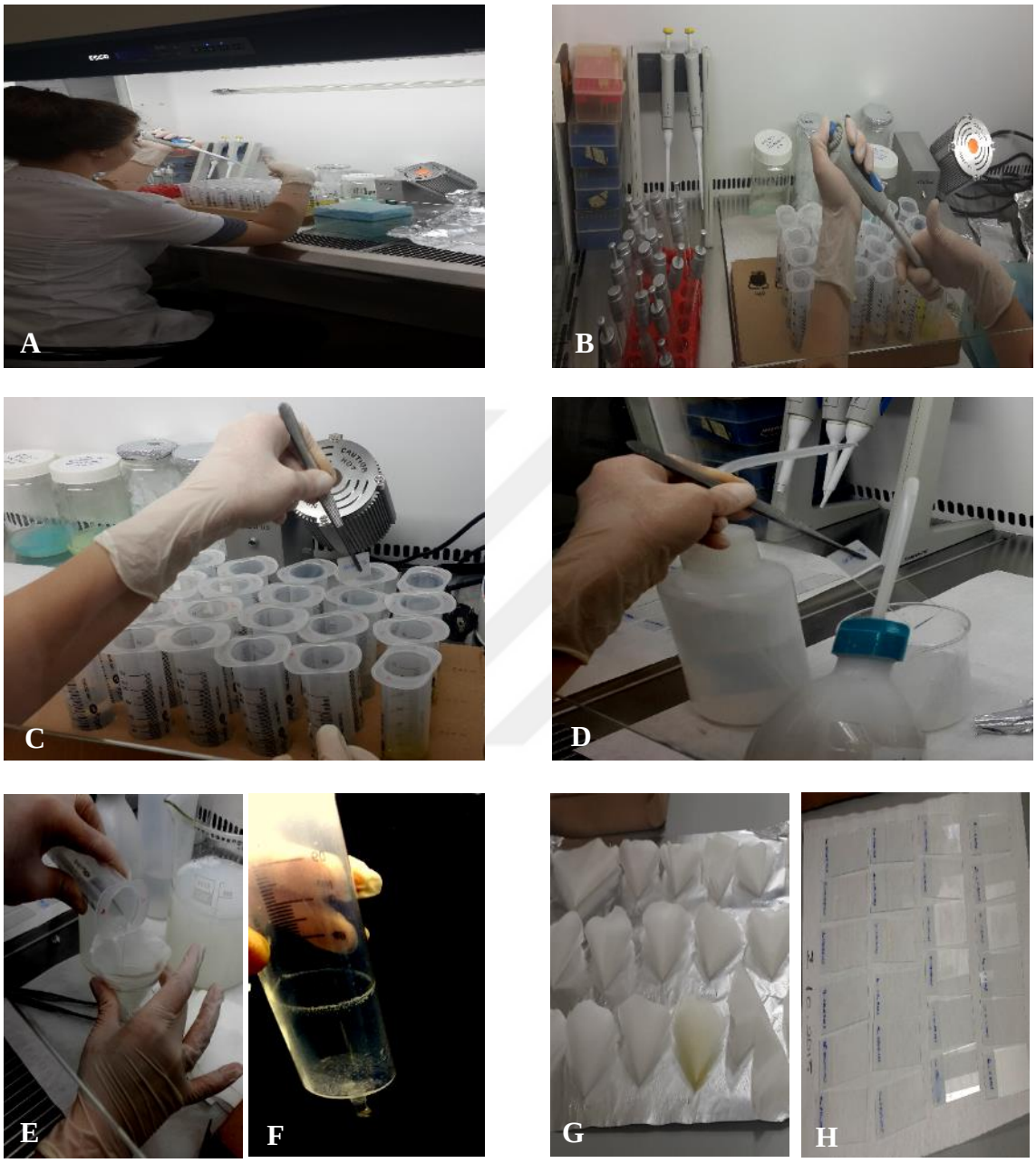
0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren şırınga

Şekil 3.2. Şırıngada $CaCO_3$ oluşumu için kullanılan 1, 0,75, 0,5 ve 0,25 M olmak üzere dört farklı konsantrasyon şeması

3.2.3. Ortam sıvılarının süzülmesi ve lam yüzeylerinin inceleme için hazırlanması

Bu deneyde şırınga içerisindeki sıvıların bir kısmı falkon tüplere alınmıştır (**Şekil 3.3A-B**). Artan sıvılar filtre kağıtları ile süzülmüş ve kağıtlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (**Şekil 3.3E-F**). Süzülen artık sıvı ise, falkon içerisine alınıp dolaba kaldırılmış ve şırıngalar %50 aseton-etanol karşımı ile yıkanmıştır. Lamlar ise önce distile

su daha sonra %50 aseton-etanol karşımı ile yıkanmıştır (**Şekil 3.3C-D**). Lamlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra, optik mikroskopta incelenmiştir (**Şekil 3.3G-H**).

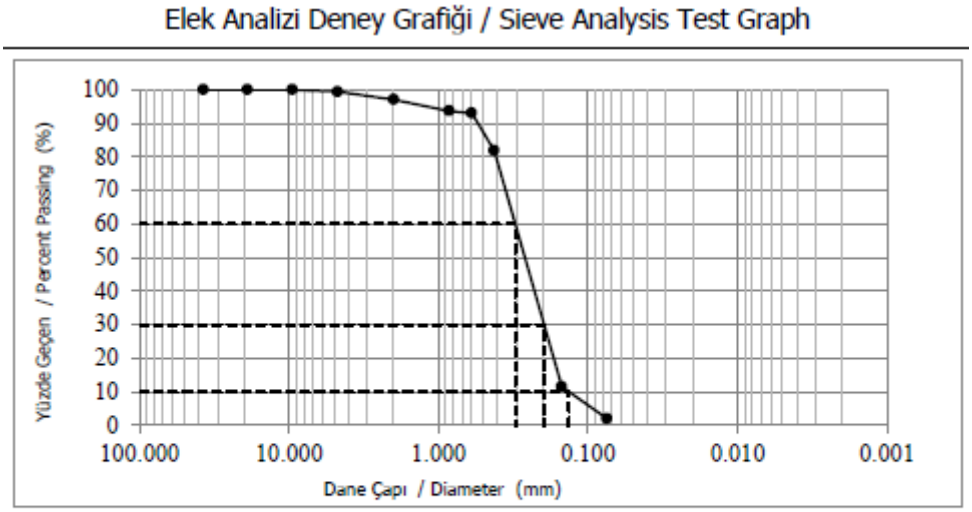


Şekil 3.3. A,B; Ortam sıvılarının falkon tüplere alınması, C,D; şırınga içindeki lamların distile su ve aseton-metanol (%50) karışımı ile yıkanması, E,F; Sıvıların süzülmesi, G,H; Filtre kağıdı ve lamların oda sıcaklığında kurutulması

3.3. Kum Kolonlarında $CaCO_3$ Oluşturulması ve SEM ile İncelemesine Yönelik Kullanılan Yöntemler

3.3.1 Kum kolonlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılacak kum çeşidi olarak dane boyutu ≤ 0,850 (TS/Turkish Standard 1900) (**Şekil 3.4**) olan deniz kumu seçilmiştir. Deniz kumu deneylerde kullanılmadan önce, içerisindeki tuzları ortadan kaldırmak için distile su ile iyice yıkanmıştır. Yıkanarak tuz ve artık maddelerden arındırılan kum, 65°C'de Pasteur fırınında kurutulmak üzere 2 gece bekletilmiştir. Kurutulan kum daha sonra otoklav ile 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Steril edilen kum örnekleri, yaklaşık olarak 42 g olacak şekilde petrilere konmuş ve 1 gece boyunca 80°C'de kurumaya bırakılmıştır. 42 g konulmasının sebebi ise, otoklav esnasında, taneler arasında oluşan nemin kurutularak uzaklaştırılması sonucu yaklaşık olarak 40 g kum elde etmektir. Steril edilmiş ve kurutulmuş kum örnekleri, destek deliklerine yerleştirilmiş steril şırıngalar içerisine boşaltılmıştır. Kum örnekleri konmadan önce, şırıngaların alt yüzeylerine 0,45 µm membran filtre yerleştirilmiştir. Membran filtre yerleştirilmesinin amacı, kum örneklerinin, şırınganın alt kısımda bulunan delikten çıkmasını ve bakteri süspansiyonu eklendiğinde kum içerisindeki bakteri kaybını engellemektir.



Blok %	Çakıl / Gravel %	Sand / Kum %	Silt + Kil / Mil + Clay %
	2.93	**95.00**	**2.07**

Şekil 3.4. Kumun dane boyutu dağılım grafiği

3.3.2. Kum örneklerinin bakteri ve çimentolama solüsyonu ile muamelesi

Steril edilmiş ve kurutulmuş kum örneklerinin 40'ar g'ı ve 8 grubun her biri steril şırıngaya konulmuştur. 8 farklı grubun içeriği **Tablo 3.2**'de verilmiştir. Kum örneklerini içeren şırıngalar özel hazırlanmış delikli destekler üzerine yerleştirilmiştir.

Bu çalışmada 3 farklı iyileştirme şekli uygulanmıştır. 1. iyileştirme şeklinde 2 gün, 2. iyileştirme şeklinde 4 gün ve 3. iyileştirme şeklinde 6 gün süren bir prosedür hazırlanmıştır **(Şekil 3.5)**.

3.3.2.1. 2 günlük iyileştirme prosedürü

Destek üzerine yerleştirilen örnekler içerisine öncelikle bakteri süspansiyonu ($OD_{625\ nm}$:0,180-2 McFarland) eklenmiştir. Bakteri süspansiyonun aktarılmasının hemen ardından 60 ml fiksatif çözeltisi örnek üzerine eklenmiştir. 30 dakika bekleme süresinden sonra çimento solüsyonunun ilk 60 ml'si örnekler üzerine eklenmiştir. Aktarma işlemi bittikten sonra kum örnekleri içerisinde partiküllere tutunan bakterilerin, çimentolama solüsyonu içerisindeki ortama alışması ve üreyi fark edip parçalaması için 2 saatlik bir bekleme süresi uygulanmıştır. Bu bekleme süresi tamamlandıktan sonra çimentolama solüsyonunun ikinci 60 ml'si örnekler üzerine uygulanmıştır. Bu uygulamadan sonra ortama uyum sağlayan bakterilerin üreaz aktivitelerini gerçekleştirmek, devam ettirmek ve $CaCO_3$ oluşumunu sağlamak için 24 saatlik bir bekleme süresine girilmiştir. 24 saat sonunda çimento solüsyonunun son 60 ml'si eklenmiştir. Uygulama tamamlandıktan sonra 30°C'de inkübe edilerek 14. ve 28. günlerde oluşan $CaCO_3$ miktar tayini ve konpenetrasyon için ölçümler yapılmıştır. Bu ölçümlerden ilerleyen bölümlerde bahsedilecektir. Şırıngada filtreden süzülen çıkış suları, desteğin alt kısmına konan bir beher yardımı ile toplanmıştır. 8 farklı grup için 3 tekrar yapılmıştır.

3.3.2.2. 4 günlük iyileştirme prosedürü

Bu deney, 4 günlük bir iyileştirme sürecini kapsamaktadır. 1. iyileştirmede uygulanan prosedür tamamlandıktan sonra örnekler üzerine, 2 gün daha 8 saatte bir 30 ml çimento solüsyonu eklenmiştir. Üçüncü gün tamamlandıktan sonra 15 ml bakteri solüsyonu ($OD_{625\ nm}$:0,180-2 McFarland) eklenmiş ve çimento solüsyonlarını ekleme işleme devam edilmiştir. 4 günlük uygulama tamamlandıktan sonra 30°C'de inkübe edilerek 14. ve 28. günlerde oluşan $CaCO_3$ miktar tayini ve konpenetrasyon testleri için

ölçüm yapılmıştır. Şırıngada filtreden süzülen çıkış suları, desteğin alt kısmına konan bir beher yardımı ile toplanmıştır. 8 farklı grup için 3 tekrar yapılmıştır.

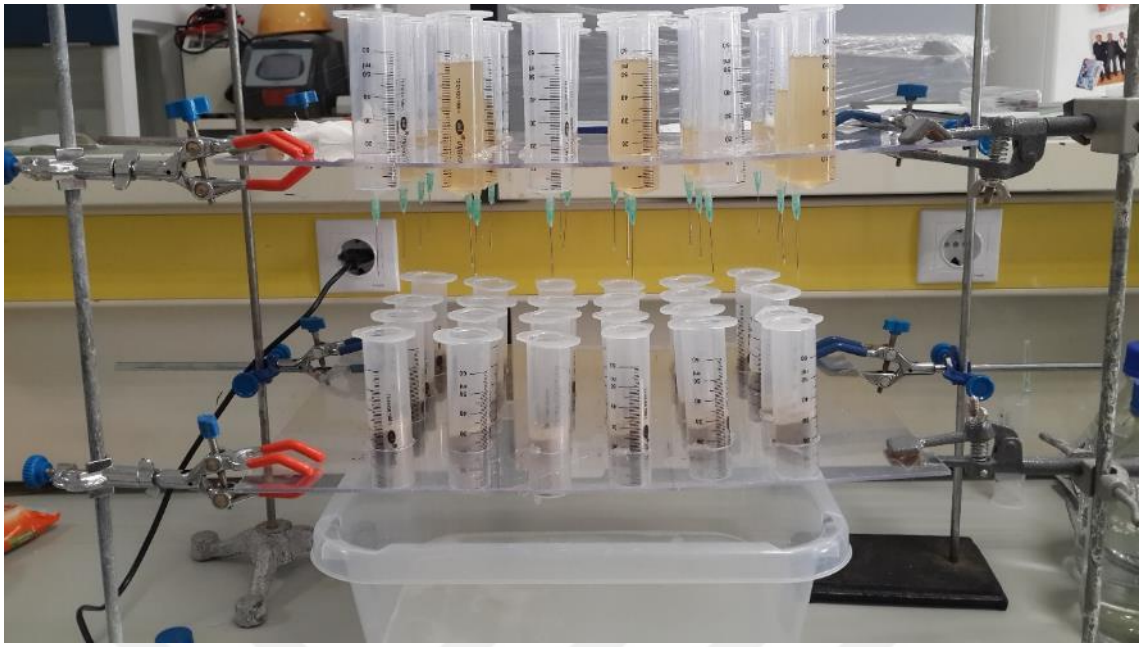
3.3.2.3. 6 günlük iyileştirme prosedürü

Bu deney, 6 günlük bir iyileştirme sürecini kapsamaktadır. 1. iyileştirmede uygulanan prosedür tamamlandıktan sonra örnekler üzerine, 4 gün daha 8 saatte bir 30 ml çimento solüsyonu eklenmiştir. Üçüncü ve beşinci gün tamamlandıktan sonra 15 ml bakteri solüsyonu ($OD_{625\ nm}$:0,180-2 McFarland) eklenmiş ve çimento solüsyonlarını ekleme işlemine devam edilmiştir. 6 günlük uygulama tamamlandıktan sonra 30°C'de inkübe edilerek 14. ve 28. günlerde oluşan $CaCO_3$ miktar tayini ve konpenetrasyon testleri için ölçüm yapılmıştır. Şırıngada filtreden süzülen çıkış suları, desteğin alt kısmına konan bir beher yardımı ile toplanmıştır. 8 farklı grup için 3 tekrar yapılmıştır.

Tablo 3.2. Kum kolonlarına eklenen solüsyonlar ve gruplara göre eklenme miktarları

	Bakteri süspansiyonu				**Çimento solüsyonu (üre-$CaCl_2$ g/g)**		
	30 ml	**45 ml**	**60 ml**	**Fiksatif çözelti**	**30 / 55 (0,5/0,3 M)**	**30 / 75 (0,5/0,5 M)**	**20 / 75 (0,3/0,5 M)**
Grup 1 (Kontrol)	-	-	-	✓	✓	-	-
Grup 2 (Kontrol)	✓	-	-	✓	-	-	-
Grup 3	✓	-	-	-	✓	-	-
Grup 4	✓	-	-	✓	✓	-	-
Grup 5	✓	-	-	✓	-	✓	-
Grup 6	✓	-	-	✓	-	-	✓
Grup 7	-	✓	-	✓	✓	-	-
Grup 8	-	-	✓	✓	✓	-	-

M*: Molar



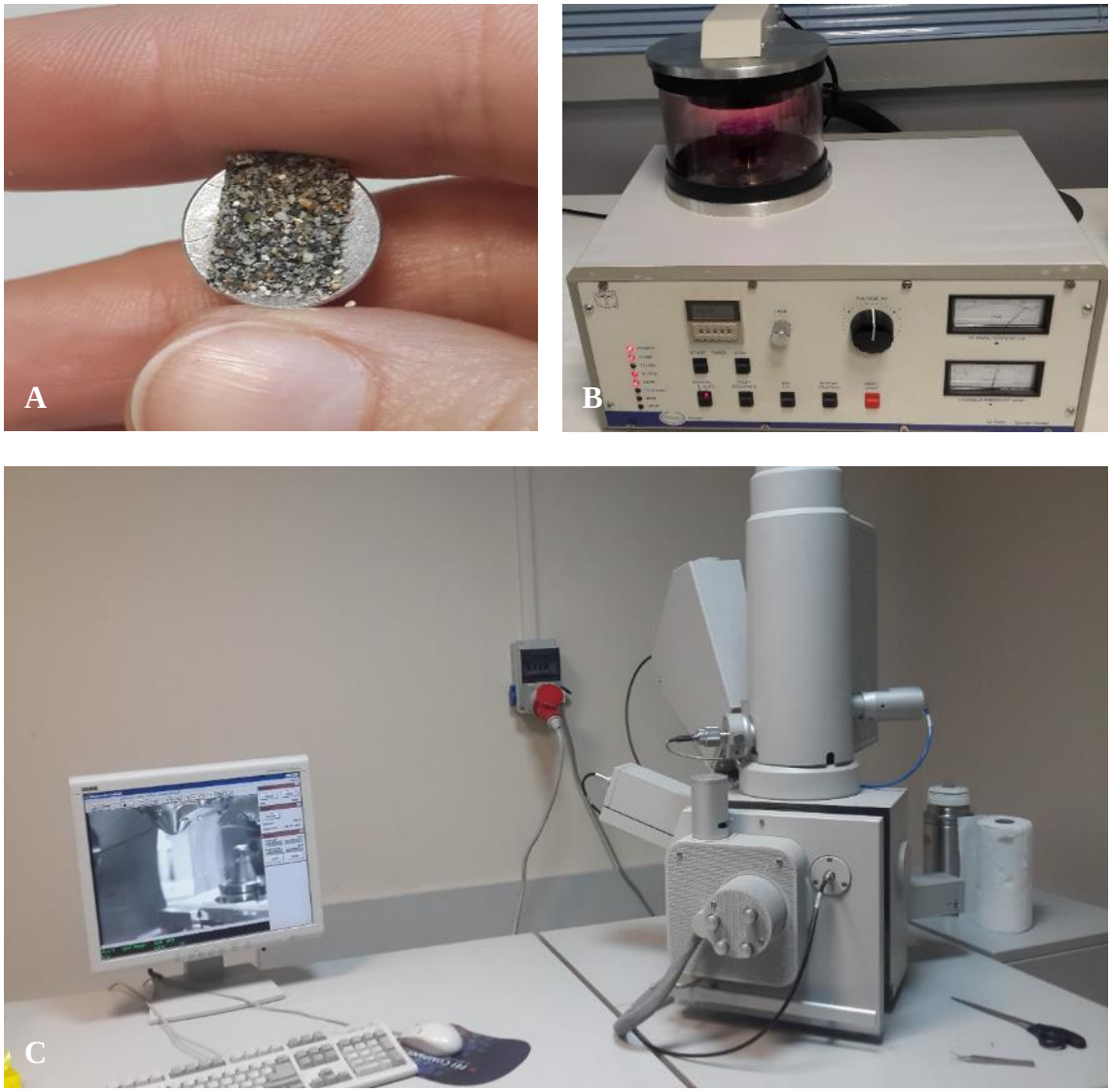
Şekil 3.5. Kum kolonlarının ortamlar ile muamelesi

3.3.3. SEM için örneklerin hazırlanması

3.3.3.1. SEM analizi için örnek hazırlanması

Kum örneklerinin SEM analizleri Marmara Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Metalurji Ve Malzeme Mühendisliği Bölümü Malzeme Karakterizasyon Laboratuvarı tarafından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir**.**

- 10 mm çaptaki alüminyum tutucular üzerine, karbon iletken çift taraflı yapıştırıcı bant yapıştırılmıştır.
- Bant yapıştırılmış tutucuların yapışkan yüzeyleri, bir pens yardımı ile kum örneklerinin üzerine kuvvetli bir şekilde bastırılmıştır. İyi yapışmayan taneler hafifçe vurularak temizlenmiştir (**Şekil 3.6A**).
- Hazırlanan örnekler hem kaplamalı hem de kaplamasız olarak incelenmiştir.
- Örnekler, Polaron SC7640 püskürtmeli kaplayıcı ile 1,5 kV'de 30 saniye süre ile 10^{-6} (mbar/Pa) basınç altında altın platin kullanılarak kaplanmıştır (**Şekil 3.6B**).
- Yaklaşık 5 dakika süren kaplama işleminden sonra, örnekler FEI Sirion Taramalı Elektron Mikroskobu içerisindeki kuyucuğa yerleştirilerek incelenmiştir (**Şekil 3.6C**).



Şekil 3.6. A; Örneğin karbon banta yapıştırılması, B; Örneklerin kaplanması, C; SEM cihazı ile örneklerin görüntülenmesi

3.4. Kum Örneklerinde Konpenetrasyon Testi (CPT) ve Bernard-Scheibler Kalsimetre Metodu ile $CaCO_3$ Miktar Tayini ve Karşılaştırılmasına Yönelik Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Koni penetrasyon testi

Bu çalışmada deney ve kontrol grupları 14. ve 28. günlerde koni penetrasyon testine tabi tutulmuştur. 14 ve 28 günlük inkübasyonlarını tamamlayan 2, 4 ve 6 günlük iyileştirme grupları, CPT için BROOKFİELD CT3 cihazında ölçülmüştür. Bunun için cihaz kurulumu tamamlandıktan sonra, kolonlar cihaz tabletine yerleştirilmiştir. Testler,

bu cihazın TA44 probu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Prob, 2 mm/s hızla ilerleyerek kum kolonlarında maksimum 2 cm derinliğe kadar indirilmiştir. Bu aşamada probun kolona uyguladığı yük kuvveti değerleri kaydedilmiş ve grafikleri çizilmiştir **(Şekil 3.7.)**.



Şekil 3.7. BROOKFİELD CT3 cihazı ile modifiye CPT deneyinin uygulanması

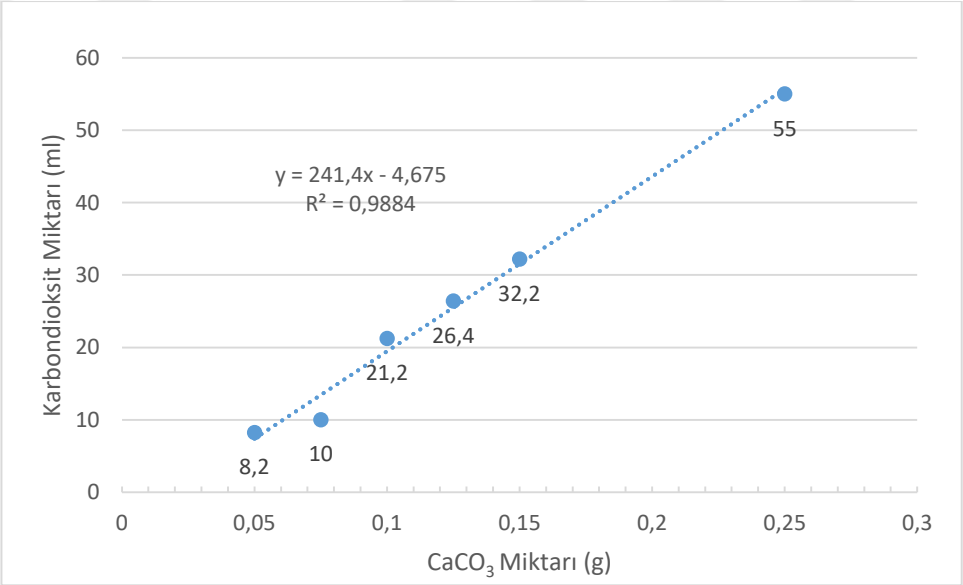
3.4.2. Bernard-Scheibler kalsimetre metodu

Kum kolonlarındaki $CaCO_3$ miktarını tayin etmek için Bernard-Scheibler kalsimetre metodu kullanılmıştır. Metod prosedürü aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

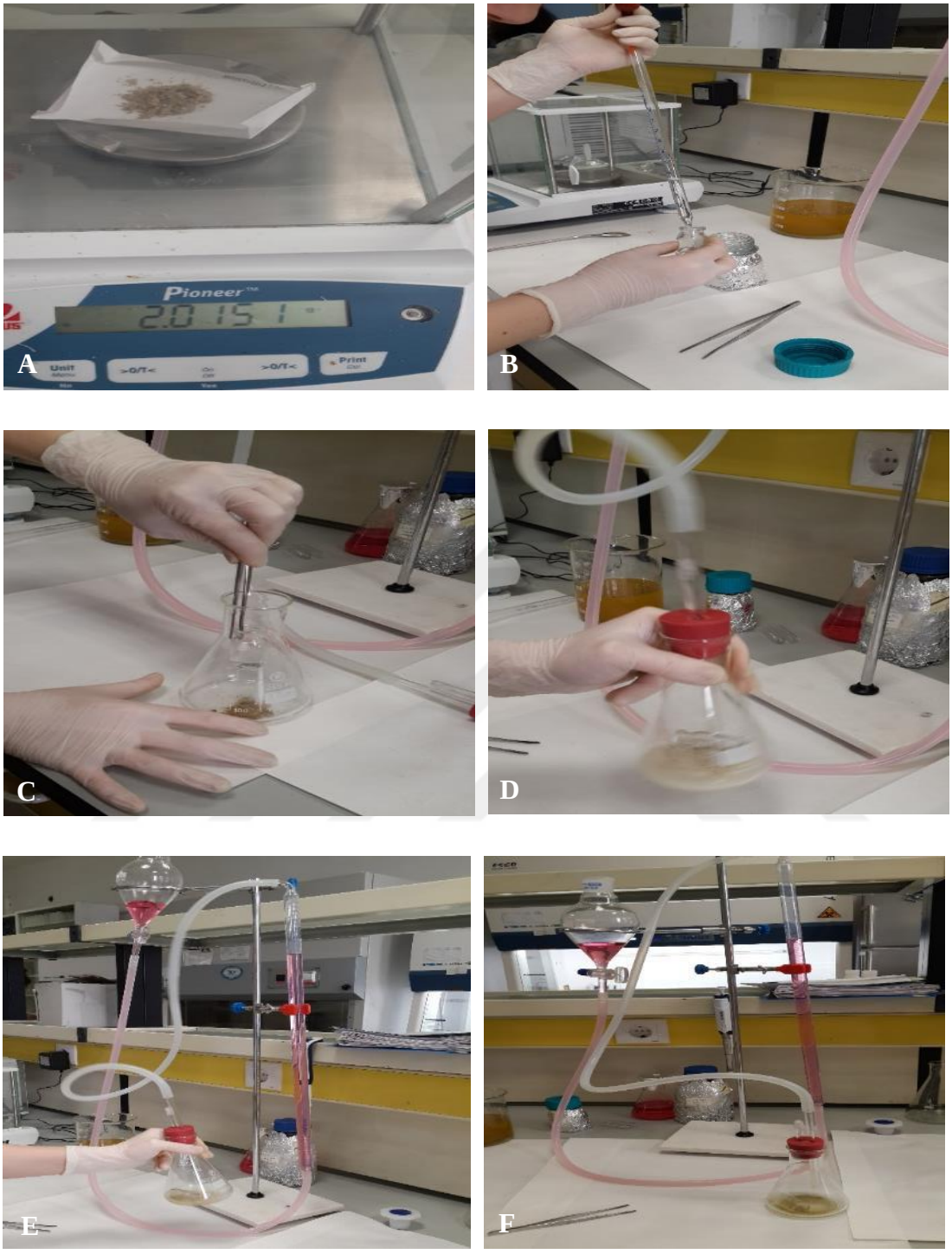
- 2,021 g kum örneği tartılmıştır (**Şekil 3.9A**).
- 250 ml'lik erlen içerisine konmuştur.
- Küçük cam tüp içerisine 6 ml 6 N HCl solüsyonu eklenmiştir (**Şekil 3.9B**).
- Cam tüp, içerisinde kum örneği bulunan erlen içerisine dökmeden dikkatlice konmuştur (**Şekil 3.9C**).
- Erlen, ağzı mantar tıpa ile sıkıca kapatılmıştır.
- İçerisinde 1 N metil oranj ile renklendirilmiş H_2SO_4 solüsyonu bulunan büret, cam musluklu ayırma hunisi ile dengelenmiştir.

- İçerisinde kum ve HCl bulunan erlen çalkalanmıştır. Çalkalama sonucu dökülen asit ve kum içerisindeki $CaCO_3$ reasksiyona girer ve CO_2 gazı mantar tıpaya bağlı cam tüpten büret içerisindeki asiti basınç etkisiyle ayırma hunisine doğru hareket ettirir (**Şekil 3.9D-E**).
- Reaksiyon tamamlandıktan sonra, ayırma hunisi ile büret içerisindeki sıvı seviyesi aynı olana kadar dengelenmiştir (**Şekil 3.9F**).
- Dengeleme tamamlandıktan sonra, değerler kaydedilmiştir.

Örnekler, teste tabi tutulmadan önce, miktar hesaplamalarının yapılıp karşılaştırılabilmesi için, saf $CaCO_3$'ın farklı kosantrasyonları kullanılarak bir standart eğri çizilmiştir (**Şekil 3.8)**



Şekil 3.8. Farklı konsantrasyonlardaki $CaCO_3$ eğrisi



Şekil 3.9. A; Kum örneğinin tartılması ve erlene konması, B; Küçük cam tüpe 6 ml HCl konulması, C; HCl tüpünün erlen içine konması, D; İçinde HCl tüpü bulunan erlenin çalkalanması, E; CO_2 gazının basıncı ile sıvının hareketi, F; Büretteki sıvı ile ayırma hunisindeki sıvının dengelenmesi

3.5. Kolonlarda Konsolidasyon Testine Yönelik Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Konsalidasyon ringlerinin hazırlanması

5 cm çapa sahip konsolidasyon ringi kullanılmıştır. Ringlerin içerisine aynı çapa sahip poröz taşları geçirilmiştir. Kum örnekleri ring içerisine konulduğunda, poröz taşların düşmemesi için alt tarafta karşılıklı iki bölgeden silikon ile yapıştırılmıştır. Poröz taşları üzerine, bölüm 4'te olduğu gibi 0,45 µm membran filtre konulmuştur. Hazırlanan ringler delikli desteklere yerleştirildikten sonra, 35 g yıkanmış ve steril edilmiş kum eklenmiştir. Bundan sonra, deneye başlamak üzere örnekler hazır hale gelmiştir.

3.5.2. Kum örneklerinin ortamlar ile muamelesi

Bu çalışmada, bölüm **3.3.2**'de uygulanan yöntem kullanılmıştır. Test edilmek üzere bir önceki bölümde kullanılan 8 farklı gruptan 5'i seçilmiştir (**Tablo 3.3**). 6 günlük iyileştirme uygulamasından sonra, 28 gün boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir **(Şekil 3.10)**.

Tablo 3.3. Konsolidasyon testi için seçilmiş gruplar ve ortamları

	Bakteri süspansiyonu			**Fiksatif çözelti**	**Çimento solüsyonu (Üre-$CaCl_2$ g/g)**		
	30 ml	**45 ml**	**60 ml**		**30 / 55 (0,5/0,3 M*)**	**30 / 75 (0,5/0,5 M)**	**20 / 75 (0,3/0,5 M)**
Grup 1 (Kontrol)	-	-	-	✓	✓	-	-
Grup 3	✓	-	-	-	✓	-	-
Grup 4	✓	-	-	✓	✓	-	-
Grup 5	✓	-	-	✓	-	✓	-
Grup 6	✓	-	-	✓	-	-	✓

***M:** Molar



Şekil 3.10. Konsolidasyon ringi içersinde bulunan kum örneklerinin iyileştirme ortamları ile muamelesi

3.5.3. Konsolidasyon testi

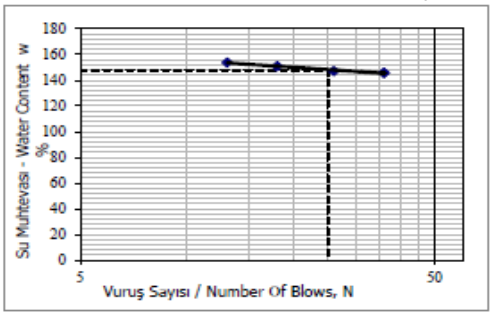
Konsolidasyon testi, TTM test merkezi tarafından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.6. Free Swell Testine Yönelik Kullanılan Yöntemler

3.6.1. Bentonitin Atterberg (kıvam) limitlerinin belirlenmesi

Bentonitin Atterberg (kıvam) limitlerinin belirlenmesi, TTM test merkezi tarafından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir (**Şekil 3.11)**.

Lokasyon / Location	Sondaj No / Borohole Number		-				
	Numune No / Specimen Number		Bentonit				
	Derinlik/ Depth	m-m	-				
Plastik Limit Tayini / Determination of Plastic Limit	Deney Başlangıç Tarihi / Test Start Date		29.12.2015				
	Deney Bitiş Tarihi /Test Final Date		30.12.2015				
	Kap No / Number Of Can		A-70	A-64	-	-	-
	Kap Ağırlığı / Weight Of Can	g	25.89	24.93	-	-	-
	Kap+Yaş Num. Ağ./ Weight Of Can+Wet Spec.	g	38.34	36.39	-	-	-
	Kap+Kuru Num. Ağ./ Weight Of Can+Dry Spec.	g	34.61	33.02	-	-	-
	Su Muhtevası / Water Content	(%)	42.72	41.60	-	-	-
Likit Limit Tayini / Determination of liquid limit	Deney Başlangıç Tarihi / Test Start Date		26.12.2015				
	Deney Bitiş Tarihi/Test Final Date		30.12.2015				
	Vuruş Sayısı / Number Of Blows		36	26	18	13	-
	Kap No / Number Of Can		A-87	A-9	A-50	A-68	-
	Kap Ağırlığı / Weight Of Can	g	28.74	27.38	25.86	26.02	-
	Kap+Yaş Num. Ağ./ Weight Of Can+Wet Spec.	g	41.11	39.58	37.98	39.11	-
	Kap+Kuru Num. Ağ./ Weight Of Can+Dry Spec.	g	33.78	32.32	30.69	31.18	-
	Su Muhtevası / Water Content	(%)	145.69	147.06	150.80	153.82	-

Likit Limit Grafiği / Liguid Limit Graph		Sonuçlar / Results
		Likit Limit / Liquit Limits: **148.0**
		Plastik Limit / Plastic Limits: **42.2**
		Plastisite İndisi / Plasticity Index: **105.8**
		Not/ Note: -
		Kurutma Yöntemi / Drying Method
		Etüvde / Oven

Şekil 3.11. Bentonitin Atterberg (kıvam) limitleri-(TS 1900-1 Mart 2006 5.1.2 - 5.1.3 Deney 2-3)

3.6.2. Bentonit ve kum karışımının hazırlanması

Bu çalışmada 5 farklı oranda kum ve bentonit içeren seri örnekler oluşturulmuştur (**Tablo 3.4)**.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılmak üzere oluşturulan kum-bentonit karışım oranları

1. Seri	2. Seri	3. Seri	4. Seri	5. Seri
% 100 kum	% 75 kum	% 50 kum	% 25 kum	% 0 kum
% 0 bentonit	% 25 bentonit	% 50 bentonit	% 75 bentonit	% 100 bentonit

- 1. seri için, 10 g kum ve 0 g bentonit tartılmıştır.

- 2. seri için, 7,5 g kum ve 2,5 g bentonit tartılmıştır.

- 3. seri için, 5 g kum ve 5 g bentonit tartılmıştır.

- 4. seri için, 2,5 g kum ve 7,5 g bentonit tartılmıştır.

- 5. seri için, 0 g kum ve 10 g bentonit tartılmıştır.

- Kum, barındırdığı tuzulardan arınacak şekilde iyice yıkanmıştır.

- Kum ve bentonit otoklav ile steril edilmiştir.

- Steril yıkanmış kum ve saf bentoniti belirtilen oranlarda toplam 10 g olacak şekilde steril petri içinde tartılmıştır.

- 80°C'de 20 saat kurutulmuştur (**Şekil 3.12A**).

3.6.3. Bakteri süspansiyonunun hazırlanması

Bu çalışmada, diğer çalışmalarda olduğu gibi *Bacilus sphaericus* CECT 5905 bakterisi seçilmiştir. Çalışmada kullanılmadan önce üreaz pozitif olan bakteri %2 üre içeren LB broth içerisinde bir gece önceden geliştirilmiştir. Deneyde kullanılacağı zaman bakteri kültürleri 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlemiş ve süpernatant atılıp pellet üzerine 10 ml FTS (Fizyolojik Tuzlu Su) çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan bakteri süspansiyonunun konsantrasyonu $OD_{625\ nm}$:0,58 (3 McFarland)'dir.

3.6.4. Bentonit-kum karışımının bakteri süspansiyonu, gelişme ortamı ve çimento solüsyonu ile muamele edilmesi

Free swell testi için 3 farklı grup seçilmiştir:

1. Grup: Bentonit-kum karışımı, Bakteri, Çimento solüsyonu, Distile Su

2. Grup: Bentonit-kum karışımı, Bakteri, Çimento solüsyonu, Gaz yağı

3. Grup: Bentonit-kum karışımı, Çimento solüsyonu, Distile Su

Bentonit-kum karışımı oranlarının her biri için, bu 3 grup hazırlanmış ve 3 tekrar yapılmıştır.

3.6.4.1. Bentonit-kum karışımının bakteri süspansiyonu ve gelişme ortamı ile muamele edilmesi

Kurutulmuş bentonit-kum karışmının (**Şekil 3.12A**), 100 ml steril cam mezür içerisine dikkatlice boşaltılmıştır. Testin ilk adımı bakterilerin bentonit ve kum tanecikleri ile birleşmesini ve bir gelişme ortamı ile gelişmesini içermektedir. Bu nedenle öncelikle örnekler 90 ml geliştirme ortamı ve 10 ml bakteri süspansiyonu ile karıştırılıp bir gece boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir (**Şekil 3.12B**).

3.6.4.2. Bentonit-kum karışımının bakteri süspansiyonu ve çimento solüsyonu ile muamele edilmesi

1 gece boyunca bakteri ve geliştirme ortamı ile muamele edilmiş karışım üzerindeki sıvı atık birkintisi steril bir cam pipet yardımı ile geri alınmıştır. Yüzeyi tamamen sıvıdan arındırılmış karışım üzerine testin ikinci basamağı olan çimento solüsyonu eklenmiştir.

Bu adımda, bir gece boyunca bentonit ve kum taneleri arasına yerleşmiş ve çoğalma imkanı bulmuş olan mikroorganizmalar, bundan önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi üre içerikli bir ortamla karşılaştıklarında üreaz aktivitesi göstermekte ve $CaCO_3$ oluşumunu sağlamaktadır. Bu nedenle, karışım üzerine 90 ml çimento solüsyonu ve 10 ml bakteri süspansiyonu eklenmiş ve karıştırılmıştır (**Şekil 3.13A**). Her gün, her bir gruptan 10 ml geri alınıp yerine taze çimento solüsyonu konmuştur. Bu işlem 7 gün boyunca tekrarlanmıştır.

3.6.4.3. İşlem görmüş bentonit-kum karışımının kurutulması

7 gün sonunda, karışım üzerinde kalan sıvı atık birikintisinin tamamı geri alınmıştır. Cam mezür içerisindeki tüm bentonit-kum karışımı grupları kurutulmak üzere 4 gün boyunca 65°C'de etüv içerisinde bekletilmiştir (**Şekil 3.13B**).

3.6.4.4. Free swell testi

Bu aşamada suyu uzaklaştırılmış bentonit-kum karışım free swell test prosedürüne tabi tutulmuştur. Burada 1. ve 3. Grupların içerisine 100 ml distile su, 2. gruba ise gaz yağı konmuştur. Örneklerdeki şişme noktaları sabitlenene kadar beklenmiştir. Şişme tamamlandıktan sonra değerler kaydedilmiştir (**Şekil 3.14A-B-C**).

Bu çalışmada betonit-kum karışımı ile yapay bir zemin ortamı yaratılıp, şişme derecesi incelenmiştir. Bentonit, en yüksek şişme derecesine sahip kil özelliği göstermektedir. Bu nedenle, bu testte maksimum şişme derecesini göstermek için distile su kullanılmıştır. Minimum şişme derecesi ise gaz yağı kullanılarak belirlenmiştir. Çünkü bentonit partikülleri, gaz yağı ile birleşme özelliğine sahip değildir.

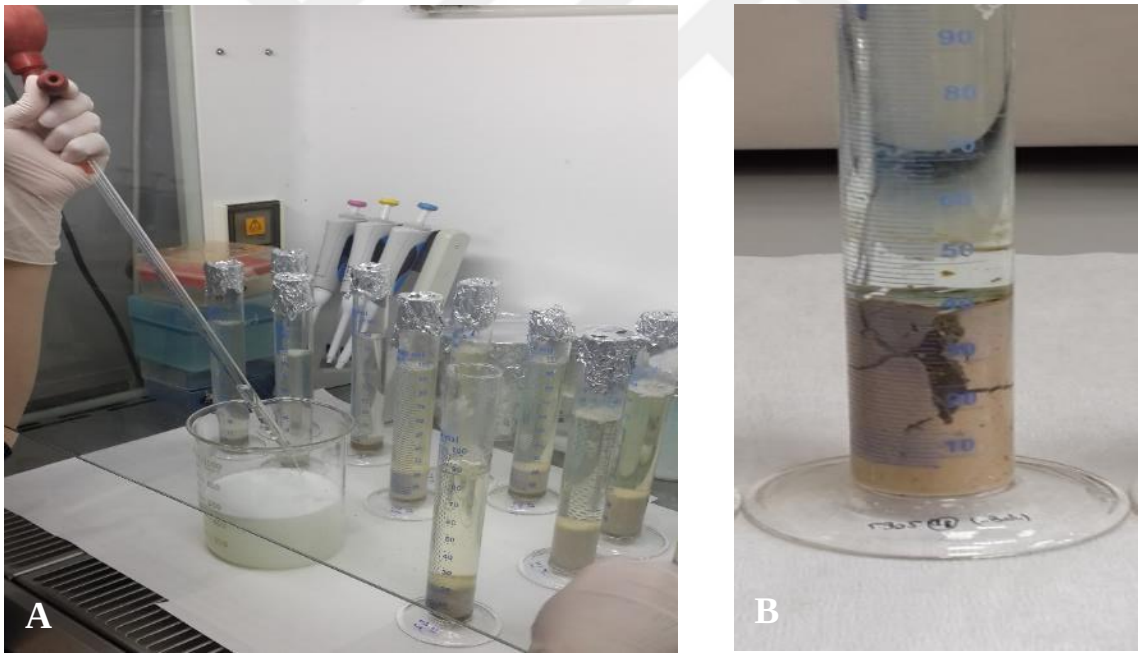
Free swell değeri aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Free swell Indeksi } \% = \frac{Vd - Vk}{Vk} \, x \, 100$$

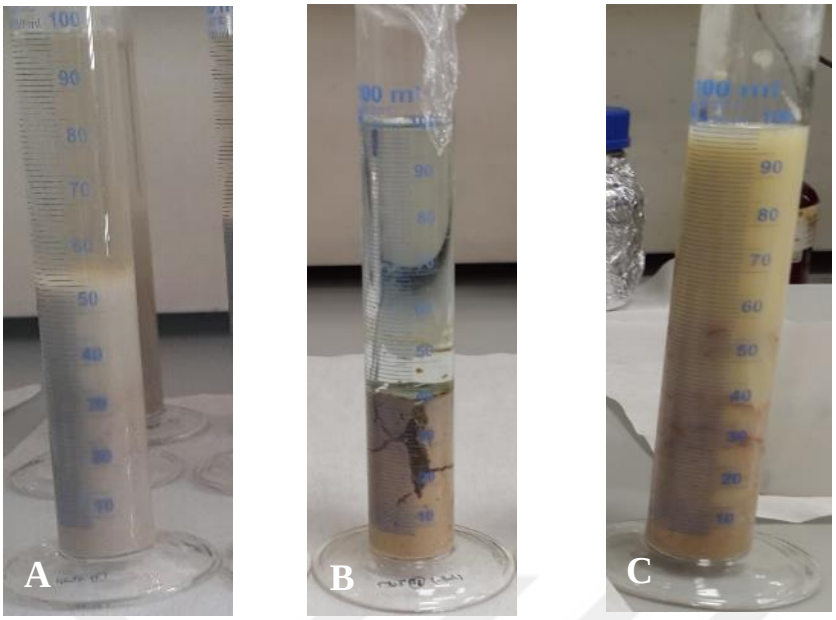
Burada; V_d, Distile su içeren cam mezürdeki toprak örneğinin yükseklik değerini, V_k, gaz yağı içeren cam mezürdeki toprak örneğinin yükseklik değerini belirtmektedir.



Şekil 3.12. A; Bentonit ve kum karışımının kurutulması, B; gelişme ortamı ve bakteri süspansiyonu ile muamele edilmiş bentonitin 30°C'de inkübasyonu



Şekil 3.13. A; Çimento solüsyonu eklenmiş bentonit-kum karışımı, B; bentonit-kum karışımının kurutulması



Şekil 3.14. A; Çimento solüsyonu eklenmiş bentonit-kum karışımı, B; bentonit-kum karışımının kurutulması, C; şişme sabitlenene kadar beklenmesi

BÖLÜM 4

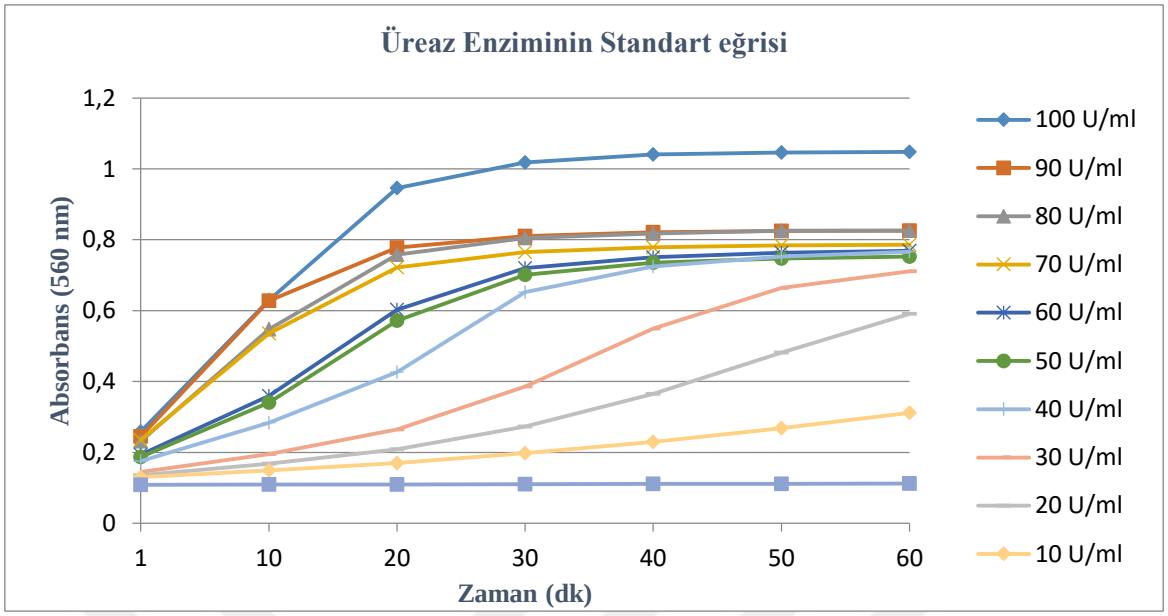
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bakterilerin Geliştirilmesi ve Çoğaltılması, Bakterilerin Üreaz Aktivite Testleri ve Farklı Sıcaklık pH ve Besin (Maya Özütü) Kosantrasyonunda Aktivitenin Belirlenmesi

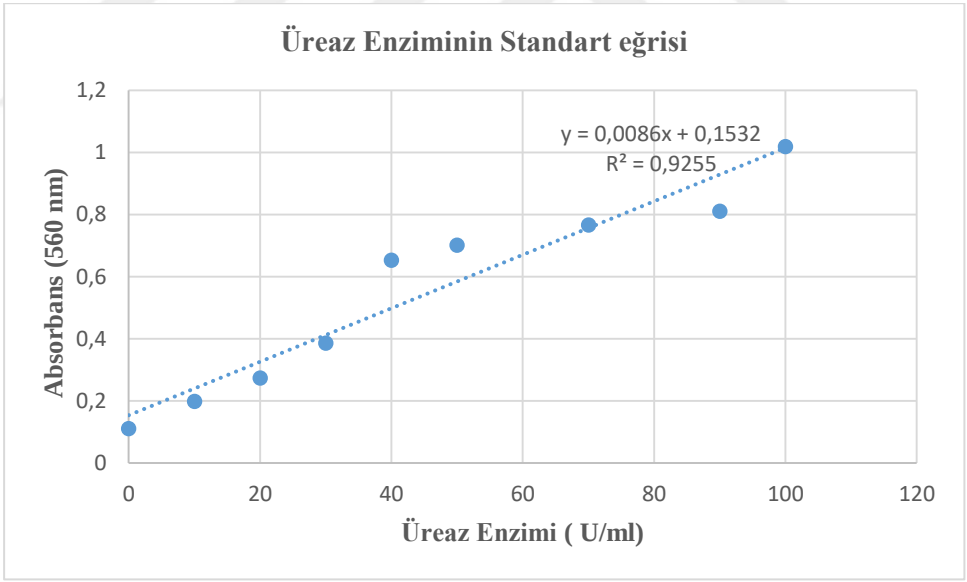
4.1.1. Üreaz enziminin absorbans ve standart eğri grafiğinin çizilmesi

Üre broth içerisinde bulunan fenol kırmızısı indikatörü, ortamda pH'ın artmasına bağlı olarak, ortamın renginin sarıdan pembeye dönmesine neden olmaktadır. Bu renk değişimi, spektrofotometrik olarak 430 ve 560 nm'de ölçülmüştür. Üreaz enziminin absorbans grafiği **Şekil 4.1**'de gösterilmektedir. Bu grafikte konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak 560 nm'de belirli bir zamandaki üreaz enziminin aktivitesi belirtilmektedir. Yüksek miktarda üreaz enzimi içeren kuyucuklar, diğer konsantrasyonlara sahip kuyucuklara göre zamana bağlı olarak daha hızlı etki göstermiştir. Fakat zaman ilerledikçe substrat miktarının azalmasına bağlı olarak aktivitede bir sabitlenmeye doğru gidildiği gözlenmektedir (Okyay et. Al;2013).

Şekil 4.2'de saf üreaz enziminin standart eğri grafiği gösterilmektedir. Konsantrasyona bağlı olarak artan üreaz aktivitesi ile grafiğin eğimi de lineer olarak devam etmiştir.



Şekil 4.1. Jack Bean üreaz enziminin farklı konsantrasyonlardaki aktivitesinin 60 dakika boyunca 560 nm'de absorbans grafiği



Şekil 4.2. Jack Bean üreaz enziminin farklı konsantrasyonlardaki aktivitesinin 60 dakika boyunca 560 nm'de standart eğri grafiği

4.1.2. Mikroorganizmalar ile üreaz aktivite testi

24 saatlik inkübasyon boyunca 30 dakika arayla devamlı olarak 560 ve 430 nm'de ölçümler alınmıştır. Mikroorganizmaların üreaz aktivitelerine ait değişim grafiği **Şekil 4.3**'te verilmektedir. Tüm mikroorganizmaların 3-18. saatler arasındaki absorbans değişim değerleri ve üretilen üreaz enzim miktarı **Tablo 4.1**'de gösterilmektedir.

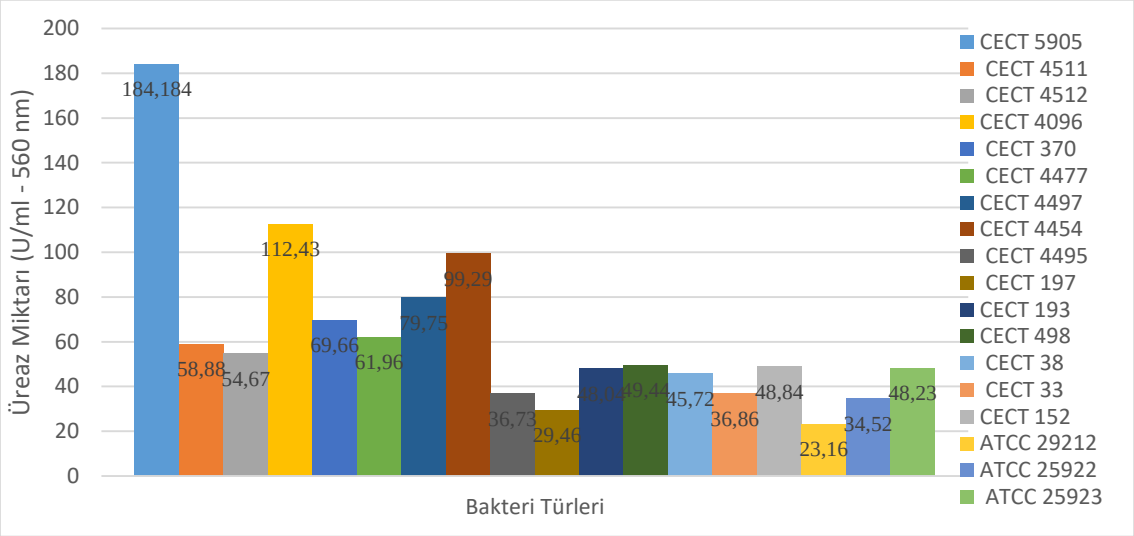
İnkübasyon sonrası ortamlardaki renk değişimleri, üreaz aktivitesi hakkında bilgi vermektedir. Buna bağlı olarak denenen 18 bakteri türünden sadece *B. sphaericus* CECT 5905, *B. megaterium* CECT 4096, *B. thuringiensis* CECT 4497, *B. megaterium* CECT 370 ve *B. thuringiensis* CECT 4454 **(Şekil 4.4)** türleri salgıladığı üreaz enzimi sayesinde ürenin parçalanmasını sağlayarak ortamın pH'ını artırmış ve sarıdan pembeye doğru renk değişimine sebep olduğu belirlenmiştir **(Şekil 4.5**). Absorbansa bağlı renk değişim oranı göze alındığında, ortamdaki renk değişiminin yaklaşık 3. saatte başladığı görülmüştür. 18-19. saatten sonra ise substrat azalmasına bağlı olarak grafikte bir sabitlenme olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Üreaz aktivitesi incelenen mikroorganizmaların 3. ve 18. saatlerde üreaz aktivitelerinin ortamdaki renk değişimine bağlı 560 nm'de absorbans değerleri, +: açık pembe, ++: koyu pembe

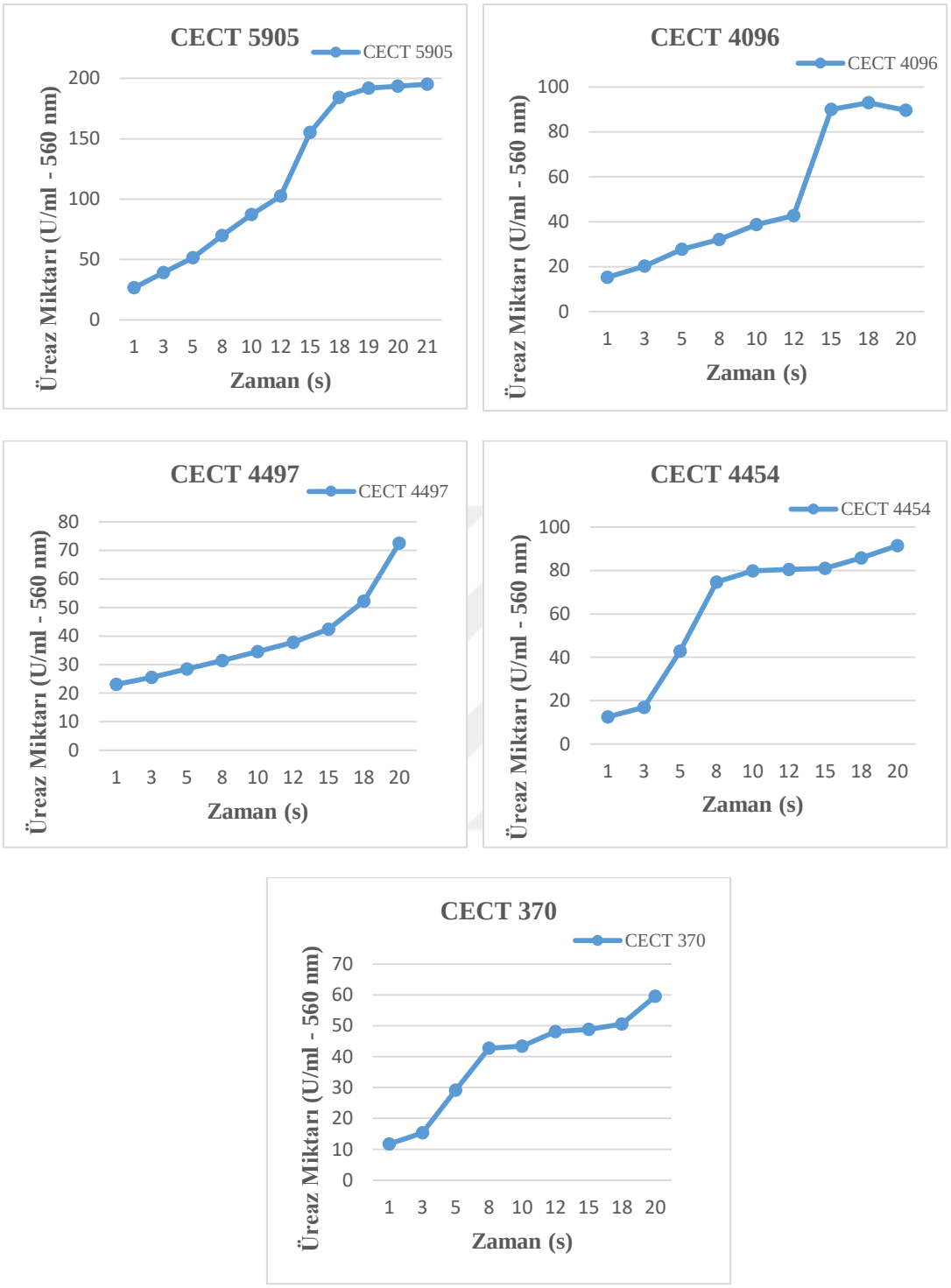
Mikroorganizma	Ortamdaki Renk Değişimi	3. saatte absorbans değeri (560 nm)	18. saatte absorbans değeri (560 nm)	3. saatte üreaz miktarı değeri (U/ml)	18. saatte üreaz miktarı değeri (U/ml)
***B. sphaericus* CECT 5905**	++	0,4972	1,7667	51,83486	184,1847
***B. sphaericus* CECT 4511**	-	0,3854	0,5648	40,17932	58,8824
***B. sphaericus* CECT 4512**	-	0,3751	0,5244	39,1055	54,67056
***B. megaterium* CECT 4096**	+	0,2704	1,0785	28,19016	112,4374
***B. megaterium* CECT 370**	+	0,34	0,5944	35,44621	69,66222
***B. megaterium* CECT 4477**	-	0,3699	0,6682	38,56339	61,96831
***B.thuringiensis* CECT 4497**	+	0,3215	0,765	33,51751	79,75396
***B. thuringiensis* CECT 4454**	+	0,3114	0,9524	32,46455	99,29108
***B. thuringiensis* CECT 4495**	-	0,3324	0,3524	34,65388	36,73895
***B. thuringiensis* CECT 197**	-	0,2534	0,2826	26,41785	29,46205
***B. cereus* CECT 193**	-	0,4228	0,4608	44,0784	48,04003
***B.subtilis* CECT 498**	-	0,3748	0,4743	39,07423	49,44746
***B. atrophaeus* CECT 38**	-	0,3937	0,4386	41,04462	45,7256
***Lysinibacillus sphaericus* CECT 33**	-	0,3523	0,3536	36,72852	36,86405
***B. pumilus* CECT 152**	-	0,4573	0,4685	47,67515	48,84279

Tablo 4.1. devam.

***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**	-	0,1908	0,2222	19,89158	23,16514
***Escherichia coli* ATCC 25922**	-	0,2684	0,3312	27,98165	34,52877
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	-	0,3578	0,4627	37,30192	48,23812



Şekil 4.3. Mikroorganizmaların 18. saatte ürettiği üreaz enzimi miktarlarının karşılaştırma grafiği



Şekil 4.4. *B. sphaericus* CECT 5905, *B. megaterium* CECT 4096, *B. thuringiensis* CECT 4497, *B. thuringiensis* CECT 4454, *B. megaterium* CECT 370 türlerinin 20 saat boyunca 560 nm'de üreaz enzim miktarı değişim grafiği

B. sphaericus CECT 5905 zamana bağlı olarak 3. ve 18. saatlar arasında yüksek bir aktivite göstermektedir (**Tablo 4.2**).

Tablo 4.2. *B. sphaericus* CECT 5905 türünün en fazla aktivite gösterdiği zaman ve değerler

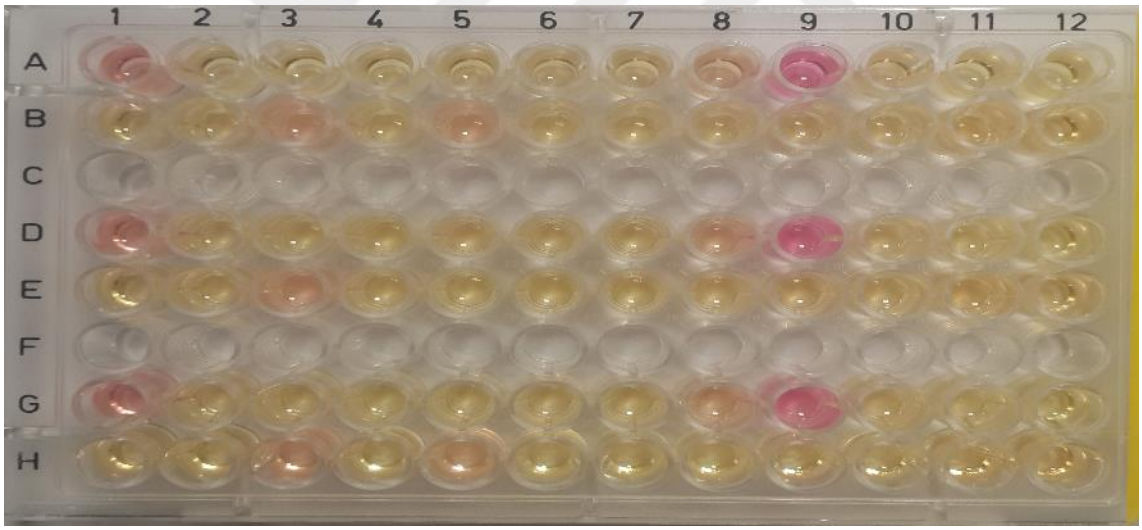
Zaman (s)	***B. sphaericus* CECT 5905 üreaz aktivitesi**
3	33,51219766
6	40,2809633
13	83,73790659
18	184,1847373

4.1.3. Sıcaklık stresi

Her mikroorganizmanın yaşayabildiği bir optimum sıcaklık değeri bulunmaktadır. Bu tezde kullanılan bakteri türlerinin en iyi şekilde çoğalabildiği ve fiziksel aktivite gösterebildiği sıcaklık 30°C olarak literatürde belirtilmektedir. Bu çalışmada, 42°C ve 25°C'de inkübe edilen bakterilerin üreaz aktivitesi incelendiğinde, *B. megaterium* CECT 370, *B. megaterium* CECT 4096, *B. thurungiensis* CECT 4454, *B. thurungiensis* CECT 4497 ve *B. sphaericus* CECT 5905 bakterisinin aktivite gösterdiği görülmektedir. Belirtilen bakterilerin 42°C'de 24. saat sonundaki absorbans değerleri **Tablo 4.3**'te verilmektedir. Elde edilen değerler, optimum koşullarda (30°C) gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında farklılıklar görülmektedir. Elde edilen değerler sonucunda çalışmada kullanılan tüm bakterilerin çoğalma hızlarının düştüğü belirlenmiştir.

Tablo 4.3. Üreaz aktivitesi gösteren bakterilerde 24 saat inkübasyon sonrası 42°C ve 30°C'deki aktivite değişim değerleri

Bakteri ismi	42°C sıcaklıkta Unit değerleri (U/ml)	30°C sıcaklıkta Unit değerleri (U/ml)
***B. sphaericus* CECT 5905**	60,64428691	208,4862385
***B. thurungiensis* CECT 4497**	36,92139283	89,18890742
***B. thurungiensis* CECT 4454**	43,5675563	103,8886572
***B. megaterium* CECT 4096**	48,65512927	160,998749
***B. megaterium* CECT 370**	47,39366138	83,12135113



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CECT 370	CECT 152	CECT 38	CECT 498	CECT 4313	CECT 44	CECT 4477	CECT 4096	CECT 5905	ATCC 29212	CECT 4495	CECT 193
B	CECT 4511	CECT 4512	CECT 4454	CECT 33	CECT 4497	CECT 197	ATCC 25922	ATCC 25923	ÜRE BROTH	ÜRE BROTH	ÜRESİZ BROTH	ÜRESİZ BROTH

Şekil 4.5. Mikroorganizmaların 30°C'de 1 gece inkübasyon sonucu plakada sarıdan pembeye renk değişimi, ☐ :Üreaz aktivitesi gösteren bakteri türleri

Optimum koşullarda (30°C) aktivite gösteren bakterilerin, sıcaklık etkisi ile aktivitelerinde belirgin derecede azalma görülmüştür. Cytation 3 cihazı ile 560 nm'de

yapılan spektrofotometrik ölçümlerde, *B. sphaericus* CECT 5905'in üreaz miktarı 208,4862385'ten 60,64428691'e, *B. thurungiensis* CECT 4497'nin üreaz miktarı 89,18890742'den 36,92139283'e, *B. thurungiensis* CECT 4454'ün üreaz miktarı 103,8886572'den 43,5675563'e, *B. megaterium* CECT 4096'nın üreaz miktarı 160,998749'dan 48,65512927'e, *B. megaterium* CECT 370'in üreaz miktarı 83,12135113'ten 47,39366138'e kadar azaldığı belirlenmiştir. Buna göre aktivitedeki en büyük azalma CECT 5905 ve CECT 4096'da görülmektedir.

4.1.4. pH stresi

Mikroorganizmalar bulundukları ortamda belirli bir pH değerinde yaşayabilmektedir. Bu nedenle ortamdaki pH değerinin yükselmesi ya da düşmesi, asidite veya alkalitede değişikliğe sebep olduğundan bakterinin yaşayabileceği optimum koşulları olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan çalışmada bu bilgilere dayanarak 2 farklı pH değeri seçilmiştir.

pH: 5,5, ortamın (pH:6,8) asiditesinin artırdığı için bakterilerin yaşama ve çoğalma faaliyetlerini etkilemiştir. Bu nedenle ortamın pH'ının düşmesine bağlı olarak bakterinin enzim aktivitesini de gerçekleştirememesine sebep olduğu düşünülmektedir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında Cytation 3 ile elde edilen veriler incelendiğinde gerek üreaz aktivite değerlerinde (560-430 nm) gerek bakteri konsantrasyonu (625 nm) değerlerinde başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında değişim gözlenmemiştir.

pH:7,5, ortamın (pH:6,8) alkalinitesini artırdığı için özellikle üreaz aktivitesine sahip bakterilerin fiziksel aktivitelerini az da olsa etkilemiştir. Ortamın alkanitesine bağlı olarak üreaz aktivitelerinde çok büyük bir değişiklik olmasa da aktivitede bir yükselme gözlenmiştir. Bakteri konsantrasyonunun artışının ise optimum koşullarda çoğalma düzeyiyle aynı olduğu saptanmıştır. Üreaz aktivitesi göstermeyen bakterilerde ise enzim aktivitesinde başlangıç değerleri ile aynı değerler elde edilmiştir. Bakteri konsantrasyonu ise optimum koşullardaki ile benzer değerler ile sonlanmıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, 2 farklı pH etkisi altında *B. sphaericus* CECT 5905 türü en iyi üreaz aktivitesi gösteren bakteri olarak belirlenmiştir. Düşük pH'ta diğer bakteri türleri gibi çoğalamamış ve aktivite göstermemiştir. Yüksek pH'ta ise

aktivitesinde belirgin olmayan bir artış gözlenmiştir. Fakat diğer bakteri türleri ile karşılaştırıldığında bu oran göze alınamayacak kadar küçük bir değerdedir.

4.1.5. Besin (maya özütü) stresi

Bu çalışmada, farklı maya özütü konsantrasyonlarında bakterilerin üreaz aktivitelerindeki değişim incelenmiştir. Maya özütü konsantrasyonu arttıkça üreaz aktivitesi göstermeyen bakterilerde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, üreaz aktivitesi gösteren bakterilerde ise aktivitede bir azalma görüldüğü belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak en yüksek aktiviteye sahip olan *B. sphaericus* CECT 5905 türü ile deney 3 kez tekrar edilmiştir. Tekrar testleri sonucunda zamana bağlı olarak maya özütü konsantrasyonu 5 g'dan 0,1 g'a doğru azaldıkça üreaz aktivitesinin arttığı görülmektedir. 0,1 g'dan sonra ise üreaz aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. Elde edilen değerler, **Tablo 4.4** ve **Şekil 4.6**'da verilmiştir.

5 g/l maya özütü içeren üre broth içerisinde üreyen *B. sphaericus* CECT 5905, yaklaşık 24 saat sonunda 116,5033 U/ml değerinde üreaz enzimi salgıladığı tespit edilmiştir. Elde edilen değerin, normal maya özütü konsantrasyonu (0,1 g/l-175,35 U/ml) içeren ortama göre düşük olduğu gözlenmiştir. Belirtilen ortamda yaklaşık 8. saatten sonra üreaz aktivitesinin başladığı belirlenmiştir (**Şekil 4.7**).

2,5 g/l maya özütü içeren üre broth içerisine inoküle edilmiş *B. sphaericus* CECT 5905'in, 24 saat sonunda 139,7519 U/ml değerinde üreaz enzimi salgıladığı tespit edilmiştir. Salgılanan enzim miktarı, 5 g/l maya özütü içeren ortama göre daha fazla iken, normal besin konsantrasyonu (0,1 g/l-175,35 U/ml) içeren ortama göre düşük olduğu belirlenmiştir. 5 g/l maya özütü içeren ortamda olduğu gibi bu ortamda da yaklaşık 8. saatten sonra üreaz aktivitesi başlamıştır (**Şekil 4.8**).

0,5 g/l maya özütü içeren üre broth içerisine inoküle edilmiş *B. sphaericus* CECT 5905'in, yaklaşık 173,1304 U/ml değerinde üreaz enzimi salgıladığı tespit edilmiştir. Bu ortamda elde edilen değerin, 5 ve 2,5 g/l maya özütü içeren ortama göre oldukça fazla olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.9**).

0,1 g/l maya özütü içeren üre broth içerisine inoküle edilmiş *B. sphaericus* CECT 5905'in, yaklaşık 175,3545 U/ml değerinde üreaz enzimi salgıladığı tespit edilmiştir. En iyi sonuç 0,1 g maya özütü içeren ortamdan elde edilmiştir. Yaklaşık 1. saatten itibaren

üreaz aktivitesi başlamıştır. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında, 5 ve 2,5 g/l maya özütüden oldukça yüksek üreaz aktivitesi görülürken, 0,5 g maya özütü içeren ortamdan ise çok az bir farkla artış gösterdiği belirlenmiştir (**Şekil 4.10**).

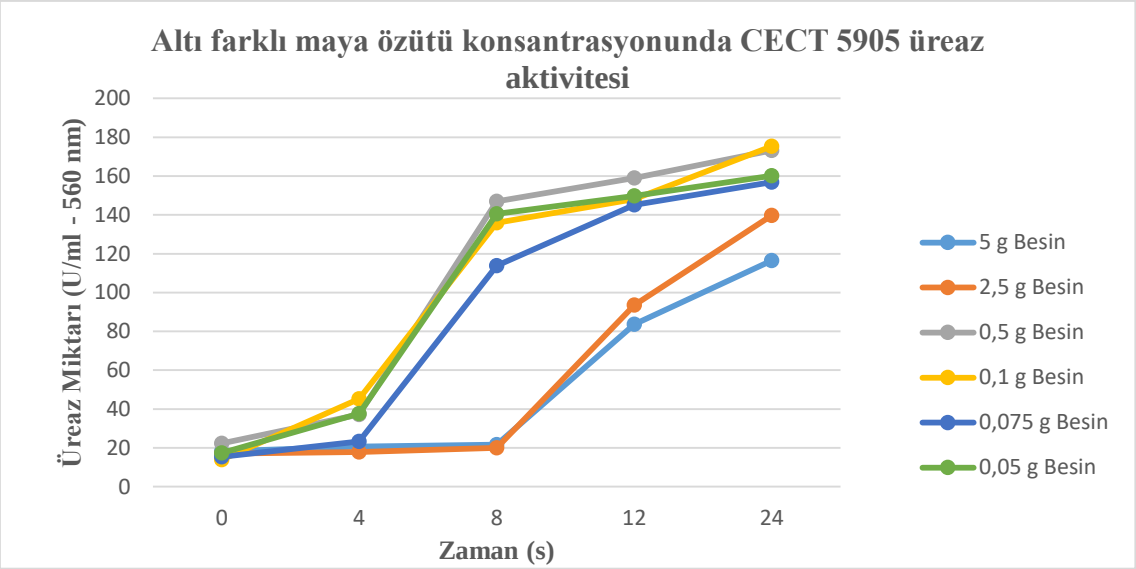
0,075 g/l maya özütü içeren üre broth içerisinde üreyen *B. sphaericus* CECT 5905'in, yaklaşık 24 saat sonunda 156,8669 U/ml değerinde üreaz enzimi salgıladığı tespit edilmiştir. Yaklaşık 2. saatten sonra üreaz aktivitesi başlamıştır. Elde edilen değerin, 0,1 g/l maya özütü içeren ortama göre düşük olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.11**).

0,05 g/l maya özütü içeren üre broth içerisinde üreyen *B. sphaericus* CECT 5905, yaklaşık 24 saat sonunda 160,0987 U/ml değerinde üreaz enzimi salgıladığı belirlenmiştir. Üreaz aktivitesi bu ortamda 1. saatten sonra başlamıştır. 0,075 g/l maya özütü içeren ortama göre aktivite artmıştır (**Şekil 4.12**).

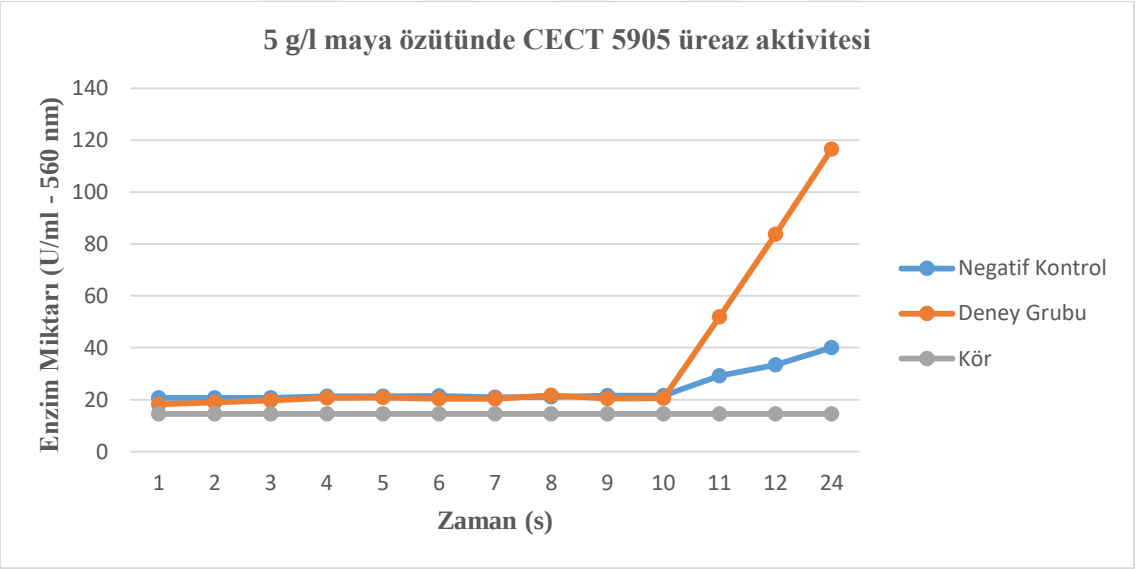
Tablo 4.4. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında *B. sphaericus* CECT 5905'in mikrobiyal aktivitesi ile üretilen üreaz enzim miktar değerleri

	Üreaz Miktarı (U/ml - 560 nm)					
Zaman (saat)	**5** g/l	**2,5** g/l	**0,5** g/l	**0,1** g/l	**0,075** g/l	**0,05** g/l
0	18,24437	17,04545	22,24076	13,96997	15,32527	17,37563
4	20,69433	17,87948	37,14901	45,24604	23,24854	37,63553
8	21,63261	20,01668	146,9975	135,8771	113,8796	140,5685
12	83,7156	93,4633	159,0214	148,1443	145,2252	149,8123
24	116,5033	139,7519	173,1304	175,3545	156,8669	160,0987

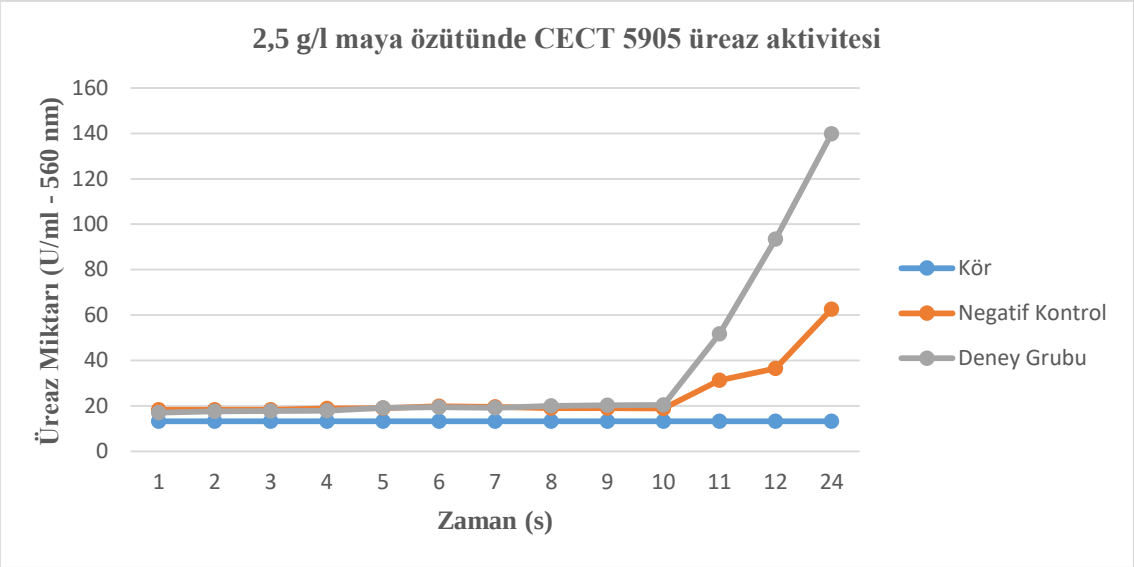
: En az üreaz aktivitesinin görüldüğü maya özütü konsantrasyonu, : En çok üreaz aktivitesinin görüldüğü maya özütü konsantrasyonu



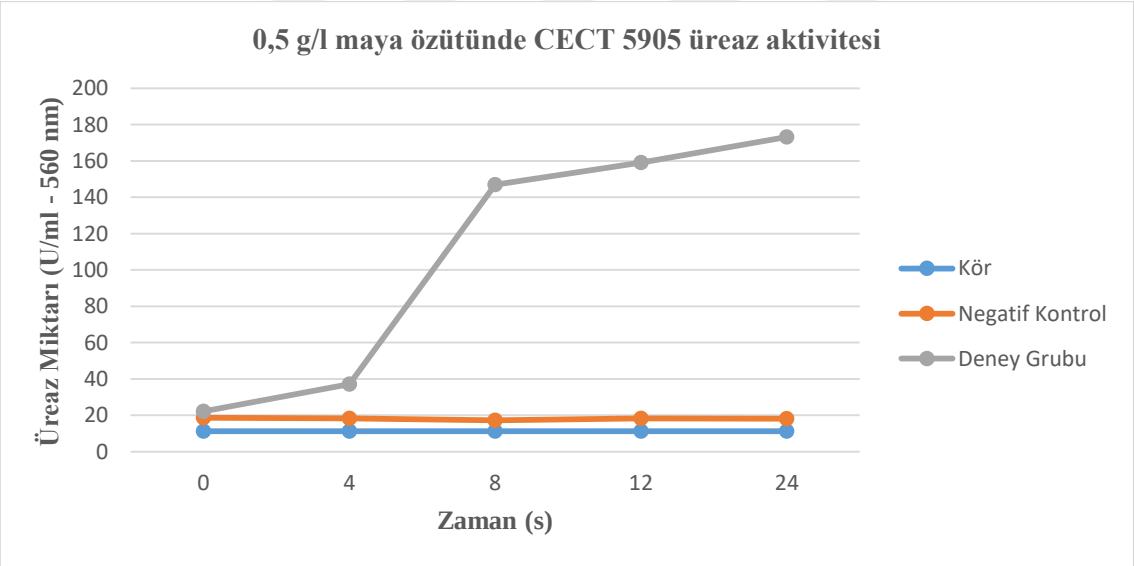
Şekil 4.6. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 5, 2,5, 0,5, 0,1, 0,075 ve 0,05 g/l maya özütü içeren ortamlarda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişimlerin karşılaştırma grafiği



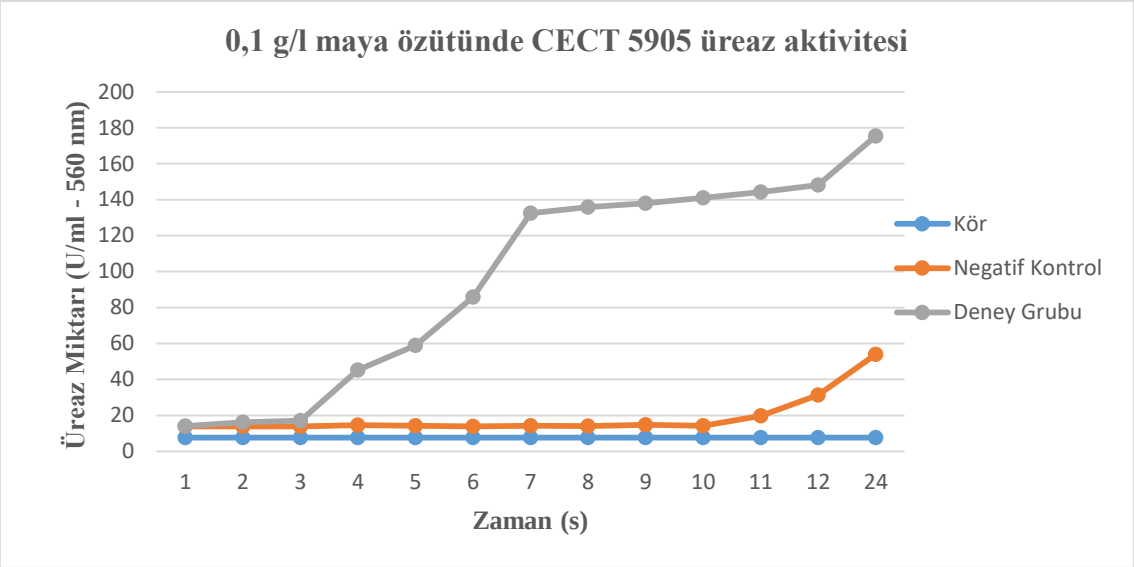
Şekil 4.7. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 5 g/l maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği



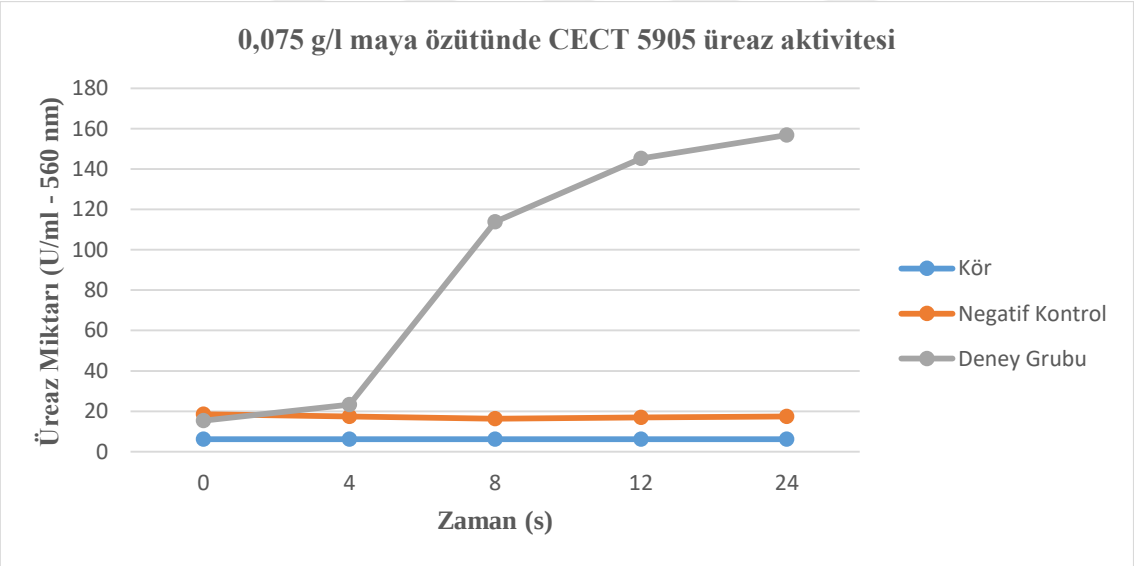
Şekil 4.8. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 2,5 g/l maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği



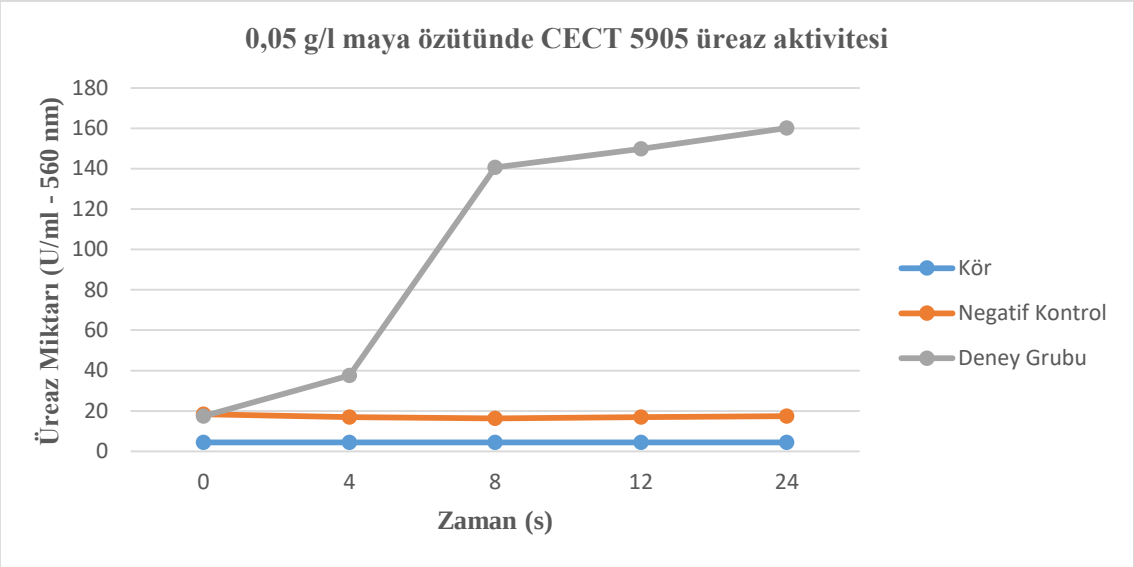
Şekil 4.9. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,5 g/l maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği



Şekil 4.10. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,1 g/l maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği



Şekil 4.11. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,075 g/l maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği



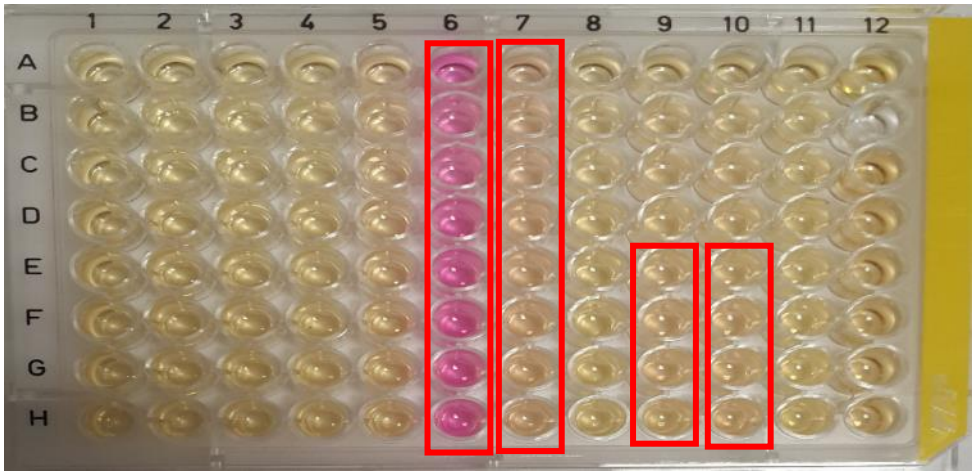
Şekil 4.12. *B. sphaericus* CECT 5905'in zamana bağlı olarak 0,05 g/l maya özütü içeren ortamda ürettiği üreaz enzimi miktarındaki değişim grafiği

4.1.6. Nikel iyonu etkisi

Nikel iyonu üreaz enziminin kofaktörüdür. Bu nedenle üreaz enziminin aktif bölgesine bağlanarak, enzimin faaliyetini hızlandırmaktadır. Yapılan çalışmada üreaz aktivitesi gösteren ve göstermeyen 11 bakteri seçilmiştir. Bu testinin yapılamasının esas amacı, üreaz aktivitesi göstermeyen *Bacillus* türlerinin, enzim aktivitesi gösterebilmeleri için Nikel kofaktörüne ihtiyaç duyabileceğinin düşünülmesi ve aktivite gösterenlerin ise nikel iyonu ile aktivitesinin artırılıp artırılmayacağının belirlemesidir. Belirlenen hedefe uygun olarak 8 farklı nikel konsantrasyonu belirlenmiştir. Nikel çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının bakterilerin üreaz aktivitesi üzerine etkisi **Şekil 4.13**'te gösterilmektedir.

30°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası üreaz aktivitesi göstermeyen bakterilerde yine bir değişiklik gözlenmemiştir. Üreaz aktivitesi gösteren *B. megaterium* CECT 370, *B. thurungiensis* CECT 4497, *B. megaterium* CECT 4096 ve *B. sphaericus* CECT 5905 türlerinde ise nikel iyonu üreaz aktivitelerinde azalma meydana getirmiştir.

50 µl Ni
40 µl Ni
30 µl Ni
25 µl Ni
20 µl Ni
10 µl Ni
5 µl Ni
0 µl Ni



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CECT 4511	CECT 4512	CECT 33	CECT 197	CECT 152	CECT 5905	CECT 4096	CECT 4477	CECT 370	CECT 4497	ATCC 25923	KONTROL SERİSİ

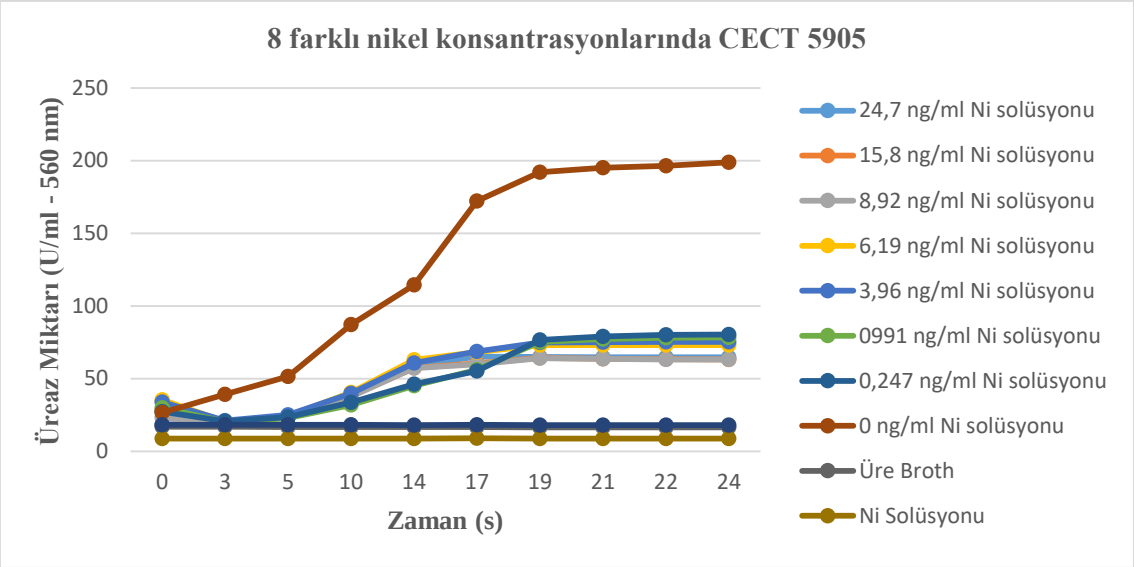
Şekil 4.13. Nikel iyonu içeren üre broth'ta, bakterilerin 30°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası gösterdikleri üreaz aktivite görüntüsü, □ : En çok üreaz aktivitesinin görüldüğü bakteri türleri ve nikel konsantrasyonları

B. sphaericus CECT 5905, nikel çözeltisinin tüm konsantrasyonlarında aktivite göstermiştir (**Şekil 4.14** ve **Tablo 4.5)**. Nikel konsantrasyonu azaldıkça, üreaz aktivitesi artmıştır. 24 saat sonunda 24,7 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 64,66847373 U/ml değerinde, 15,8 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 63,24020017 U/ml değerinde, 8,92 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 63,19849875 U/ml değerinde, 6,19 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 73,14428691 U/ml değerinde, 3,96 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 75,18765638 U/ml değerinde, 0,991 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 78,41951626 U/ml değerinde, 0,247 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 80,42118432 U/ml değerinde ve nikel solüsyonu içermeyen ortamda ise 198,8323603 U/ml değerinde üreaz aktivitesi göstermiştir. En yüksek aktivite nikel solüsyonu içermeyen ortamda görülmüştür.

Tablo 4.5. *B. sphaericus* CECT 5905'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri

ZAMAN (s)	50 µl Ni solüsyonu (24,7 ng/ml)	40 µl Ni solüsyonu (15,8 ng/ml)	30 µl Ni solüsyonu (8,92 ng/ml)	25 µl Ni solüsyonu (6,19 ng/ml)	20 µl Ni solüsyonu (3,96 ng/ml)	10 µl Ni solüsyonu (0,991 ng/ml)	5 µl Ni solüsyonu (0,247 ng/ml)	0 µl Ni solüsyonu (0 ng/ml)
0	18,390 32527	28,461 21768	23,029 60801	35,498 33194	33,944 95413	29,879 06589	27,356 13011	26,532 52711
3	19,516 26355	20,141 78482	19,484 98749	20,496 24687	21,090 49208	20,423 26939	20,767 30609	39,178 48207
5	23,269 39116	23,686 40534	22,914 92911	24,165 97164	25,020 85071	22,831 52627	23,477 89825	51,428 27356
10	38,928 27356	38,188 07339	37,666 80567	40,471 22602	39,824 85405	31,912 01001	33,569 64137	87,270 6422
14	58,903 25271	57,506 25521	57,287 32277	63,031 69308	60,800 66722	45,068 80734	46,236 44704	114,44 95413
17	65,064 6372	60,602 58549	59,768 55713	68,338 1985	68,630 10842	56,223 93661	55,296 08007	172,26 85571
19	64,929 10759	64,334 86239	64,032 52711	73,113 01084	74,760 21685	75,271 05922	76,574 22852	192,00 37531
21	64,762 30192	63,719 76647	63,542 53545	73,154 71226	75,020 85071	77,304 00334	79,086 73895	195,16 26355
22	64,710 17515	63,344 45371	63,240 20017	73,113 01084	75,187 65638	78,211 00917	80,108 42369	196,45 53795
24	64,668 47373	63,240 20017	63,198 49875	73,144 28691	75,187 65638	78,419 51626	80,421 18432	198,83 23603

: En az üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu, : En çok üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu



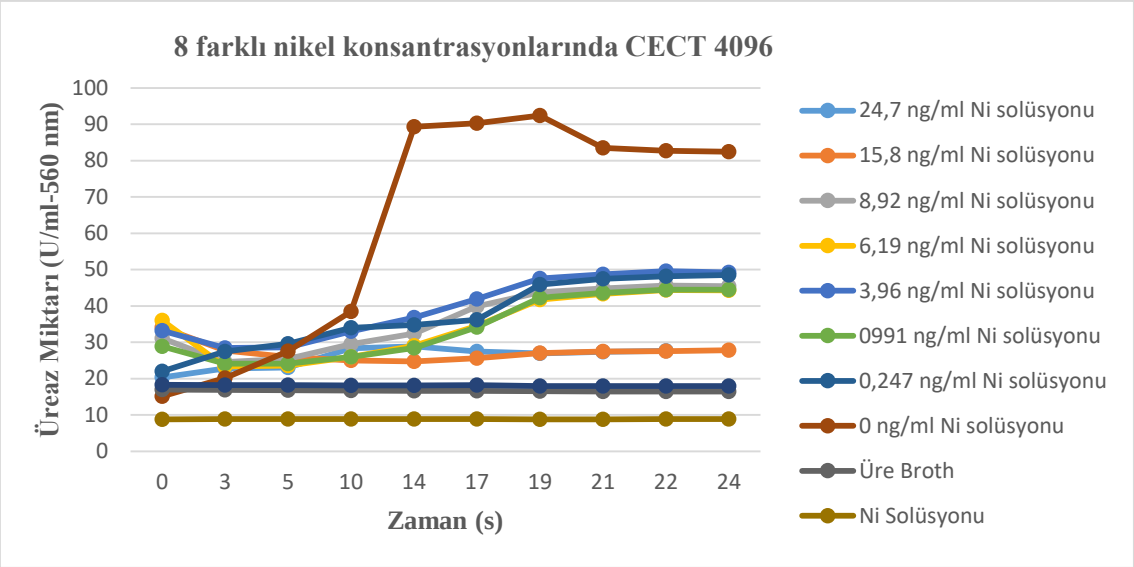
Şekil 4.14. *B. sphaericus* CECT 5905'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği

B. megaterium CECT 4096 türünde nikel çözeltisinin tüm konsantrasyonlarında aktivite görülmüştür (**Şekil 4.15** ve **Tablo 4.6**). 24 saat sonunda 24,7 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 27,74187 U/ml değerinde, 15,8 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 27,85655 U/ml değerinde, 8,92 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 45,4754 U/ml değerinde, 6,19 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 44,32861 U/ml değerinde, 3,96 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 49,19724771 U/ml değerinde, 0,991 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 44,51626355 U/ml değerinde, 0,247 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 48,498748968 U/ml değerinde ve nikel solüsyonu içermeyen ortamda 82,46455 U/ml değerinde üreaz aktivitesi göstermiştir. Elde edilen bu değerlere göre en iyi aktivitenin nikel içermeyen ortamda görüldüğü gözlenmiştir. Ayrıca nikel içeren ortamlarda ise, 3,96 ng/ml nikel konsantrasyonuna sahip ortamda 2. en iyi aktivite oranın olduğu belirlenmiştir. Aktivite oranları ortamların konsantrasyon içeriğine göre farklılık göstermektedir. Bu bilgiler ışığında, *B. megaterium* CECT 4096 için üreaz aktivitesini artırmak için en iyi nikel konsantrasyonunun 3,96 ng/ml olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6. *B. megaterium* CECT 4096'nın aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri

ZAMAN (s)	50 µl Ni solüsyonu (24,7 ng/ml)	40 µl Ni solüsyonu (15,8 ng/ml)	30 µl Ni solüsyonu (8,92 ng/ml)	25 µl Ni solüsyonu (6,19 ng/ml)	20 µl Ni solüsyonu (3,96 ng/ml)	10 µl Ni solüsyonu (0,991 ng/ml)	5 µl Ni solüsyonu (0,247 ng/ml)	0 µl Ni solüsyonu (0 ng/ml)
0	20,33987	34,03878	31,11968	35,99875	33,23603003	28,90950792	21,98707256	15,13761
3	22,81068	27,77314	24,56214	23,33194	28,40909091	24,09299416	27,51251043	20,16264
5	23,09216	26,01126	25,46914	23,61343	28,59674729	24,10341952	29,60800667	27,57506
10	28,37781	25	29,49333	25,95913	33,01709758	26,01125938	33,9970809	38,51126
14	28,84696	24,77064	32,39158	29,06589	36,81192661	28,45079233	34,77898249	89,31401
17	27,48123	25,59425	39,86656	34,50792	41,90992494	34,19516264	36,17597998	90,30442
19	26,91827	27,00167	43,77606	41,78482	47,53961635	42,31651376	45,87155963	92,38949
21	27,37698	27,50209	44,83945	43,3382	48,66555463	43,59883236	47,48748957	83,47581
22	27,62719	27,60634	45,65263	44,38073	49,61426188	44,5058382	48,17556297	82,74604
24	27,74187	27,85655	45,4754	44,32861	49,19724771	44,51626355	48,49874896	82,46455

: En az üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu, : En çok üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu



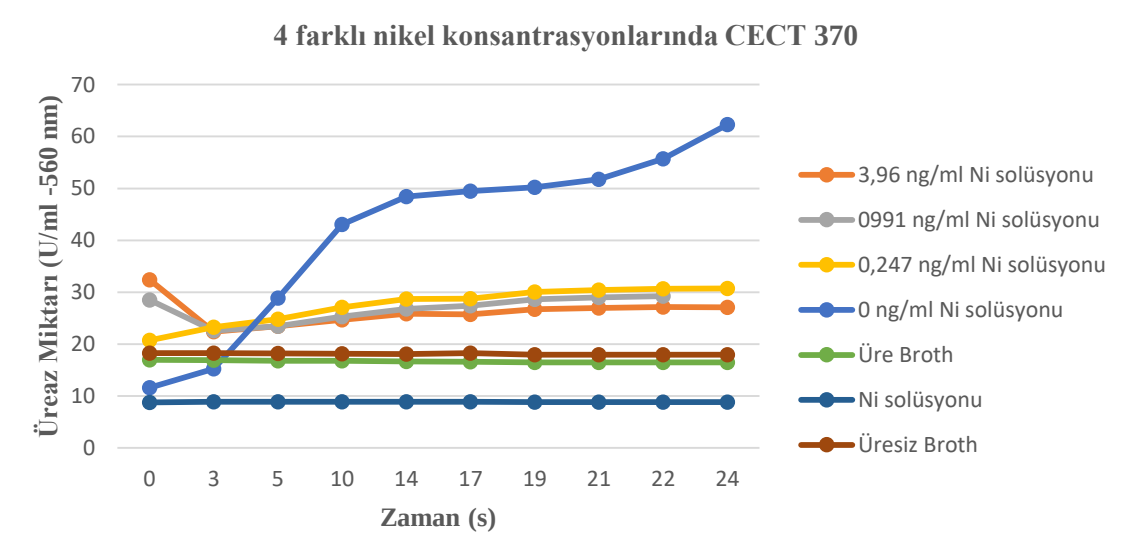
Şekil 4.15. *B. megaterium* CECT 4096'nın aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği

B. megaterium CECT 370 bakterisi, 24 saat sonunda nikel çözeltisinin son 4 konsantrasyonunda (3,96 ng/ml, 0,991 ng/ml, 0,247 ng/ml, 0 ng/ml) aktivite göstermiştir (**Şekil 4.16** ve **Tablo 4.7)**. 3,96 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 27,11635 U/ml değerinde, 0,991 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 29,32652 U/ml değerinde, 0,247 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 30,71309 U/ml değerinde ve nikel solüsyonu içermeyen ortamda 62,30192 U/ml değerinde üreaz aktivitesi göstermiştir. En yüksek aktivite nikel solüsyonu içermeyen ortamda görülmüştür. Nikel solüsyonu içeren ortamlarda ise konsantrasyon azaldıkça, üreaz aktivitesi artmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *B. megaterium* CECT 370 için nikel kofaktörünün üreaz aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4.7. *B. megaterium* CECT 370'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri

ZAMAN (s)	20 µl Ni solüsyonu (3,96 ng/ml)	10 µl Ni solüsyonu (0,991 ng/ml)	5 µl Ni solüsyonu (0,247 ng/ml)	0 µl Ni solüsyonu (0 ng/ml)
0	32,402	28,51334	20,7256	11,58257
3	22,41451	22,56047	23,29024	15,24187
5	23,44662	23,4779	24,80192	28,89908
10	24,69766	25,28148	27,0955	43,04629
14	25,83403	26,81401	28,68015	48,44662
17	25,75063	27,42911	28,77398	49,46831
19	26,74103	28,62802	30,04587	50,19808
21	26,93912	28,99291	30,44204	51,73061
22	27,12677	29,25354	30,66097	55,72352
24	27,11635	29,32652	30,71309	62,30192

: En az üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu, : En çok üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu



Şekil 4.16. *B. megaterium* CECT 370'in aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği

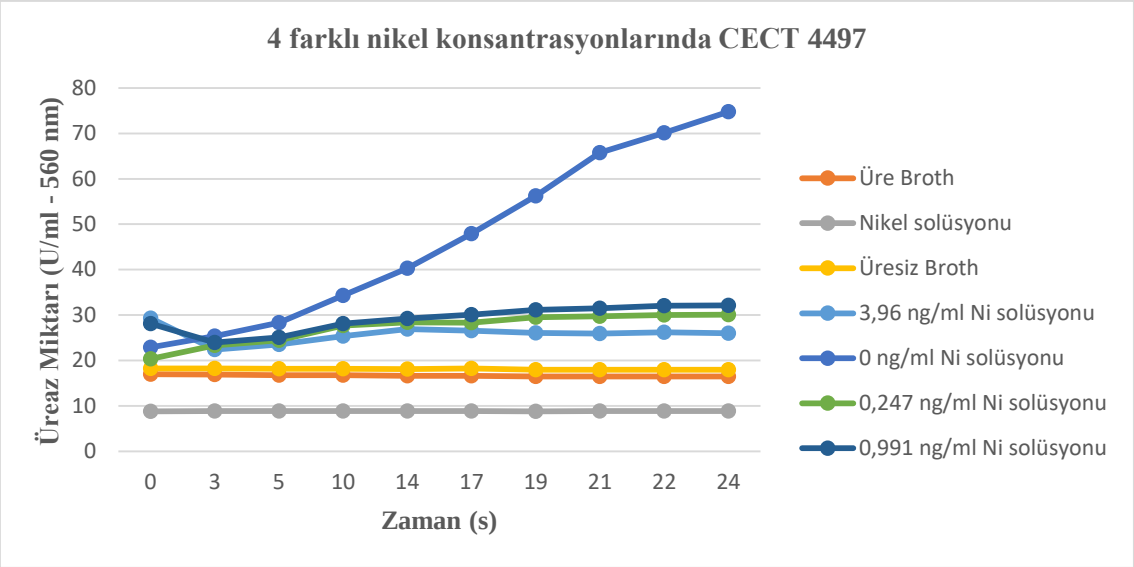
B. thurungiensis CECT 4497 bakterisi, 24 saat sonunda nikel çözeltisinin son 4 konsantrasyonunda (3,96 ng/ml, 0,991 ng/ml, 0,247 ng/ml, 0 ng/ml) aktivite

göstermiştir (**Şekil 4.17** ve **Tablo 4.8)**. 3,96 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 25,96955796 U/ml değerinde, 0,991 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 32,11009174 U/ml değerinde, 0,247 ng/ml konsantrasyonundaki nikel solüsyonu içeren ortamda 30,07714762 U/ml değerinde ve nikel solüsyonu içermeyen ortamda 74,73936614 U/ml değerinde üreaz aktivitesi göstermiştir. En yüksek aktivite nikel solüsyonu içermeyen ortamda görülürken, 2. iyi aktivite 0,991 ng/ml nikel konsantrasyonuna sahip ortamda gözlenmiştir.

Tablo 4.8. *B. thurungiensis* CECT 4497'nin aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişen üreaz miktarı değerleri

ZAMAN (s)	**20 µl Ni solüsyonu (3,96 ng/ml)**	**10 µl Ni solüsyonu (0,991 ng/ml)**	**5 µl Ni solüsyonu (0,247 ng/ml)**	**0 µl Ni solüsyonu (0 ng/ml)**
0	29,31609675	28,13803169	20,33986656	22,87322769
3	22,38323603	23,93661384	23,29024187	25,36488741
5	23,49874896	25,1146789	24,45788157	28,30483736
10	25,33361134	28,13803169	27,72101751	34,3411176
14	26,92869058	29,26396997	28,41951626	40,27314429
17	26,58465388	30,07714762	28,33611343	47,92535446
19	26,07381151	31,10925771	29,5558799	56,21351126
21	25,95913261	31,51584654	29,75396163	65,73185988
22	26,19891576	32,06839033	30,00417014	70,12093411
24	25,96955796	32,11009174	30,07714762	74,73936614

: En az üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu, : En çok üreaz aktivitesinin görüldüğü nikel konsantrasyonu



Şekil 4.17. *B. thurungiensis* CECT 4497'nin aktivite gösterdiği nikel konsantrasyonlarındaki üreaz miktarı-zaman grafiği

Bu çalışmada potansiyel biyolojik üreaz aktivitesine sahip olduğu düşünülen 18 bakteri örneği test edilmiştir. Bakterilerin biyolojik üreaz aktivileri üre broth besiyerinde, ortamdaki renk değişimi kullanılarak belirlenmiştir. Üreaz aktivitesi sonucu zamana bağlı oluşan ortamdaki renk değişimi, spektrofotometrik olarak okunan absorbans değerlerine göre belirlenmiştir.

Sonuç olarak elde edilen verilerde sadece 5 bakteri üreaz pozitiftir. En yüksek üreaz aktivitesine sahip *B. sphaericus* CECT 5905 ile yapılmış, nikel kofaktör etkisi ise üreaz aktivitesi gösteren tüm bakteriler ve göstermeyen birkaç bakteri üzerinde denenmiştir.

Sıcaklık, pH, kofaktör gibi ortam şartlarının enzimlerin aktivite oranını etkilediği literatürde belirtilmektedir (Grahame ve ark., 2015). Çalışmamızda, pH'nın mikrobiyal üreaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, nötral pH'a sahip üre broth besiyerinde pH değişikliği yapılarak, optimum değerin (pH: 6,8) alt ve üst değerleri denenmiştir. Denenen değerlerde asiditenin artmasına bağlı olarak mikrobiyal üreaz aktivitesinde düşüş gözlenirken, pH'ın yüksek olduğu ortamda ise belirgin olmasa da bir yükseliş olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara paralel olarak, Eed (2012) yaptığı çalışmada belirlediği bir enzim için, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin alt ve üst sınırlarını deneyerek etkinliklerini incelemiş ve optimum değerler değiştirildiğinde aktivitenin düştüğünü gözlemlemiştir. Ayrıca çalışmamızda, mikrobiyal üreaz aktivitesi üzerine

sıcaklık etkisi incelenmiş ve bakterinin yaşayabildiği optimum sıcaklık (30°C) üzerine çıkıldığında, aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Burada hem bakteri hem de enzim sıcaklıktan etkilendiği için, her iki faktör için optimum sıcaklığın, aktivitenin en yüksek düzeyde sıcaklık olduğu düşünülmektedir. Literatürde de mikrobiyal enzim aktivitesinde optimum sıcaklık değiştiğinde enzim aktivitesinin de değiştiği belirtilmektedir (Williams ve ark., 2002). Üreaz enziminin kofaktörü çoğunlukla nikel iyonudur (Smyj, 1997). Bu nedenle çalışmada, ortama farklı konsantrasyonlarda nikel solüsyonu eklenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, çalışılan türler arasında nikel kofaktörünün, üreaz aktivitesinde etkin bir rol oynamadığı belirlenmiştir. Fakat literatürde *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmada, nikel bağlı üreaz enziminin daha fazla aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Milne ve ark., 2015). Ayrıca diğer bir çalışmada, beton örneklerine eklenen *B. cohnii* ve *B. megaterium* bakterilerinin nikel solüsyonunun düşük dozunu içeren ortamda üreaz aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir (Chaurasia ve Verma, 2014). Bu bağlamda, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların literatüre göre farklı olmasının sebebi, bakteriyel üreaz enziminin nikel bağımlı olmadığı yönündedir. Literatürde, üreaz enziminin kofaktörü olarak Ni'in yanında Co ve Mn olduğu da belirtilmektedir (Carter ve ark., 2009). Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda bakteriyel enzim aktivitesi üzerine belirtilen metal iyonlarının etkisi incelenecektir.

Bununla birlikte bu çalışmada, besin (maya özütü) konsantrasyonunun üreaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuçta zamana bağlı olarak maya özütü konsantrasyonu 5 g/l'den 0,1 g/l'e doğru azaldıkça üreaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. 0,1 g/l'den sonra ise üreaz aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, maya özütü miktarının fazla olması, bakterinin çoğalma aktivitesini hızlandırırken, enzim aktivitesine çok fazla etki etmediği yönündedir. Bunun yanında besinin azalması ile bakteri besin stresine gireceği için, ortamdaki üreyi parçalayarak besinini ondan sağlamak isteyeceği ve bu nedenle üreaz aktivitesi göstererek üreyi parçalayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, ileride yapılacak çalışmalar için optimize prosedür niteliği taşımakta olup, deneyler bu veriler kullanılarak gerçekleştirilecektir.

4.2. Farklı Üre ve $CaCl_2$ Konsantrasyonlarında Mikrobiyal $CaCO_3$ Oluşumu ve Mikroskobik Olarak İncelenmesi

4.2.1. Plakada $CaCO_3$ oluşturma ve mikroskobik inceleme

1 ve 0,75 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren kuyucuklarda hiçbir üreme ve $CaCO_3$ oluşumu gözlemlenmemiştir. Üreme olmamasının sebebinin klor miktarının fazla olması ve öldürücü etkisinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

0,5 ve 0,25 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren kuyucuklarda ise bakteri eklenen gruplarda üreme gözlenmiştir. A1, A2 ve A3 gruplarında hem üreme hem de $CaCO_3$ oluşumu gözlenmiştir. C1 grubunda ise üreme olurken $CaCO_3$ oluşumu gerçekleşmemiştir.

0,25 M üre-$CaCl_2$ çözeltisinde, 0,5 M üre-$CaCl_2$ çözeltisine göre daha fazla kristalin oluşumu gözlenmiştir.

1, 0,75, 0,5 ve 0,25 M üre-$CaCl_2$ çözeltisi için, A1, A2, A3 ve C1 gruplarında kalsit ve vaterit (tetragonal ve yuvarlak kristal) görünümü, D1 gruplarında ince camsı ve yassı görünüme sahip aragonit yapısı olarak gözlemlenmiştir.

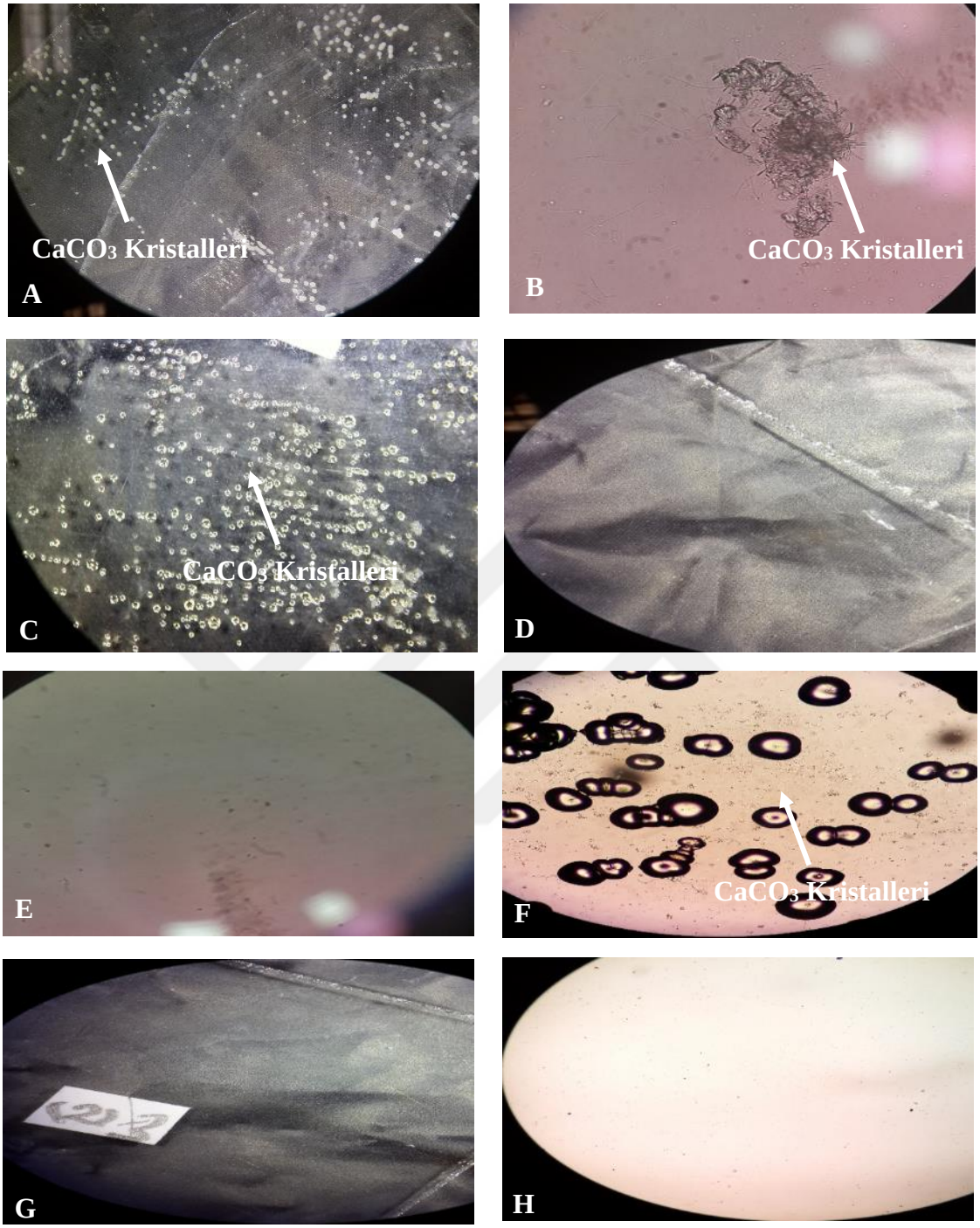
İşlem sonrasında lam ve kuyucuklarda görülen değişiklikler **Şekil 4.18**'de gösterilmiştir.

4.2.2. Şırıngada $CaCO_3$ oluşturma ve mikroskobik inceleme

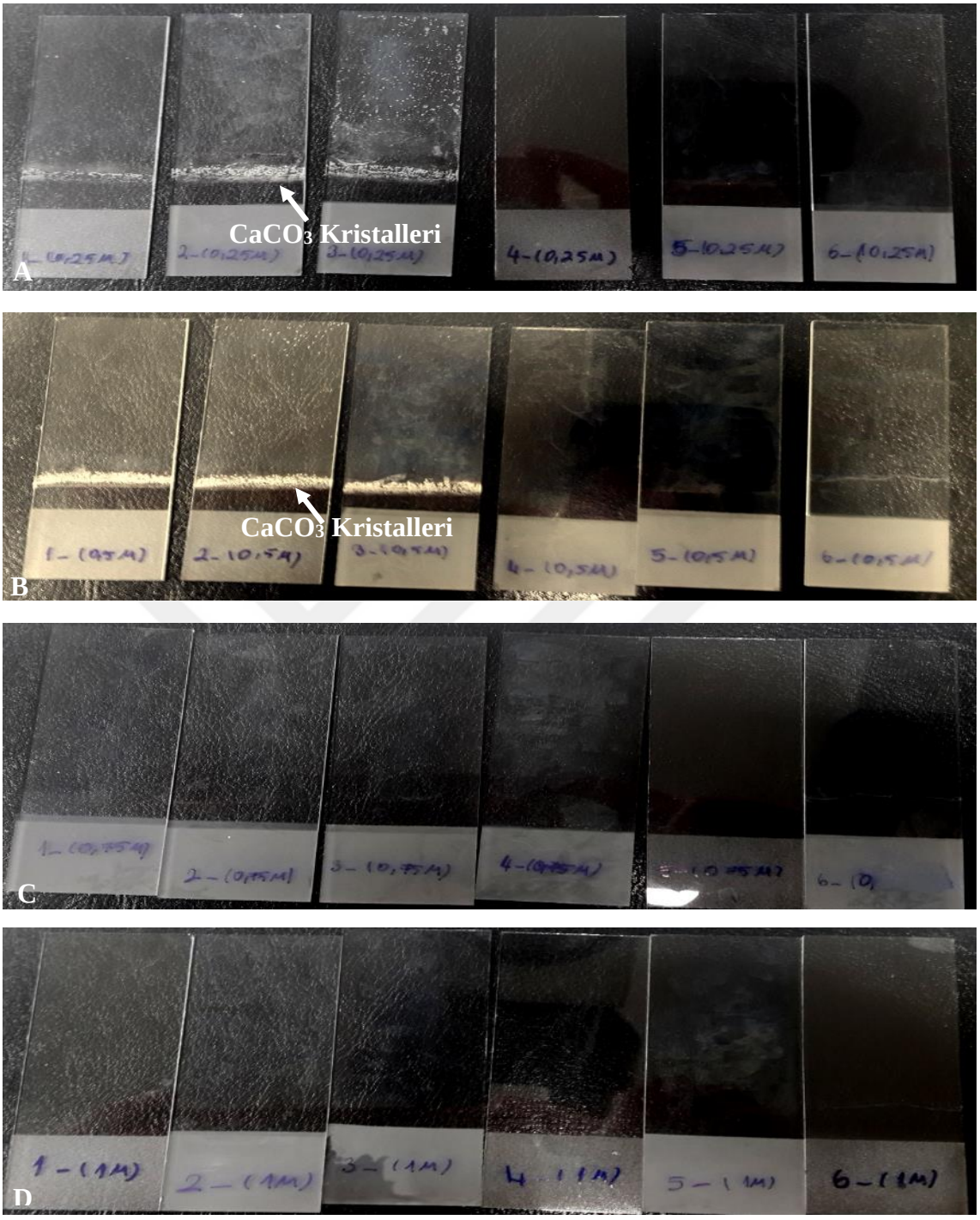
0,25 ve 0,5 M üre-$CaCl_2$ çözeltileri içerisinde $CaCO_3$ kristallerinin oluşumu gözlenmiştir. Şırınga yüzeyi, tabanı ve lam yüzeylerine kristaller belirlenmiştir (**Şekil 4.19A-B**).

0,75 ve 1 M üre-$CaCl_2$ çözeltileri içerisinde diğer iki deneyde olduğu gibi herhangi bir üreme ve kristal oluşumu gözlenmemiştir (**Şekil 4.19C-D**).

Tüm deney gruplarının B1 gruplarında üreme gözlenmezken, C1 gruplarında üreme gözlemlenmiş fakat kristal oluşumu belirlenmemiştir. D1 gruplarda ise diğer iki deneyde olduğu gibi yassı kırılgan ve yüzeye yapışmayan kristal oluşumu gözlenmiştir (**Şekil 4.18**).



Şekil 4.18. A; 0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 lam stereo mikroskop görüntüsü, B;0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 lam ışık mikroskobu görüntüsü, C; 0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 kuyucuk stereo mikroskop görüntüsü, D; 0,5 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam ışık mikroskobu görüntüsü, E; 0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam ışık mikroskobu görüntüsü, F; 0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A2 lam stereo mikroskop görüntüsü, G; 1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam stereo mikroskop görüntüsü, H; 1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi, A3 lam ışık mikroskobu görüntüsü



Şekil 4.19. A; 0,25 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile muamele edilen lam grupları, B; 0,5 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile muamele edilen lam grupları, C; 0,75 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile muamele edilen lam grupları, D; 1 M Üre-$CaCl_2$ çözeltisi ile muamele edilen lam grupları

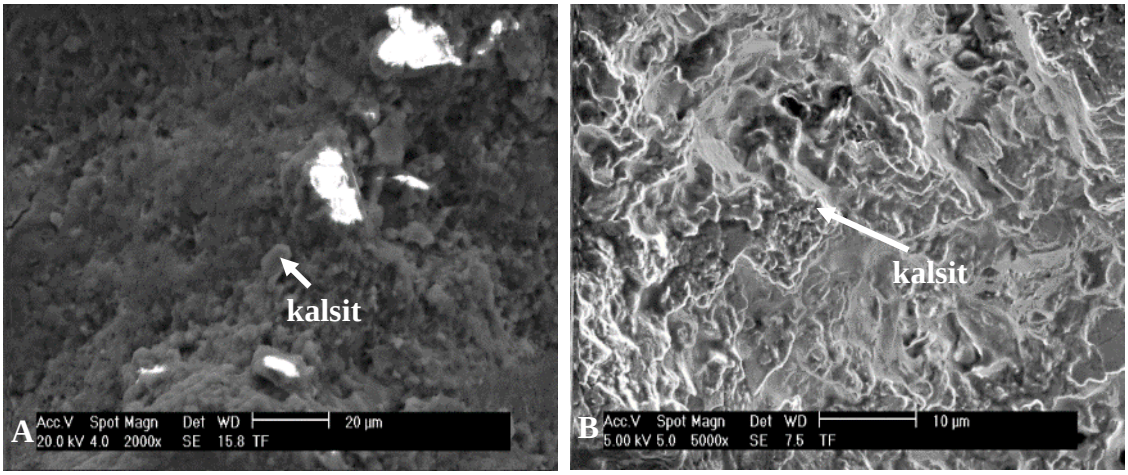
Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, 4 farklı üre-$CaCl_2$ konsantrasyonunda en iyi sonuç 0,25 M ve 0,5 M'da gözlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Bacillus* türü bakterilerin çoğunun 1 M konsantrasyondaki üre-$CaCl_2$ çözeltisinde mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşumu gerçekleştirdiği ve çoğalmalarında da herhangi bir problem olmadığı gözlenmiştir. Bunun yanında De Muynck ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, 0,3 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren ortamda *B. sphaericus* bakterisinin üreaz aktivitesi sonucu, ortamdaki NH_3 oluşumunu artırdığı ve Ca^{+2} iyonunun azaltarak $CaCO_3$ oluşumunu gerçekleştirdiğini belirlemiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların kullanılan solüsyonların eşit molariteye sahip olması açısından, De Muynck ve ark.'nın (2010) yaptığı sonuçlar ile benzer olduğu görülmektedir. 0,75 M ve 1 M konsantrasyondaki üre-$CaCl_2$ çözeltisinde $CaCO_3$ oluşumunun gözlenmemesi ve üremenin olmamasının sebebinin, ortamda konsantrasyona bağlı Cl^- iyonunun fazlalığı olduğu düşünülmektedir. Cl'un, literatürde etkili bir dezenfektan olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Özellikle, havuzların ve atık depolarının temizlenmesinde Cl içeren bileşikler kullanılarak, dezenfeksiyon sağlanmaktadır (Nemery ve ark., 2002). Belirtilen durumlar göz önüne alındığında, 0,75 M ve 1 M konsantrasyondaki üre-$CaCl_2$ çözeltisi içeren ortama eklenen bakterinin, üreme aktivitesi gösterememiş ve buna bağlı olarak $CaCO_3$ oluşumunu da gerçekleştirememiş olabileceği düşünülmektedir. Bundan sonraki çalışmalar, bu bölümde elde edilen sonuçlara göre gerçekleştirilecektir.

4.3. Kum kolonlarında $CaCO_3$ oluşturulması ve SEM ile incelemesi

4.3.1. Kum kolonlarının SEM görüntüleri

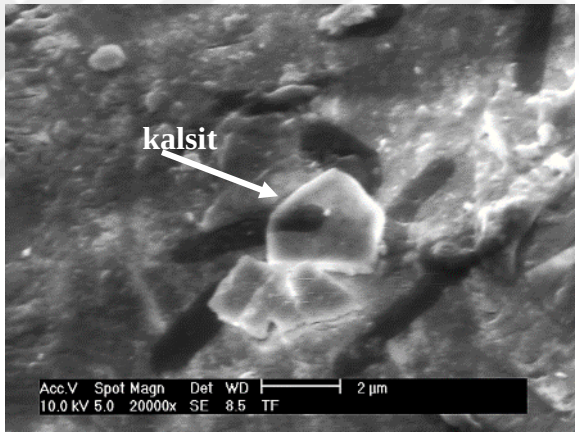
Numunelerin SEM görüntüleri incelendiğinde, her grupta iyileştirmeler sonucunda farklı $CaCO_3$ formlarının oluştuğu belirlenmiştir.

Grup 1'de çoğunlukla toplu halde bulunan partikül yüzeylerine yapışmış $CaCO_3$ kristalleri gözlenmiştir (**Şekil 4.20A-B**).



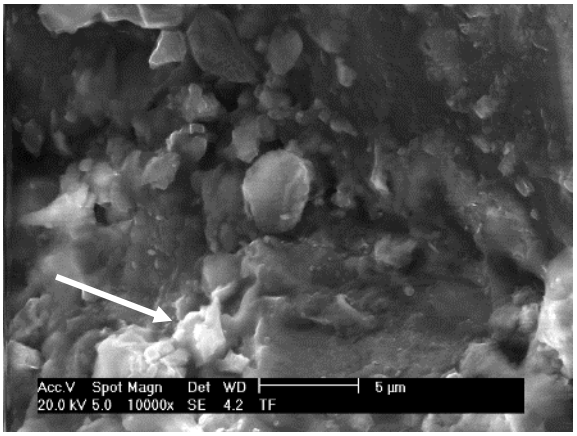
Şekil 4.20. A, B; Partikül yüzeyine tutunmuş kalsit kristalleri

Grup 2'de $CaCO_3$ kristallerinin kalsit formları belirlenmiştir. Oluşan kristal yapıları az sayıda ve düzensiz formdadır. Altın platin ile kaplanmış örnekler, kaplanmamış şekilleriyle karşılaştırıldığında fark gözlenmemiştir (**Şekil 4.21**).



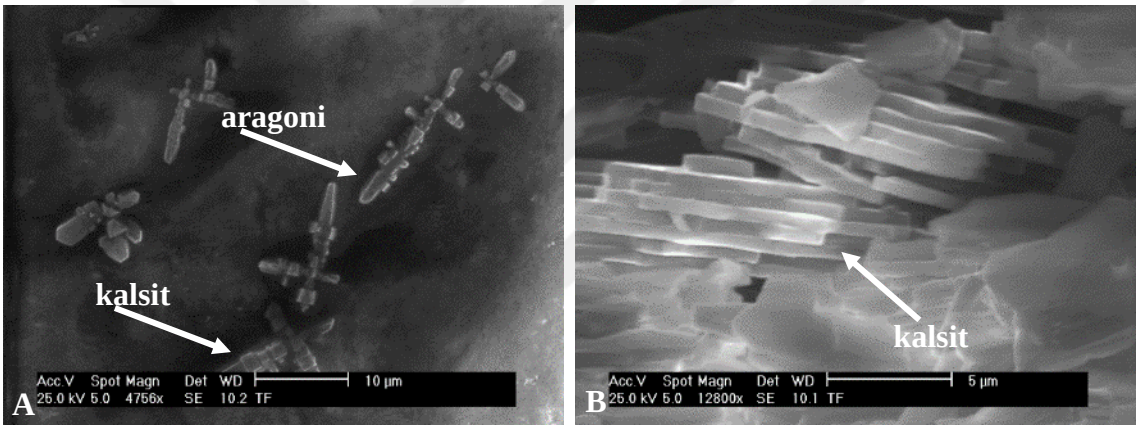
Şekil 4.21. Düzensiz formdaki kalsit yapıları

Grup 3'te çoğunlukla toplu halde bulunan partikül yüzeylerine yapışmış $CaCO_3$ kristalleri gözlenmiştir (**Şekil 4.22**).



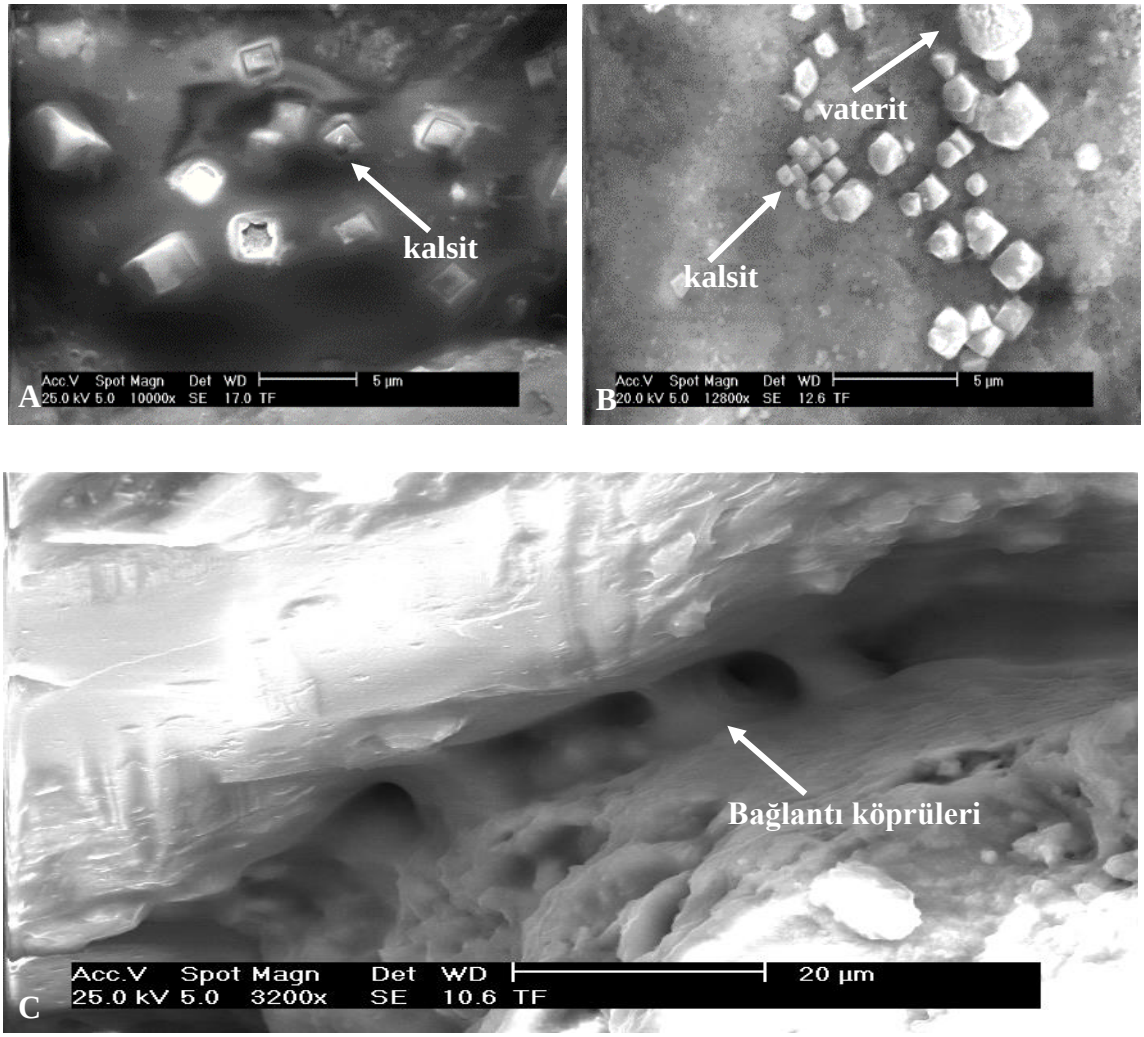
Şekil 4.22. Partikül yüzeylerine tutunmuş düzensiz formdaki $CaCO_3$ kristalleri

Grup 4'te $CaCO_3$ kristallerinin çoğunlukla aragonit formları gözlenmiştir (**Şekil 4.23A-B**).



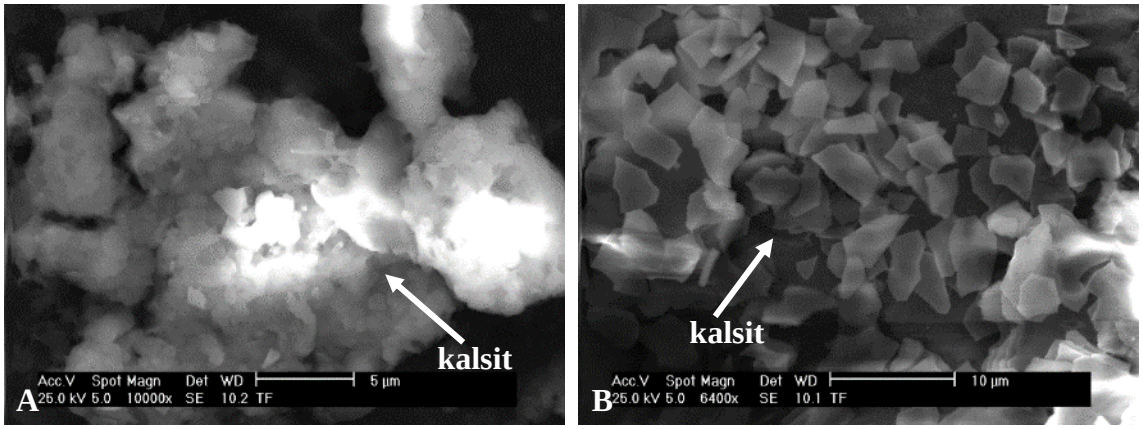
Şekil 4.23. A; aragonit ve kalsit formlarının birleşmesi, B; yığın halde bulunan kalsit formları

Grup 5'te $CaCO_3$ kristallerinin kalsit, aragonit ve vaterit formları görülmüştür. Çoğunlukla kalsit formunda bulunan kristaller partiküller arasında bol miktarda bulunmaktadır. Aynı zamanda partiküller arasında $CaCO_3$ kristalleri ile bağlantı köprüleri oluşmuştur. Kaplama yapılan örneklerde kalsit kristalleri net olarak görülebilmektedir (**Şekil 4.24A-B-C**).



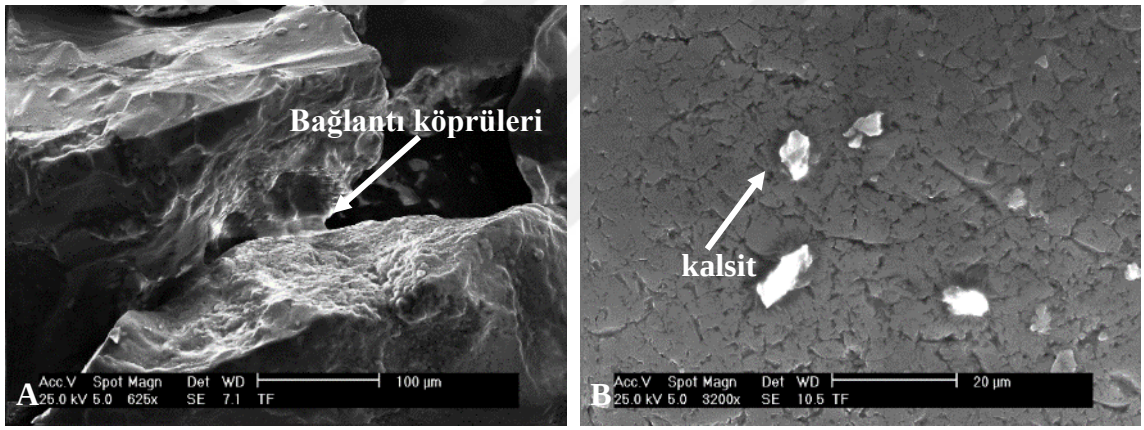
Şekil 4.24. A; düzenli ve kırılmamış kalsit formları, B; vaterit ve kalsit formları, C; iki partikül arasındaki bağlantı köprüleri

Grup 6'da altın platin kaplama yapılmamış örneklerde kum partikülleri üzerinde kalsit formunda bulunan $CaCO_3$ kristalleri gözlenmiştir. Kristaller çoğunlukla tek tek değil toplu halde bulunmaktadır. Aynı zamanda yine partiküller üzerinde bulut şeklinde kristal birikimi gözlenmiştir (**Şekil 4.25A-B**).



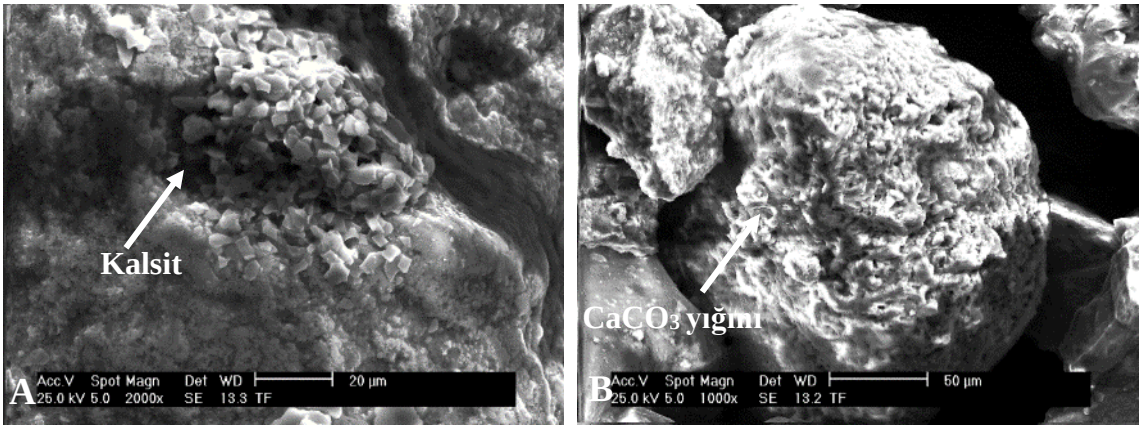
Şekil 4.25. A; yığın oluşturmuş düzensiz kalsit formları, B; kalsit formları

Grup 7'de altın platin ile kaplanmamış örneklerde, her partikül üzerinde eser miktarda kalsit formunda kristal oluşumları belirlenmiştir. Aynı zamanda partiküller arasında kristallerden oluşmuş bağlantı köprüleri gözlenmiştir (**Şekil 4.26A-B**).



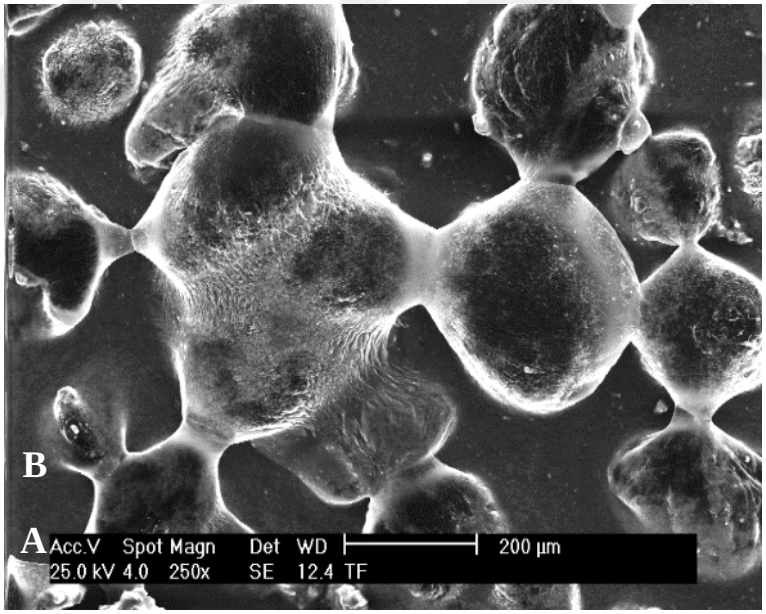
Şekil 4.26. A; partiküller arasında $CaCO_3$ ile oluşan bağlantı köprüleri, B; partikül üzerindeki kalsit formları

Grup 8'de örneklerin çoğunda kalsit formunda toplu halde bulunan kristaller görülmüştür. Kalsitler partiküller arasında bağlantılar kurarken, partikül yüzeylerinde ise yoğun miktarda birikmiş halde bulunmaktadır(**Şekil 4.27A-B**).



Şekil 4.27. A; partikül yüzeyinde düzenli yığın oluşturmuş kalsitler, düzensiz yığın halindeki $CaCO_3$ birikintileri

Bir önceki bölümde yapılan plakada $CaCO_3$ oluşturma çalışmaları sonucunda, plaka yüzeyine yapışan kristallerin dambıl şeklinde kalsit uniteleri oldukları belirlenmiştir (**Şekil 4.28**). Bu yapılara benzer yapılar ise, Subramanian ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada belirtilmiştir.



Şekil 4.28. A; Plaka yüzeyine tutunmuş dambıl şeklindeki kalsit yapıları

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kullanılan 8 farklı grup içerisinde genel olarak $CaCO_3$'ın kalsit formları gözlenmiştir. Literatürde, doğada da çoğunlukla mikrobiyal olarak kalsit formlarının oluşturulduğu belirtilmektedir. $CaCO_3$'ın diğer formları ise sıcaklık, pH gibi faktörlerin değişmesi ile oluşmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda, en fazla $CaCO_3$ formunun görüldüğü grup, Grup 5'tir. Grup 5, 0,5 M üre-

0,5 M $CaCl_2$ çözeltisi ve bakteri süspansiyonu ile muamele edilmiştir. Bu grupta $CaCO_3$ oluşumunun düzenli ve farklı formlarda gözlemlenmesi, bir önceki bölümde elde edilen sonuçlarla tutarlılık göstermektedir. Ayrıca kum partikülleri arasında mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumları ile dayanıklı bağlantı köprüleri meydana gelmiş ve partiküllerin birbirine bağlanması sağlanmıştır. 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ çözeltisi ve bakteri süspansiyonu içeren Grup 4 ve 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ çözeltisi ve bakteri süspansiyonu içeren Grup 6'da, kalsit formları oluşmuştur. Buna göre, üre konsantrasyonunun azalması ve $CaCl_2$ konsantrasyonunun artması, eşit molariteye sahip gruba göre daha düzensiz ve kırılgan formda $CaCO_3$ meydana gelmiştir. De Muynck ve ark.'nın (2010) yaptığı çalışmada, eşit üre-$CaCl_2$ molaritesine sahip çözelti ile muamele edilen örneklerde, eşit molaritesi olmayan gruplara göre daha fazla $CaCO_3$ oluşumu gözlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan kontrol gruplarında (Grup 1 ve Grup 2) ise az miktarda, düzensiz ve kırılgan bir $CaCO_3$ formunun oluşumu gözlenmiştir. Grup 1, sadece fiksatif ve çimento solüsyonu içermekte, bakteri süspansiyonu içermemektedir. Bu nedenle, mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşumu gerçekleşmemiştir. Grup 2 ise, bakteri süspansiyonu içerdiği halde çimento solüsyonu ile muamele edilmemiştir. Buna göre, kum örneklerine eklenen bakteri, ortamda üre olmadığı için üreaz aktivitesi gösterememiş ve buna bağlı olarak mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu gerçekleşmemiştir. Yine yapılan bir çalışmada, benzer kontrol grupları kullanılmış ve aynı şekilde az miktarda mikrobiyal $CaCO_3$ oluştuğu gözlenmiştir. Kum örneklerine ultrasonik ses dalgaları gönderilerek kayma dalga hızı belirlenmiş ve diğer gruplara göre düşük değerler gözlenmiştir (Bernardi ve ark., 2014).

Literatürde, bakteri konsantrasyonlarının mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumuna etkisi ile alakalı çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalarda elde edilen verilere göre, bakteri konsantrasyonunun çok yüksek ve çok düşük olması $CaCO_3$ oluşumunu azaltmaktadır (Vempada ve ark., 2011, Maheswaran ve ark., 2014, Gurbuz ve ark., 2015). Bu bağlamda çalışmamızda, bakteri konsantrasyonun etkisini incelemek için 2 farklı grup daha kullanılmıştır. Yüksek bakteri konsantrasyonuna sahip Grup 7 ve Grup 8'e ait kum örneklerinde, partiküller arasında ve yüzeylerinde kırılgan ve düzensiz yığın halinde kalsit formları gözlenmiştir. Buna göre, yüksek bakteri konsantrasyonu, $CaCO_3$ oluşumununda önemli derecede etkili olamamakla birlikte, normal düzeydeki (30 ml-

1,5x10^8 cfu/ml) bakteri konsantrasyonunda daha fazla miktarda, düzenli ve kırılmaz yapıda $CaCO_3$ formlarının oluştuğu söylenebilmektedir.

4.4 Kum Örneklerinde Konpenetrasyon Testi (CPT) ve Bernard-Scheibler Kalsimetre Metodu ile $CaCO_3$ Miktar Tayini

4.4.1. Koni penetrasyon testi

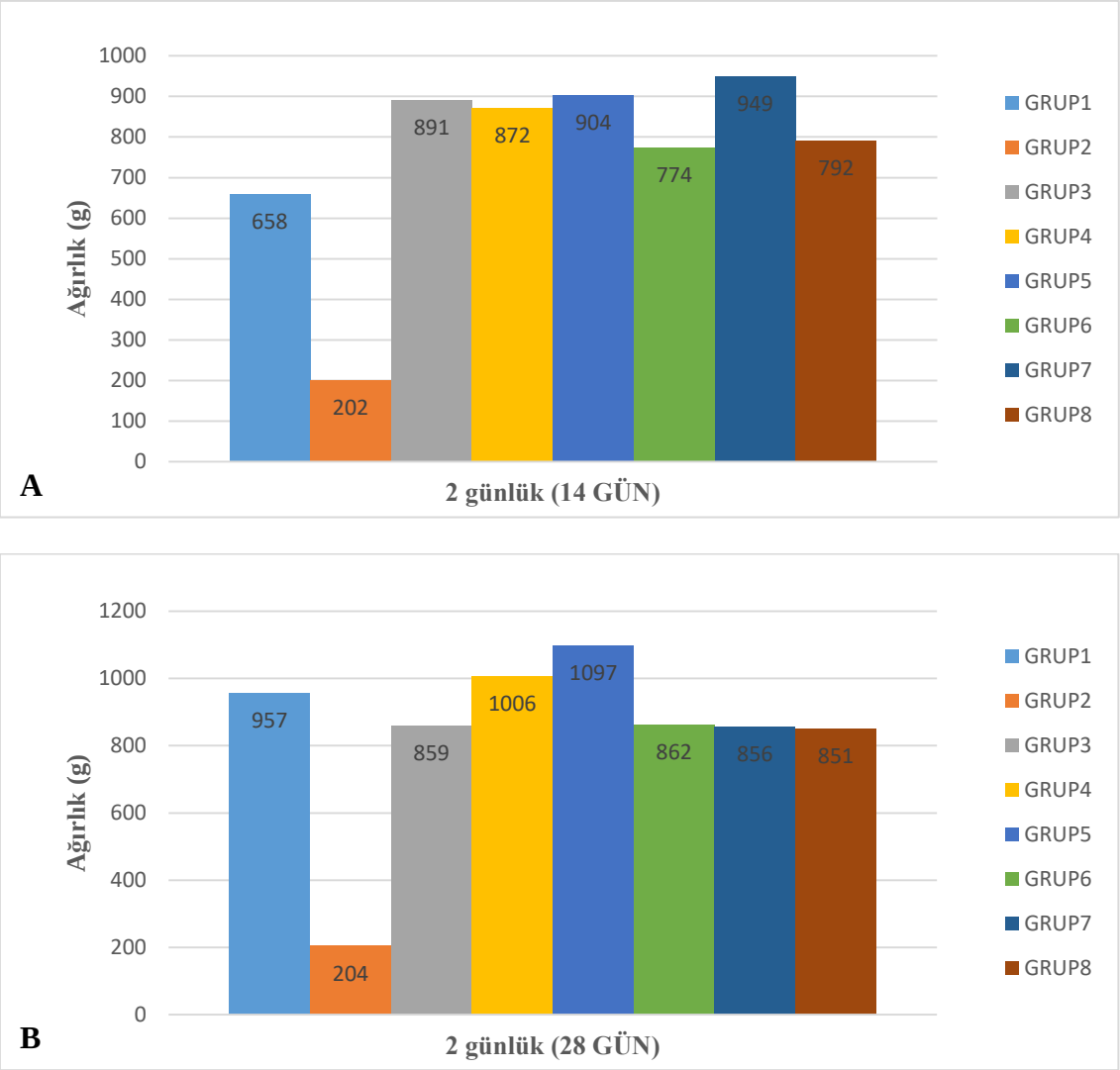
4.4.1.1. 2 günlük uygulama sonucunda kum örneklerinde mukavemet sonuçları

2 günlük iyileştirme uygulanan gruplarda, 14. ve 28. günlerde elde edilen CPT sonuçları **Tablo 4.9** ve **Şekil 4.29**'da verilmektedir.

Tablo 4.9. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. ve 28. günde CPT sonuçları

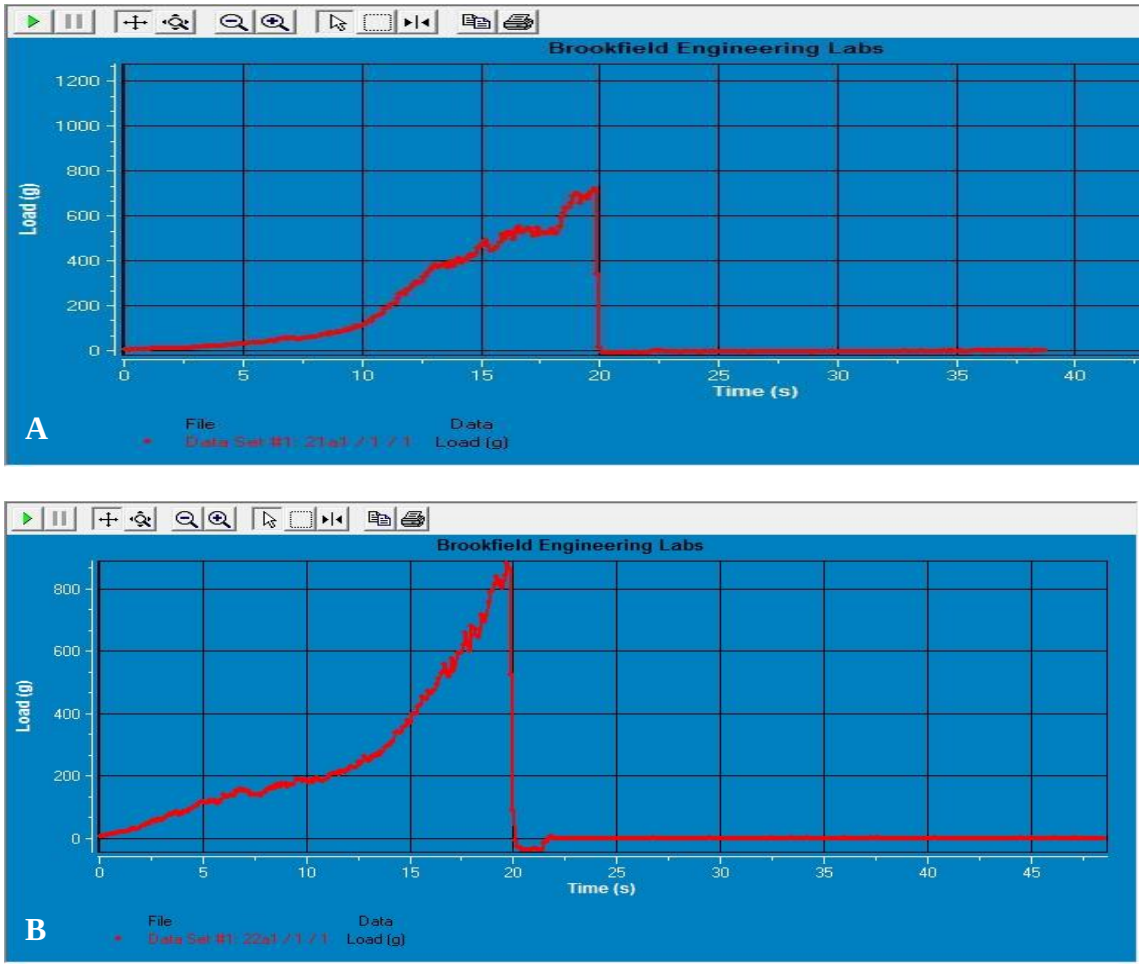
Uygulama Günü	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5	GRUP 6	GRUP 7	GRUP 8
2 günlük (14. gün)	658	202	891	872	904	774	949	792
2 günlük (28. gün)	957	204	859	1006	1097	862	856	851

: En az mukavemete sahip grup, : En çok mukavemete sahip grup



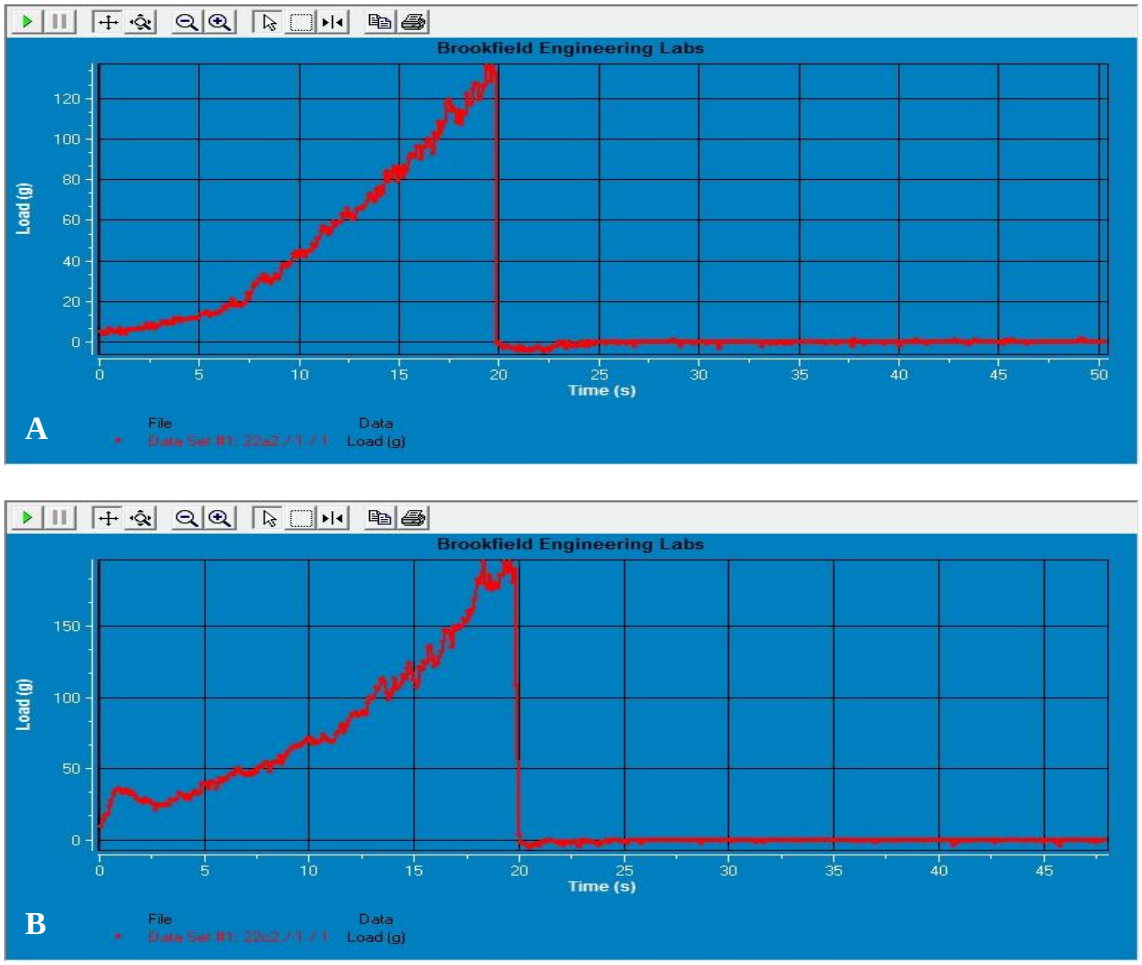
Şekil 4.29. A; 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği, B; 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Grup 1, sadece fiksatif ve çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 658 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 957 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.30A-B**).



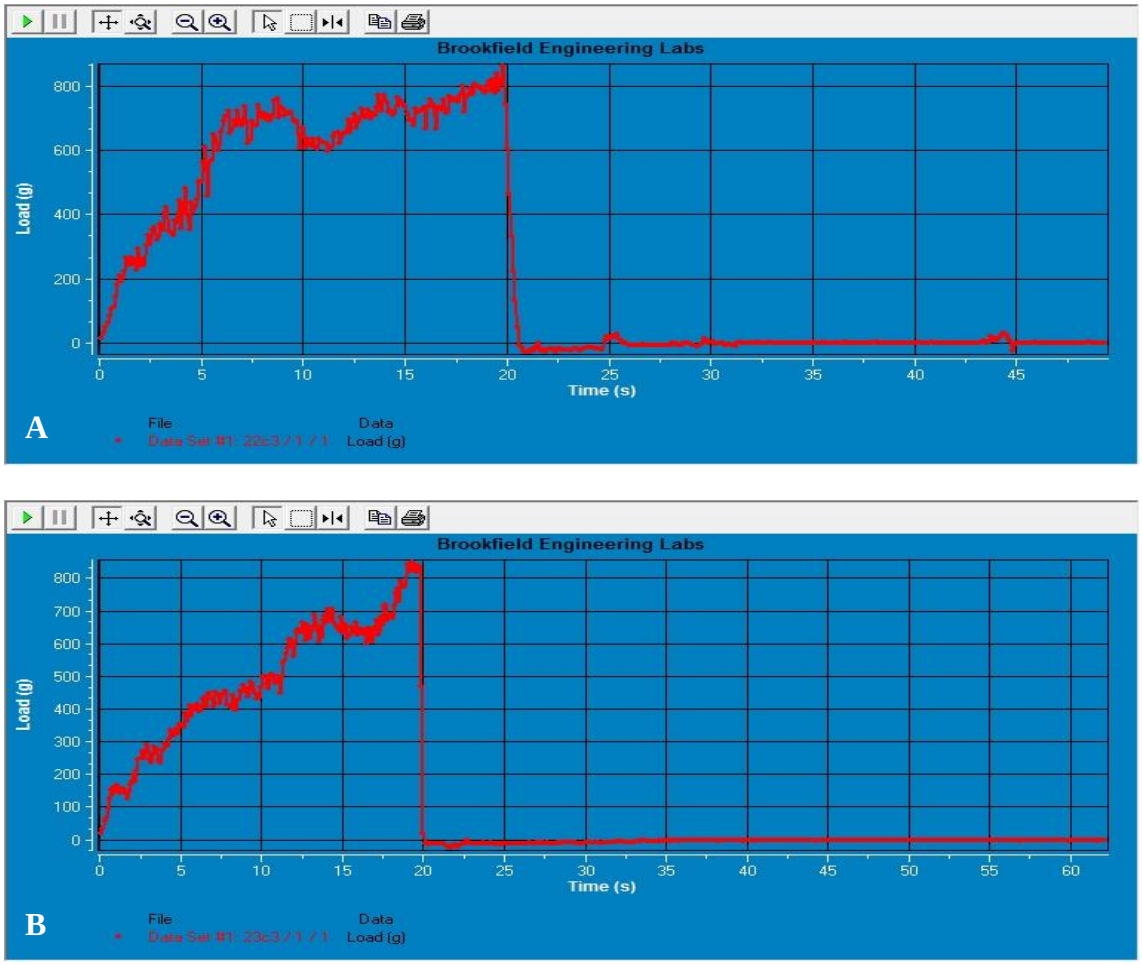
Şekil 4.30. A; Grup 1'de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 1'de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 2, sadece fiksatif ve bakteri solüsyonu ile muamele edilmiştir. Eklenen bakteri, ortamda üre bulunmadığı için aktivite göstermemiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 202 g olduğu belirlenmiştir. 28. Günde yapılan testte ise bu değer 204 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.31A-B**).



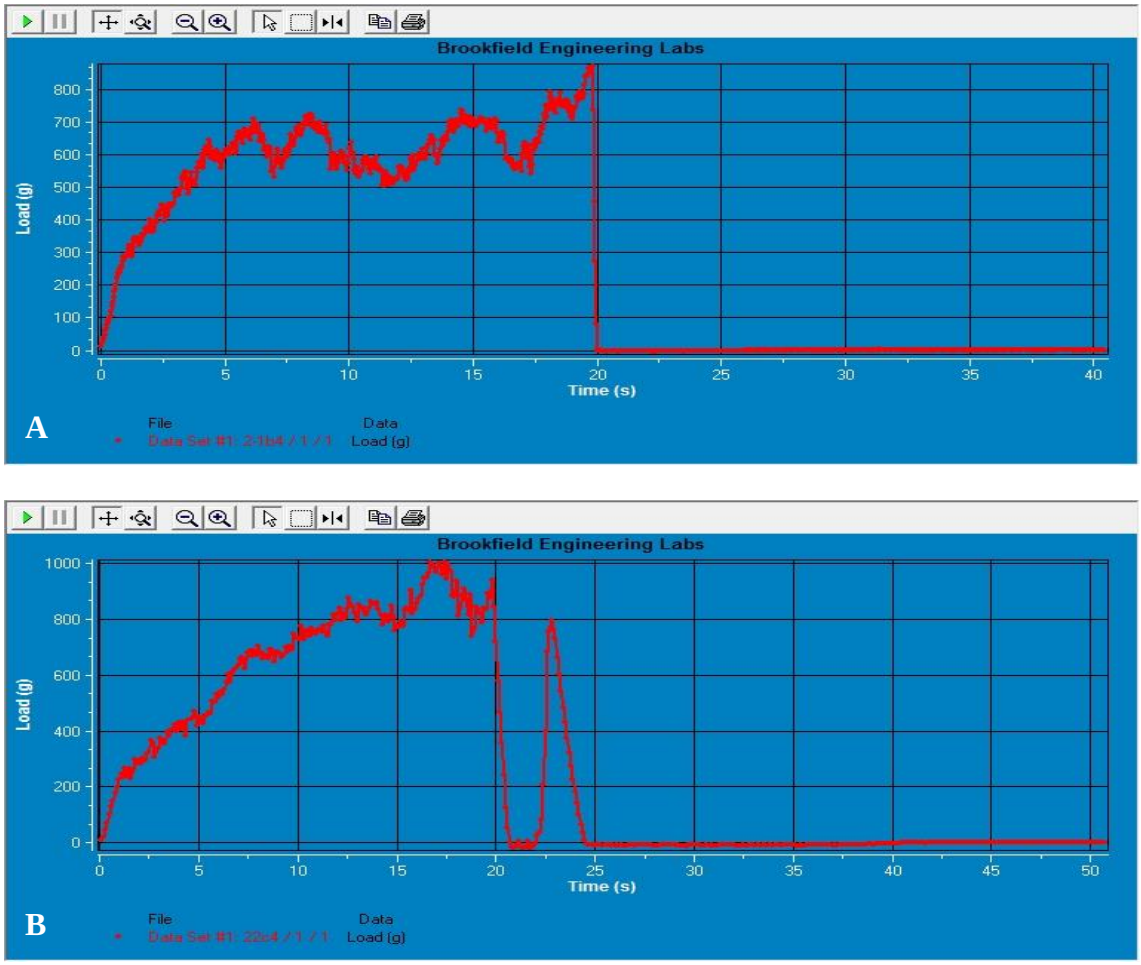
Şekil 4.31. A; Grup 2'de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 2'de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 3, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 891 g olduğu belirlenmiştir. 28. Günde yapılan testte ise bu değer 859 g'a düşmüştür (**Şekil 4.32A-B**).



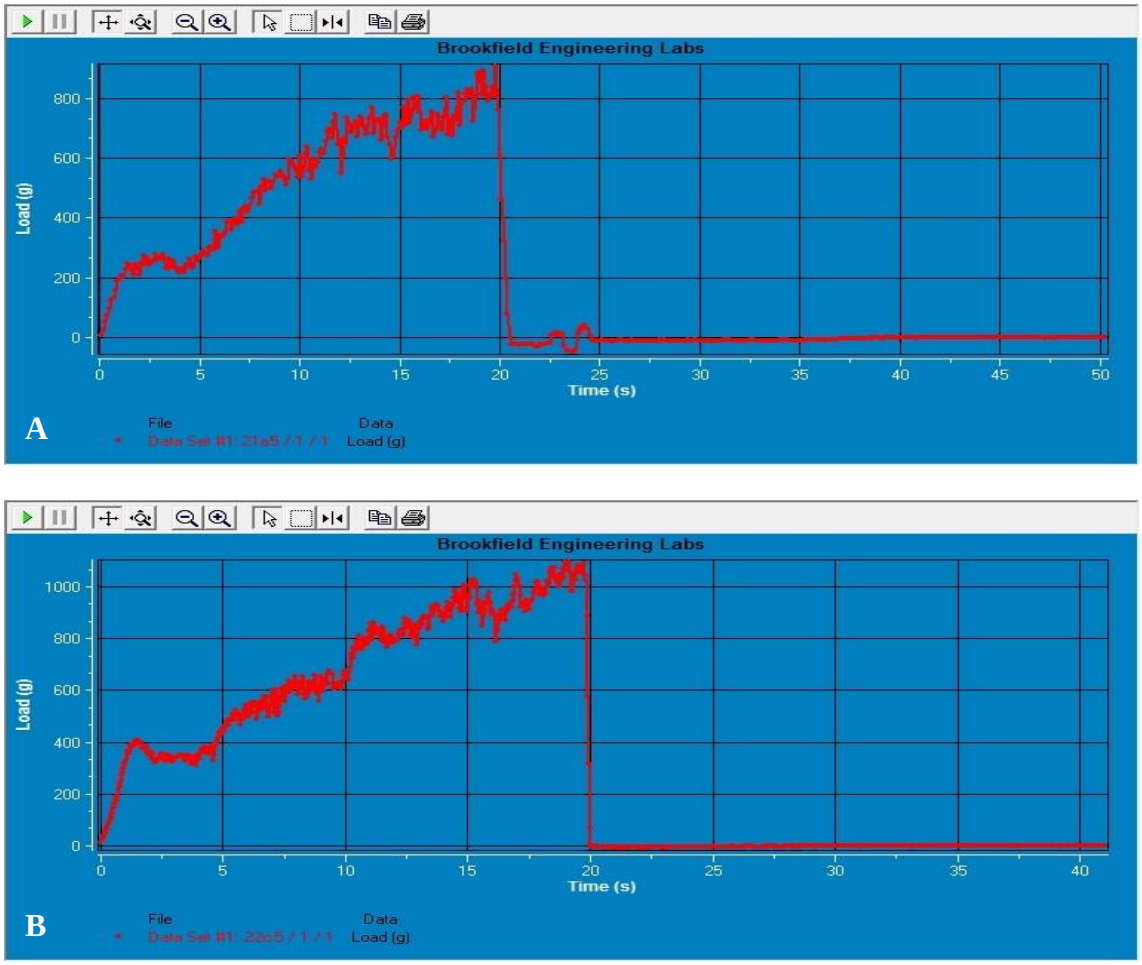
Şekil 4.32. A; Grup 3'te 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 3'te 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 4, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 872 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1006 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.33A-B**).



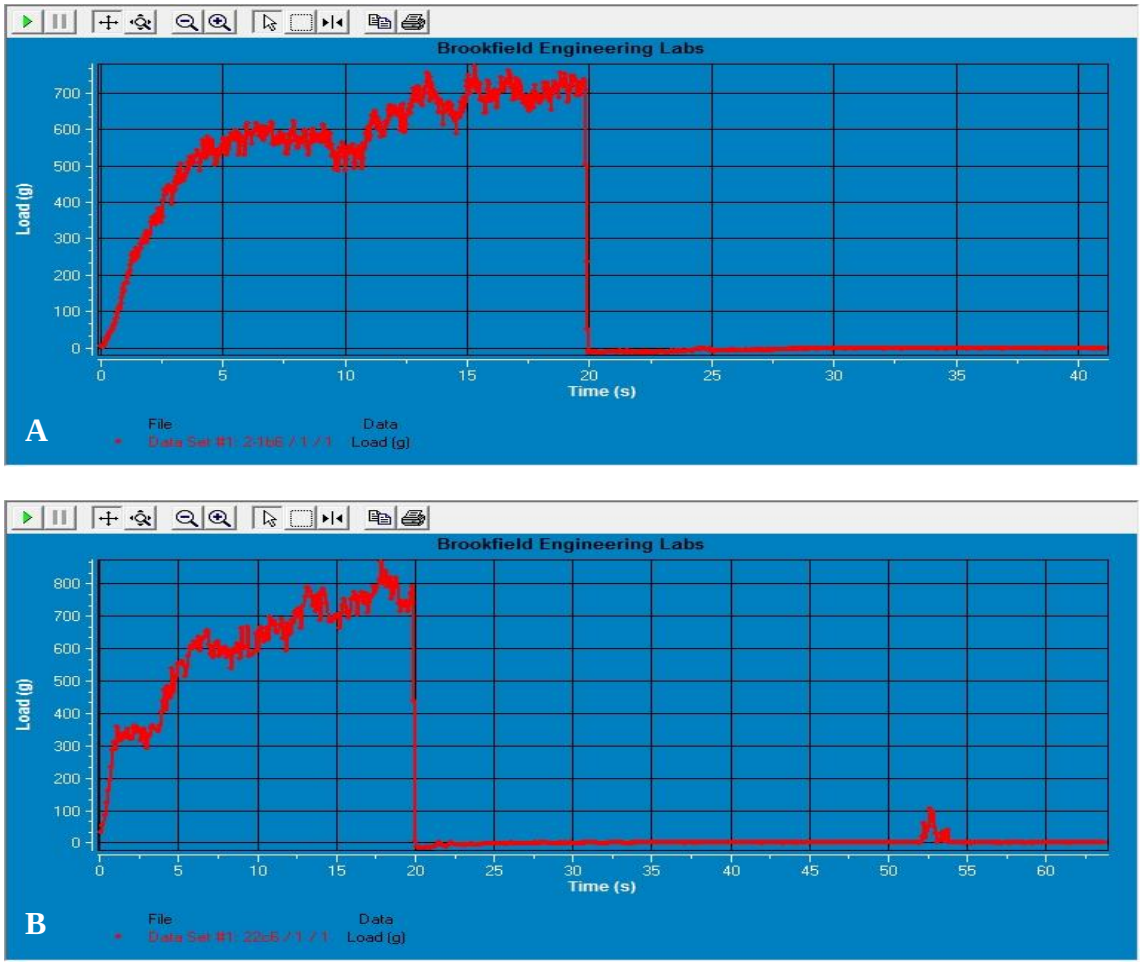
Şekil 4.33. A; Grup 4'te 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 4'te 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 5, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 910 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1097 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.34A-B**).



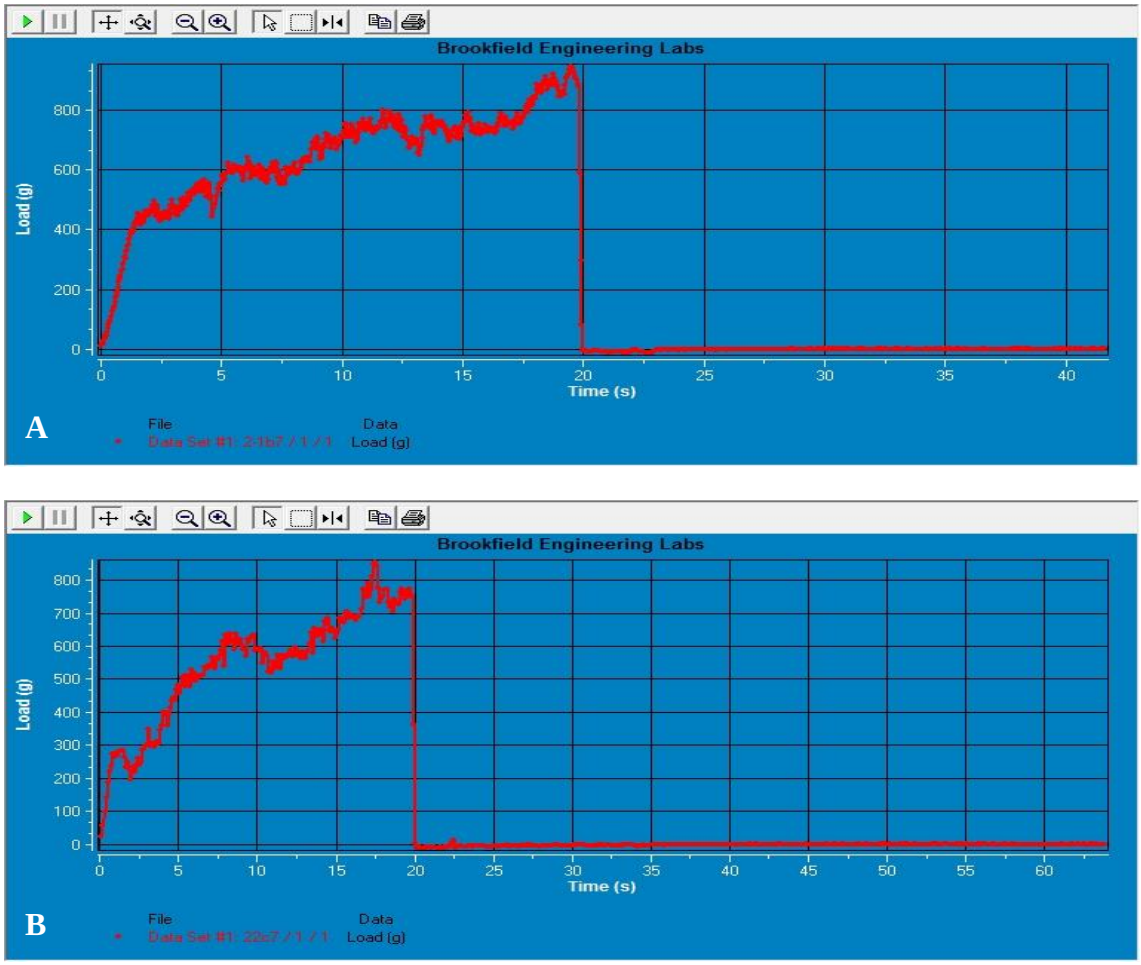
Şekil 4.34. A; Grup 5'te 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 5'te 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 6, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 774 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 862 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.35A-B**).



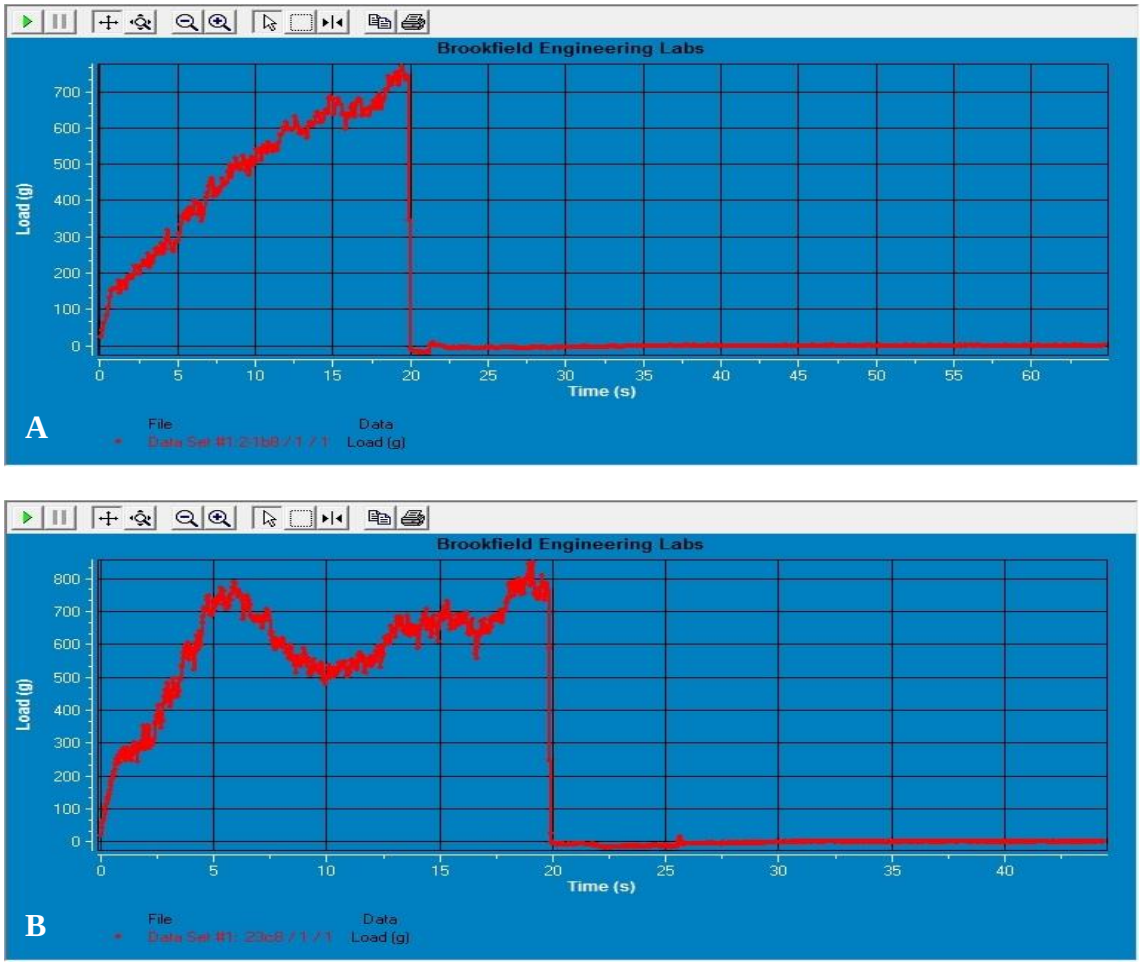
Şekil 4.35. A; Grup 6'da 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 6'da 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 7, fiksatif çözeltisi, 45 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 949 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 856 g'a düşmüştür (**Şekil 4.36A-B**).



Şekil 4.36. A; Grup 7'de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 7'de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 8, fiksatif çözeltisi, 60 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 792 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 851 g'a yükselmiştir (**Şekil 4.37A-B**).



Şekil 4.37. A; Grup 8'de 2 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 8'de 2 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

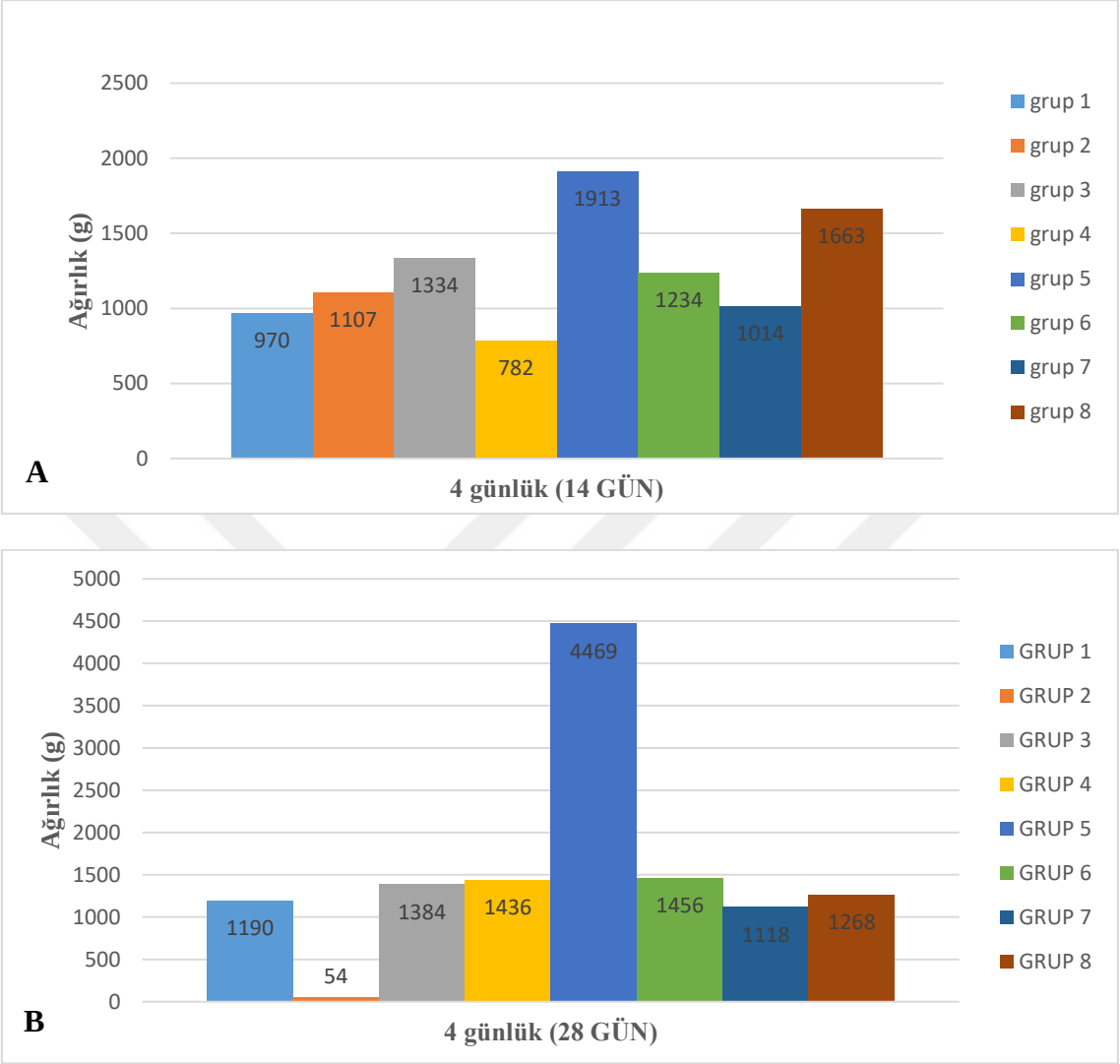
4.4.1.2. 4 günlük uygulama sonucunda kum örneklerinde mukavemet sonuçları

4 günlük iyileştirme uygulanan gruplarda, 14. ve 28. günlerde elde edilen CPT sonuçları **Tablo 4.10** ve **Şekil 4.38A-B**'de verilmektedir.

Tablo 4.10. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. ve 28. günde CPT sonuçları

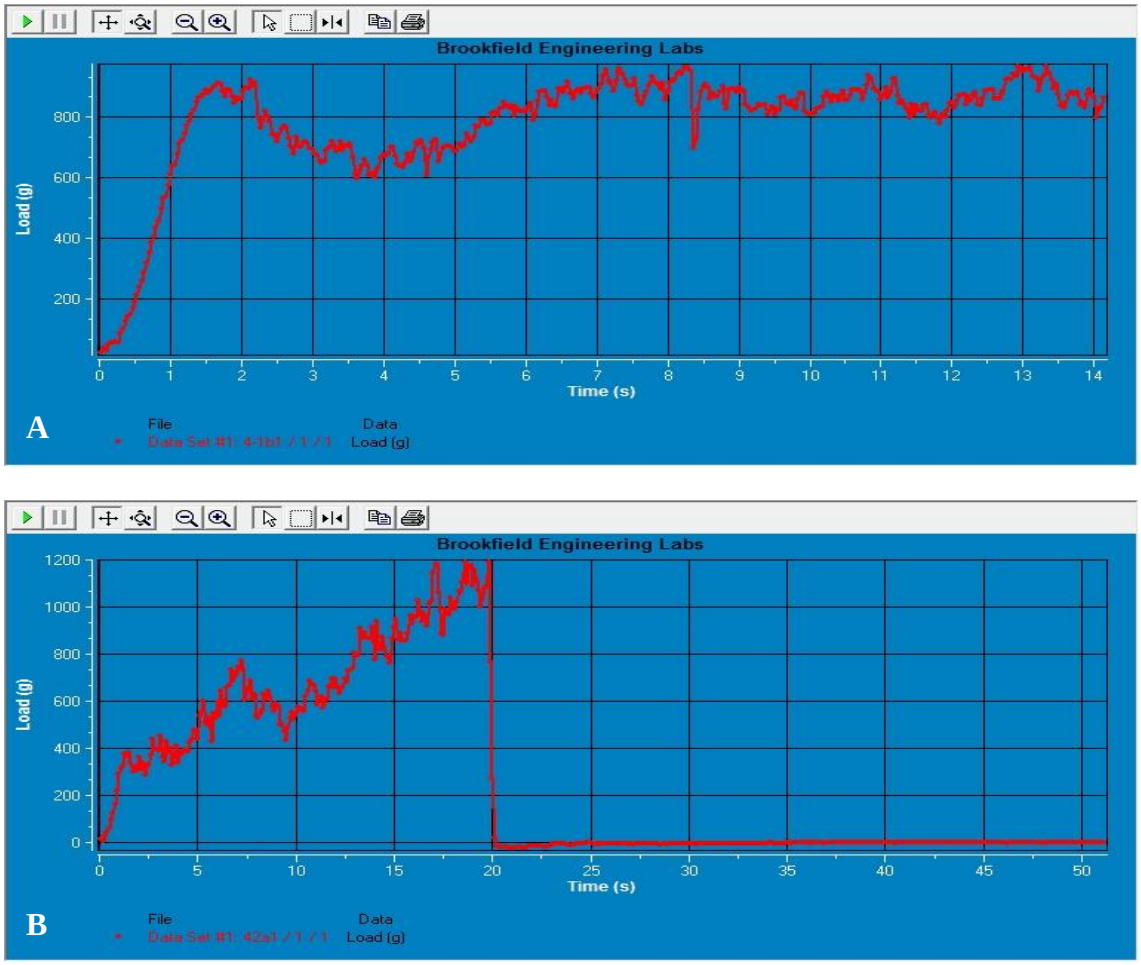
Uygulama Günü	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5	GRUP 6	GRUP 7	GRUP 8
4 günlük (14. gün)	970	1107	1334	782	1913	1234	1014	1663
4 günlük (28. gün)	1190	54	1384	1436	4469	1456	1118	1268

: En az mukavemete sahip grup, : En çok mukavemete sahip grup



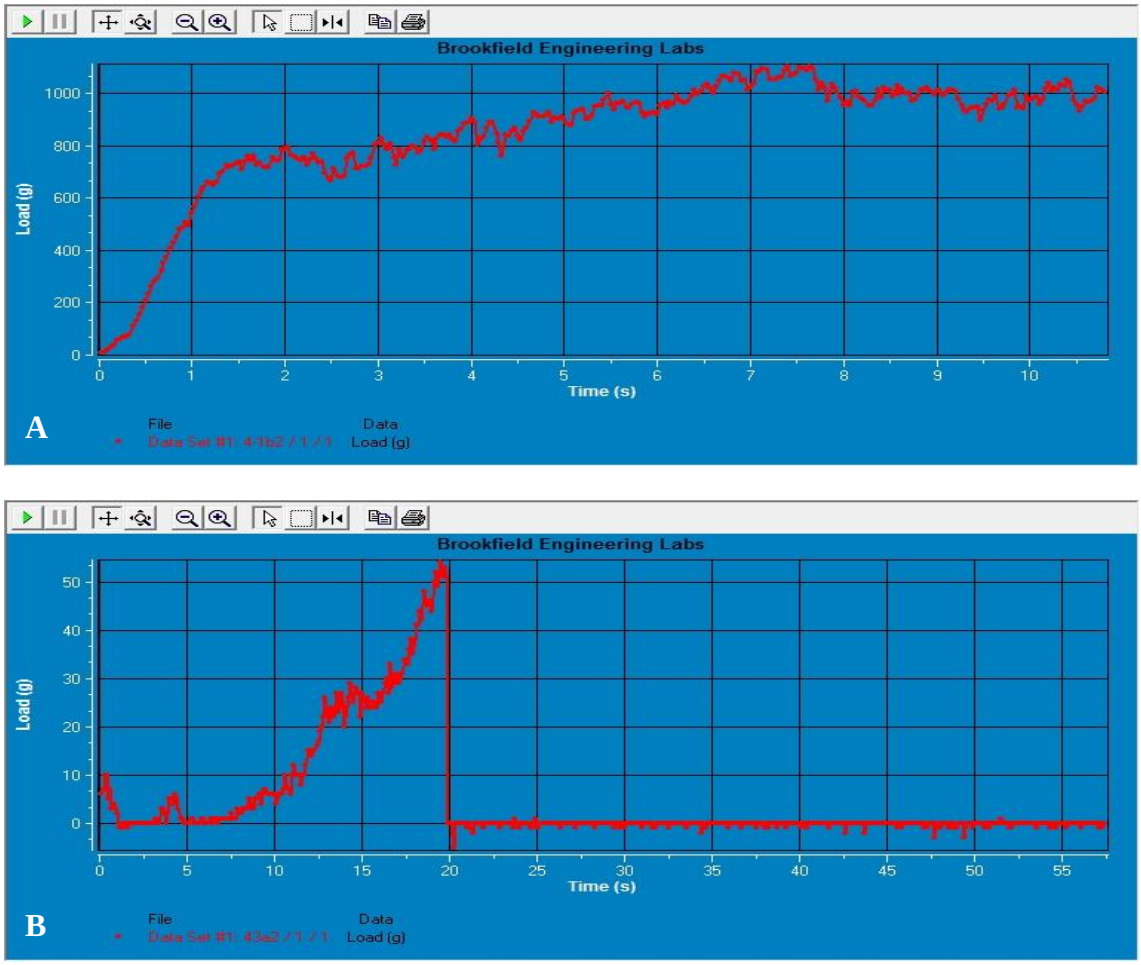
Şekil 4.38. A; 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği, B; 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Grup 1, sadece fiksatif ve çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 970 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1190 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.39A-B**).



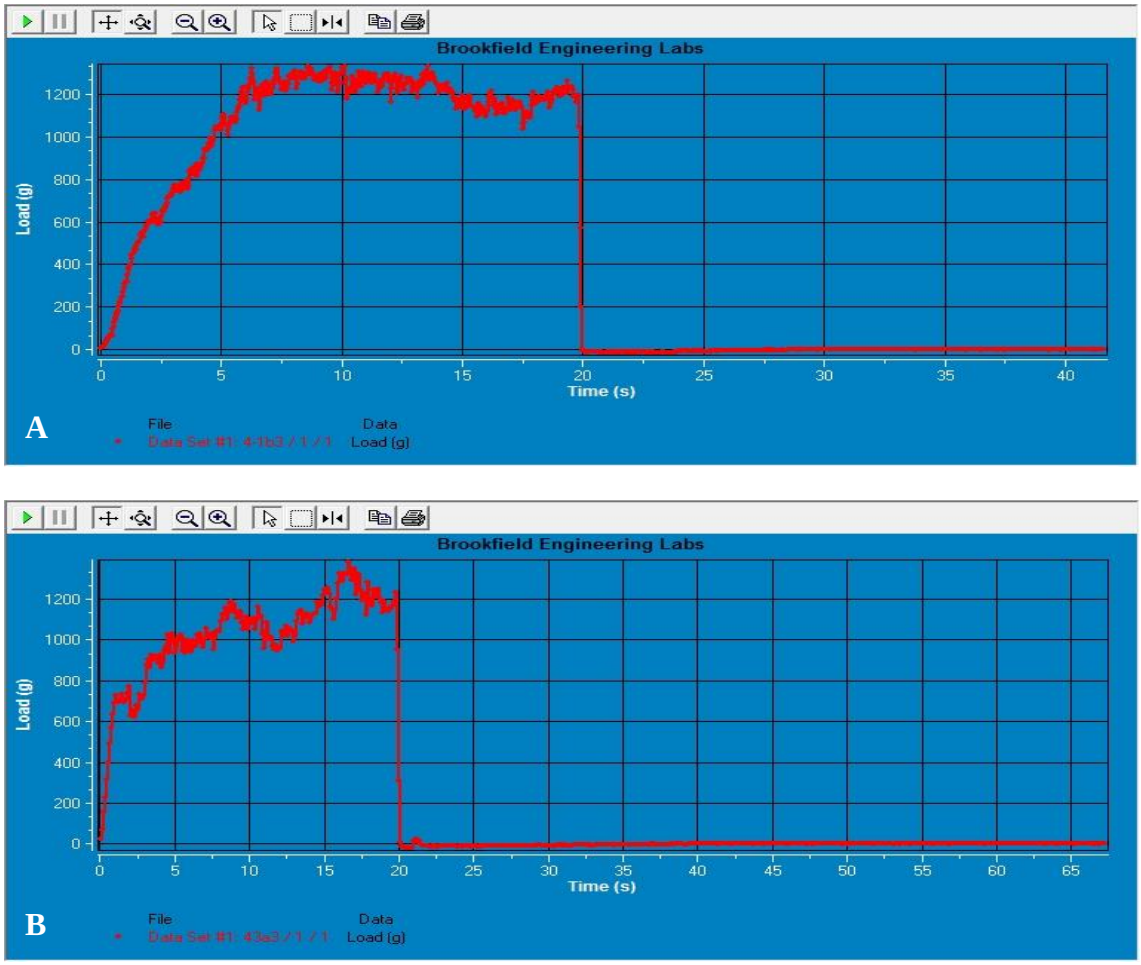
Şekil 4.39. A; Grup 1'de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 1'de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 2, sadece fiksatif ve bakteri solüsyonu ile muamele edilmiştir. Eklenen bakteri, ortamda üre bulunmadığı için aktivite göstermemiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1107 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 54 g'a düşmüştür (**Şekil 4.40A-B**). Değerdeki düşüşün sebebi, kum örneğinin ölçüme götürülmesi sırasında hasar görmesidir.



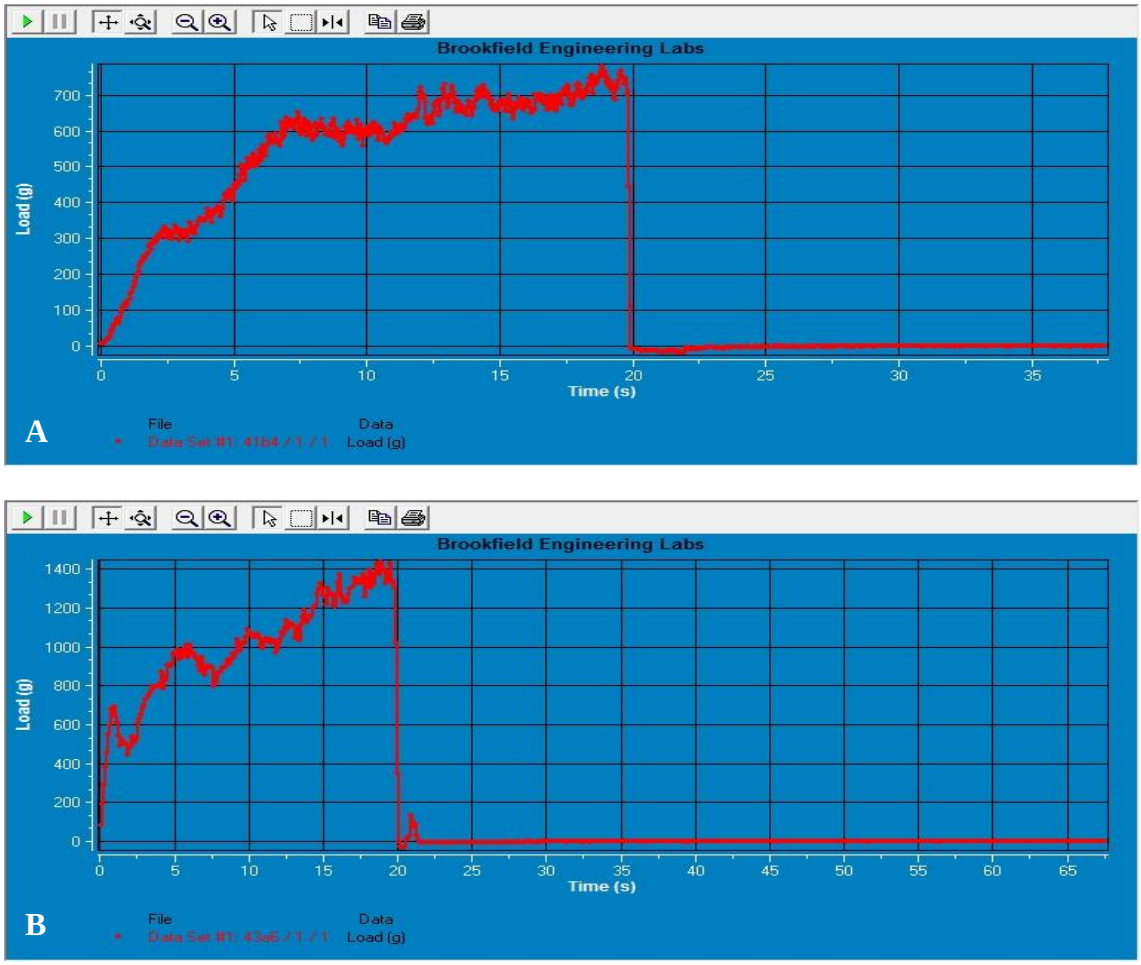
Şekil 4.40. A; Grup 2'de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 2'de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 3, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1334 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1384 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.41A-B**).



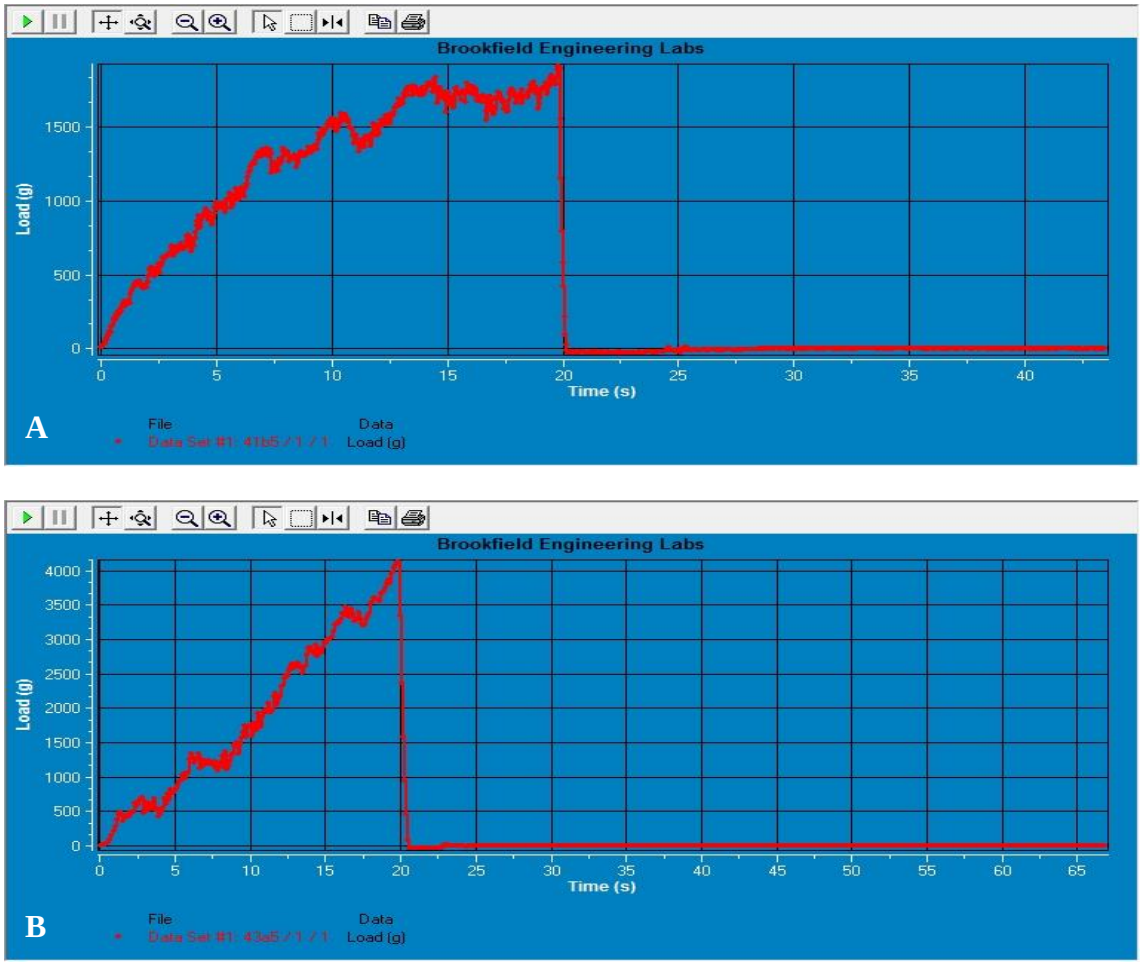
Şekil 4.41. A; Grup 3'te 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 3'te 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 4, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 782 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1486 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.42A-B**).



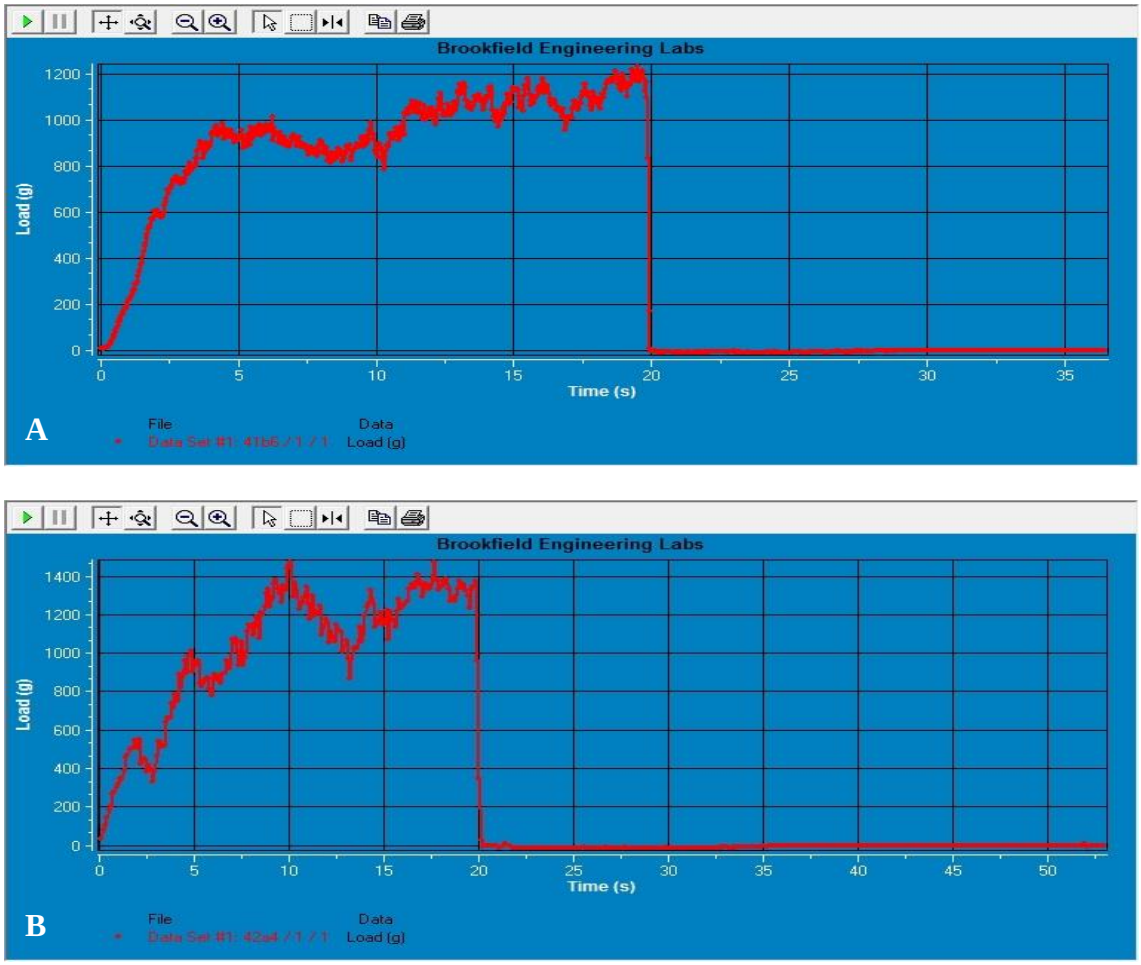
Şekil 4.42. A; Grup 4'te 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 4'te 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 5, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1193 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 4469 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.43A-B**).



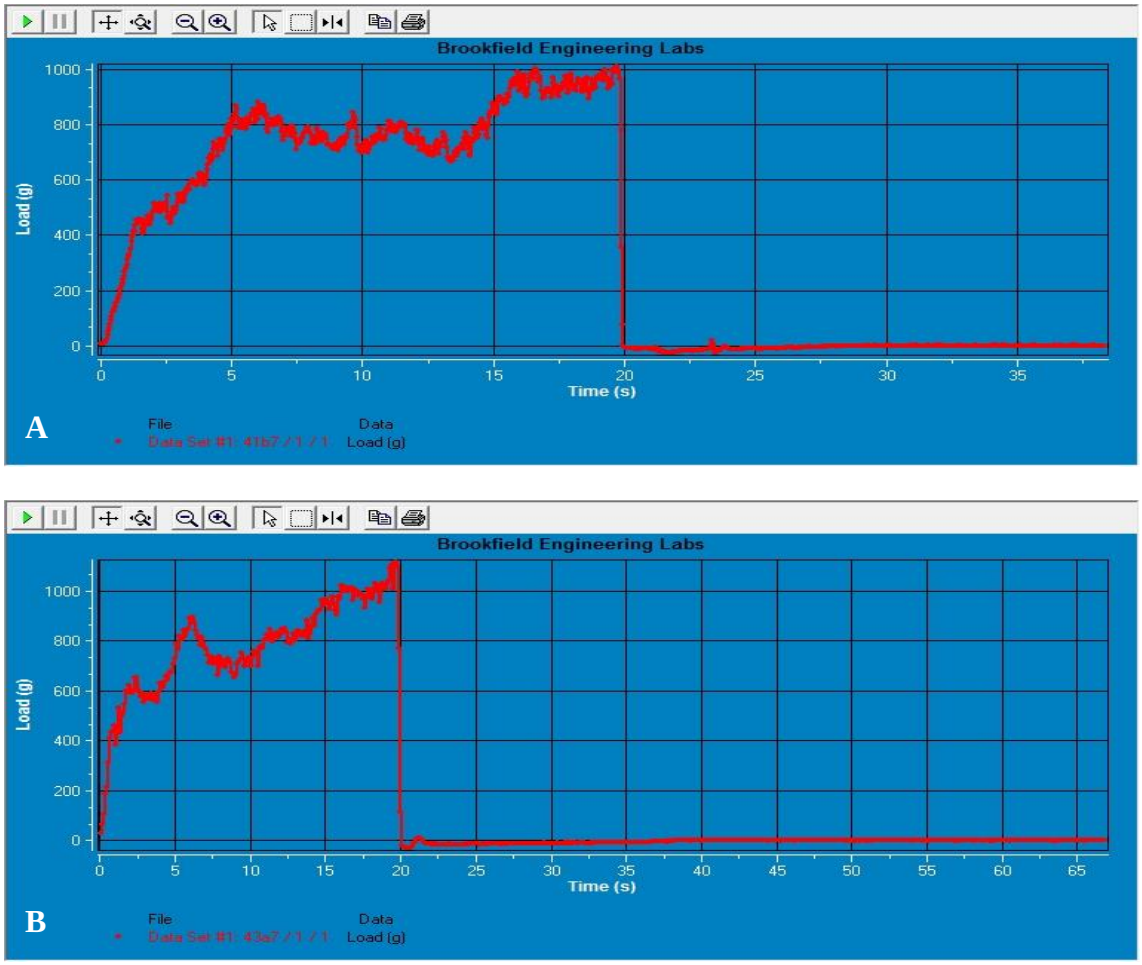
Şekil 4.43. A; Grup 5'te 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 5'te 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 6, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1234 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1456 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.44A-B**).



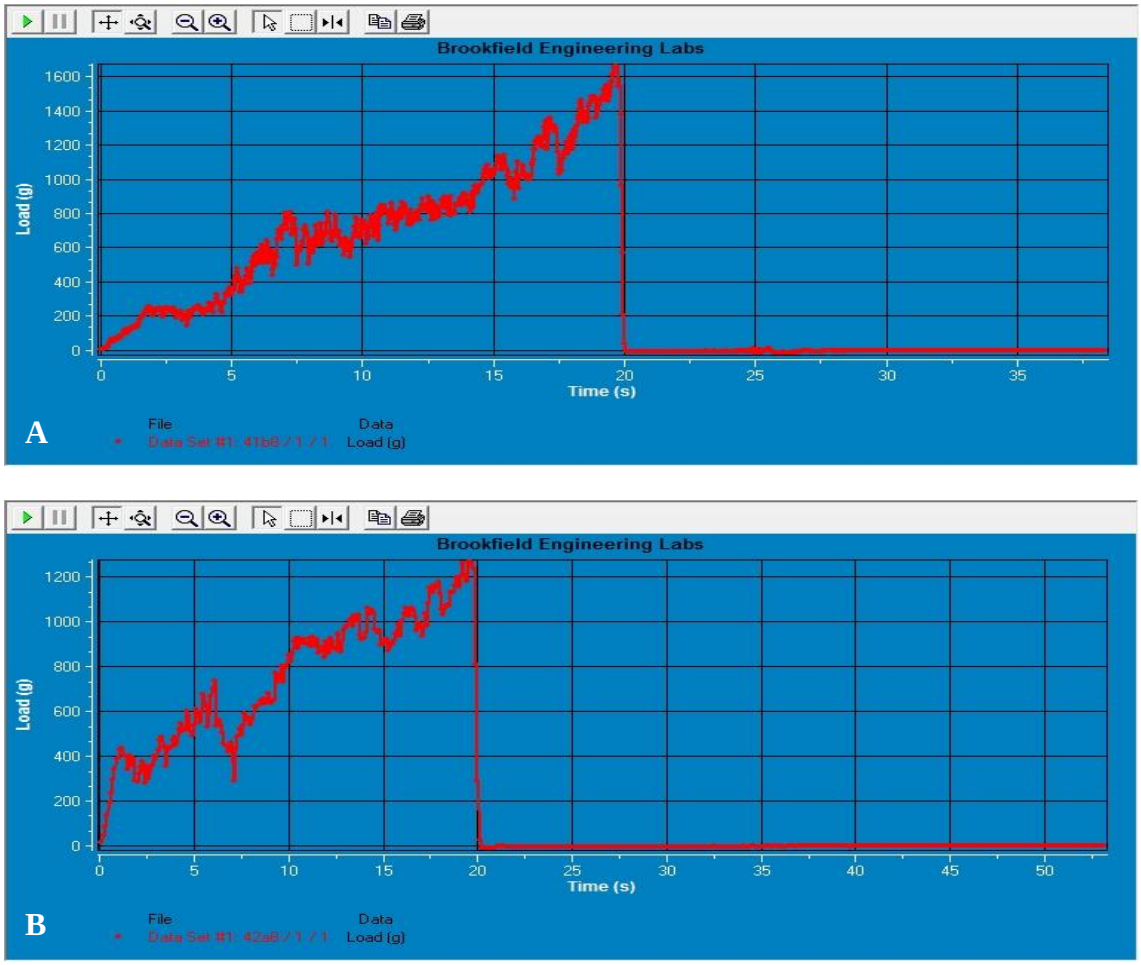
Şekil 4.44. A; Grup 6'da 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 6'da 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 7, fiksatif çözeltisi, 45 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1014 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1118 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.45A-B**).



Şekil 4.45. A; Grup 7'de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 7'de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 8, fiksatif çözeltisi, 60 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1663 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1268 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.46A-B**).



Şekil 4.46. A; Grup 8'de 4 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 8'de 4 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

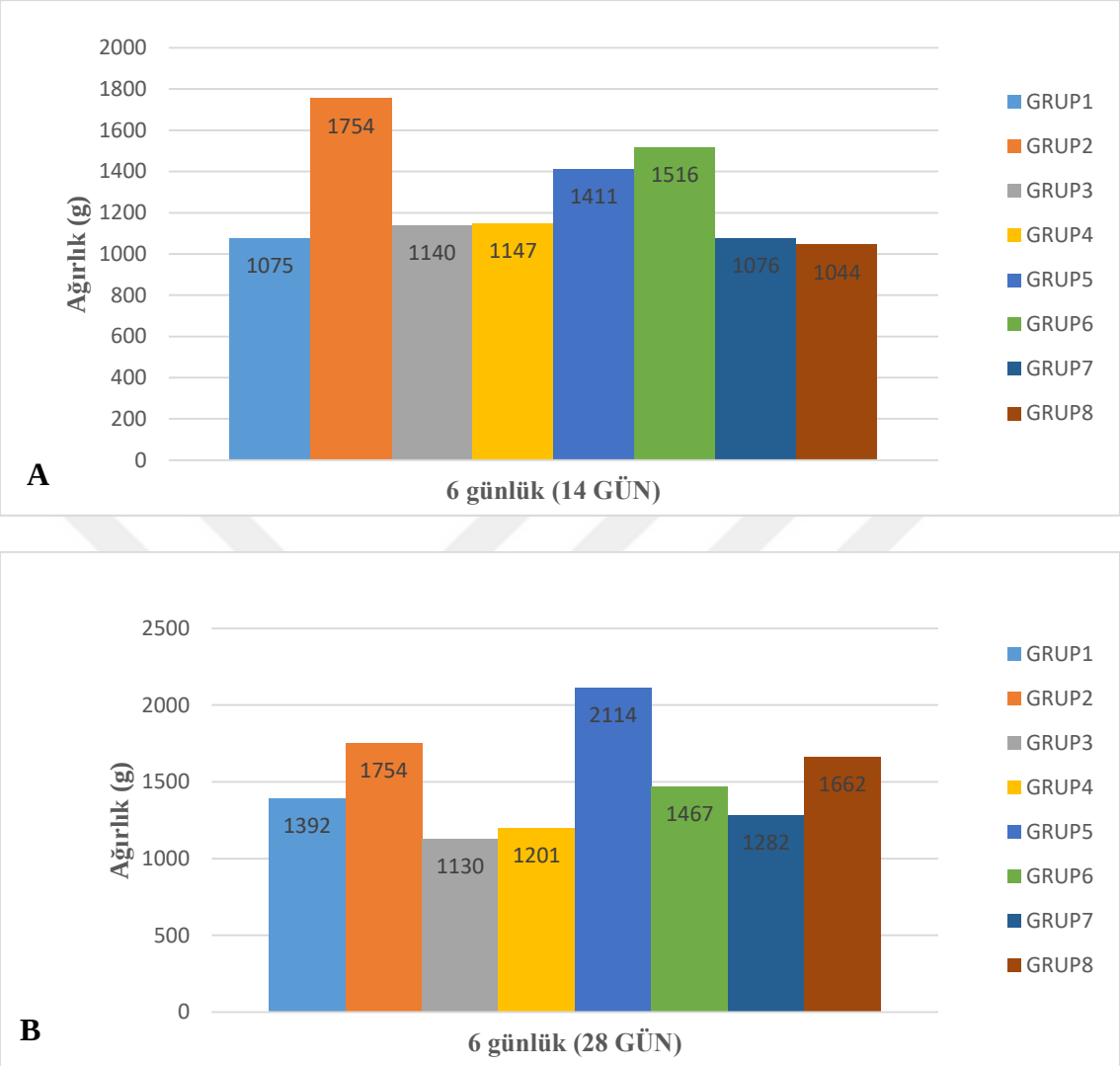
4.4.1.3. 6 günlük uygulama sonucunda kum örneklerinde mukavemet sonuçları

6 günlük iyileştirme uygulanan gruplarda, 14. ve 28. günlerde elde edilen CPT sonuçları **Tablo 4.11** ve **Şekil 4.47A-B**'de verilmektedir.

Tablo 4.11. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. ve 28. günde CPT sonuçları

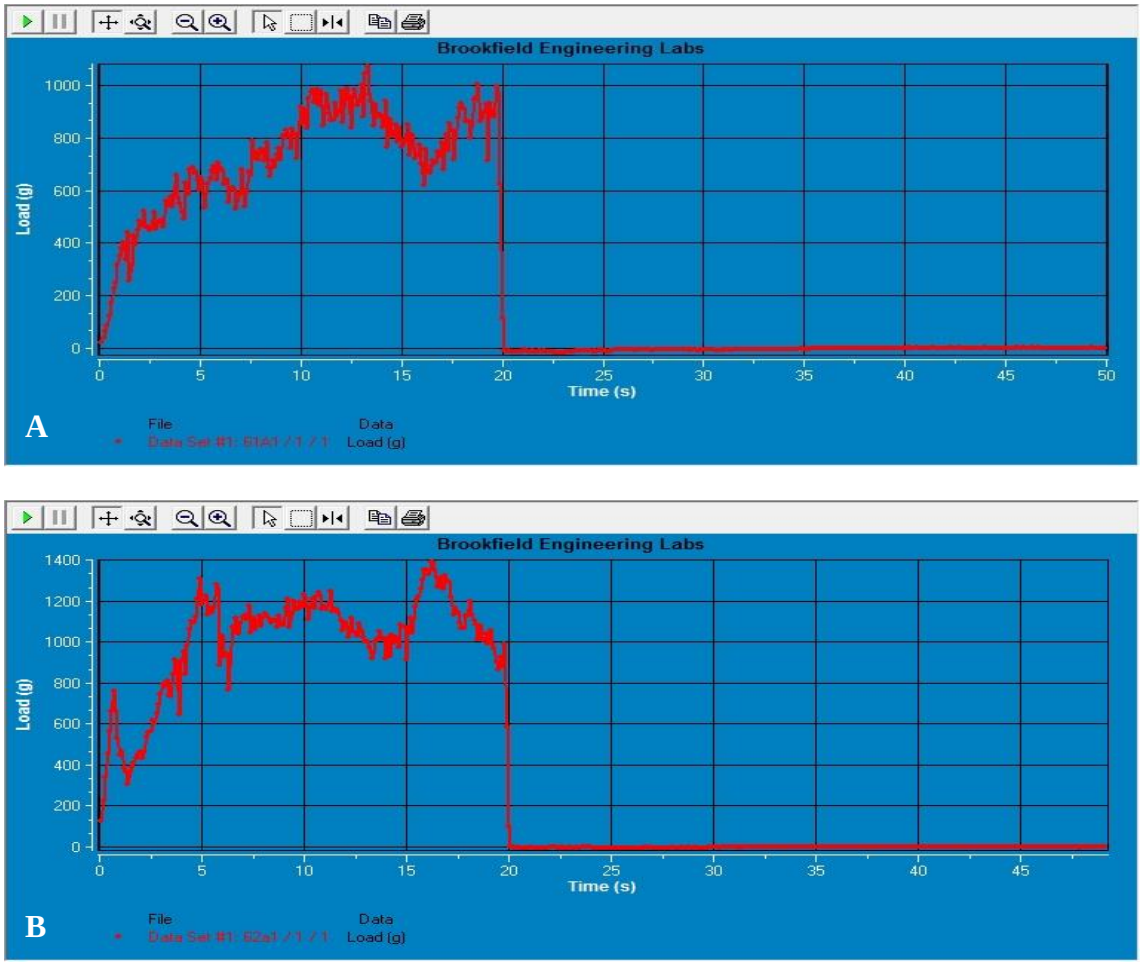
Uygulama Günü	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5	GRUP 6	GRUP 7	GRUP 8
4 günlük (14. gün)	1075	1754	1140	1147	1411	1516	1076	1044
4 günlük (28. gün)	1392	1754	1130	1201	2114	1467	1282	1662

: En az mukavemete sahip grup, **:** En çok mukavemete sahip grup



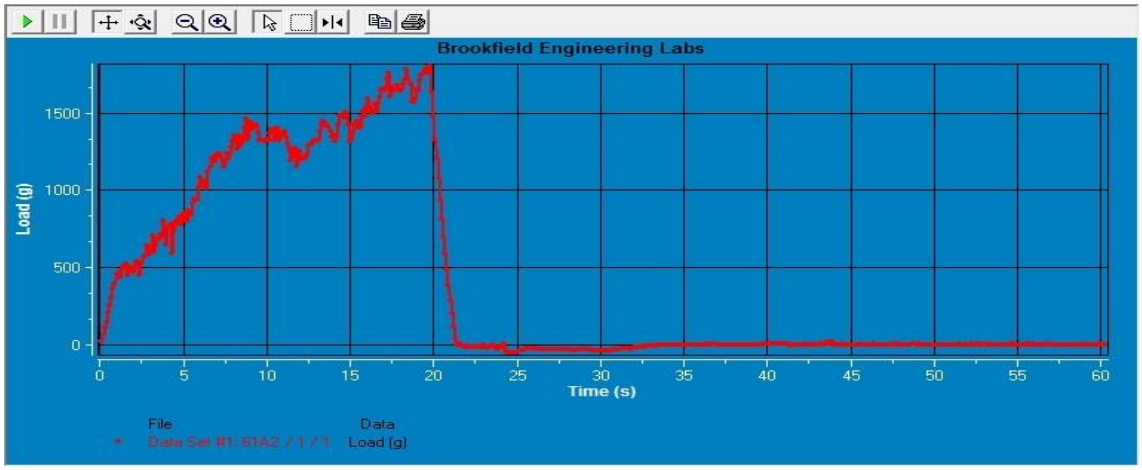
Şekil 4.47. A; 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği, B; 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde CPT sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Grup 1, sadece fiksatif ve çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1075 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1392 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.48A-B**).



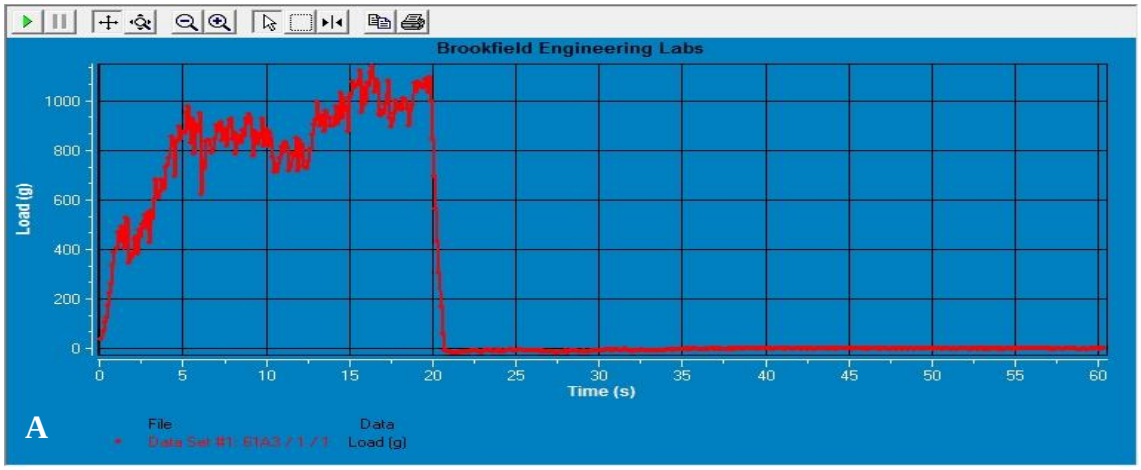
Şekil 4.48. A; Grup 1'de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 1'de 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

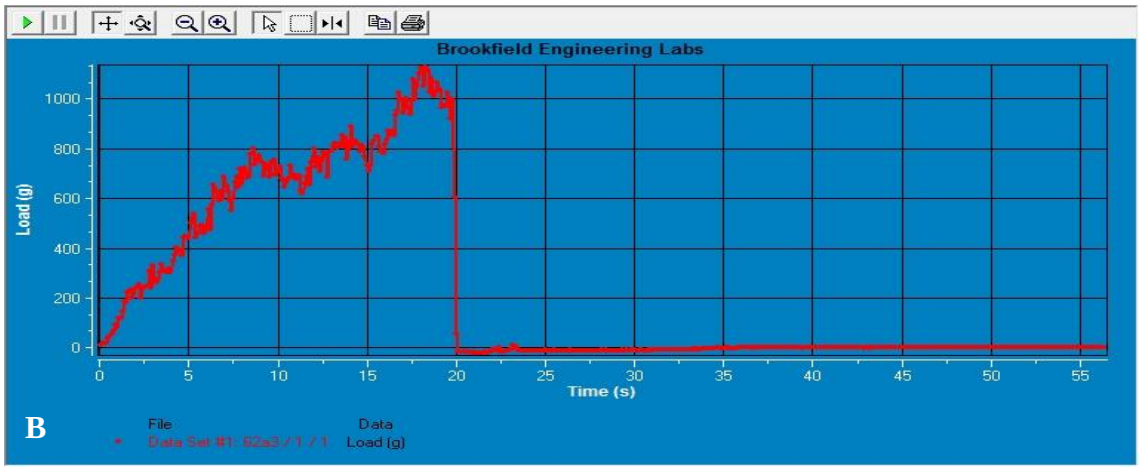
Grup 2, sadece fiksatif ve bakteri solüsyonu ile muamele edilmiştir. Eklenen bakteri, ortamda üre bulunmadığı için aktivite göstermemiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1754 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde bu değerde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (**Şekil 4.49**).



Şekil 4.49. A; Grup 2'de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği

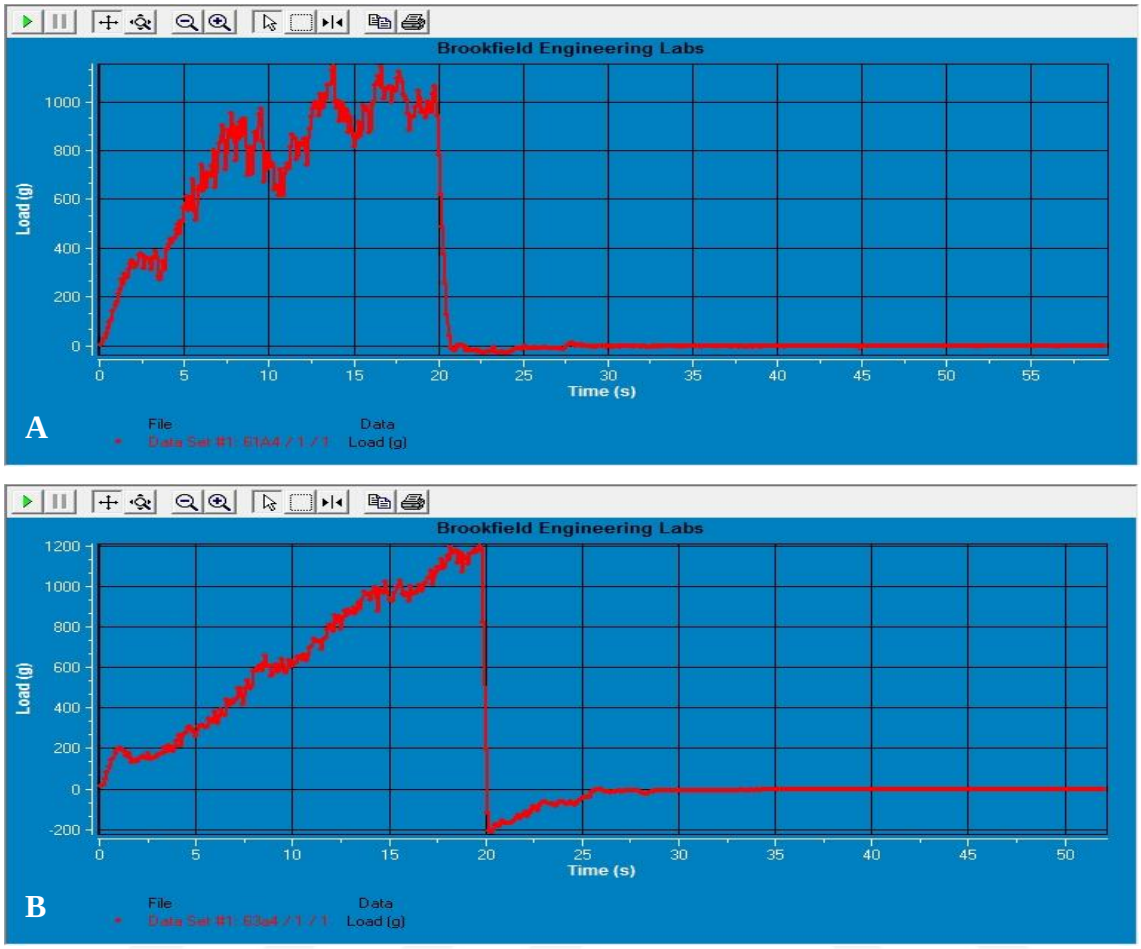
Grup 3, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1140 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1130 g'a düşmüştür (**Şekil 4.50A-B**). Bu düşüşün önemsenecek boyutta olmadığı düşünülmektedir.





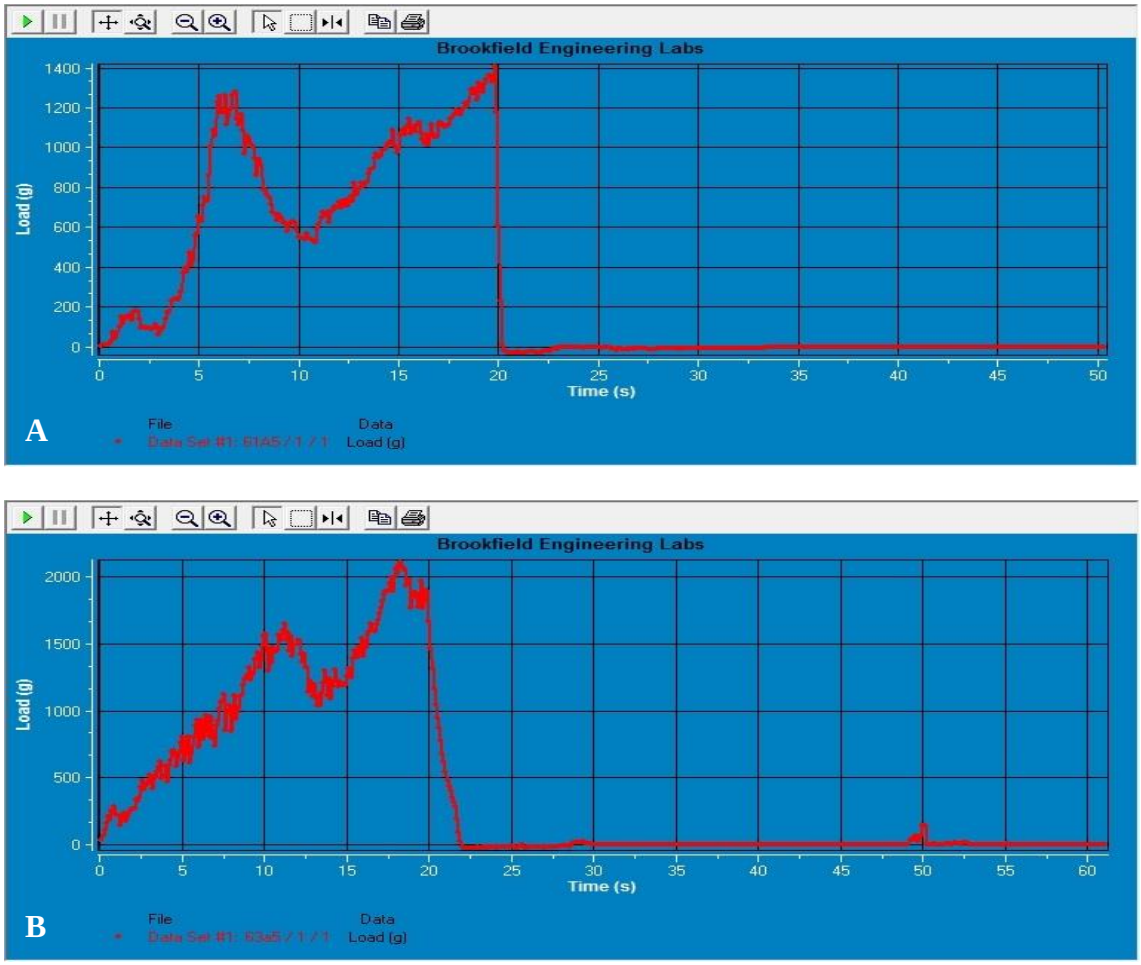
Şekil 4.50. A; Grup 3'te 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 3'te 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 4, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1147 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1201 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.51A-B**).



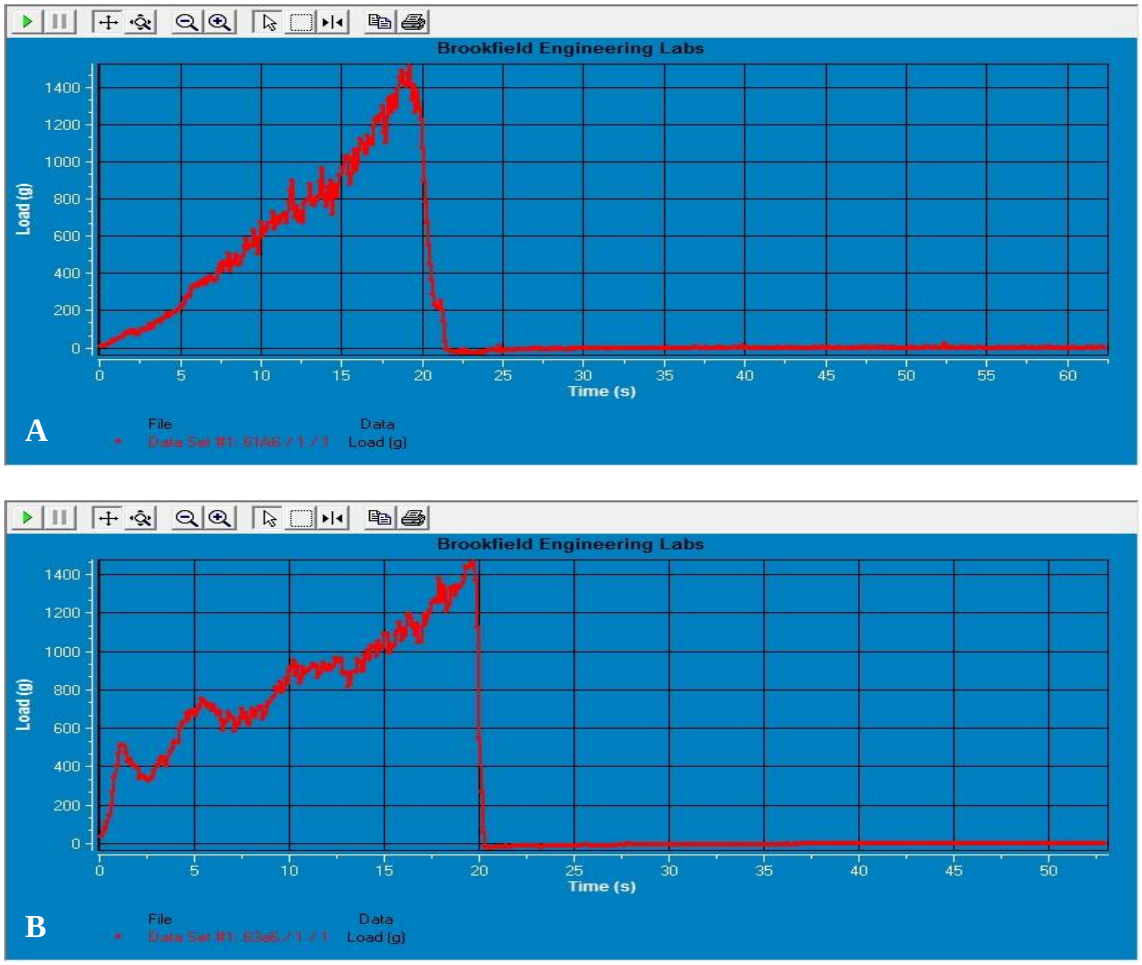
Şekil 4.51. A; Grup 4'te 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 4'te 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 5, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1411 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 2114 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.52A-B**).



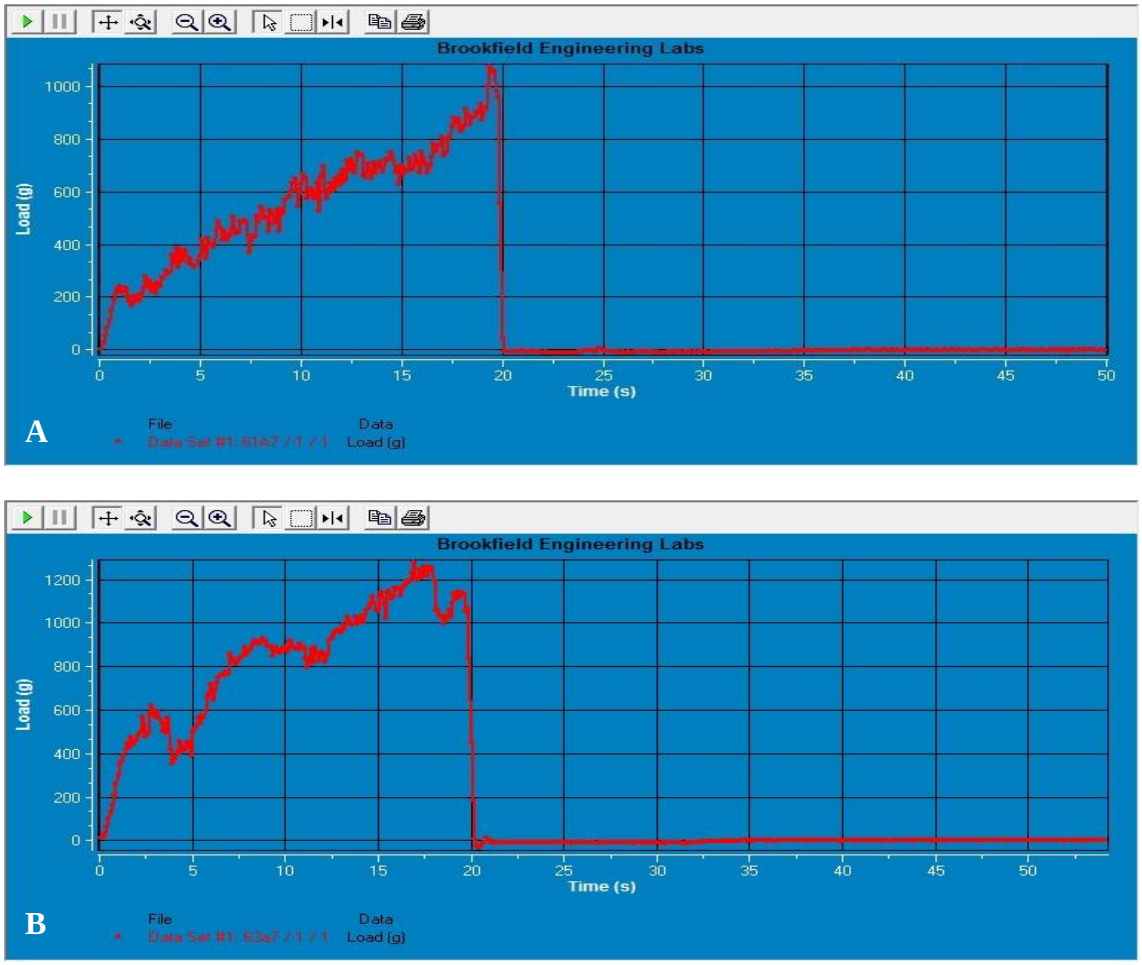
Şekil 4.52. A; Grup 5'te 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 5'te 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 6, fiksatif çözeltisi, 30 ml bakteri solüsyonu ve 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1516 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1467 g'a düşmüştür (**Şekil 4.53A-B**).



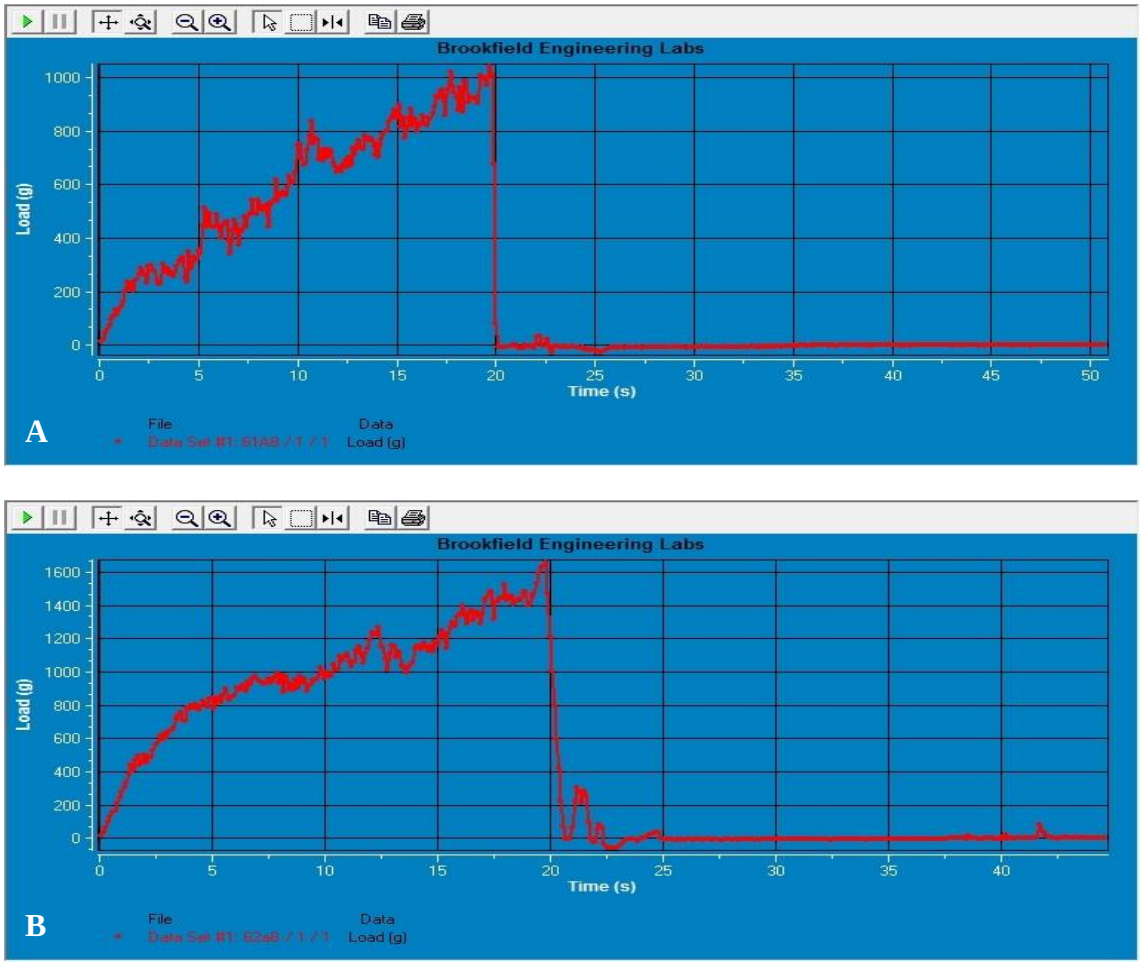
Şekil 4.53. A; Grup 6'da 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 6'da 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 7, fiksatif çözeltisi, 45 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1076 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1282 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.54A-B**).



Şekil 4.54. A; Grup 7'de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 7'de 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 8, fiksatif çözeltisi, 60 ml bakteri solüsyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren çimento solüsyonu ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 14 gün sonra, CPT deneyi ile en yüksek mukavemetin 1044 g olduğu belirlenmiştir. 28. günde yapılan testte ise bu değer 1662 g'a kadar yükselmiştir (**Şekil 4.55A-B**).



Şekil 4.55. A; Grup 8'de 6 günlük uygulama sonucu 14. günde elde edilen CPT grafiği, B; Grup 8'de 6 günlük uygulama sonucu 28. günde elde edilen CPT grafiği

Grup 1 (Kontrol 1)'de, kum kolonları bakteri süspansiyonu içermemektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, $CaCO_3$ oluşumu biyokimyasal değil kimyasal olarak gerçekleşmiştir. 14 ve 28 günlük ölçümlerde zaman ilerledikçe, kristal oluşumu da arttığı için mukavemetin de arttığı gözlenmiştir. 2, 4 ve 6 günlük uygulamaların hepsinde benzer bir ilerleme gözlenmiştir. Fakat, deney grupları ile karşılaştırıldığında, mukavemet değerlerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (**Tablo 4.12**).

Tablo 4.12. Grup 1 (Kontrol 1)'e göre 28 gün sonunda deney gruplarının mukavemet değerlerindeki kat artış ve azalış değerleri

GÜN	GRUP1	GRUP3	GRUP4	GRUP5	GRUP6	GRUP7	GRUP8
2	957	0,1025↓	1,0512↑	1,1462↑	0,2757↓	0,1056↓	0,1108↓
4	1190	1,1630↑	1,2067↑	3,7554↑	1,2235↑	0,0606↓	1,0655↑
6	1392	0,1883↓	0,1373↓	1,5186↑	1,0538↑	0,0791↓	1,1939↑

↑: Kat artışı ↓: Kat azalışı

Grup 2 (Kontrol 2)'de, kum kolonları çimento solüsyonu ile muamele edilmemiştir. Bu nedenle, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunu sağlayacak ürenin ortamda bulunmaması, bakterinin üreaz aktivitesini gösterememesine sebep olmuştur. Bunun yanında, ortama çok az miktarda $CaCl_2$ eklenmesinin kristal oluşumunu engellediği düşünülmektedir. 2 ve 4 günlük iyileştirme uygulamalarının, diğer gruplara göre çok daha az mukavemete sahip olduğu görülmüştür. 6 günlük iyileştirme uygulamasında ise yüksek bir değer elde edilmesine rağmen 14 ve 28 günlük ölçümlerde zaman ilerledikçe değişim gözlenmemiştir. Deney grupları ile karşılaştırıldığında, mukavemet değerlerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (**Tablo 4.13**).

Tablo 4.13. Grup 2 (Kontrol 2)'ye göre 28 gün sonunda deney gruplarının mukavemet değerlerindeki kat artış ve azalış değerleri

GÜN	GRUP2	GRUP3	GRUP4	GRUP5	GRUP6	GRUP7	GRUP8
2	204	4,2107↑	4,9313↑	5,3774↑	4,2254↑	4,1960↑	4,1715↑
4	1107	1,2502↑	1,2971↑	4,0370↑	1,3152↑	1,0099↑	1,1454↑
6	1754	0,3558↓	0,3153↓	1,2052↑	0,1637↓	0,2691↓	0,0525↓

↑: Kat artışı ↓: Kat azalışı

Grup 3 için, kum kolonlarında fiksatif solüsyonu bulunmamaktadır. Elde edilen verilere göre, mukavemet bakımından fiksatif solüsyonunun çok fazla etkili olmadığı belirlenmiştir. Çıkan sonuçlarda, Kontrol grubu 1'e göre 2 günlük uygulamada 0,1 kat (859 g) mukabemet değerinde azalma görülürken, 4 günlük uygulamada 1,2 kat (1384 g g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiş olup, 6 günlük uygulamada ise kontrol grubuna göre 0,2 kat (1130 g) daha az mukavemet değeri belirlenmiştir. Kontrol grubu 2'ye göre 2 günlük uygulamada 4,21 kat (859 g), 4 günlük uygulamada 1,25 kat (1384 g

g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiş olup, 6 günlük uygulamada ise kontrol grubuna göre 0,35 kat (1130 g) daha az mukavemet değeri belirlenmiştir.

Grup 4 için, kum kolonları bakteri, fiksatif ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren solüsyonlar içermektedir. Bu grupta $CaCl_2$ miktarı üreye göre daha yüksek konsantrasyonda uygulanmıştır. Kontrol grubu 1'e göre 2 günlük uygulamada 1 kat (1006 g), 4 günlük uygulamada 1,2 kat (1436 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiş olup, 6 günlük uygulamada ise 0,2 kat (1201 g) daha az mukavemet değeri belirlenmiştir. Kontrol grubu 2'ye göre 2 günlük uygulamada 4,93 kat (1006 g), 4 günlük uygulamada 1,29 kat (1436 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiş olup, 6 günlük uygulamada ise 0,31 kat (1201 g) daha az mukavemet değeri belirlenmiştir. Üre, üreaz enziminin substratı olduğu için, substrat bittiği zaman enzim aktivitesi azalacağından $CaCO_3$ oluşumunun da azalması beklenmektedir. $CaCl_2$ tuzunun fazla olması, kum örneklerinde Cl^- iyonun miktarını artırmaktadır. Cl^- iyonunun, mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu grupta Cl^- iyonunun fazla olmasının, bakteri konsantrasyonunu azalttığı ve böylelikle aktivite oranını da azalttığı düşünülmektedir. 2, 4 ve 6 günlük iyileştirme uygulamalarında, 14 ve 28 günlük ölçümlerde zaman ilerledikçe mukavemet artmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuca paralel olarak, Madhavi ve Naik (2016), yaptıkları çalışmada mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunu 7, 14 ve 28. günlerde incelemiş ve zaman arttıkça birikiminde arttığını gözlemlemiştir. Burada elde edilen sonuçların grup 5 hariç diğer tüm gruplardan yüksek olduğu görülmektedir. Grup 5'in sonucuyla ise benzerlik göstermektedir.

Grup 5, en iyi sonucun elde edildiği gruptur. Bu grupta, üre ve $CaCl_2$ eşit molariteye (0,5 M) sahiptir. Bu nedenle, bakterinin ürettiği üreaz enzimi, ortama eklenen miktardaki üreyi parçalayıp, yine kendisi ile aynı miktarda bulunan Ca^{2+} iyonları ile reaksiyona girerek eşit miktarda $CaCO_3$ oluşturduğu düşünülmektedir. Paassen (2009) yaptığı çalışmada, farklı konsantrasyonlarda üre-$CaCl_2$ içeren solüsyonlar ile numuneleri muamele etmiş ve en iyi sonucun eşit molariteye sahip üre-$CaCl_2$ içeren solüsyonda olduğunu belirlemiş ve bunun yanında $CaCO_3$ birikiminin de arttığını gözlemlediklerini belirtmiştir. Tüm iyileştirme günlerinde zaman ilerledikçe mukavemet değerinin de yükseldiği bildirilmektedir (Madhavi ve Naik, 2016). Çıkan sonuçlarda, Kontrol grubu 1'e göre 2 günlük uygulamada 1,14 kat (1097 g), 4 günlük uygulamada 4 kat (4469 g), 6 günlük uygulamada 1,5 kat (2114 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiştir. Kontrol

grubu 2'ye göre 2 günlük uygulamada 5,37 kat (1097 g), 4 günlük uygulamada 4 kat (4469 g), 6 günlük uygulamada 1,2 kat (2114 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiştir. Bu verilere göre, en iyi sonuç 4 günlük iyileştirme uygulamasında elde edilmiştir. Buna göre, örneklerdeki bakteri konsantrasyonunun ve üre-$CaCl_2$ konsantrasyonunun çok yüksek (6 günlük) veya düşük (2 günlük) olmasının $CaCO_3$ oluşumunu olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir.

Grup 6, kum kolonları bakteri, fiksatif ve 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ içeren solüsyonlar içermektedir. Çıkan sonuçlarda, Kontrol grubu 1'e göre 2 günlük uygulamada 0,1 kat (862 g) mukavemet değerinde azalma görülürken, 4 günlük uygulamada 1,2 kat (1456 g), 6 günlük uygulamada 1 kat (1467 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiştir. Kontrol grubu 2'ye göre 2 günlük uygulamada 4,22 kat (862 g) ve 4 günlük uygulamada 1,31 kat (1456 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilirken, 6 günlük uygulamada 0,16 kat (1467 g) azalma görülmüştür. Madhavi ve Naik (2016), yaptıkları çalışmada mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunu 7, 14 ve 28. günlerde incelemiş ve zaman arttıkça birikiminde arttığını gözlemlemiştir. Buna göre, CO_3^- iyonlarının miktarı üreye bağlı olarak az olacağı için, Ca^{2+} iyonları ile yeteri kadar kristal oluşturamadığı öngörülmektedir.

Grup 7, kum kolonları bakteri (45 ml – $1,5x10^8$ cfu/ml), fiksatif ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ içeren solüsyonlar içermektedir. Bu grupta, bakteri konsantrasyonları diğer gruplara göre daha yüksektir. Çıkan sonuçlarda, Kontrol grubu 1'e göre 4 günlük uygulamada 1 kat (1118 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiş olup, 6 günlük uygulamada 0,1 kat (1282 g) ve 2 günlük uygulamada 0,1 kat (856 g) daha az mukavemet değeri belirlenmiştir. Kontrol grubu 2'ye göre 2 günlük uygulamada 4,19 kat (856 g), 4 günlük uygulamada 1 kat (1118 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiş olup, 6 günlük uygulamada 0,26 kat (1282 g) ve daha az mukavemet değeri belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, bakteri konsantrasyonunun yüksek olmasının, $CaCO_3$ oluşumuna çok fazla katkı sağlamadığı düşünülmektedir.

Grup 8'de bulunan bakteri konsantrasyonu, diğer gruplara göre oldukça yüksektir. Kontrol grubu 1'e göre 2 günlük uygulamada 0,12 kat (851 g) azalma görülürken, 4 günlük uygulamada 1 kat (1268 g), 6 günlük uygulamada 1,19 kat (1662 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilmiştir. Kontrol grubu 2'ye göre 2 günlük uygulamada 4,17

kat (851 g) ve 4 günlük uygulamada 1,14 kat (1268 g) daha fazla mukavemet değeri elde edilirken, 6 günlük uygulamada 0,05 kat (1662 g) düşüş gözlenmiştir

Bazı örneklerin 14. Gün sonuçları, 28. gün sonuçlarına göre daha yüksek çıkmıştır. Örnekler, CPT ölçümleri için ulaşım esnasında az miktarda hasar görmüştür. Bu hasarlar, kum partikülleri arasındaki $CaCO_3$ bağlantılarına zarar verdiği için mukavemet değerlerinin de düşüş çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

4.4.2. Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile $CaCO_3$ miktar tayini

Bu çalışmada, numune özelliklerini belirtmek amacıyla kodlar kullanılmıştır. Örneğin, "2,1-1" kodundaki rakamlar, "uygulanan gün sayısı, tekrar sayısı-grup numarası" şeklinde tanımlanmıştır.

4.4.2.1. 2 günlük iyileştirme uygulaması

2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. gün için 72 adet kum örneğindeki $CaCO_3$ miktarı Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile tayin edilmiştir. 2 günlük iyileştirmeye tabi tutulan örneklerde, her grup ve tekrarı için belli miktarlarda $CaCO_3$ oluşmuştur. 14 gün sonunda oluşan $CaCO_3$ miktarı **Şekil 4.56** ve **Tablo 4.12**'de gösterilmektedir.

Grup 1'de, yaklaşık % 25,57 oranında $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Oluşturulan standart eğri ile karşılatırıldığında ise 0,102830189 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

Grup 2'de, yaklaşık olarak %19,71 oranında $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Bu oran standart $CaCO_3$ miktarında 0,079245283 g'a karşılık gelmektedir.

Grup 3'te, $CaCO_3$ birikim oranı %27,69'dur. Kum örneği içerisinde yaklaşık olarak 0,111320755 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

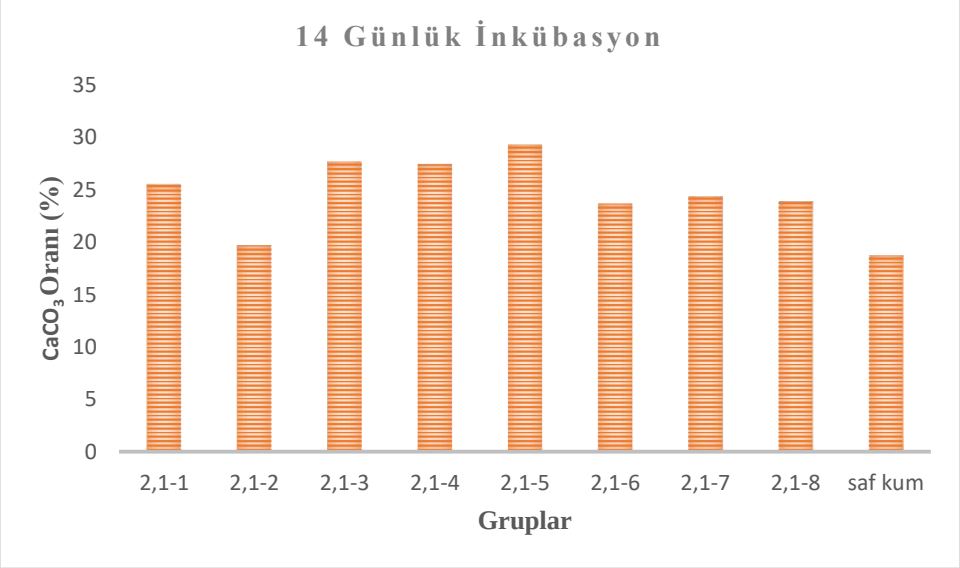
Grup 4'te, yaklaşık %27,45 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Belirlenen oran, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,110377358 g $CaCO_3$ birikimi olduğu belirlenmiştir.

Grup 5'te, $CaCO_3$ birikim oranı % 29,33'tür. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,117924528 g $CaCO_3$ birikimi olduğu belirlenmiştir. Bu grup, 2 günlük iyileştirme uygulamasında en iyi sonucu veren gruptur.

Grup 6'da, yaklaşık %23,70 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Bu oran ile 0,095283019 gr $CaCO_3$ oluştuğu belirlenmiştir.

Grup 7'de, %24,40 oranında $CaCO_3$ birikmiştir. Kum örneği içerisinde ise bu oran, 0,098113208 g $CaCO_3$ oluştuğunu göstermektedir.

Grup 8'de, $CaCO_3$ birikim oranı % 23,93'tür. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,096226415 g $CaCO_3$ birikimi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.56. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Tablo 4.14. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları

Numune ismi	Tartılan miktar	Standart için ilk okunan değer	Standart için son okunan değer	Toplam okunan değer	Hesaplanan % değer (VTX100)/(TX2XW)	Hesaplanan g değeri (WSX VÖ)/ VS
2,1-1	2,01	2	23,8	21,8	25,57964893	0,102830189
2,1-2	2,01	2	18,8	16,8	19,71275697	0,079245283
2,1-3	2,01	2	25,6	23,6	27,69173003	0,111320755
2,1-4	2,01	1,8	25,2	23,4	27,45705435	0,110377358
2,1-5	2,01	0	25	25	29,33445978	0,117924528
2,1-6	2,01	2	22,2	20,2	23,7022435	0,095283019
2,1-7	2,01	2	22,8	20,8	24,40627053	0,098113208
2,1-8	2,01	1	21,4	20,4	23,93691918	0,096226415
saf kum	2,01	2	18	16	18,77405426	0,075471698

: En az $CaCO_3$ birikimine sahip grup, **:** En çok $CaCO_3$ birikimine sahip grup

2 günlük iyileştirme uygulamasında 28. gün için 72 adet kum örneğindeki $CaCO_3$ miktarı Bernard - Scheibler kalsimetre metodu ile tayin edilmiştir. 2 günlük iyileştirmeye tabi tutulan örneklerde, her grup ve tekrarı için belli miktarlarda $CaCO_3$ oluşmuştur. 28 gün sonunda oluşan $CaCO_3$ miktarı **Şekil 4.57** ve **Tablo 4.13**'te gösterilmektedir.

Grup 1'de, yaklaşık %27,92 oranında $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Oluşturulan standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,112264151g $CaCO_3$ oluşumu gözlenmiştir.

Grup 2'de, yaklaşık olarak %19,94 oranında birikim gözlenmiştir. Bu oran standart $CaCO_3$ miktarında 0,080188679 g'a karşılık gelmektedir. Bu grupta, diğer gruplara oranla daha az birikim gerçekleşmiştir.

Grup 3'te, $CaCO_3$ birikim oranı %22,99'dur. Kum örneği içerisinde yaklaşık olarak 0,09245283 g $CaCO_3$ birikimi olduğu belirlenmiştir.

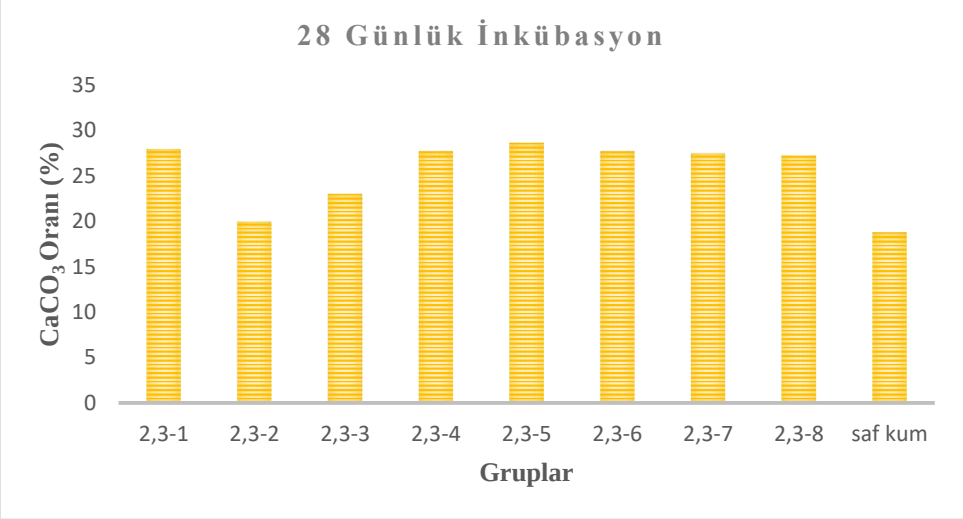
Grup 4'te, yaklaşık %27,69 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Belirlenen oran, standart eğri ile karşılaştırılmış ve 0,111320755 g $CaCO_3$ birikimi olduğu belirlenmiştir.

Grup 5'te, $CaCO_3$ birikim oranı %28,63'tür. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,11509434 g $CaCO_3$ oluşduğu belirlenmiştir. Bu grup, 2 günlük iyileştirme uygulamasında en iyi sonucu veren gruptur.

Grup 6'da, yaklaşık %27,69 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Bu oran ile 0,111320755 g $CaCO_3$ oluştuğu belirlenmiştir.

Grup 7'de, %27,45 oranında $CaCO_3$ birikmiştir. Kum örneği içerisinde ise bu oran, 0,110377358 g $CaCO_3$ oluştuğunu göstermektedir.

Grup 8'de, $CaCO_3$ birikim oranı %27,22'dir. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,109433962 g $CaCO_3$ birikimi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.57. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Tablo 4.15. 2 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları

Numune ismi	Tartılan miktar	Standart için ilk okunan değer	Standart için son okunan değer	Toplam okunan değer	Hesaplanan % değer (V_TX100)/(TX2XW)	Hesaplanan g değeri (W_SX Vö)/ V_S
2,3-1	2,01	2	25,8	23,8	27,92640571	0,112264151
2,3-2	2,01	2	19	17	19,94743265	0,080188679
2,3-3	2,01	1	20,6	19,6	22,99821646	0,09245283
2,3-4	2,01	2	25,6	23,6	27,69173003	0,111320755
2,3-5	2,01	2	26,4	24,4	28,63043274	0,11509434
2,3-6	2,01	1	24,6	23,6	27,69173003	0,111320755
2,3-7	2,01	1	24,4	23,4	27,45705435	0,110377358
2,3-8	2,01	1,6	24,8	23,2	27,22237867	0,109433962
kum	2,01	2	18	16	18,77405426	0,075471698

: En az $CaCO_3$ birikimine sahip grup, **:** En çok $CaCO_3$ birikimine sahip grup

4.4.2.2. 4 günlük iyileştirme uygulaması

4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. gün için 72 adet kum örneğindeki $CaCO_3$ miktarı Bernard - Scheibler kalsimetre metodu ile tayin edilmiştir. 2 günlük iyileştirmeye tabi tutulan örneklerde, her grup ve tekrarı için belli miktarlarda $CaCO_3$ oluşmuştur. 14 gün sonunda oluşan $CaCO_3$ miktarı **Şekil 4.58** ve **Tablo 4.14**'te gösterilmektedir.

Grup 1'de, yaklaşık %31,91 oranında $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Oluşturulan standart eğri ile karşılatırıldığında 0,128302 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

Grup 2'de, yaklaşık olarak %28,16 oranında birikim gözlenmiştir. Bu oran standart $CaCO_3$ miktarında 0,113208 g'a karşılık gelmektedir.

Grup 3'te, $CaCO_3$ birikim oranı %30,03'tür. Kum örneği içerisinde yaklaşık olarak 0,120755 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

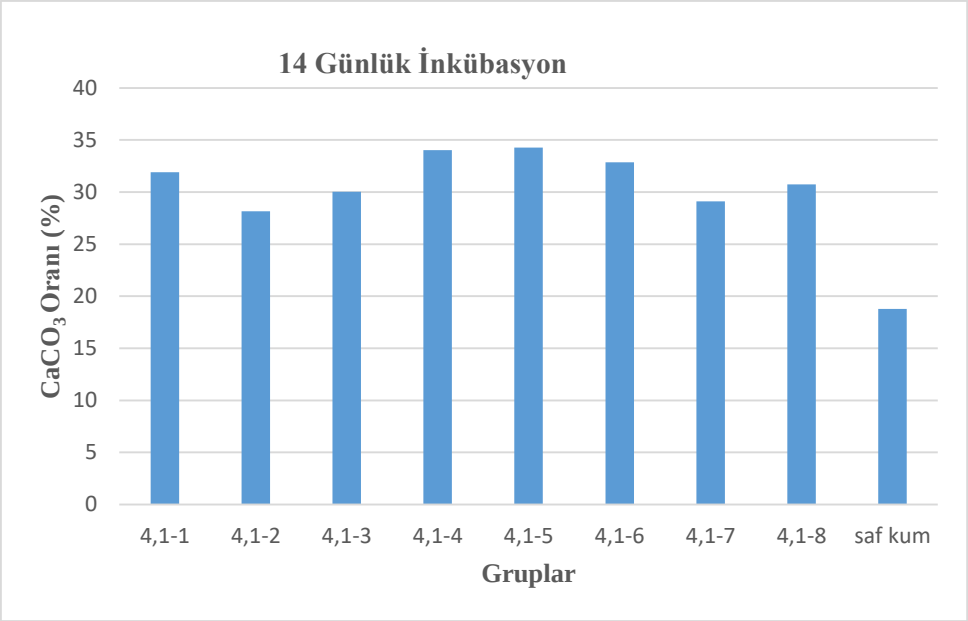
Grup 4'te, yaklaşık %34,02 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Belirlenen oran, standart eğri ile karşılaştırılmış ve 0,136792 g $CaCO_3$ birikimi olduğu belirlenmiştir.

Grup 5'te, $CaCO_3$ birikim oranı %34,26'dır. Oluşan $CaCO_3$ miktarının, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,137736 g olduğu belirlenmiştir. Bu grup, 2 günlük iyileştirme uygulamasında en iyi sonucu veren gruptur.

Grup 6'da, yaklaşık %32,85 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Bu oran ile 0,132075 g $CaCO_3$ oluştuğu belirlenmiştir.

Grup 7'de, %29,09 oranında $CaCO_3$ birikmiştir. Kum örneği içerisinde ise bu oran, 0,116981 g $CaCO_3$ oluştuğunu göstermektedir.

Grup 8'de, $CaCO_3$ birikim oranı %30,74'tür. Oluşan $CaCO_3$ miktarının, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,123585 g olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.58. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Tablo 4.16. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları

Numune ismi	Tartılan miktar	Standart için ilk okunan değer	Standart için son okunan değer	Toplam okunan değer	Hesaplanan % değer (VTX100)/(TX2XW)	Hesaplanan g değeri (WSX VÖ)/ VS
4,1-1	2,01	2,4	29,6	27,2	31,91589	0,128302
4,1-2	2,01	2,2	26,2	24	28,16108	0,113208
4,1-3	2,01	2,2	27,8	25,6	30,03849	0,120755
4,1-4	2,01	2,4	31,4	29	34,02797	0,136792
4, 1-5	2,01	2,2	31,4	29,2	34,26265	0,137736
4,1-6	2,01	2,2	30,2	28	32,85459	0,132075
4,1-7	2,01	2,2	27	24,8	29,09978	0,116981
4,1-8	2,01	2,2	28,4	26,2	30,74251	0,123585
kum	2,01	2	18	16	18,77405	0,075472

: En az $CaCO_3$ birikimine sahip grup, **:** En çok $CaCO_3$ birikimine sahip grup

4 günlük iyileştirme uygulamasında 28. gün için 72 adet kum örneğindeki $CaCO_3$ miktarı Bernard - Scheibler kalsimetre metodu ile tayin edilmiştir. 2 günlük iyileştirmeye

tabi tutulan örneklerde, her grup ve tekrarı için belli miktarlarda $CaCO_3$ oluşmuştur. 28 gün sonunda oluşan $CaCO_3$ miktarı **Şekil 4.59** ve **Tablo 4.15'**te gösterilmektedir.

Grup 1'de, yaklaşık %27,92 oranında $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Oluşturulan standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,112264 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

Grup 2'de, yaklaşık olarak %21,12 oranında birikim gözlenmiştir. Bu oran standart $CaCO_3$ miktarında 0,084906 g'a karşılık gelmektedir. Bu grupta, diğer gruplara oranla daha az birikim gerçekleşmiştir.

Grup 3'te, $CaCO_3$ birikim oranı %28,63'tür. Kum örneği içerisinde yaklaşık olarak 0,115094 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

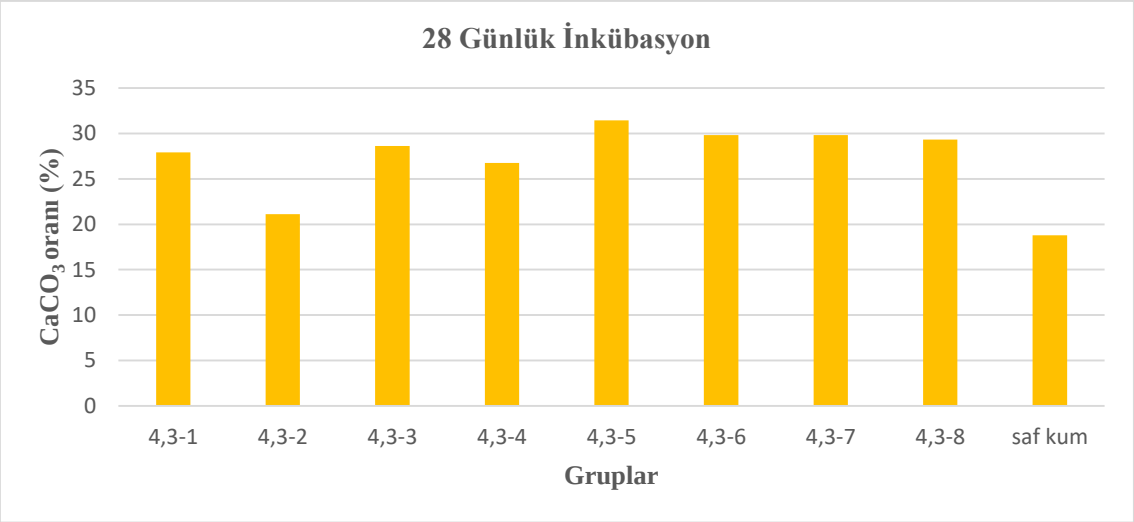
Grup 4'te, yaklaşık %26,75 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Belirlenen oran, standart eğri ile karşılaştırılmış ve 0,107547 g birikim olduğu belirlenmiştir.

Grup 5'te, $CaCO_3$ birikim oranı %31,44'tür. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,126415 g olduğu belirlenmiştir. Bu grup, 2 günlük iyileştirme uygulamasında en iyi sonucu veren gruptur. Elde edilen veriler, CPT sonuçları ile karşılaştırıldığında, birbirleri ile tutarlı değerler elde edilmiştir.

Grup 6'da, yaklaşık %29,80 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Bu oran ile 0,119811 g $CaCO_3$ oluştuğu belirlenmiştir.

Grup 7'de, %29,80 oranında $CaCO_3$ birikmiştir. Kum örneği içerisinde ise bu oran, 0,119811 g $CaCO_3$ oluştuğunu göstermektedir.

Grup 8'de, $CaCO_3$ birikim oranı %29,33'tür. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,117925 g olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.59. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Tablo 4.17. 4 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları

Numune ismi	Tartılan miktar	Standart için ilk okunan değer	Standart için son okunan değer	Toplam okunan değer	Hesaplanan % değer (VTX100)/(TX2XW)	Hesaplanan g değeri (WSX VÖ)/ VS
4,3-1	2,01	2,4	26,2	23,8	27,92641	0,112264
4,3-2	2,01	2	20	18	21,12081	0,084906
4,3-3	2,01	2	26,4	24,4	28,63043	0,115094
4,3-4	2,01	2	24,8	22,8	26,75303	0,107547
4,3-5	2,01	2	28,8	26,8	31,44654	0,126415
4,3-6	2,01	2,4	27,8	25,4	29,80381	0,119811
4,3-7	2,01	2	27,4	25,4	29,80381	0,119811
4,3-8	2,01	2,2	27,2	25	29,33446	0,117925
kum	2,01	2	18	16	18,77405	0,075472

: En az $CaCO_3$ birikimine sahip grup, **:** En çok $CaCO_3$ birikimine sahip grup

Bu çalışmada elde edilen sonuçların CPT sonuçları ile hemen hemen tutarlı olduğu görülmektedir. CPT sonuçlarında olduğu gibi Grup 5 en iyi sonucu verirken, Grup 2 etkisiz olan grup olarak belirlenmiştir. 2 günlük iyileştirme uygulamasında elde edilen veriler, 4 günlük iyileştirme uygulaması sonuçları ile karşılaştırıldığında, her grubun birbiri ile tutarlı değerlere sahip olduğu görülmektedir.

4.4.2.3. 6 günlük iyileştirme uygulaması

6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. gün için 72 adet kum örneğindeki $CaCO_3$ miktarı Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile tayin edilmiştir. 6 günlük iyileştirmeye tabi tutulan örneklerde, her grup ve tekrarı için belli miktarlarda $CaCO_3$ oluşmuştur. 14 gün sonunda oluşan $CaCO_3$ miktarı **Şekil 4.60** ve **Tablo 4.16**'da gösterilmektedir.

Grup 1'de, yaklaşık % 30,03 oranında $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Oluşturulan standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,120755 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

Grup 2'de, yaklaşık olarak %30,27 oranında birikim gözlenmiştir. Bu oran standart $CaCO_3$ miktarında 0,121698 g'a karşılık gelmektedir.

Grup 3'te, $CaCO_3$ birikim oranı %30,97'dir. Kum örneği içerisinde yaklaşık olarak 0,124528 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

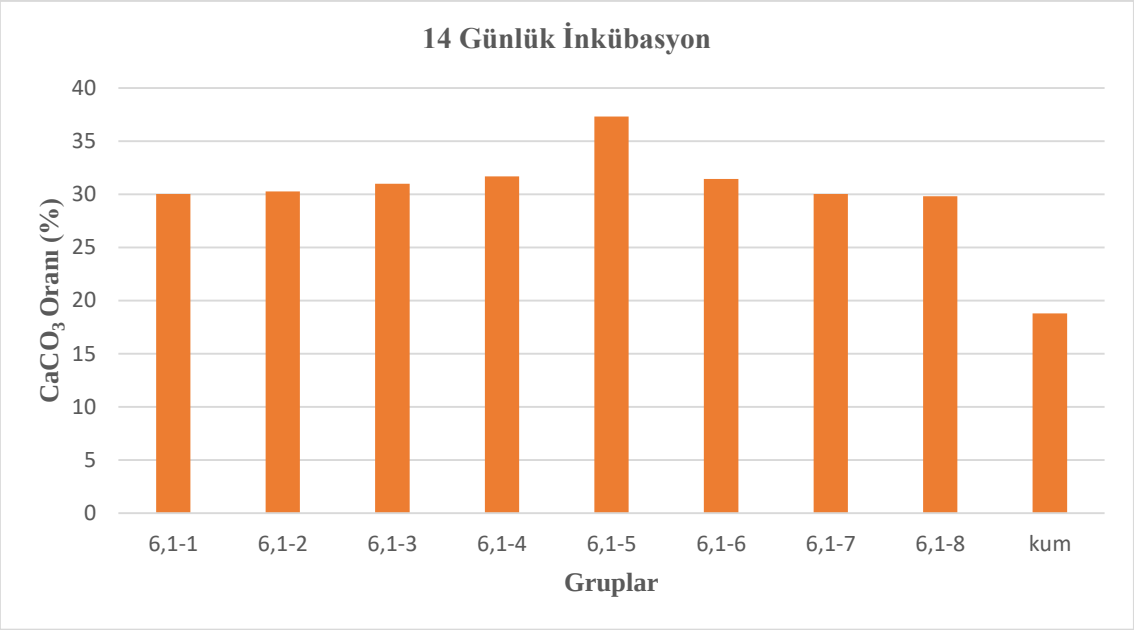
Grup 4'te, yaklaşık %31,68 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Belirlenen oran, standart eğri ile karşılaştırılmış ve 0,127358 g birikim olduğu belirlenmiştir.

Grup 5'te, $CaCO_3$ birikim oranı %37,31'dir. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,15 g olduğu belirlenmiştir. Bu grup, 6 günlük iyileştirme uygulamasında en iyi sonucu veren gruptur.

Grup 6'da, yaklaşık %31,44 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Bu oran ile 0,126415 g $CaCO_3$ oluştuğu belirlenmiştir.

Grup 7'de, %30,03 oranında $CaCO_3$ birikmiştir. Kum örneği içerisinde ise bu oran, 0,120755 g $CaCO_3$ oluştuğunu göstermektedir.

Grup 8'de, $CaCO_3$ birikim oranı %29,80'dir. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,119811 g olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.60. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Tablo 4.18. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları

Numune ismi	Tartılan miktar	Standart için ilk okunan değer	Standart için son okunan değer	Toplam okunan değer	Hesaplanan % değer (VTX100)/(TX2XW)	Hesaplanan g değeri (WSX VÖ)/ VS
6,1-1	2,01	1,4	27	25,6	30,03849	0,120755
6,1-2	2,01	2,2	28	25,8	30,27316	0,121698
6,1-3	2,01	2,2	28,6	26,4	30,97719	0,124528
6,1-4	2,01	2	29	27	31,68122	0,127358
6,1-5	2,01	2,2	34	31,8	37,31343	0,15
6,1-6	2,01	2,2	29	26,8	31,44654	0,126415
6,1-7	2,01	2,2	27,8	25,6	30,03849	0,120755
6,1-8	2,01	2	27,4	25,4	29,80381	0,119811
kum	2,01	2	18	16	18,77405	0,075472

: En az $CaCO_3$ birikimine sahip grup, **:** En çok $CaCO_3$ birikimine sahip grup

6 günlük iyileştirme uygulamasında 28. gün için 72 adet kum örneğindeki $CaCO_3$ miktarı Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile tayin edilmiştir. 6 günlük iyileştirmeye

tabi tutulan örneklerde, her grup ve tekrarı için belli miktarlarda $CaCO_3$ oluşmuştur. 28 gün sonunda oluşan $CaCO_3$ miktarı **Şekil 4.61** ve **Tablo 4.17**'de gösterilmektedir.

Grup 1'de, yaklaşık %29,80 oranında $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Oluşturulan standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,119811 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

Grup 2'de, yaklaşık olarak %30,50 oranında birikim gözlenmiştir. Bu oran standart $CaCO_3$ miktarında 0,122642 g'a karşılık gelmektedir.

Grup 3'te, $CaCO_3$ birikim oranı %31,91'dir. Kum örneği içerisinde yaklaşık olarak 0,128302 g $CaCO_3$ oluşmuştur.

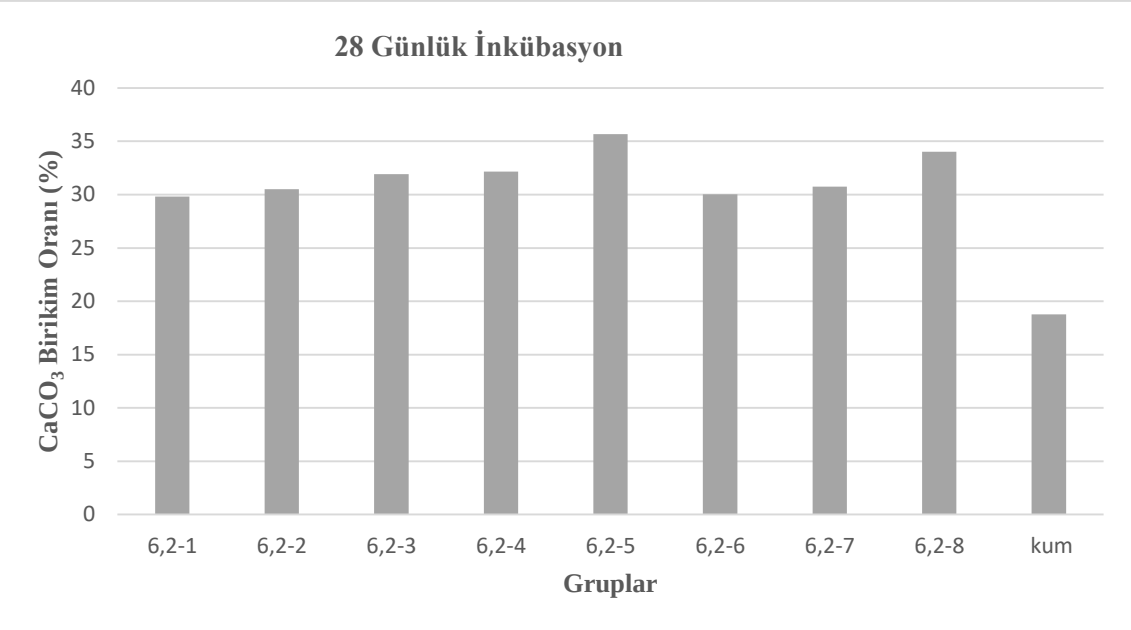
Grup 4'te, yaklaşık %32,15057 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Belirlenen oran, standart eğri ile karşılaştırılmış ve 0,129245 g birikim olduğu belirlenmiştir.

Grup 5'te, $CaCO_3$ birikim oranı %35,67'dir. Oluşan $CaCO_3$ miktarı, standart eğri ile karşılaştırıldığında ise 0,143396 g olduğu belirlenmiştir. Bu grup, 6 günlük iyileştirme uygulamasında en iyi sonucu veren gruptur. Elde edilen veriler, CPT sonuçları ile karşılaştırıldığında, birbirleri ile tutarlı değerler elde edilmiştir.

Grup 6'da, yaklaşık %30,03 oranında $CaCO_3$ oluşmuştur. Bu oran ile 0,120755 g $CaCO_3$ oluştuğu belirlenmiştir.

Grup 7'de, %30,74 oranında $CaCO_3$ birikmiştir. Kum örneği içerisinde ise bu oran, 0,123585 g $CaCO_3$ oluştuğunu göstermektedir.

Grup 8'de, $CaCO_3$ birikim oranı %34,02'dir. Oluşan $CaCO_3$ miktarının, standart eğri ile karşılaştırıldığında 0,136792 g olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.61. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçlarının gruplara göre karşılaştırma grafiği

Tüm iyileştirme uygulama grupları ve tekrar sonuçları **Tablo 4.18**'de gösterilmektedir.

Tablo 4.19. 6 günlük iyileştirme uygulamasında 28. günde Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile hesaplanmış $CaCO_3$ miktarı sonuçları

Numune ismi	Tartılan miktar	Standart için ilk okunan değer	Standart için son okunan değer	Toplam okunan değer	Hesaplanan % değer (VTX100)/(TX2XW)	Hesaplanan g değeri (WSX VÖ)/ VS
6,2-1	2,01	2	27,4	25,4	29,80381	0,119811
6,2-2	2,01	2	28	26	30,50784	0,122642
6,2-3	2,01	2,2	29,4	27,2	31,91589	0,128302
6,2-4	2,01	2	29,4	27,4	32,15057	0,129245
6,2-5	2,01	2	32,4	30,4	35,6707	0,143396
6,2-6	2,01	2	27,6	25,6	30,03849	0,120755
6,2-7	2,01	2	28,2	26,2	30,74251	0,123585
6,2-8	2,01	2	31	29	34,02797	0,136792
saf kum	2,01	2	18	16	18,77405	0,075472

: En az $CaCO_3$ birikimine sahip grup, **:** En çok $CaCO_3$ birikimine sahip grup

Tablo 4.20. Bernard-Scheibler kalsimetre metodu ile kolonlarda belirlenen $CaCO_3$ miktarları

Numune ismi	Tartılan miktar	Standart için ilk okunan değer	Standart için son okunan değer	Toplam okunan değer	Hesaplanan % değer (V_TX100)/(TX2XW)	Hesaplanan g değeri (W_SX Vö)/ V_S
Standart	0,05	2	10,2	8,2		
Standart	0,075	0,6	10,6	10		
Standart	0,1	2	23,2	21,2		
Standart	0,125	2,2	28,6	26,4		
Standart	0,15	2,2	34,4	32,2		
Standart	0,25	2	57	55		
Standart	0,5	2	124	122		
kum	2,01	2	18	16	18,77405	0,075472
2,1-1	2,01	2	23,8	21,8	25,57965	0,10283
2,1-2	2,01	2	18,8	16,8	19,71276	0,079245
2,1-3	2,01	2	25,6	23,6	27,69173	0,111321
2,1-4	2,01	1,8	25,2	23,4	27,45705	0,110377
2,1-5	2,01	0	25	25	29,33446	0,117925
2,1-6	2,01	2	22,2	20,2	23,70224	0,095283
2,1-7	2,01	2	22,8	20,8	24,40627	0,098113
2,1-8	2,01	1	21,4	20,4	23,93692	0,096226
2,2-1	2,01	2	24,2	22,2	26,049	0,104717
2,2-2	2,01	2	24	22	25,81432	0,103774
2,2-3	2,01	1	23,4	22,4	26,28368	0,10566
2,2-4	2,01	2	26	24	28,16108	0,113208
2,2-5	2,01	1	25,6	24,6	28,86511	0,116038
2,2-6	2,01	2	23	21	24,64095	0,099057
2,2-7	2,01	0,5	23,8	23,3	27,33972	0,109906
2,2-8	2,01	2	24	22	25,81432	0,103774
2,3-1	2,01	2	25,8	23,8	27,92641	0,112264
2,3-2	2,01	2	19	17	19,94743	0,080189
2,3-3	2,01	1	20,6	19,6	22,99822	0,092453
2,3-4	2,01	2	25,6	23,6	27,69173	0,111321
2,3-5	2,01	2	26,4	24,4	28,63043	0,115094
2,3-6	2,01	1	24,6	23,6	27,69173	0,111321
2,3-7	2,01	1	24,4	23,4	27,45705	0,110377
2,3-8	2,01	1,6	24,8	23,2	27,22238	0,109434

Tablo 4.20. Devam.

4,1-1	2,01	2,4	29,6	27,2	31,91589	0,128302
4,1-2	2,01	2,2	26,2	24	28,16108	0,113208
4,1-3	2,01	2,2	27,8	25,6	30,03849	0,120755
4,1-4	2,01	2,4	31,4	29	34,02797	0,136792
4,1-5	2,01	2,2	31,4	29,2	34,26265	0,137736
4,1-6	2,01	2,2	30,2	28	32,85459	0,132075
4,1-7	2,01	2,2	27	24,8	29,09978	0,116981
4,1-8	2,01	2,2	28,4	26,2	30,74251	0,123585
4,2-1	2,01	2,2	27	24,8	29,09978	0,116981
4,2-2	2,01	2,2	30,8	28,6	33,55862	0,134906
4,2-3	2,01	0,4	22	21,6	25,34497	0,101887
4,2-4	2,01	2	24	22	25,81432	0,103774
4,2-5	2,01	1,7	23,9	22,2	26,049	0,104717
4,2-6	2,01	2	24,9	22,9	26,87037	0,108019
4,2-7	2,01	2	27,6	25,6	30,03849	0,120755
4,2-8	2,01	2	20,8	18,8	22,05951	0,088679
4,3-1	2,01	2,4	26,2	23,8	27,92641	0,112264
4,3-2	2,01	2	20	18	21,12081	0,084906
4,3-3	2,01	2	26,4	24,4	28,63043	0,115094
4,3-4	2,01	2	24,8	22,8	26,75303	0,107547
4,3-5	2,01	2	28,8	26,8	31,44654	0,126415
4,3-6	2,01	2,4	27,8	25,4	29,80381	0,119811
4,3-7	2,01	2	27,4	25,4	29,80381	0,119811
4,3-8	2,01	2,2	27,2	25	29,33446	0,117925
6,1-1	2,01	1,4	27	25,6	30,03849	0,120755
6,1-2	2,01	2,2	28	25,8	30,27316	0,121698
6,1-3	2,01	2,2	28,6	26,4	30,97719	0,124528
6,1-4	2,01	2	29	27	31,68122	0,127358
6,1-5	2,01	2,2	34	31,8	37,31343	0,15
6,1-6	2,01	2,2	29	26,8	31,44654	0,126415
6,1-7	2,01	2,2	27,8	25,6	30,03849	0,120755
6,1-8	2,01	2	27,4	25,4	29,80381	0,119811
6,2-1	2,01	2	27,4	25,4	29,80381	0,119811
6,2-2	2,01	2	28	26	30,50784	0,122642
6,2-3	2,01	2,2	29,4	27,2	31,91589	0,128302
6,2-4	2,01	2	29,4	27,4	32,15057	0,129245
6,2-5	2,01	2	32,4	30,4	35,6707	0,143396

Tablo 4.20. Devam.

6,2-6	2,01	2	27,6	25,6	30,03849	0,120755
6,2-7	2,01	2	28,2	26,2	30,74251	0,123585
6,2-8	2,01	2	31	29	34,02797	0,136792
6,3-1	2,01	2	29,4	27,4	32,15057	0,129245
6,3-2	2,01	2	26	24	28,16108	0,113208
6,3-3	2,01	2	31,4	29,4	34,49732	0,138679
6,3-4	2,01	2,2	31,5	29,3	34,37999	0,138208
6,3-5	2,01	2	33,6	31,6	37,07876	0,149057
6,3-6	2,01	2	28,6	26,6	31,21187	0,125472
6,3-7	2,01	2	27,8	25,8	30,27316	0,121698
6,3-8	2,01	2	29,6	27,6	32,38524	0,130189

Bu çalışmada kalsimetre metodu ile belirlenen $CaCO_3$ birikim oranı ile CPT ile elde edilen mukavemet değerleri karşılaştırılmıştır. Her iyileştirme uygulaması ve onların grupları içinde en yüksek değerler, bundan önceki çalışmalarda olduğu gibi Grup 5'te gözlenmiştir. $CaCO_3$ birikiminin artması, kum partiküllerinin birbiri ile bağlamasını ve doğal olarak kum örneklerindeki mukavemetin artmasını sağlamaktadır. Literatürde $CaCO_3$ oranın artmasının zeminin kayma ve basınç mukavemetini artırdığı, su geçirgenliğini ve poroziteyi azalttığı belirtilmektedir. Çalışmamızda ortam koşullarının uygun olmaması ve cihaza ulaşım problemi sırasında örneklerde oluşan hasarların, bazı değerlerin düşük çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Genel olarak bakıldığında, Grup 1'de, CPT testlerinde olduğu gibi uygulama gününün artmasına bağlı olarak daha fazla $CaCO_3$ birikimi gözlenmiştir. Ayrıca 2 günlük iyileştirme uygulamasında 14. günden 28. güne kadar $CaCO_3$ birikimi artmıştır. 4 günlük ve 6 günlük uygulamalarda ise elde edilen değerler 14. günde daha fazladır. Bunun sebebinin, ölçümler sırasında kullanılan cihazdan CO_2 gazı kaçışı olduğu düşünülmektedir. Grup 2'de zamana ve uygulama günü sayısındaki artışa bağlı olarak birikimin arttığı gözlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarla da bu sonuçlar desteklenmektedir (Madhavi ve Naik, 2016, Jonkers ve ark., 2010). Grup 1 ve Grup 2 kontrol gruplarıdır. Bu nedenle $CaCO_3$ oluşumu biyokimyasal olarak gerçekleşmemiştir. Elde edilen verilerin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Grup 3'te en iyi sonuç 6 günlük iyileştirme uygulamasında elde edilmiştir. Diğer uygulamalarda ise zaman ilerledikçe önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu grupta fiksatif solüsyonu eklenmemiştir. Fiksatif solüsyonunun kullanılmasının esas amacı, negatif yüklü hücre membranına sahip bakteri yüzeyinin, pozitif yüklü Ca^{2+} iyonları ile kum partiküllerine tutunmasını sağlamaktır (Paassen, 2009). Bu bağlamda, fiksatif yerine çimento solüsyonundaki Ca^{2+} iyonları bu işlevi görmekte, fakat etkisini uzun süreli uygulamalarda gösterdiği düşünülmektedir. Buna göre, uygulama gün sayısının az olması Ca^{2+} iyonlarının etkisini de azaltacağından 6 günlük uygulamadaki sonuçların daha yüksek çıktığı varsayılmaktadır. Böyle bir çalışma Paassen (2009) tarafından gerçekleştirilmiş ve fiksatif solüsyonunun biyoçimentolama işleminde etkin rol oynadığını göstermiştir.

Grup 4'te, en iyi sonuç 6 günlük iyileştirme uygulamasında görülmüştür. Zamana bağlı olarak $CaCO_3$ birikiminde artış gözlenmiştir. Diğer uygulamalarda deneysel hatadan dolayı düşük değerlerin elde edildiği düşünülmektedir.

Grup 5 ise, bu çalışmada en iyi sonucun elde edildiği gruptur. Grup, eşit molaritede üre-$CaCl_2$ solüsyonu içerdiği için yüksek miktarda $CaCO_3$ birikimi olmuştur. $CaCO_3$ oluşumu sağlanırken, ortamdaki Ca^{2+} iyonları da azalmaktadır. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçla benzer olarak, De Muynck ve ark.'nın (2010) yaptığı çalışmada, eşit molariteye sahip üre-$CaCl_2$ solüsyonuyla muamele edilen örneklerde $CaCO_3$ oluşumu artarken, Ca^{2+} iyonlarının zamanla azaldığını belirtmiştir. Diğer gruplarda ise yine benzer şekilde zamana bağlı olarak bir artış gözlemlenmiştir.

4.5. Kolonlarda Konsolidasyon Testi

4.5.1. Grup 1 için konsolidasyon sonuçları

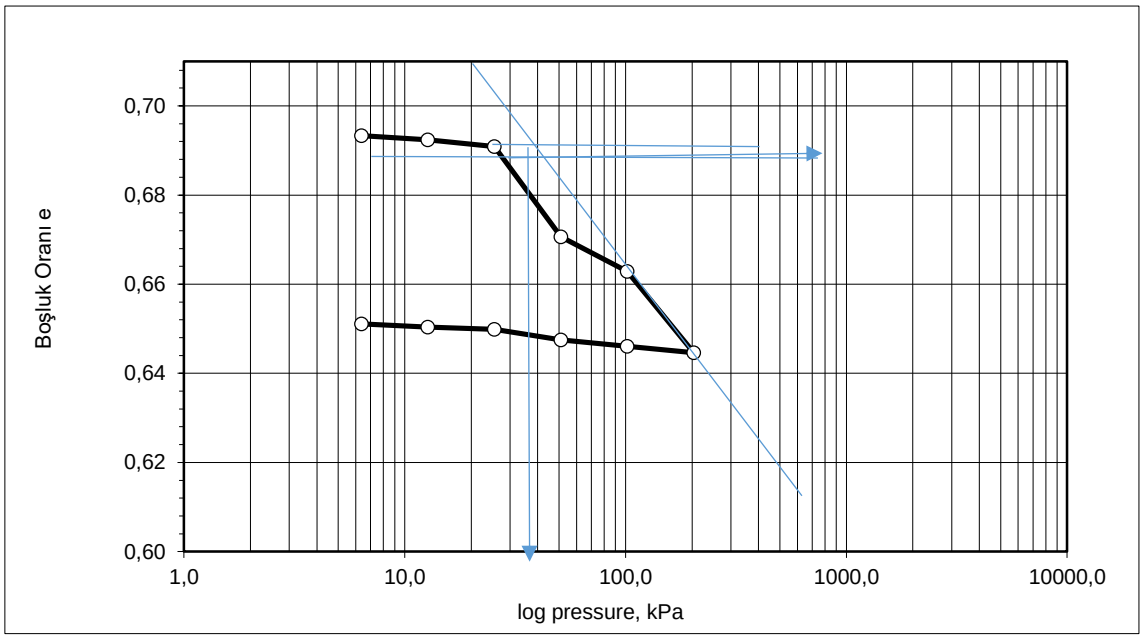
Grup 1 kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Grubun şişme yüzdesinde herhangi bir değşiklik olmayıp, sıkışma indisi 0,0259 ve yeniden sıkışma indisi 0,0079 olarak belirlenmiştir. Konsolidasyon katsayısı ise 0,000352 olarak hesaplanmıştır. Mikrobiyal bir aktivite olmadığı için, sıkışma ve şişme değerlerinde belirgin bir azalma gözlenmemiştir.

Tablo 4.21. Grup 1 için konsolidasyon parametre değerleri

Sıkışma İndisi Cc	Yeniden Sıkışma İndisi Cr	Ön Konsolidasyon Basıncı Po(kPa)	Şişme Yüzdesi	Şişme Basıncı σsp (kPa)
0,0259	0,0079	38	0	0

Tablo 4.22. Grup 1 için konsolidasyon katsayısı değeri

Uygulanan Gerilme (kPa)	d_0	t_0	d_{100}	t_{100}	d_{50}	t_{50}	Konsolidasyon Katsayısı Cv(cm^2/s)
203,7	0,312	-	0,35	5000	0,331	560	0,000352



Şekil 4.62. Grup 1 için log pressure-boşluk oranı grafiği

4.5.2. Grup 3 için konsolidasyon sonuçları

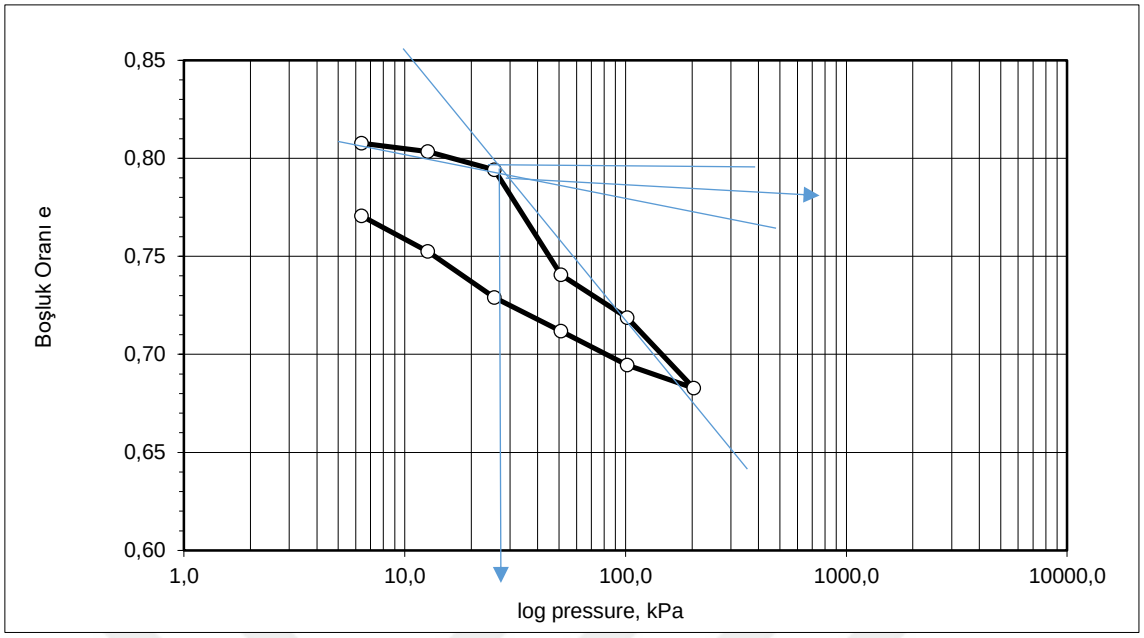
Grup 3 deney grubu olarak kullanılmıştır. Bu gruptaki kum örneği sadece bakteri süspansiyonu ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ solüsyonu ile muamele edilmiştir. Şişme yüzdesinde 0,02 olup, sıkışma indisi 0,0724 ve yeniden sıkışma indisi 0,0571 olarak belirlenmiştir. Konsolidasyon katsayısı ise 0,0003283 olarak hesaplanmıştır. Mikrobiyal aktivite sonucunda kontrol grubuna göre şişme ve sıkışma bakımından farklılıklar gözlenmiştir.

Tablo 4.23. Grup 3 için konsolidasyon parametre değerleri

Sıkışma İndisi Cc	Yeniden Sıkışma İndisi Cr	Ön Konsolidasyon Basıncı Po(kPa)	Şişme Yüzdesi	Şişme Basıncı σsp (kPa)
0,0724	0,0571	28	0,02	0

Tablo 4.24. Grup 3 için konsolidasyon katsayısı değeri

Uygulanan Gerilme (kPa)	d_0	t_0	d_{100}	t_{100}	d_{50}	t_{50}	Konsolidasyon Katsayısı Cv(cm^2/s)
203,7	0,860	-	0,86	280	0,86	60	0,0003283



Şekil 4.63. Grup 3 için log pressure-boşluk oranı grafiği

4.5.3. Grup 4 için konsolidasyon sonuçları

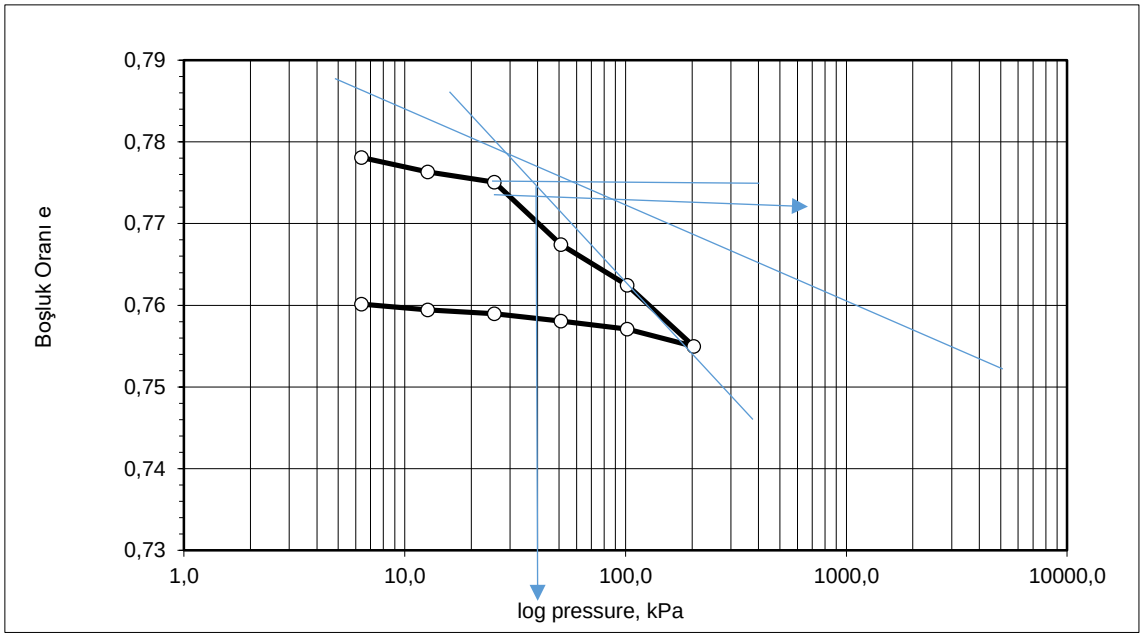
Grup 4 deney grubu olarak kullanılmıştır. Bu gruptaki kum örneği bakteri süspansiyonu, fiksatif çözeltisi ve 0,5 M üre-0,3 M $CaCl_2$ solüsyonu ile muamele edilmiştir. Şişme yüzdesinde 0,02 olup, sıkışma indisi 0,0165 ve yeniden sıkışma indisi 0,0030 olarak belirlenmiştir. Konsolidasyon katsayısı ise 0,000386 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.25. Grup 4 için konsolidasyon parametre değerleri

Sıkışma İndisi Cc	Yeniden Sıkışma İndisi Cr	Ön Konsolidasyon Basıncı Po(kPa)	Şişme Yüzdesi	Şişme Basıncı σsp (kPa)
0,0165	0,0030	40	0,02	0

Tablo 4.26. Grup 4 için konsolidasyon katsayısı değeri

Uygulanan Gerilme (kPa)	d_0	t_0	d_{100}	t_{100}	d_{50}	t_{50}	Konsolidasyon Katsayısı Cv(cm^2/s)
203,7	0,176	-	0,1843	8000	0,18015	510	0,000386



Şekil 4.64. Grup 4 için log pressure-boşluk oranı grafiği

4.5.4. Grup 5 için konsolidasyon sonuçları

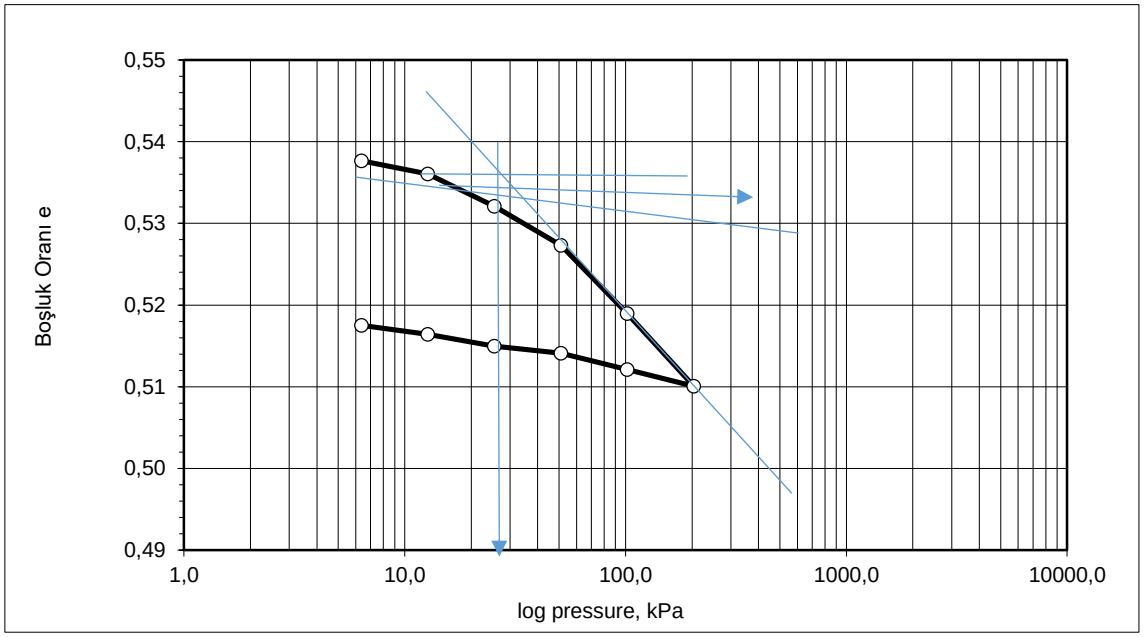
Grup 5 deney grubu olarak kullanılmıştır. Bu gruptaki kum örneği bakteri süspansiyonu, fiksatif çözeltisi ve 0,5 M üre-0,5 M $CaCl_2$ solüsyonu ile muamele edilmiştir. Şişme yüzdesinde 0,31 olup, sıkışma indisi 0,0277 ve yeniden sıkışma indisi 0,0028 olarak belirlenmiştir. Konsolidasyon katsayısı ise 0,612753 olarak hesaplanmıştır. Mikrobiyal aktivite sonucunda kontrol grubuna göre şişme azalmıştır.

Tablo 4.27. Grup 5 için konsolidasyon parametre değerleri

Sıkışma İndisi Cc	Yeniden Sıkışma İndisi Cr	Ön Konsolidasyon Basıncı Po(kPa)	Şişme Yüzdesi	Şişme Basıncı σsp (kPa)
0,0277	0,0028	28	0,31	0

Tablo 4.28. Grup 5 için konsolidasyon katsayısı değeri

Uygulanan Gerilme (kPa)	d_0	t_0	d_{100}	t_{100}	d_{50}	t_{50}	Konsolidasyon Katsayısı Cv(cm^2/s)
203,7	0,316	-	0,329	19000	0,3225	0,3215	0,612753



Şekil 4.65. Grup 5 için log pressure-boşluk oranı grafiği

4.5.5. Grup 6 için konsolidasyon sonuçları

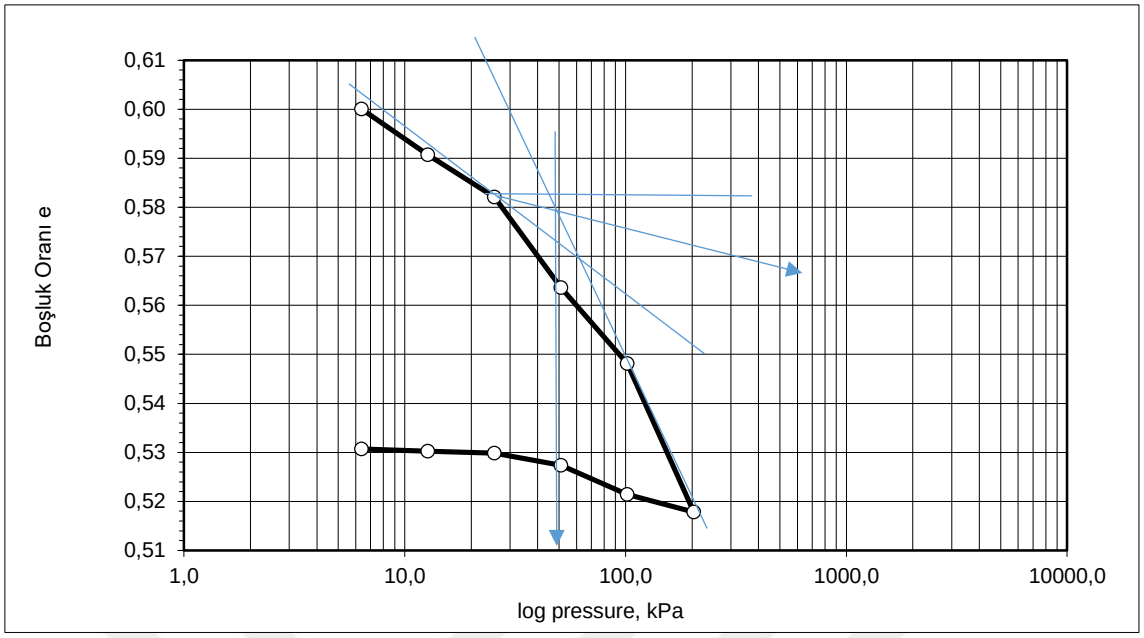
Grup 6 deney grubu olarak kullanılmıştır. Bu gruptaki kum örneği bakteri süspansiyonu, fiksatif çözeltisi ve 0,3 M üre-0,5 M $CaCl_2$ solüsyonu ile muamele edilmiştir. Şişme yüzdesinde 0,13 olup, sıkışma indisi 0,0515 ve yeniden sıkışma indisi 0,0083 olarak belirlenmiştir. Konsolidasyon katsayısı ise 0,000938 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.29. Grup 6 için konsolidasyon parametre değerleri

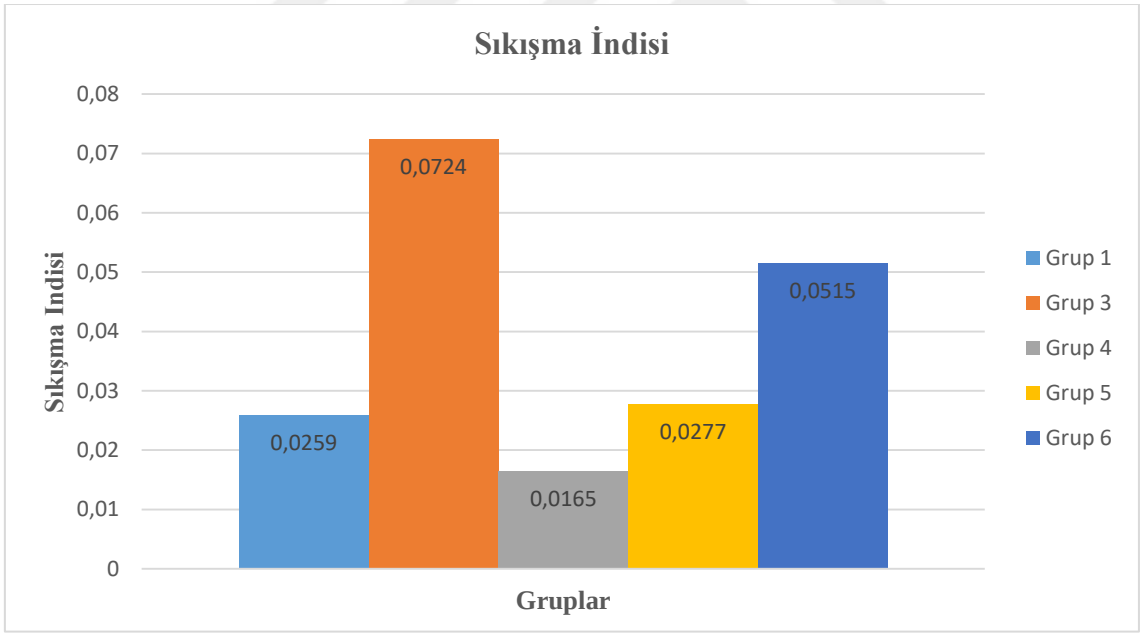
Sıkışma İndisi Cc	**Yeniden Sıkışma İndisi Cr**	**Ön Konsolidasyon Basıncı Po(kPa)**	**Şişme Yüzdesi**	**Şişme Basıncı σsp (kPa)**
0,0515	0,0083	50	0,13	0

Tablo 4.30. Grup 6 için konsolidasyon katsayısı değeri

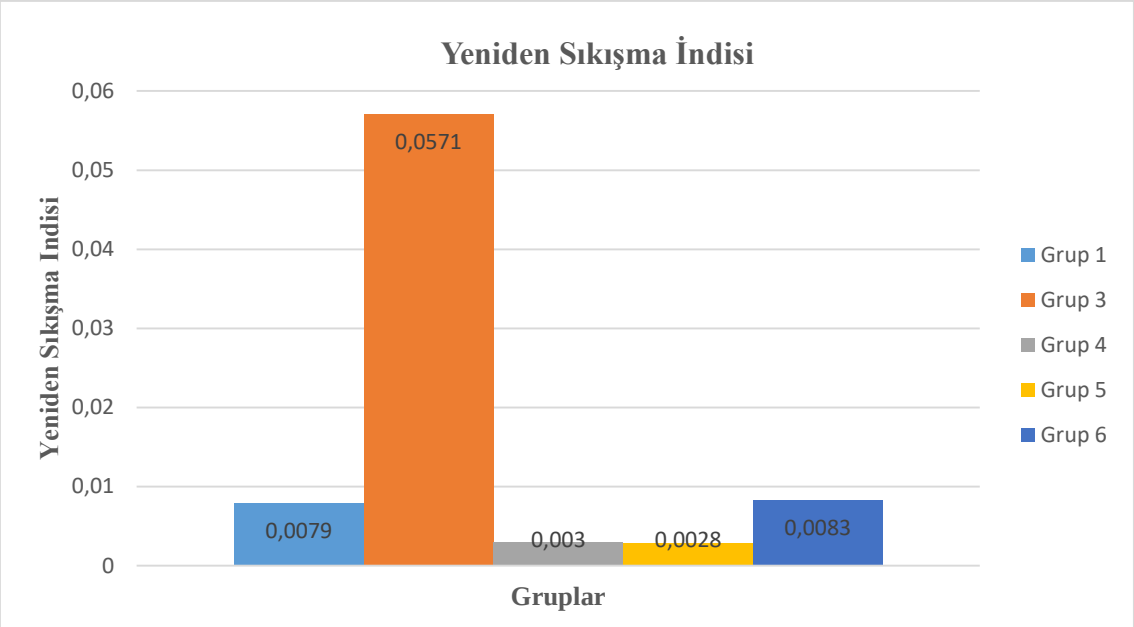
Uygulanan Gerilme (kPa)	**d_0**	**t_0**	**d_{100}**	**t_{100}**	**d_{50}**	**t_{50}**	**Konsolidasyon Katsayısı Cv(cm^2/s)**
203,7	0,671	-	0,704	8000	0,6875	210	0,000938



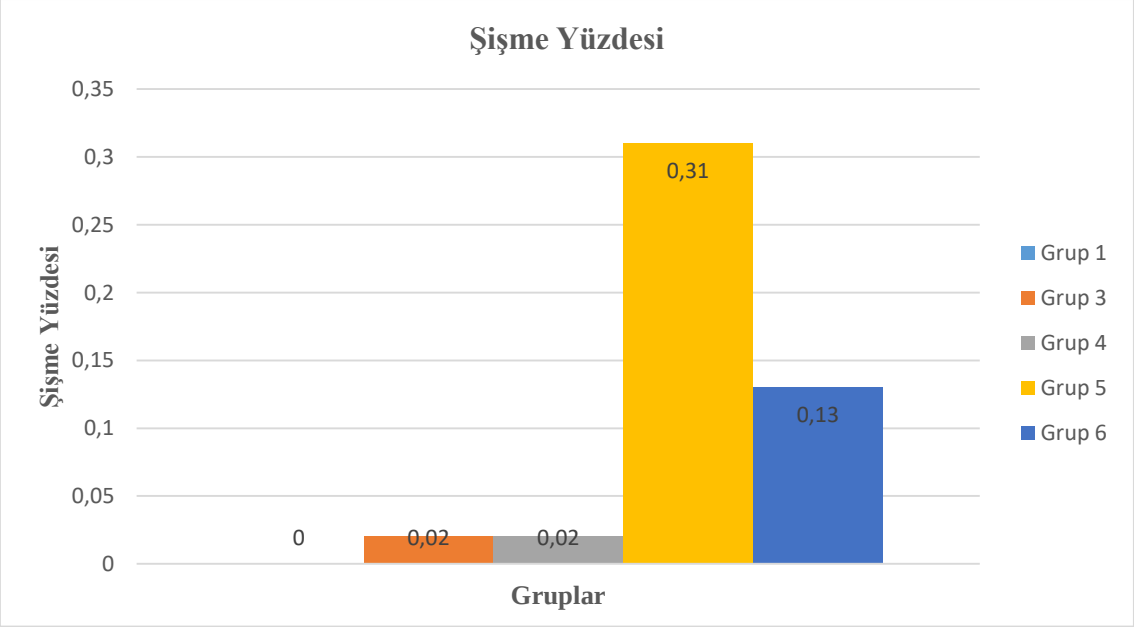
Şekil 4.66. Grup 6 için log pressure-boşluk oranı grafiği



Şekil 4.67. Grup 1, 3, 4, 5 ve 6 için sıkışma indisi değerleri



Şekil 4.68. Grup 1, 3, 4, 5 ve 6 için yeniden sıkışma indisi değerleri



Şekil 4.69. Grup 1, 3, 4, 5 ve 6 için şişme yüzdesi değerleri

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bakteri ile muamele edilmeyen kontrol grubunun diğer deney gruplarına oranla daha düşük bir konsolidasyon değerine sahip olduğu görülmektedir. Bakteri ile muamele edilip 28. gün boyunca inkübasyona bırakılan deney gruplarında, kontrol grubuna göre şişme yüzdelerinin azaldığı belirlenmiştir. Aynı

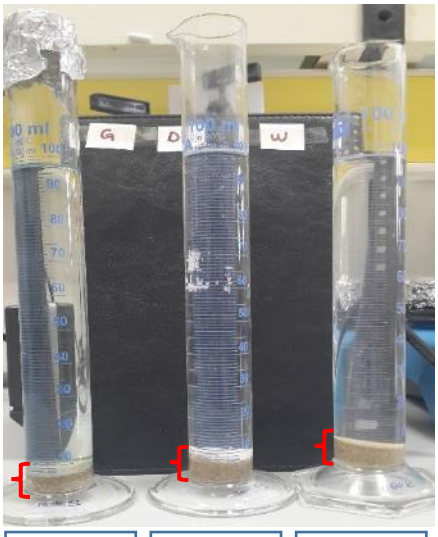
zamanda mikrobiyal üreaz aktivitesine bağlı olarak oluşan $CaCO_3$ kristalleri kum partiküllerini birbirine bağlayarak konsolidasyon değerlerini ve sıkışma oranını kontrol grubuna göre yükseltmiştir. Literatürde de yapılan çalışmalar ile ürolitik bakteriler tarafından oluşturulan $CaCO_3$ kristallerinin, kum partiküllerinin konsolidasyonuna yardımcı olduğu belirtilmiştir (Al-Thawadi ve ark., 2012, Al-Thawadi, 2013).

4.6. Free Swell Testi

Bu çalışmada *B. sphaericus* tarafından mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu sayesinde, *B. sphaericus* CECT 5905 eklenen grupta bentonitin şişme değeri %52'ye kadar azalmıştır. Tüm seri ve gruplarına ait veriler **Tablo 4.31**'da verilmiştir.

4.6.1. %100 kum içeren örneklerde serbest şişme indeksi

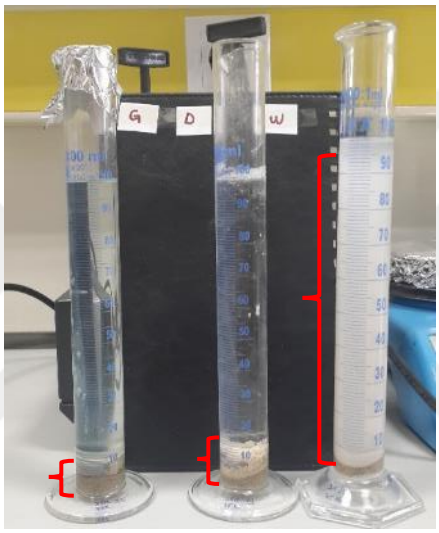
1. seri için 3 farklı grubun sonuçları **Şekil 4.70**'te verilmiştir. Bu seri tamamen %100 kum içermektedir. Kum içerisinde, şişme özelliği gösteren kil içeriği yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, hem deney grubunun hem de kontrol grubunun distile su ile muamelesi sonucu şişme gözlenmemiştir. Gaz yağı içeren diğer kontrol grubunda ise, partiküllerle adezyona girecek su molekülleri olmadığı için hiç şişme olmamıştır. Seri 1'in tüm gruplarında serbest şişme indeksi 0'dır.



Şekil 4.70. 1. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi

4.6.2. %75 kum ve %25 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi

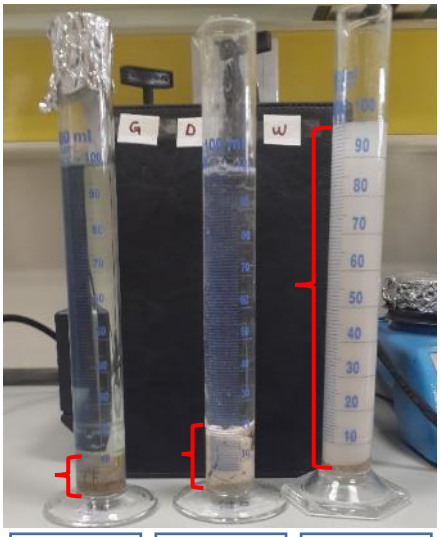
%75 kum ve %25 bentonit içeren 2. seri için 3 farklı grubun sonuçları **Şekil 4.71**'de verilmiştir. Serinin bentonit oranı düşüktür. Bakteri ile muamele edilen Deney grubu free swell testine tabi tutulduğunda şişme oranı %18,18182 olarak belirlenmiştir. Bakteri ile muamele edilmemiş ve distile su ile karıştırılmış Kontrol 2 grubunda ise şişme derecesi %87,77'dir. Gaz yağı ile muamele edilen Kontrol 1 grubu ise hiç şişme özelliği göstermediği için şişme derecesi %0'dır.



Şekil 4.71. 2. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi

4.6.3. %50 kum ve %50 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi

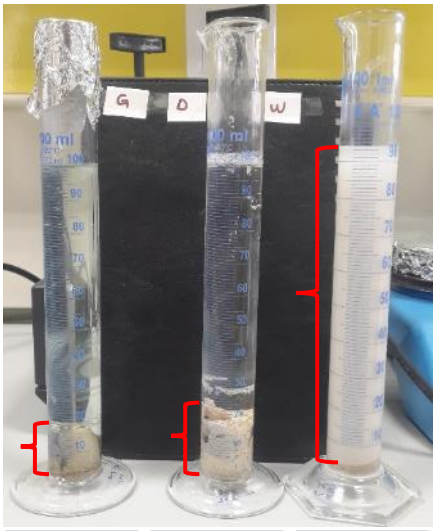
%50 kum ve %50 bentonit içeren 3. seri için 3 farklı grubun sonuçları **Şekil 4.72**'de verilmiştir. Serinin bentonit ve kum oranı eşittir ve 2. serinin bentonit oranına göre daha fazla şişme gözlenmiştir. Bunun sebebinin bentonit oranı diğer gruba göre daha fazla olmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Bakteri ile muamele edilmemiş ve distile su ile karıştırılmış Kontrol 2 grubunda serbest şişme indeksi 83,87'dir. Bakteri ile muamele edilen Deney grubunda ise, free swell testine tabi tutulduğunda serbest şişme indeksi 33,33333 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte Kontrol 1 grubu şişme olmadığı için en alt nokta olarak kabul edilmiş ve index "0" olarak esas alınmıştır.



Şekil 4.72. 3. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi

4.6.4. %25 kum ve %75 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi

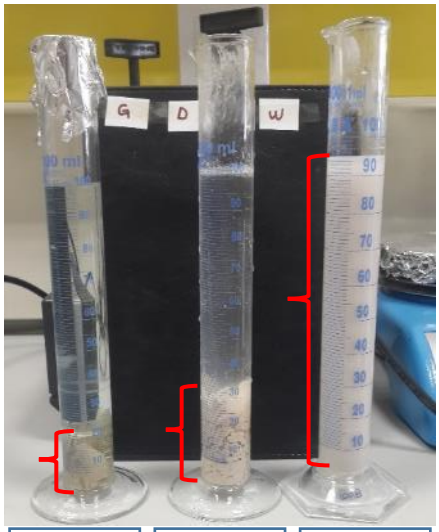
%25 kum ve %75 bentonit içeren 4. seri için 3 farklı grubun sonuçları **Şekil 4.73**'te verilmiştir. Serinin bentonit oranı kum oranına göre yüksektir. Bentonit oranının fazla olmasının şişme oranının da artmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Gaz yağı ile muamele edilen Kontrol 1 grubu hiç şişme özelliği göstermediği için şişme derecesi 0'dır. Bu nedenle, Deney ve Kontrol 2 grubunun serbest şişme indeksi hesaplanırken en alt değer olarak, Kontrol 1 grubu kullanılmıştır. Elde edilen veriler, serbest şişme indeksi formülünde yerine konduğunda, bakteri ile muamele edilmemiş ve distile su ile karıştırılmış Kontrol 2 grubunun serbest şişme indeksi 82,10 iken, bakteri ile iyileştirilmiş Deney grubunun ise indeksi 35,29412'dir.



Şekil 4.73. 4. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi

4.6.5. %100 bentonit içeren örneklerde serbest şişme indeksi

5. seri için 3 farklı grubun sonuçları **Şekil 4.74**'te verilmiştir. Bu seri tamamen %100 bentonit içermektedir. Bentonitin, su ile muamele edildiğinde yüksek derecede şişme eğilimine sahip bir kil olduğu literatürde belirtilmektedir. Bu nedenle, hem Deney grubunun hem de Kontrol grubunun distile su ile muamelesi sonucu yüksek oranlarda şişme gözlenmiştir. Gaz yağı ile muamele edilen Kontrol 1 grubunun indeks değeri, diğer serilerde olduğu gibi alt sınır olarak kabul edilmiştir. Buna göre, bakteri ile muamele edilmemiş ve distile su ile karıştırılmış Kontrol 2 grubunun serbest şişme indeksi 78,94 iken, bakteri ile iyileştirilmiş Deney grubunun ise indeksi 50'dir.



Şekil 4.74. 5. seri için Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deney grubunun free swell testi

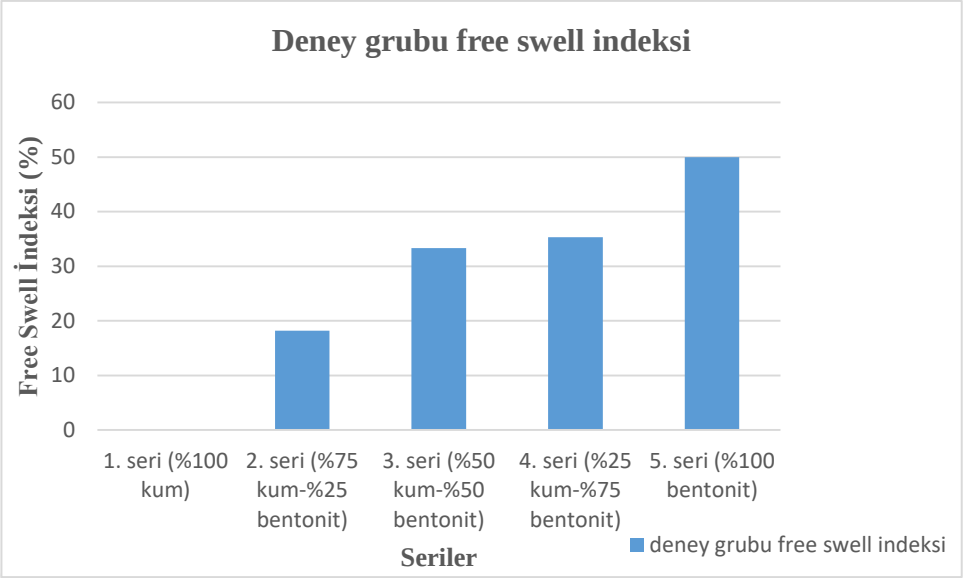
Tablo 4.31. Seriler ve gruplarının şişme mesafeleri ve free swell indeksleri

	Deney grubu (cm)	**Kontrol grubu 1 (cm)**	**Kontrol grubu 2 (cm)**	**Deney Grubunun serbest şişme indeksi**	**Kontrol 2 Grubunun serbest şişme indeksi**
1. seri (%100 kum)	8	8	8	0	0
2. seri (%75 kum-%25 bentonit)	13	11	90	18,18182	87,77
3. seri (%50 kum-%50 bentonit)	20	15	93	33,33333	83,87
4. seri (%25 kum-%75 bentonit)	23	17	95	35,29412	82,10
5. seri (%100 bentonit)	30	20	95	50	78,94

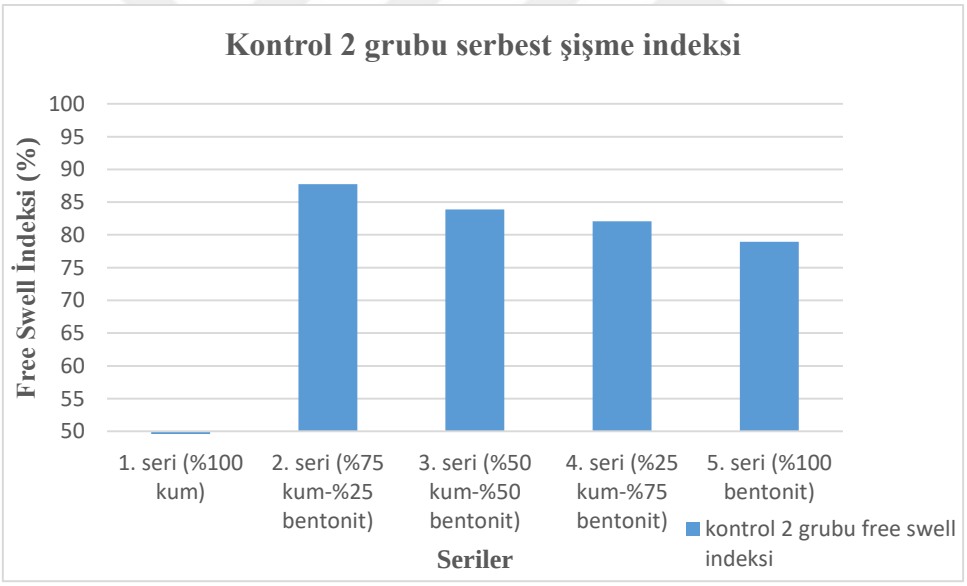
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, Kontrol 2 grubunun distile su ile muamelesi sonucu bentonit ve kum partiküllerinin su molekülleri ile aralarında yüksek oranda adezyon kuvveti oluştuğu öngörülmektedir. Bu durumun serbest şişme indeksinin de yüksek olmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Oysaki, bakteri ile iyileştirilmiş Deney grubunda, kum ve bentonit partikülleri arasında mikrobiyal aktivite sonucu $CaCO_3$ kristalleri oluştuğu ve böylece partiküllerin, su molekülleri ile adezyon oluşturma isteği azaldığı düşünülmektedir. Bu nedenle Deney grubunun serbest şişme indeksi Kontrol 2 grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur. Kontrol 1 grubunda hiç şişme olmamasının sebebi, gaz yağını oluşturan moleküllerin kum ve bentonit partikülleri ile adezyon kuvveti oluşturmaması olduğu literatürde belirtilmektedir.

Özetle, *B. sphaericus* CECT 5905 bentonit ve kum partikülleri arasına tutunarak boşluklar arasında üreaz aktivitesi ile $CaCO_3$ oluşumu sağlamıştır. Çalışmada oluşturulan 3 gruptan, sadece distile su ile muamele edilen grupta (Kontrol 2) bentonit suyun tamamıyla etkileşerek şişmiştir. Bakteri ile muamele edilmiş grupta (Deney grubu), belirgin derecede distile su ile bentonit ve kum partiküllerinin bağlantısı kesilerek şişme engellenmiştir. Gaz yağı içeren grupta (Kontrol 1) ise bentonit ve kum partiküllerinin gaz yağına karşı afinitesi olmadığı için şişmenin minimum olduğu nokta olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar buradan elde edilen değere bağlı olarak yapılmıştır.

Bu bilgiler ışığında, bakteri ile muamele edilen Deney grubu için her seride serbest şişme indeksinde belirgin derecede düşüş gözlenmiştir (**Şekil 4.75** ve **Şekil 4.76**). Ayrıca her grup için, serilerdeki bentonit oranı arttıkça, şişme derecesinin de artış gösterdiği gözlenmektedir. Literatürde killi zeminlerin konsolide olmadıkları ve oturma yüzdelerinin yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen veriler değerlendirildiğinde bentonit ve kum içeriği yüksek bölgelerde, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu konsolide olma durumlarının artacağı öngörülmekte ve zeminde şişmeye bağlı oturmaların azalacağı düşünülmektedir. Bentonit oranı yüksek bölgelerin, mikrobiyal üreaz aktivitesiyle iyileştirilmesi konusunda literatürde çok fazla çalışma olmamakla birlikte Li (2015) yaptığı çalışmada mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun killi bölgelerde dayanımı artırdığını belirlemiştir.



Şekil 4.75. 5 farklı serideki Deney grubunun Kontrol 1 grubu ile karşılaştırılması sonucu elde edilen serbest şişme indeks değeri grafiği



Şekil 4.76. 5 farklı serideki Kontrol 2 grubunun Kontrol 1 grubu ile karşılaştırılması sonucu elde edilen serbest şişme indeks değeri grafiği

BÖLÜM 5

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada amaçlanan hedefler kapsamında, zemin iyileştirme uygulamalarında kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğu düşünülen mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu üzerine çeşitli deneyler yapılmıştır. Literatürde de belirtildiği gibi mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu çeşitli yolaklar ile gerçekleşmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda daha hızlı, çok miktarda ve etkili oluşum gerçekleştirdikleri için ürolitik bakterilerle yapılan çalışmalar artmıştır. Ürolitik bakterilerin çoğunluğunu *Bacillus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızın ilk basamağında, *Bacillus* cinsi bakterilerin üreaz aktivitesine sahip olup olmadıkları, sahip iseler aktivite dereceleri ve çeşitli stres koşullarında bu aktivite oranlarının nasıl değiştiğine ilişkin deneyler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, farklı stres koşullarının, bakterilerin üreaz aktivitelerini azalttığı gözlenmiştir. Bu bağlamda, ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenen üreaz aktivitesine sahip bakterilerin, kendileri için uygun olan koşullar sağlandığında, toprak içerisinde daha etkili aktivite gösterecekleri öngörülmektedir. Çalışma sonucunda bakterilerin 30°C'de, Ni iyonu bulunmayan, 0,1 g maya özütü içeren ve pH değeri 6,8 olan bir ortamda en iyi üreaz aktivitesini gösterdiği belirlenmiş olup, diğer çalışmalarda bu parametre değerleri kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

Mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun gerçekleşmesi sadece ürolitik bakterilerin varlığına bağlı olmadığı bilinmektedir. Ürolitik bakteriler ile birlikte, ortamda üre ve Ca kaynağının bulunması, Mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunu sağlamaktadır. $CaCO_3$ oluşumunu gerçekleştirmek için, kullanılan üre ve Ca kaynağının konsantrasyonu büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızda, en iyi konsantrasyon değerini belirlemek için, farklı molaritelere sahip üre-$CaCl_2$ solüsyonları hazırlanmış ve kum içerisindeki $CaCO_3$ oluşumuna etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ortamda eşit molariteye sahip üre ve Ca kaynağının bulunmasının yüksek miktarda $CaCO_3$ oluşumunu gerçekleştirmek için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda, gelecekteki çalışmalarda eşit molariteye sahip üre-Ca kaynağının kullanılmasının toprak içerisinde daha etkili bir iyileştirme yapacağı öngörülmektedir.

Zemin yapısı yüksek oranda kum ve kil içeren bölgeler mukavemet açısından yetersizdir. Bu nedenle, belirtilen bölgelerde zemin üzerine inşa yapılmadan önce, zeminin mukavemet değerini belirlemek için CPT adlı verilen mukavemet testi gerçekleştirilmektedir. Zeminde iyileştirme teknikleri temel olarak çimentolama işlemi üzerine kurulmuş olup, zeminde kimyasal $CaCO_3$ oluşturmaya yöneliktir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, modifiye edilmiş CPT testi ile kumlu zeminlerde mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun mukavemet değerine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, inşaat mühendisliğinde kullanılan iyileştirme yöntemlerinde gerçekleşen kimyasal $CaCO_3$ oluşumu yerine mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun mukavemet değerini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Böylelikle gelecekteki çalışmalarda, zeminde mukavemet değerini artırmak için uygulanan iyileştirme tekniklerine alternatif olabilecek daha etkili ve az maliyetli biyokimyasal bir yöntem kullanılabileceği öngörülmektedir. Bunun yanında mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu gerçekleşen kum örneklerinin SEM görüntüsü incelendiğinde, kimyasal $CaCO_3$ oluşumu gerçekleşen kum örneğine göre daha düzenli ve kırılmaz yapıda $CaCO_3$ oluşmunun gerçekleştiği ayrıca kum partikülleri arasında da sıkı bağlantı köprüleri oluşturduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, zeminin sıkı ve dayanıklı bir yapıya sahip olabilmesi için biyokimyasal bir yöntemin kullanılabilirliğini göstermektedir.

Mukavemet bakımından yeteriz bölgelerin konsolidasyon değerlerinin de düşük olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, mukavemet değerini önemli ölçüde artıran mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu, zeminin konsolidasyon değerini de artırdığı bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Mikrobiyal iyileştirme yöntemi uygulanan kum örneklerinin, kimyasal iyileştirme yöntemi uygulanan kum örneğine göre daha fazla sıkışma değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Buna göre, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun zeminde daha dayanıklı ve sıkı bir yapı oluşturup, üzerindeki yapıya karşı mukavemeti artırdığı sonucuna varılmıştır.

Kumlu ve killi zeminlerin çoğu su ile temas ettiklerinde şişme eğilimine sahiptir. Bu nedenle, bu zeminlerin üzerine kurulmuş yapılar, belli bir süre sonra zemindeki şişme ve çatlamadan dolayı zarar görmektedir. Belirtilen zeminlerde kilin şişme durumunu incelemek için free swell adı verilen bir test yapılmakta ve bu test araştırmacılara zeminin şişme derecesinin maksimum ve minimum değerlerini göstermektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda böyle bölgelerin iyileştirmesinde yetersiz kalan inşaat mühendisliği

tekniklerine alternatif olarak mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun etkisi incelenmiştir. Yapay olarak oluşturulan kumlu ve killi zemin örneklerinde mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumuna bağlı olarak yaklaşık yarı yarıya şişme değerini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu sonuca göre, inşaat mühendisliğinde bu bölgelerin iyileştirmesi için kullanılan yöntemler yetersiz kaldığı için, bu yöntemlere alternatif olarak mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu ile zeminin şişme derecesini azaltılabileceği öngörülmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumu özellikle inşaat mühendisliği alanında, son yıllarda çok fazla üzerinde çalışılan bir konu haline gelmiştir. Zeminlerde meydana gelen çatlakların onarılması, porlu yapıların doldurulması, zeminde sıkı bir yapının elde edilmesi, şişme derecesinin azaltılması ve üzerindeki yapıya karşı mukavemeti artırması yönünden iyi sonuçlar elde edilmiş olup, bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile bu oluşumlar desteklenmiştir. Bu sonuçlar göze alınarak, sadece inşaat mühendisliğinde değil, tarihi eserlerin korunması, çevre kirliliğinin önlenmesi ve boya ve kağıt sanayisinde yenilenebilir biyomalzemelerin oluşturulması alanlarında mikrobiyal $CaCO_3$ oluşumunun kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abe K. ve Kawashima K. (2015). Method for producing soybeans having reduced urease content. U.S. Patent No. 8,993,036.
2. Abo-El-Enein, S. A., Ali, A. H., Talkhan, F. N., & Abdel-Gawwad, H. A. (2012). Utilization of microbial induced calcite precipitation for sand consolidation and mortar crack remediation. HBRC Journal, 8(3), 185-192.
3. Achal V., Pan X., Zhang D., Fu Q.L. (2012). Bioremediation of Pb-contaminated soil based on microbially induced calcite precipitation. J Microbiol Biotechnol;22:244–7.
4. Achal, V., Mukerjee, A., & Reddy, M. S. (2013). Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. Construction and Building Materials, 48, 1-5.
5. Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., Zhang, Q. (2015). Biomineralization for sustainable construction–A review of processes and applications. Earth-Science Reviews, 148, 1-17.
6. Achal, V., Pan, X., & Özyurt, N. (2011). Improved strength and durability of fly ash-amended concrete by microbial calcite precipitation. Ecological Engineering, 37(4), 554-559.
7. ADNKS
8. Almahamedh H. H. (March 2013). Sulfate reducing bacteria influenced calcium carbonate precipitation. In CORROSION 2013. NACE International.
9. Al-Thawadi, S. M. (2013). Consolidation of Sand Particles by Aggregates of Calcite Nanoparticles Synthesized by Ureolytic Bacteria under Non-Sterile Conditions. Journal of Chemical Science and Technology Jul, 2(3), 141-146.
10. Al-Thawadi, S., Cord-Ruwisch, R., & Bououdina, M. (2012). Consolidation of sand particles by nanoparticles of calcite after concentrating ureolytic bacteria in situ. International Journal of Green Nanotechnology, 4(1), 28-36.
11. Baumgartner L. K., Reid R. P., Dupraz C., Decho A. W., Buckley D. H., Spear J. R. ve Visscher P. T. (2006). Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. Sedimentary Geology, 185(3), 131-145.
12. BCCF, http://www.calcium-carbonate.org.uk/calcium-carbonate/caco3-10facts.asp. Erişim Tarihi: 29.07.2016.
13. Belie, N. Ve Muynck, W. (November 2008). Crack repair in concrete using biodeposition. In Proceedings of the International Conference on Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting (ICCRRR), Cape Town, South Africa,pp. 291-292.
14. Bernardi, D., DeJong, J. T., Montoya, B. M., & Martinez, B. C. (2014). Bio-bricks: biologically cemented sandstone bricks. Construction and Building Materials, 55, 462-469.
15. Berns D.S., Holohan P., and Scott E. (1966). "Urease activity in blue-green algae." Science 152(3725): 1077-1078.
16. Braissant O., Decho A. W., Dupraz C., Glunk C., Przekop K. M. ve Visscher P. T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. Geobiology, 5(4), 401-41.

17. Cañveras J. C., Sanchez-Moral S., Sloer V., Saiz-Jimenez C. (2001). Microorganisms and Microbially Induced Fabrics in Cave Walls, Geomicrobiology Journal Volume 18, Issue 3, pages 223-240.
18. Carter, E. L., Flugga, N., Boer, J. L., Mulrooney, S. B., & Hausinger, R. P. (2009). Interplay of metal ions and urease. Metallomics, 1(3), 207-221.
19. Chaurasia, R. K., Verma, V. V. (2014). Microbial carbonate precipitation by urease producing bacteria in cementitious materials. Intern. J. Adv. Biotech. Res, 15, 671-679.
20. Chou, C. W., Seagren, E. A., Aydilek, A. H., & Lai, M. (2011). Biocalcification of sand through ureolysis. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 137(12), 1179-1189.
21. Chu, J. & Ivanov, V. (2008). Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 7(2), 139-153.
22. Ciurli S., Mangani S., Benini S., Rypniewski W. R., Wilson K. S., Miletti S. (1999). A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from Bacillus pasteurii: why urea hydrolysis costs two nickels. Structure, vol. 7:205–216.
23. Clifton J.R., Frohnsdorff G.J.C. (1982). Stone consolidating materials: a status report. In: Conservation of Historic Stone Buildings and Monuments, National Academy Press, Washington, DC, pp. 287–311.
24. Coelho, L. M., Rezende, H. C., Coelho, L. M., de Sousa, P. A., Melo, D. F. ve Coelho, N. M. (2015). Bioremediation of Polluted Waters Using Microorganisms.
25. Cuzman, O. A., Rescic, S., Richter, K., Wittig, L. ve Tiano, P. (2015). Sporosarcina pasteurii use in extreme alkaline conditions for recycling solid industrial wastes. Journal of biotechnology, 214, 49-56.
26. Çepel N. (1988). Toprak İlmi. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, İstanbul.
27. Dalgıç, S., Turgut, M., Kuşku, İ., Coşkun, Ç., & Coşgun, T. (2009). İstanbul'un avrupa yakasındaki zemin ve kaya koşullarının bina temellerine etkisi.Uygulamalı Yerbilimleri, (2), 47-70.
28. De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. Ecological Engineering, 36(2), 99-111.
29. DeJong, J. T., Fritzges, M. B., & Nüsslein, K. (2006). Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 132(11), 1381-1392.
30. DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C., & Nelson, D. C. (2010). Bio-mediated soil improvement. Ecological Engineering, 36(2), 197-210.
31. DeJong, J., Proto, C., Kuo, M., & Gomez, M. (2014). Bacteria, biofilms, and invertebrates: the next generation of geotechnical engineers?. In Geo-Congress 2014 Technical Papers: Geo-characterization and Modeling for Sustainability (pp. 3959-3968). ASCE.

32. Del Río A. V., Buys B., Campos J. L., Méndez R. ve Mosquera-Corral A. (2015).Optimizing upflow velocity and calcium precipitation in denitrifying granular systems. Process Biochemistry, 50(10), 1656-1661.
33. Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2012). Improvement in strength properties of ash bricks by bacterial calcite. Ecological Engineering, 39, 31-35.
34. Edil, T. B., & Aydilek, A. H. (2001). Geotechnics of capping very soft wastes. In Proceedıngs Of The Internatıonal Conference On Soıl Mechanıcs And Geotechnıcal Engıneerıng (Vol. 3, Pp. 1903-1906). Aa Balkema Publıshers.
35. Eed, J. (2012). Factors Affecting Enzyme Activity. ESSAI, 10(1), 19.
36. Elaty, M. A. A., ve Ghazy, M. F. (2014). Evaluation of consistency properties of freshly mixed concrete by cone penetration test. HBRC Journal.
37. EPA (1974). Screening Study For Emissions Characterization From Lime Manufacture, Contract No. 68-02-0299, Vulcan-Cincinnati, Inc., Cincinnati, OH, August.
38. Erşan Y. Ç., De Belie N. ve Boon N. (2015). Microbially induced $CaCO_3$ precipitation through denitrification: an optimization study in minimal nutrient environment. Biochemical Engineering Journal, 101, 108-118.
39. Gafta. (2003). METHOD 25:0- CARBONATES.
40. Gomez-Taylor M. (2001). Ammonia-N in Water and Biosolids by Ion-Selective Electrode Potentiometry with Preliminary Distillation, Draft,
41. González-Muñoz, M. T., Chekroun, K. B., Aboud, A. B., Arias, J. M., & Rodriguez-Gallego, M. (2000). Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg2+ in development of crystal morphology. Journal of Sedimentary Research,70(3).
42. Gopi, S., Subramanian, V. K., & Palanisamy, K. (2013). Aragonite–calcite–vaterite: a temperature influenced sequential polymorphic transformation of $CaCO_3$ in the presence of DTPA. Materials Research Bulletin, 48(5), 1906-1912.
43. Gopinath, G. (2016). Application of Electric Cone Penetration Test in Unconsolidated and Consolidated Sediments. Procedia Technology, 24, 271-279.
44. Grahame, D.A.S., Bryksa, B.C., Yada, R.Y. (2015). Factors affecting enzyme activity. Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality, Pages 11-55.
45. Gurbuz, A., Sari, Y. D., Yuksekdag, Z. N. (2015). Bacteria Induced Cementation in Sandy Soils. Geomicrobiology Journal,32(9).
46. Hall-Stoodley L., Costerton J.W, Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, Nat Rev Microbiol., 2(2):95-108.
47. Hammes F, Boon N, Clement G, de Villiers J, Siciliano SD, Verstraete W. (2003). Molecular biochemical and ecological characterisation of a bio-catalytic calcification reactor. Appl Microbiol Biotechnol;62:191–201.
48. Janda, A., & Ooi, J. Y. (2016). DEM modeling of cone penetration and unconfined compression in cohesive solids. Powder Technology, 293, 60-68.
49. Jeong, H., Park, J., & Kim, H. (2013). Determination of NH4. Journal of Chemistry, 2013.
50. Jimenez-Lopez C., Jroundi F., Rodríguez-Gallego M., Arias J. M. ve Gonzalez-Muñoz M. T. (2007). Biomineralization induced by Myxobacteria. Communicating

current research and educational topics and trends in applied microbiology, Formatex, Microbiology Series, (1), 1.
51. Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., & Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. Ecological engineering, 36(2), 230-235.
52. Jyothsna P., Usha J., Pallavi P. (2015). Calcium Carbonate precipitation based improvement of concrete through microbiologically induced precipitation, GJTE-Vol(2)-Issue(2).
53. Kandeler E. ve Gerber H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium, Biology and Fertility of SoilsMarch, Volume 6, Issue 1, pp 68-72.
54. Karol, R. H. (2003). Chemical grouting and soil stabilization, revised and expanded (Vol. 12). CRC Press.
55. Kerstin Stingl, , Hilde De Reuse (2005). Staying alive overdosed: How does Helicobacter pylori control urease activity? International Journal of Medical Microbiology Volume 295, Issue 5, Pages 307–315.
56. Khaliq, W. ve Ehsan, M. B. (2016). Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. Construction and Building Materials, 102, 349-357.
57. Kim H. K., Park S. J., Han J. I. ve Lee H. K. (2013). Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete.Construction and Building Materials, 38, 1073-1082.
58. Kirboga, S., & Öner, M. (2013). Application of experimental design for the precipitation of calcium carbonate in the presence of biopolymer. Powder technology, 249, 95-104.
59. Koroleff, F. (1966). Direct spectrophotometric determination of ammonia in precipitation. Tellus, 18(2-3), 562-565.
60. Krajewska B. (2016). A combined temperature-pH study of urease kinetics. Assigning pKa values to ionizable groups of the active site involved in the catalytic reaction. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 124,70–76.
61. Li, B. (2015). Geotechnical properties of biocement treated sand and clay(Doctoral dissertation).
62. Li, Q., Csetenyi, L., Paton, G. I. ve Gadd, G. M. (2015). $CaCO_3$ and $SrCO_3$ bioprecipitation by fungi isolated from calcareous soil. Environmental microbiology, 17(8), 3082-3097.
63. Madhavi, E., & Naik, D. R. (2016). Strength properties of a bacterial concrete when Cement partially replaced with flyash and GGBS.
64. Mahanty B., Kim S. ve Kim C. G. (2014). Biokinetic modeling of ureolysis in Sporosarcina pasteurii and its integration into a numerical chemodynamic biocalcification model. Chemical Geology, 383, 13-25.
65. Maheswaran, S., Dasuru, S. S., Murthy, A. R. C., Bhuvaneshwari, B., Kumar, V. R., Palani, G. S., ... & Sandhya, S. (2014). Strength improvement studies using new type wild strain Bacillus cereus on cement mortar. Curr Sci India,106, 50-57.
66. Martinez, B. C., & DeJong, J. T. (2009). Bio-mediated soil improvement: load transfer mechanisms at the micro-and macro-scales. In Advances in Ground

Improvement: Research to Practice in the United States and China (pp. 242-251). ASCE.
67. Matongo F. and Nwodo U.U. (2014). In vitro Assessment of *Helicobacter pylori* Ureases Inhibition by Honey Fractions. Archives of Medical Research 45, 540-546.
68. Mavromatis V., Pearce, C. R., Shirokova L. S., Bundeleva I. A., Pokrovsky O. S., Benezeth P., Oelkers E. H. (2012). Magnesium isotope fractionation during hydrous magnesium carbonate precipitation with and without cyanobacteria. Geochimica et Cosmochimica Acta, 76, 161-174.
69. Milne, N., Luttik, M. A. H., Rojas, H. C., Wahl, A., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Daran, J. M. (2015). Functional expression of a heterologous nickel-dependent, ATP-independent urease in Saccharomyces cerevisiae. Metabolic engineering, 30, 130-140.
70. Mitchell J. K., Santamarina J.C. (2005). Biological considerations in geotechnical engineering. Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering, 131. 10, 1222-1233.
71. Mobley L. T. ve JONES B. D. (1989). Proteus mirabilis Urease: Nucleotide Sequence Determination and Comparison with Jack Bean Urease. Journal of Bacterıology, 6414-6422.
72. Morse J.W., Arvidson R.S., Lu¨ttge A. (2007). Calcium Carbonate Formation and Dissolution.. Chem. Rev., 107, 342−381.
73. Muynck W, Cox K, Belie N, Verstraete W. (2008). Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. Constr Build Mater; 22:875–85.
74. Nan, Z., Chen, X., Yang, Q., Wang, X., Shi, Z., & Hou, W. (2008). Structure transition from aragonite to vaterite and calcite by the assistance of SDBS. Journal of colloid and interface science, 325(2), 331-336.
75. Nancharaiah, Y. V. ve Lens, P. N. (2015). Selenium biomineralization for biotechnological applications. Trends in biotechnology, 33(6), 323-330.
76. Nemery, B., Hoet, P. H. M., & Nowak, D. (). Indoor swimming pools, water chlorination and respiratory health. European Respiratory Journal, 19(5), 790-793.
77. Nicholson, P. G. (2014). Soil improvement and ground modification methods. Butterworth-Heinemann.
78. Nugroho, A., Satyarno, I., & Subyakto, S. (2015). Bacteria as Self-Healing Agent in Mortar Cracks. Journal of Engineering and Technological Sciences,47(3), 279-295.
79. Okyay T.O., Rodrigues D.F. (2013). High throughput colorimetric assay for rapid ureaseactivity quantication, Journal of Microbiological Methods,95, 324-326.
80. Olszewski M. A., Noverr M.C., Chen G.-H., Toews G.B, Cox G.M., Perfect J.R., Huffnagle G.B. (2004), Urease expression by Cryptococcus neoformans promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. The American Journal of Pathology Volume 164, Issue 5, Pages 1761–1771.
81. Orman Toprak ve Ekoloji Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. (2014). Toprak Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.

82. Özdemir A., Özdemir M. (2010). Zayıf Zeminlerin İyileştirilmesi Ve Son Yıllarda Yaygın Olarak Uygulanan Bazı Zemin İyileştirme Yöntemleri, Sondaj Dünyası, Sayı:3.
83. Patro Sanjaya K., Chandra K.S, Sugandha S., Chand S., Sahu S.K., Manimaran S. (2015). Effect of bacteria on the properties of concrete using Portland slag cement, Proceedings of the National Conference on Recent Advances and Future Prospects in Civil Engineering (RAFPCE-15), 89-98.
84. Prakash, K., & Sridharan, A. (2004). Free swell ratio and clay mineralogy of fine-grained soils.
85. Qıan C., Luo M., LI R., Rong H. (2015). Efficiency of concrete crack-healing based on biological carbonate precipitation. Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed., 30(6), 1255-1259.
86. Rahman M. A. Ve Halfar J. (2014). First evidence of chitin in calcified coralline algae: new insights into the calcification process of Clathromorphum compactum. Scientific reports, 4.
87. Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V., & Bang, S. S. (2001). Remediation of concrete using micro-organisms. ACI Materials journal, 98(1), 3-9.
88. Reddy, M. S. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. Front. Microbiol, 4(314), 10-3389.
89. Rivadeneyra, M. A., Párraga, J., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A., & Delgado, G. (2004). Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. FEMS Microbiology Ecology,48(1), 39-46.
90. Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Chekroun K. B. ve Gonzalez-Munoz M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by Myxococcus xanthus-induced carbonate biomineralization. Applied and Environmental Microbiology, 69(4), 2182-2193.
91. Rodriguez-Navarro, C., Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E., & González-Muñoz, M. T. (2012). Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: implications for stone conservation.Applied and environmental microbiology, 78(11), 4017-4029.
92. Ropp, R. C. (2012). Encyclopedia of the alkaline earth compounds. Newnes.
93. Rowshanbakht, K., Khamehchiyan, M., Sajedi, R. H., & Nikudel, M. R. (2016). Effect of injected bacterial suspension volume and relative density on carbonate precipitation resulting from microbial treatment. Ecological Engineering, 89, 49-55.
94. Saggar S., Singh J., Giltrap D.L., Zaman M., Luo J., Rollo M., Kim D.-G., Rys G., van der Weerden T.J. (2013). Quantification of reductions in ammonia emissions from fertiliser urea and animal urine in grazed pastures with urease inhibitors for agriculture inventory: New Zealand as a case study. Science of the Total Environment 465,136–146.
95. Sert S., Bol E., Özocak A. (2013). Zemin Özelliklerini Belirlemede Koni Penetrasyon Deneyi.1. International Symposium on Innovative Technologies in Engineering and Science.1272-1280.

96. Shackelford C.D., Jefferis S.A. (2000). "Geoenvironmental Engineering for In Situ Remediation", Int. Conf. on Geotech. and Geoenv. Eng., Melbourne, Australia, Technomic Publ. Co., Inc., Lancaster, PA, Vol. 1, 121-185.
97. Shaheen, S. M., Hooda, P. S., & Tsadilas, C. D. (2014). Opportunities and challenges in the use of coal fly ash for soil improvements–a review. Journal of environmental management, 145, 249-267.
98. Shen, S. L., Wang, Z. F., Horpibulsuk, S., & Kim, Y. H. (2013). Jet grouting with a newly developed technology: the twin-jet method. Engineering Geology,152(1), 87-95.
99. Singh, M., Kumar, S. V., Waghmare, S. A., & Sabale, P. D. (2016). Aragonite–vaterite–calcite: Polymorphs of $CaCO_3$ in 7th century CE lime plasters of Alampur group of temples, India. Construction and Building Materials, 112, 386-397.
100. Sinha S., Rez P. (2015). Distortions of the calcite and aragonite atomic structures from interstitial water. Materials Chemistry and Physics 157, 56-62.
101. Smyj, R. P. (1997). A conformational analysis study of a nickel (II) enzyme: urease. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 391(3), 207-223.
102. Somturk B., Yilmaz I., Altinkaynak C., Karatepe A., Özdemir N., Ocsoy I. (2016). Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalyticproperties. Enzyme and Microbial Technology 86, 134–142.
103. Spagnoli, G., Stanjek, H., & Sridharan, A. (2012). Influence of ethanol/water mixture on the undrained shear strength of pure clays. Bulletin of Engineering Geology and the Environment, 71(2), 389-398.
104. Sridharan, A. ve Gurtug, Y. (2004). Swelling behaviour of compacted fine-grained soils. Engineering Geology, 72(1), 9-18.
105. Tewatia, S. K., Bose, P. R., Sridharan, A., & Rath, S. (2007). Stress induced time dependent behavior of clayey soils. Geotechnical and Geological Engineering, 25(2), 239-255.
106. Tiano P, Biagiotti L, Mastromei G. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. J Microbiol Methods 1999;36:139–45.
107. Tinoco, J., Correia, A. G., & Cortez, P. (2011). Application of data mining techniques in the estimation of the uniaxial compressive strength of jet grouting columns over time. Construction and Building Materials, 25(3), 1257-1262.
108. Tobler D. J., Cuthbert M. O., Greswell R. B., Riley M. S., Renshaw J. C., Handley-Sidhu S. ve Phoenix V. R. (2011). Comparison of rates of ureolysis between Sporosarcina pasteurii and an indigenous groundwater community under conditions required to precipitate large volumes of calcite. Geochimica et Cosmochimica Acta, 75(11), 3290-3301.
109. Tripathy, S., Sridharan, A., & Schanz, T. (2004). Swelling pressures of compacted bentonites from diffuse double layer theory. Canadian Geotechnical Journal, 41(3), 437-450.
110. Ural N. (2011). Mikrobiyolojik Çimentolanmayla Zemin İyileştirilmesi, 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), , Elazığ, Turkey.
111. Uygunoğlu T. (2012). Su Yalıtımcısı (Seviye 3) Ders Notu, s.41.

112. Vaithiyalingam S. U., Gnanasekaran D., Gopalakrishnan S., Lakshmanan U. ve Prabaharan D. (2014). Biocalcification Mediated Remediation of Calcium Rich Ossein Effluent by Filamentous Marine Cyanobacteria. Journal of Bioremediation & Biodegradation, 2014.
113. Van Paassen, L. A. (2009). Biogrout, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation. TU Delft, Delft University of Technology.
114. Velde, B. ve Meunier, A. (2008). The Origin of Clay Minerals in Soils and Weathered Rocks, Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
115. Vempada, S. R., Reddy, S. S. P., Rao, M. S., & Sasikala, C. (2011). Strength enhancement of cement mortar using microorganisms-an experimental study.Int J Earth Sci Eng, 4, 933-936.
116. Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W. ve De Belie, N. (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. Cement and Concrete Research, 56, 139-152.
117. Wang, J., & Becker, U. (2009). Structure and carbonate orientation of vaterite ($CaCO_3$). American Mineralogist, 94(2-3), 380-386.
118. Warren L.A., Maurice P.A., Parmar N., Ferris F.G. (2001). Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants, Geomicrobiology Journal, 18.1:93-115.
119. Whiffin, V. S. (2004). Microbial $CaCO_3$ precipitation for the production of biocement (Doctoral dissertation, Murdoch University).
120. Whiffin, V. S., van Paassen, L. A., & Harkes, M. P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiology Journal, 24(5), 417-423.
121. Williams, A. G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., & Banks, J. M. (2002). Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese.International Dairy Journal, 12(10), 841-852.
122. Zhan, Q. ve Qian, C. (2016). Microbial-induced remediation of Zn 2+ pollution based on the capture and utilization of carbon dioxide. Electronic Journal of Biotechnology, 19, 29-32.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI	**:**	Nazlıhan YILDIRIM
YAZIŞMA ADRESİ	**:**	Cevizli Mah. Bağdat Cd. Tekinler Apt. No:516 D: 13 Maltepe/İSTANBUL
DOĞUM TARİHİ VE YERİ	**:**	25.06.1992 Kadıköy/ İSTANBUL
E-POSTA	**:**	nazlihanyildirim@hotmail.com
ÖĞRENİM DURUMU	**:**	Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Başlangıç Yılı
Ortaöğretim	Sayısal	Maltepe Orhangazi Lisesi	2006
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2014

Yayınlar

Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Balıkesir Bölgesinden Toplanan Liken Örneklerine Ait Özütleri E. coli Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri, 2nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2015.

Çeşitli Bahçe Bitkilerinin Candida Cinsi Mayalar Üzerine Antifungal Etkisi, 1.Ulusal Mikoloji Günleri, Eylül 2014.

Ulusal ve uluslararası bilimsel dergilerde basılan makaleler

YILDIRIM, N., GÜRTUĞ, Y., & SESAL, C. (2016). Mikrobiyal Kalsiyum Karbonat Oluşum Mekanizmaları Ve Uygulama Alanları. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, *28*(2), 70-80.

YILDIRIM, N., GÜRTUĞ, Y., & SESAL, C. (2016). The influence of $CaCO_3$ formed by ureolytic bacteria on the swelling degree of bentonite- Proceedings of the Fourth

International Conference on New Developments in Soil Mechanics and Geotechnical Engineering, June 2016.

Katılımcı olarak yer alınan kongreler ve çalıştaylar

Eylül 2015 - II. Ulusal Mikoloji Günleri

Ağustos 2015 - Liken Kültürü Yöntem ve Uygulamaları Çalıştayı – organizasyon görevlisi ve katılımcı

Aralık 2014 – Nanobiyomalzemeler ve Nanotıp Uygulamaları Çalıştayı

Eylül 2014 – I. Ulusal Mikoloji Günleri (poster sunumu)

Aralık 2013 – 1. KUGEN MBG Bilim Toplantısı, Koç Üniversitesi

Nisan 2013 – 8. Moleküler biyoteknoloji Bahar okulu, Karadeniz Teknik Üniversitesi

Temmuz 2012 – 19. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi

Mayıs 2012 – 4. Ulusal Biyoloji Toplulukları Kongresi, Uludağ Üniversitesi

Aralık 2011 – 2. Kök Hücre Sempozyumu

Ekim 2011 – BIOTECH-2011 2. Ulusal Biyoteknoloji Öğrenci Kongresi

Ekim 2011 – BIOTECH-2011 2. Ulusal Biyoteknoloji Öğrenci Kongresi, Biyoinformatik Çalıştayı

Temmuz 2011 – 18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi

Mayıs 2011 – Evrimsel Biyoloji Öğrenci Kongresi