



Zeminlerin Biyolojik İyileştirilmesinde *Viridibacillus Arenosi* Bakterisinin Zemin Ortamına Olan Etkisinin Gözlemlenmesi

Harun AKOĞUZ^{1*}, Semet ÇELİK², Özlem BARIŞ³

¹Motorlu Araçlar ve Ulaştırma Teknolojileri Bölümü, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Refahiye, Erzincan, Türkiye

²Mühendislik Fakültesi İnşaat Mühendisliği Bölümü, Atatürk Üniversitesi, Yakutiye, Erzurum, Türkiye

³Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Atatürk Üniversitesi, Yakutiye, Erzurum, Türkiye

Anahtar kelimeler:

MICP
Biyolojik zemin
iyileştirme tekniği
*Viridibacillus
arenosi*

Özet

Son yıllarda ortaya çıkan zeminlerin biyolojik iyileştirilmesi tekniği diğer tekniklerden farklı olarak mikroorganizmalar kullanılarak yapılabilmektedir. Mikroorganizmalar kullanılarak yapılan bu yeni yaklaşım ile zeminlerin birçok özelliği iyileştirilebilmektedir. Diğer iyileştirme tekniklerinden daha çevreci olması ve yeni bir konu olması bu alandaki çalışmaları artırmıştır. Literatürde mevcut birçok çalışmada silis kumu ve *Bacillus pasteurii* bakterisi kullanılmıştır. Bu çalışmamızda literatürden farklı olarak *Viridibacillus arenosi* bakterisi kullanılmıştır. Farklı çap aralıklarında zeminler (Kaba kum, Kaba kum – çakıl karışımı ve silis kumu) %50 rölatif sıklıkta kalıplara yerleştirilmiştir. Biyolojik zemin iyileştirilmesi üzerine farklı besiyerlerin etkisi SEM ve XRD analizleriyle incelenmiş ve iyileştirilmiş silis kum zemini üzerinde serbest basınç deneyi yapılmıştır. Sonuç olarak kaba kum ve kaba kum – çakıl zeminlerinde farklı besiyerlerin biyolojik iyileştirmeyi etkilediği görülmüştür. Silis kumunda 25,5 kPa serbest basınç dayanımı elde edilmiş SEM ve XRD analizleri ile oluşan yapıların kalsit ve vaterit olduğu belirlenmiştir.

The Observation into the Effect of *Viridibacillus Arenosi* Bacteria on Soil Environment in Biological Improvement of Soils

Keywords:

MICP
Microbially
Induced Calcite
Precipitation
*Viridibacillus
arenosi*

Abstract

The technique of biological improvements of soils that has emerged in recent years may be achieved by using microorganisms in difference to other techniques. With this new approach that is achieved by using microorganisms, several characteristics of soils may be improved. Studies in this field have become more prevalent as this technique is more environment-friendly then other improvement techniques, and it is a novel topic. Silica sand and the bacterium *Bacillus pasteurii* were used in many studies in the literature. In this study, we used the bacterium *Viridibacillus arenosi* in difference to the literature. Soils with different spaces (coarse sand, coarse sand - gravel mixture and silica sand) were placed into molds with a relative densities of 50%. The effects of different broth media on biological soil improvement were examined through SEM and XRD analyses, and a unconfined compressive strength experiment was carried out on the improved silica sand soil. As a result, it was seen that different broth media affected biological improvements in coarse sand and coarse sand - gravel soils. 25.5 kPa of unconfined compressive strength was achieved in the silica sand, and it was determined that the structures that were formed with the SEM and XRD analyses were calcite and vaterite.

1. GİRİŞ

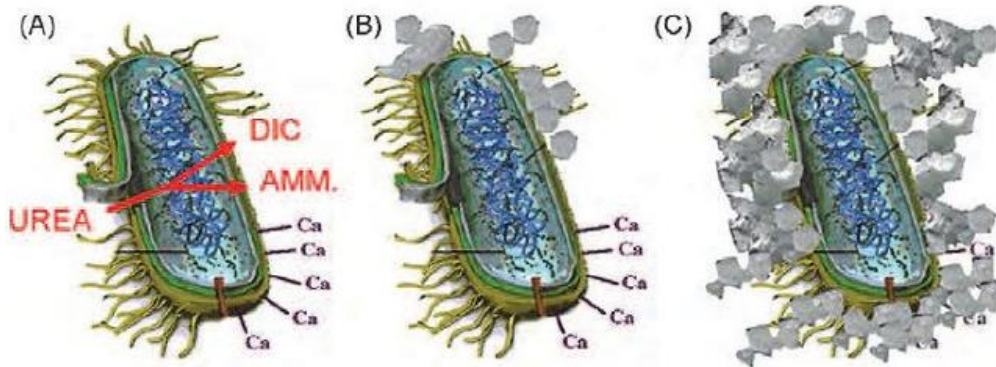
Son yıllarda endüstri, sanayi ve inşaat sektöründeki hızlı gelişmeler sonucunda imara yeni yerler açılmış, inşaat sahaları genişlemiş böylece zayıf zeminler üzerine yapılar inşa edilmek zorunda kalmıştır. Zayıf zeminler genellikle düşük dayanım ve yüksek sıkışabilirlik karakteristiklerine sahiptirler [1], [2]. Kullanıma uygun inşaat sahalarının azalmasıyla birlikte farklı zemin iyileştirme metotları gelişmiş ve bu metotlar kullanılarak zayıf zeminler iyileştirilmiş ve üzerine yapılar inşa edilebilmiştir. Ancak zemin iyileştirme metotları çevre sorunlarını da birlikte getirmiştir. Son yıllarda zemin iyileştirme metotlarına farklı bir yaklaşım olarak biyolojik zemin iyileştirme tekniği ortaya çıkmıştır. Bu tekniğin diğer iyileştirme tekniklerine göre birçok avantajı bulunmaktadır. MICP (Mikrobiyal kaynaklı kalsit çökeltmesi) kullanılarak yapılan iyileştirme yemyeşil, sürdürülebilir ve doğa dostu bir teknik olarak bize iyi bir gelecek vaat etmektedir [3]. Ayrıca mikrobiyal zemin iyileştirmenin maliyetinin (0,5\$ -9 \$ /m³) kimyasal enjeksiyon tekniğine (2\$ - 72\$ /m³) göre oldukça ucuz olduğu belirtilmiştir [4] .

Bakteri gruplarına bağlı olarak farklı mikrobiyal CaCO₃ oluşum mekanizmaları bulunmaktadır. Bunları fotosentetik mikroorganizmalar tarafından siyanobakteriyel fotosentez, sülfat indirgeyen bakteriler tarafından sülfat indirgenmesi, nitrat indirgeyen bakteriler tarafından denitrifikasyon, amonifikasyon ve ürolitik bakteriler tarafından gerçekleştirilen üre hidrolizi olarak sıralayabiliriz [5].

Biyolojik zemin iyileştirmesi diğer bir deyişle Kalsiyum karbonat çökeltmesi reaksiyonu bir dizi kimyasal işlemler sonucunda gerçekleşmektedir. Sıvı besiyerinde bakteri aracılığı ile gerçekleşen reaksiyon sonucunda amonyum ve karbonat (1) oluşmaktadır [6].



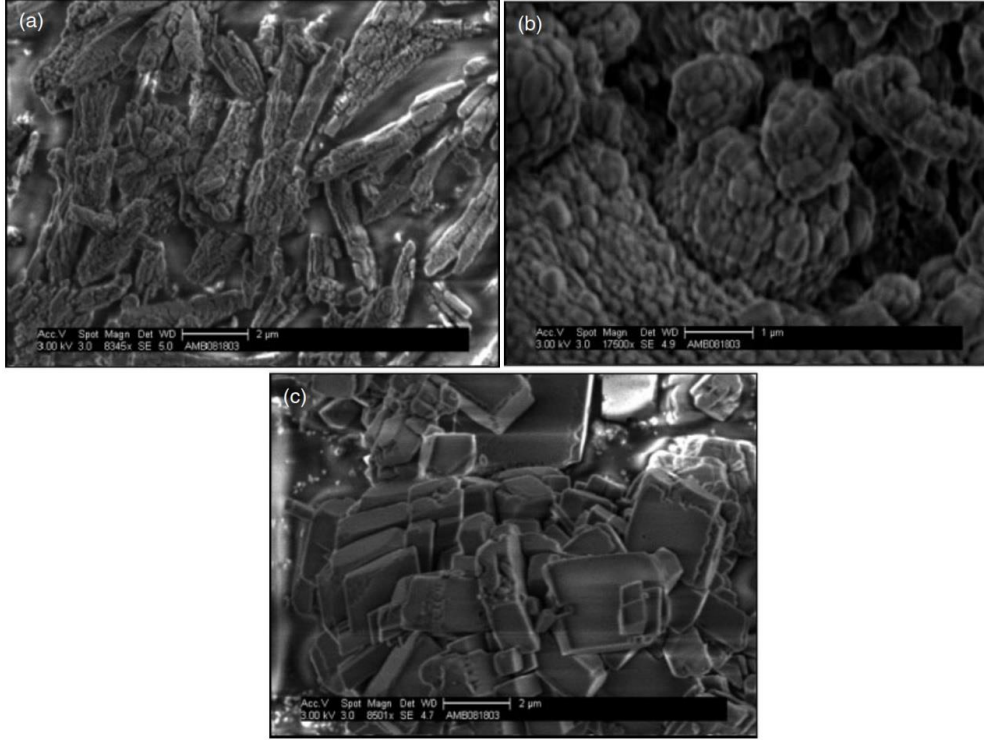
Kültür ortamına CaCl₂ stok çözelti eklendiğinde (Şekil 1) gerçekleşen reaksiyon sonucunda oluşan karbonat iyonları kalsiyum ile reaksiyona girerler ve pH değerinin yükselmesi ile kalsiyum karbonat çökeltmesi (2) meydana gelir [6].



Şekil 1. Mikroorganizmada oluşan üre enzim aktivitesi tarafından başlatılan kalsiyum karbonat çökeltmesi mekanizması [7]

* (A) Ca iyonlarının bakteriyeye tutunması. (B) Bütün hücrenin kapsüllemesi. (C) Kalsiyum karbonat çökeltmesinin sonlanması.

Reaksiyon sonucunda farklı kristal yapıya sahip CaCO₃ oluşumunu tespit etmek amacıyla SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) ve XRD (X-Işını Kırınımı) analizleri yapılabilir. Şekil 2'de SEM mikrografında kalsiyum karbonatın (CaCO₃) 3 farklı biçimi görülmektedir.



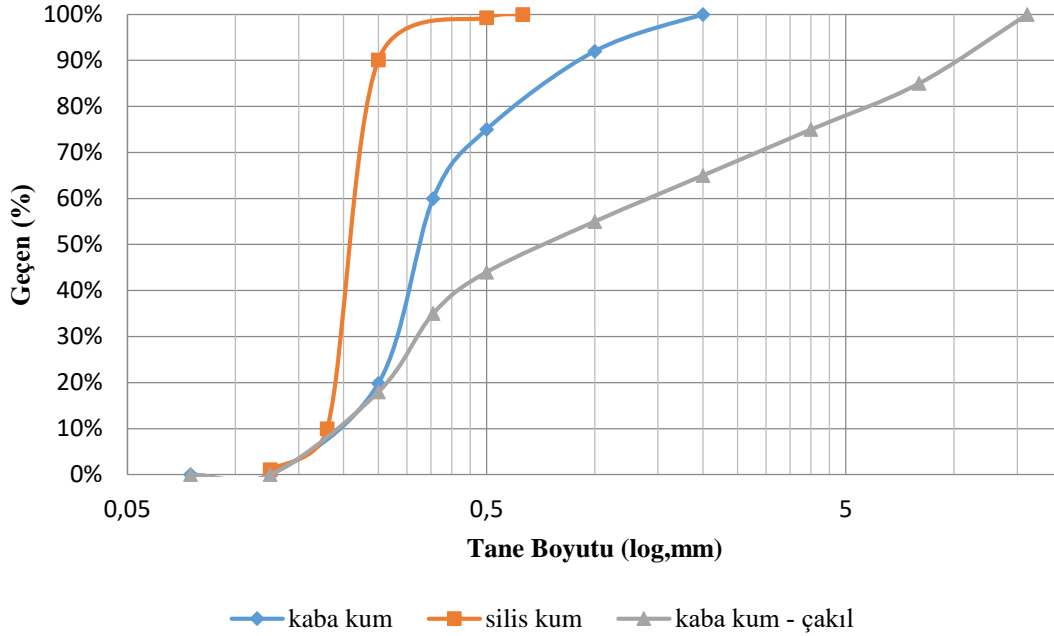
Şekil 2. Üç farklı kalsiyum karbonat polimorfu SEM görüntüleri (a) aragonit, (b) vaterit, (c) kalsit [8]

MICP uygulaması ile zeminlerin birçok özelliği iyileştirilebilmektedir. Biyolojik uygulamanın başlıca etkileri, kum ve kilde sıklığın ve kesme dayanımının artırılması, kumda permeabilitenin düşürülmesi, killi zeminlerde sıkışabilirliğin azaltılması, kumlarda sıvılaşma direncinin artırılmasını içermektedir [9]. Literatürde zeminlerin biyolojik iyileştirmesinde kullanılan farklı birkaç bakteri bulunmaktadır. Kalsiyum karbonat oluşumunda literatürde yapılan birçok çalışmada *Bacillus pasteurii* bakterisi kullanılmıştır [10–17]. Bu çalışmada literatürden farklı olarak *Viridibacillus arenosi* bakterisi kullanılmıştır. Farklı besiyerleri ve farklı granülometriye sahip zeminler kullanılarak sonuçları analiz edilmiştir.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Deneylerde Kullanılan Zemin

Deneylerde farklı zeminler farklı çap aralıklarında (kaba kum, kaba kum- çakıl, silis kum) hazırlanarak kalıplara yerleştirilmiş ve uygulamalar yapılmıştır. ASTM E 11 standardına göre yapılan elek analizine göre zeminlerin tane çapı dağılım eğrisi Şekil 3'te verilmiştir. Tüm zeminler kalıplara %50 rölatif sıklıkta yerleştirilmiştir.



Şekil 3. Uygulama yapılan zeminlerin granülometri eğrileri

2.2. Bakteri ve Sıvı Besiyeri

Kalsiyum Karbonat reaksiyonunun gerçekleşmesi için yüksek üreaz aktivitesine sahip presipitasyonda rol aldığı bilinen gram pozitif in vitro kalsiyum karbonat çöktürebilen *Viridibacillus arenosi* K64 izolatı kullanılmıştır. İlgili izolatın daha önce mağaralardan elde edilmiş ve kalsiyum karbonat çökeltisi oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu bakteri gram pozitif özelliğe sahip topraktan izole edilebilen bir örnek olup endospor oluşturma yeteneği nedeni ile de oldukça dayanıklıdır. Mikroskoptaki görüntüsü çubuk şeklinde olup boyutları yaklaşık 1 mikron çapında 2.5 mikron boyundadır. Bakterinin tanısı 16S rDNA dizi analizleri kullanılarak yapılmıştır. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümündeki Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Sıvı besiyeri olarak Çizelge 1’de yer alan Growth medium (DB), Biodeposition (DB) ve SF kullanılmıştır. Her sıvı besiyeri için kontroller zeminlere uygulanmıştır. Besiyerleri hazırlandıktan sonra 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Tüm işlemler steril ortam şartlarında uygulanmıştır.

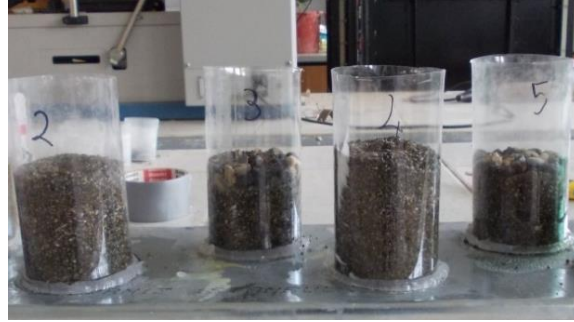
Çizelge 1. Kalsiyum karbonat çökeltmesi reaksiyonunda kullanılan farklı sıvı besiyerleri [18]

İsim	Beslevici Öğeler	Konsantrasyon	pHa	Referanslar
SF ^{b,c}	Nutrient broth	3 g L ⁻¹	6	Stocks-Fischer <i>et al.</i> (1999) [19]
	Urea	20 g L ⁻¹		
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,4-5,6 g L ⁻¹		
	NH ₄ Cl	10 g L ⁻¹		
Growth Medium (DB)	NaHCO ₃	2,12 g L ⁻¹	7	Whiffin (2004) [13]
	Yeast extract	20 g L ⁻¹		
	Urea	20 g L ⁻¹		
Biodeposition (DB)	Urea	20 g L ⁻¹	7	De Belia and De Mynck (2008) [20]
	CaCl ₂ .2H ₂ O	50 g L ⁻¹		

2.3. Uygulama Yöntemi

Sıvı besiyeri belirlenmesinde öncelikle literatürdeki çalışmalar incelenmiştir. Seçilen sıvı besiyerlerine bakteri aşılması yapılmış ve inkübe edilmiştir. Elde edilen kültürler farklı zeminlere uygulanarak sonuçları incelenmiştir. Zeminler farklı çap aralıklarında (kaba kum, kaba kum- çakıl) hazırlanarak plastik kalıplara %50 rölatif sıklıkta yerleştirilmiştir (Şekil 4). Kültür ortamı ve çimentolama solüsyonu (2/100 mL CaCl₂) numunelere aşılanmıştır. Literatürde mevcut çalışmaların birçoğunda silis kumu kullanılmıştır. Bu çalışmada da ayrıca benzer şekilde silis

kumu kullanılmıştır. Silis kum numuneleri 5 cm iç çaplı PVC kalıplara 10 cm yüksekliğinde %50 rölatif sıklıkta yerleştirilmiştir (Şekil 5). Bakteri kültürü zemine eklenmiş ve zemin doymun hale gelince alttan süzölmüştür. Süzölen költür tekrar zemine verilerek költürün zeminin her noktasına ulaşması amaçlanmıştır. Daha sonra 2/100 oranında CaCl₂ stok çözeltili eklenmiştir. Kimyasal reaksiyonun devam etmesi için 14 gün sonra tekrar sıvı besiyeri ve CaCl₂ stok çözeltili eklenmiş ve 28 gün sonunda numuneler incelenmiştir. Biyolojik iyileştirme sonucunda oluşan yapıların değeriendirilebilmesi amacıyla SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve XRD (X-Ray Kırınımı) analizleri yapılmıştır. Ayrıca serbest basınç dayanımı belirlenmiştir.



Şekil 4. Kültür ortamı eklenecek olan kaba kum, kaba kum-çakıl zemin numuneleri



Şekil 5. Silis kumu deney düzeneği

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Sıvı Besiyeri Analizi

Uygulama yapılan zeminler ve kullanılan besiyerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Költür uygulaması yapılan zeminlere sonrasında 2/100 CaCl₂ uygulanarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonuçları kaba kum, kaba-kum çakıl karışımlarında 14 gün silis kumunda ise çevrim yapıldığı için 28 gün sonra incelenmiştir.

Çizelge 2. Deney Uygulama Çizelgesi

No	Zemin Türü	Sıvı Besiyeri	No	Zemin Türü	Sıvı Besiyeri
1	Kaba Kum	Growth Medium (DB)	8	Silis kumu	SF
2	Kaba Kum-Çakıl	Growth Medium (DB)	9	Silis kumu	SF
3	Kaba Kum	Biodeposition (DB)	10	Silis kumu	SF
4	Kaba Kum-Çakıl	Biodeposition (DB)	11	Silis kumu	SF
5	Kaba Kum	Growth Medium (DB)	12	Silis kumu	SF
6	Kaba Kum-Çakıl	Growth Medium (DB)	13	Silis kumu	SF
7	Kaba Kum-Çakıl	Biodeposition (DB)			

Çizelge 2’de 3 ve 4 nolu numunelerde iyileşme gözlemlenmiştir. 4 nolu kaba kum-çakıl zemin karşımı kohezyonsuz olduğundan doğal şartlarda taneler birbirine tutunmamaktadır. Ancak uygulama sonrasında Şekil 6 (b) ve (c) ‘de görüldüğü gibi taneler arasında çimentolanma gerçekleşmiştir. Çizelge 2’de 3 nolu kaba kum numunesinde de aynı şekilde zemin taneleri arasında çimentolanma görülmüştür (Şekil 6(a)). Buradan Biodeposition (DB) sıvı besiyerine *V. arenosi* bakterisinin aşılması ve inkübasyonu ile kaba kum ve çakıl karışımı zeminlerin iyileştirilebileceği görülmektedir. Sadece sıvı besiyeri eklenen numunelerde herhangi bir iyileşme gözlemlenmemiştir.



Şekil 6. Uygulama sonuçları (a) 3 nolu numune, (b) 4 nolu numune, (c) 4 nolu numune (zemin tanelerinin birbirine tutunması)

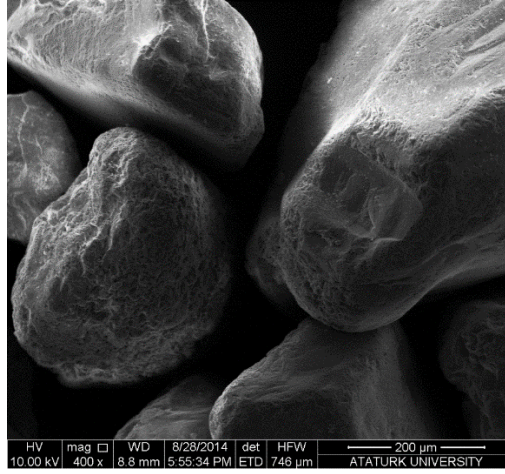
Silis kum üzerinde yapılan uygulamalarda diğer numunelerden farklı olarak içeriği Çizelge 1’de verilen SF sıvı besiyeri kullanılmıştır. SF sıvı besiyerinin seçiminde içeriğinde bulunan nutrient broth kimyasalının da etkisi olmuştur. Birçok çalışmada kullanılan nutrient broth, uygulama solüsyonuna eklendiğinde bakterinin yaşama yeteneğini ve büyümesini sürdürülebilir hale getirmektedir [21] . Silis kum numuneleri Şekil 5’te verilen deney düzeneğinde kalıplara yerleştirilmiştir. Şekil 7’de görüldüğü gibi 1 nolu numunede iyileşme gözlemlenmiş kontrol olarak sadece besiyeri uygulanan numunelerde iyileşme görülmemiştir.



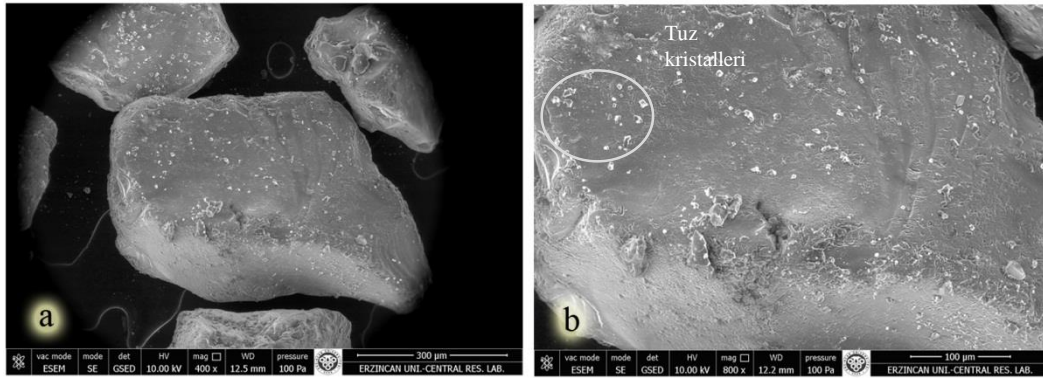
Şekil 7. Uygulama yapılan numune sonuçları (a) 1 nolu numune, (b) 2, 5, 6 nolu numune

3.2. SEM Analizi Sonuçları

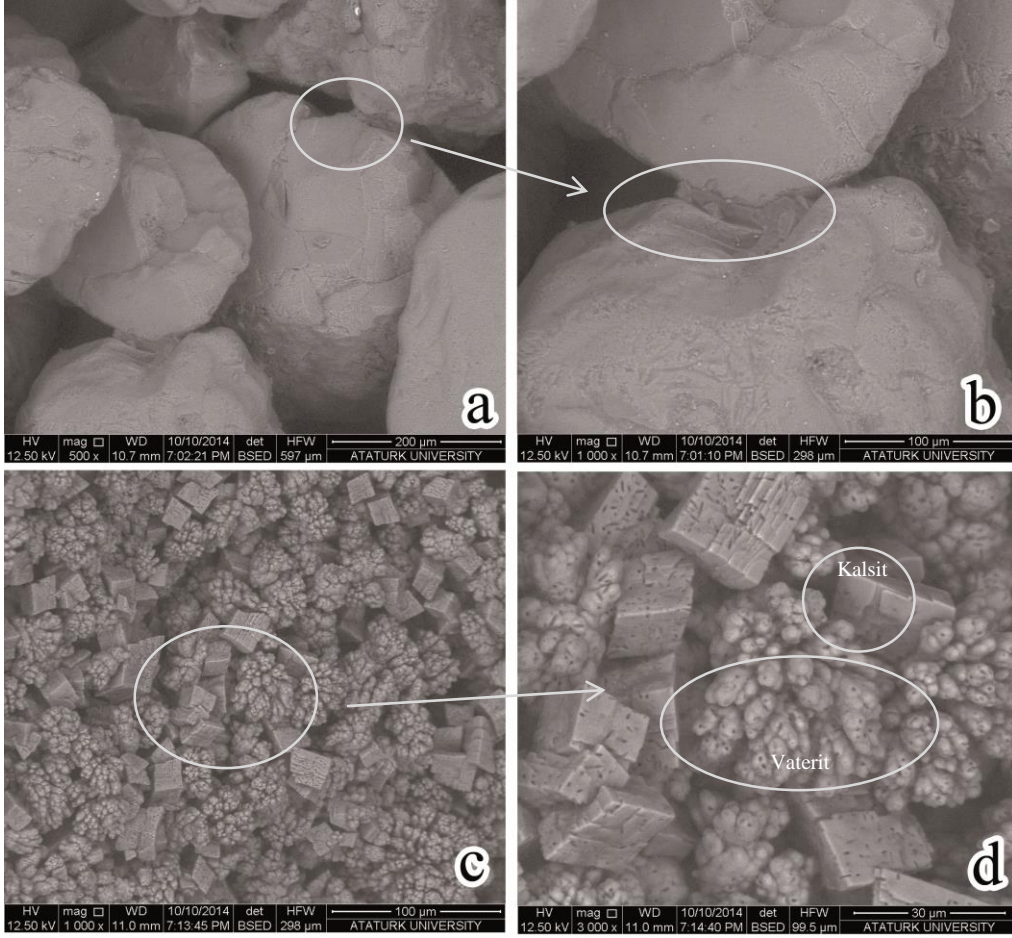
Uygulama yapılan silis kum numunelerden Şekil 7(a)’ da yer alan 1 nolu numune üzerinde SEM analizleri yapılmış ve sonuçları incelenmiştir. Şekil 8’de uygulama yapılmayan silis kum numunenin görüntüsü bulunmaktadır. Şekil 9’da sadece sıvı besiyeri uygulanan kültür ortamında sadece tuz kristallerine rastlanmıştır başka bir oluşuma rastlanmamıştır.



Şekil 8. Uygulama yapılmamış kum zemin SEM analizi (400x)



Şekil 9. Sadece sıvı besiyeri uygulanmış kum zemin SEM analizi a) 400x, b) 800x



Şekil 10. Uygulama sonucu SEM görüntüleri (a) uygulama yapılan zemin 500x, (b) uygulama yapılan zemin 1000x, (c) oluşan yapılar 1000 x, (d) oluşan yapılar (3000x)

Uygulama sonucunda oluşan yapılar Şekil 10'da verilmiştir. Şekil 10(a) ve (b)'ye bakıldığında biyolojik iyileştirme sonucunda taneler arasında bağlayıcı bir yapı oluşmuştur. Şekil 10(c) ve (d) incelendiğinde Şekil 2'de görüldüğü gibi oluşan yapıların kalsit ve vaterit olduğu görülmektedir.

3.3. XRD Analizi Sonuçları

Şekil 11'da uygulama yapılan ve yapılmayan zeminlerin XRD analiz sonuçları verilmiştir. XRD analiz sonuçlarına göre uygulama yapıldıktan sonra kalsit ve vaterit piklerinde artışlar görülmüştür.



Şekil 11. (a) Uygulama yapılan kum zemin XRD sonuçları (b) uygulama yapılmayan zemin XRD sonuçları

3.4. Serbest Basınç Deneyi Sonuçları

SF besiyeri kullanılarak hazırlanan silis kum numune üzerinde ASTM D 4219–02 standardına uygun olarak serbest basınç deneyi yapılmıştır. Kırılma anındaki gerilme 25,5 kPa olarak hesaplanmıştır. Serbest basınç deneyine ait bir fotoğraf Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. Serbest basınç deneyine ait fotoğraf

4. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada *V. arenosi* bakterisi kullanılarak zeminlerin biyolojik iyileştirilmesi araştırılmıştır. Literatürde mevcut çalışmalarda çoğunlukla silis kumu kullanılmıştır. Çalışmamızda silis kum zeminle beraber farklı çaplara sahip zeminler üzerinde de uygulama yapılmıştır. Farklı çaplarda hazırlanan zemin numunelerinde yapılan uygulama ile biyolojik olarak iyileştirmenin bu zeminlerde de başarılı sonuçlar verebileceği görülmüştür. Aynı tür zeminlerde farklı besiyerleri kullanılmış ve besiyerinin uygulama sonuçlarını etkilediği görülmüştür. Silis kum üzerinde yapılan uygulamalarda ise 25,5 kPa basınç dayanım değeri elde edilmiş ve reaksiyon sonrasında oluşan yapılar incelenmiştir. Taneler arasında oluşan bu yapılar tanelerin arasını doldurmuş ve birbirine bağlamıştır. SEM analizlerinde bu yapıların vaterit ve kalsit olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak *V. arenosi* bakterisi kullanılarak biyolojik zemin iyileştirmesinin yapılabileceği görülmektedir. Yapılacak detaylı analizlerle daha iyi sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- [1] B. Kim Huat, "Deformation and shear strength characteristics of some tropical peat and organic soils," *Pertanika J. Sci. Technol.*, vol. 14, no. 1 & 2, pp. 61–74, 2006.
- [2] M.-H. Ho and C.-M. Chan, "Some mechanical properties of cement stabilized Malaysian soft clay," *World Acad Sci Eng Technol*, vol. 74, pp. 24–31, 2011.
- [3] A. Sharma and R. R., "Study on effect of Microbial Induced Calcite Precipitates on strength of fine grained soils," *Perspect. Sci.*, vol. 8, pp. 198–202, 2016.
- [4] V. Ivanov and J. Chu, "Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ," *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*, vol. 7, no. 2, pp. 139–153, 2008.
- [5] N. YILDIRIM, Y. GÜRTUĞ, and C. SESAL, "Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşum mekanizmaları ve uygulama alanları," 2016.
- [6] L. Cheng and R. Cord-Ruwisch, "Upscaling effects of soil improvement by microbially induced calcite precipitation by surface percolation," *Geomicrobiol. J.*, vol. 31, no. 5, pp. 396–406, 2014.
- [7] S. G. Gupta, C. Rathi, and S. Kapur, "Biologically Induced Self Healing Concrete: A Futuristic Solution for Crack Repair," *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.*, vol. 1, no. 3, pp. 85–89, 2013.
- [8] M. Ni and B. D. Ratner, "Differentiating calcium carbonate polymorphs by surface analysis techniques— an XPS and TOF-SIMS study," *Surf. Interface Anal. An Int. J. devoted to Dev. Appl. Tech. Anal. surfaces, interfaces thin Film.*, vol. 40, no. 10, pp. 1356–1361, 2008.
- [9] L. I. Bing, "GEOTECHNICAL PROPERTIES OF GEOTECHNICAL PROPERTIES OF BIOCEMENT TREATED SAND AND CLAY School of Civil and Environmental Engineering," 2015.
- [10] S. Stocks-Fischer, J. K. Galinat, and S. S. Bang, "Microbiological precipitation of CaCO₃," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 31, no. 11, pp. 1563–1571, 1999.
- [11] S. K. Ramachandran, V. Ramakrishnan, and S. S. Bang, "Remediation of concrete using microorganisms," *ACI Mater. J.*, vol. 98, no. 1, 2001.
- [12] S. S. Bang, J. K. Galinat, and V. Ramakrishnan, "Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 28, no. 4, pp. 404–409, 2001.
- [13] V. S. Whiffin, "Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement." Murdoch University, 2004.
- [14] J. T. DeJong, M. B. Fritzges, and K. Nüsslein, "Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear," *J. Geotech. Geoenvironmental Eng.*, vol. 132, no. 11, pp. 1381–1392, 2006.
- [15] V. S. Whiffin and L. A. Van Paassen, "Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique," pp. 417–423, 2007.
- [16] G. D. O. Okwadha and J. Li, "Chemosphere Optimum conditions for microbial carbonate precipitation," *Chemosphere*, vol. 81, no. 9, pp. 1143–1148, 2010.
- [17] S. Li, "A laboratory study of the effects of bio-stabilization on geomaterials by Shengting Li A thesis submitted to the graduate faculty In partial fulfillment of the requirements for the degree of MASTER OF

SCIENCE Major : Civil Engineering (Geotechnical Engin,” 2013.

- [18] W. De Muynck, N. De Belie, and W. Verstraete, “Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review,” *Ecol. Eng.*, vol. 36, no. 2, pp. 118–136, 2010.
- [19] S. Stocks-Fischer, J. K. Galinat, and S. S. Bang, “Microbiological precipitation of CaCO₃,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 31, no. 11, pp. 1563–1571, 1999.
- [20] N. De Belie and W. De Muynck, “Crack repair in concrete using biodeposition,” in *Proceedings of the International Conference on Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting (ICRRR)*, Cape Town, South Africa, 2008, pp. 291–292.
- [21] W.-S. Ng, M.-L. Lee, and S.-L. Hii, “An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement,” *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, vol. 62, pp. 723–729, 2012.