

**Kimyasal katkı malzemelerinin biyomineralizasyon ile kendiliğinden iyileşen çimento-esaslı malzemelerin performansına olan etkisi**

**Influence of chemical admixtures on performance of biomineralized self healing cement-based materials**

Ali Amiri, Zeynep Başaran Bundur

\* Department of Civil Engineering, Özyeğin University, İstanbul.

Geliş Tarihi : 07.04.2019

Kabul Tarihi : 20.05.2019

**ÖZET**

Beton yapıların servis ömrünü etkileyen faktörler birbirleriyle genellikle bağlantılıdır. Beton gevrek ve kırılğan doğası yüzünden, gerilmeler altında çatlayabilir. Son yıllarda yapılan araştırmalar kendiliğinden iyileşen çimento esaslı malzemelerin üretiminin mümkün olduğunu göstermiştir. Kendiliğinden iyileşme özelliği, betonun oluşan çatlakları kendiliğinden kapatabilmesidir ve bu amaçla kullanılacak yenilikçi yöntemlerden biri biyomineralizasyondur. Biyomineralizasyon mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu ürün olarak kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) oluşmasıdır. Bu oluşan ürün/ $\text{CaCO}_3$  çökeltisinin çatlakları doldurması ile kendiliğinden iyileşme elde edilir. Bu çalışmanın amacı, çimento-esaslı malzemelerde kendiliğinden iyileşmenin sağlanabilmesi için çimento hamuru içine katılan bakterilerin malzemenin performansına olan etkisinin incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda bakteriler sulu besi yerinde büyütüldükten sonra hiçbir işlem uygulanmadan çimento harcı içine katılmış ve performans değerlendirme priz süresi, basınç dayanımı, karbonizasyon ve kendiliğinden iyileşme kabiliyeti incelenerek belirlenmiştir. Bakterilerin harç 30 içine eklenmesi kimyasal yapıyı ve basınç dayanımını olumsuz yönde etkilemez iken, priz süresinde belirgin bir artış olmuştur. Bu artış, bakteri ile beraber çimento içine katılan besi yeri ile ilişkilendirilmiştir. Çimento harcı içine karıştırılan bakteriler eğilme altında oluşturulan çatlakları kapatabilmiş, ürün/ $\text{CaCO}_3$  çatlakları doldurmuştur. Son olarak, süperakışkanlaştırıcı ve hava sürükleyici katkı (HSK) gibi sıkça kullanılan katkı malzemelerinin biyomineralizasyona olan etkileri incelenmiştir. Süperakışkanlaştırıcı kullanımı bakterilerin kendiliğinden iyileşmeyi sağlamasında olumlu bir etki sağlarken, HSK'nın çatlak içinde  $\text{CaCO}_3$  çökmesini kısmen azalttığı gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kendiliğinden iyileşme; çimento harcı; biyomineralizasyon; basınç dayanımı; priz süresi

**ABSTRACT**

Factors affecting the durability of concrete structures are generally associated with each other. Due to its brittle nature, concrete can crack when stress is applied. Recent research in the field proposes that it might be possible to develop a smart, cement-based material that can self-heal itself. Self-healing is the ability of concrete to heal the cracks without any external application. Self-healing property of concrete can be obtained via different approaches. Use of biomineralization is a novel technique to provide self-healing in cement-based materials. Biomineralization is a biochemical process in which microorganisms stimulate the formation of minerals. In this system, calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) is induced by leveraging the metabolic activity of microorganism and self-healing is obtained by sealing of the cracks with  $\text{CaCO}_3$ . The goal of this study to investigate the influence of bacterial self-healing agent on performance of cement-based materials. In this study, the bacteria will be introduced to cement paste with its growth media without any additional manipulation such as encapsulation. Performance of cement-based mortar was evaluated by Vicat needle test, compressive strength test, thermogravimetric analysis and crack healing ability. While incorporation of bacterial cells did not affect the compressive strength and chemical composition, there was a significant delay in initial setting time. This was attributed to the nutrient medium added along with bacterial cells. With this approach, the flexural cracks on the mortar surface were sealed with the  $\text{CaCO}_3$ . At last but not the least the influence of superplasticizers and air entraining agents (AEA) on self healing was investigated. While the superplasticizers improved the self-healing efficiency of the bacterial cells, AEA relatively reduced the amount of  $\text{CaCO}_3$  precipitation within the cracks.

**Keywords:** Self-healing; cement-based mortar; biomineralization; compressive strength; initial setting time

Sorumlu Yazar: zeynep.basaran@ozyegin.edu.tr

## 1. GİRİŞ

Beton yapıların servis ömrünü etkileyen faktörler genellikle birbirleriyle bağlantılıdır. Beton gevrek ve kırılğan doğası yüzünden, gerilmeler altında çatlayabilir. Bu çatlaklar betonun geçirgenliğini artırır, dayanımını düşürür ve dolayısıyla servis ömrünü kısaltır. Günümüzde, püskürtme beton ve epoksi enjeksiyonu, betonda çatlak onarımı için kullanılan tamir ve restorasyon yöntemlerinden bazılarıdır. Klasik yöntemlerin uygulanması zaman almakla beraber, çatlaklara hızlı müdahale olasılığı düşüktür. Bu yöntemler büyük çatlakların onarımı için uygundur, ama çatlaklar incelidikçe bu malzemelerin, çatlağın derinlerine inmesi zorlaşmaktadır (J.Y. Wang vd. 2014). Son yıllarda yapılan araştırmalar kendiliğinden iyileşen çimento esaslı malzemelerin üretiminin mümkün olduğunu göstermiştir (De Muynck, De Belie, ve Verstraete 2010; Van Tittelboom ve De Belie 2013; Sahmaran vd. 2013). Kendiliğinden iyileşme özelliği, betonun oluşan çatlakları kendiliğinden kapatabilmesidir. Bu amaçla kullanılacak en yenilikçi yöntemlerden biri de biyomineralizasyondur. Biyomineralizasyon mikroorganizmaların metabolik aktivitelerine dayanan bir tür biyokimyasal reaksiyonlar zinciridir (Stephan Mann 2001). Bu reaksiyonlarla elde edilecek minerallerin listesi uzundur ama çimento esaslı malzemelerde sıkça kullanılan biyomineralizasyon ürünü kalsiyum karbonattır ( $\text{CaCO}_3$ ). Üreaz enzimine sahip ve negatif yüzey yükü olan mikroorganizmalar, ortamda bulunan üreyi, karbonat ve amonyak olarak hidrolize edebilmektedirler. Mikroorganizmalar eksi yüklü yüzeyleri sayesinde ortamdaki kalsiyum iyonlarını elektros-tatik olarak çekmekte ve kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) çökeltisinin yüzeyinde çekirdeklenmesini sağlamaktadır (Stocks-Fischer, Galinat, and Bang 1999; De Muynck, De Belie, and Verstraete 2010). Özellikle, üreaz enzimi içeren mikroorganizmalar üre ve kalsiyum içeren ortamlarda ürün olarak  $\text{CaCO}_3$  oluşumunu indükleyebilir ve oluşan  $\text{CaCO}_3$  çökeltisi çimento esaslı malzemelerde oluşabilecek çatlakları doldurarak kendiliğinden iyileşme sağlayabilir (De Muynck, De Belie, anved Verstraete 2010). Çimento esaslı malzemelerde biyomineralizasyon ile kendiliğinden iyileşmenin sağlanması için ilk adım mikroorganizmaların çimento hamuru içine katılmasıdır. Bu aşamada önemli bir nokta mikroorganizmaların çimento hamuru içerisinde canlı kalabilme yeteneğidir. Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda farklı yöntemler ile mikroorganizmaların beton içinde uzun süre canlı kalabildiği gözlemlenmiştir. Bu yöntemler genellikle hücrelerin çeşitli işlemlerden geçirilerek spor olarak veya kapsül içerisine enjekte edilmesini içermektedir (Wiktor ve Jonkers 2011; J. Wang vd. 2012; J. Y. Wang, Snoeck vd. 2014). Çimentonun alkali yapısı ve de devam eden hidratasyon nedeni ile azalan boşluk miktarının, mikroorganizmaların canlı kalma olasılığını azaltabileceği öne sürülmüş ve geçmişte yapılan çalışmalar büyük oranda mikroorganizmaların çimento içinde canlılığı/dayanımı üzerinde yoğunlaşmıştır. Wiktor ve Jonkers (2011) Delft Üniversitesi'nde geliştirdikleri sistem ile endosporları (kalsiyum laktat ile beraber) genleştirilmiş kilden oluşan hafif agregaların içine enjekte etmişlerdir ve bu agregaları beton karışımında kullanmışlardır. Çatlak oluşumunda yüzeyle beraber kırılan agregaların içindeki karışım sayesinde yüzey çatlakları kalsiyum karbonat çökeltisi ile tamamen kapatılmış ve malzemenin geçirgenliği azaltılmıştır. Wang vd. (2012; 2014a) yaptıkları çalışmada bakterileri sırasıyla poliüretan ve silika jel kapsüllerin içine yerleştirip, iki farklı sistemin verimliliğini karşılaştırmışlardır. Silika jel kapsüllerin bakterilerin metabolik aktivitelerini daha az etkilediklerini ve üre ayrışımının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Wang vd., 2014a). Wang vd. (Wang vd., 2014b) son çalışmalarında ise endosporları mikro kapsüller içerisine yerleştirip; üre, maya özütü ve kalsiyum nitrat ( $\text{CaNO}_3$ ) ile beraber çimento harcının içine karıştırmışlardır. Bu yöntem ile çatlaklar onarılmış ve harcın geçirgenliği azaltılmıştır (J. Y. Wang, Soens, vd. 2014). Ancak doğru mikroorganizma ve besi yeri seçimi ile bu işlemler azaltılarak, mikroorganizmalar doğada buldukları koşullar ile çimento harcı içine katılabileceği bilinmektedir. Achal vd. (2011) bakteriyi sulu besi yerinde büyüttükten sonra bu besi yerini kum, uçucu kul ve çimento ile karıştırmışlardır. Yapılan analizlerle bu yöntem ile çimento harcı içine katılan hücrelerin 28 gün boyunca canlı kalabildikleri ve basınç gücünü arttırdıkları gözlemlenmiştir (Achal vd. 2011). Ayrıca Bundur (Bundur Z.B. vd. 2017) yaptığı çalışmalarda *Sporasarcina pasteurii* (*S. pasteurii*) suşunun büyütüldüğü sulu besi yeri ile çimento harcı karışımına katıldığında, hücrelerin 11 ay kadar canlı kalabildiklerini gözlemlemiştir. Bu çalışmada çimento harcı içine katılan *S. pasteurii* suşu önce uygun besi yerinde büyütüldükten sonra ekstra hiçbir işlem uygulanmadan çimento ile karıştırılmıştır. *S. pasteurii* aktif üreaz enzimine sahip olması ve eksi yüzey yükü sayesinde biyomineralizasyon üzerine yapılan çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Stocks-Fischer vd. 1999; De Muynck vd. 2010). Bu araştırmanın amacı hiçbir işlem gerektirmeden çimento hamuru içine katılan aktif *S. pasteurii* hücrelerinin malzemenin performansına, biyomineralizasyona ve kendiliğinden iyileşme özelliğine olan etkisinin incelenmesidir. Bunun yanı sıra bu mekanizmaya karışımlarda sıkça kullanılan süper akışkanlaştırıcı ve hava sürükleyici katkıların (HSK) etkileri de incelenmiştir.

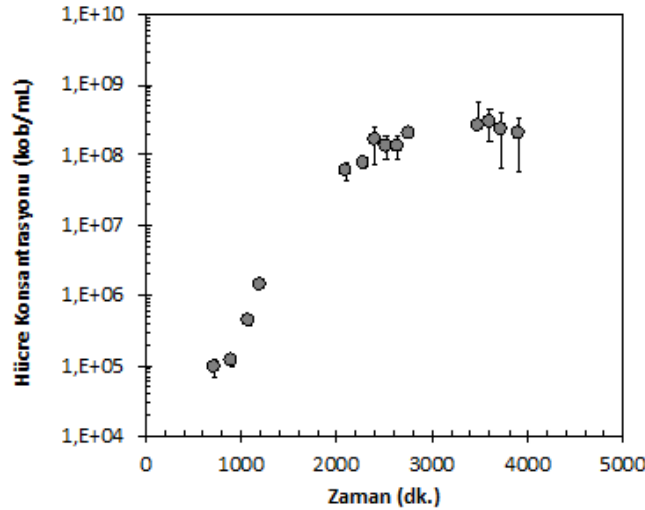
## 2. YÖNTEM

### 2.1 Bakteri suşunun seçilmesi ve sulu besi yerinde büyütülmesi

Bu çalışmada Alman mikroorganizma ve hücre kültürleri koleksiyonundan (DSMZ) 33 nolu suşu olan *S. pasteurii* kullanılmıştır. *S. pasteurii* topraktan kolayca elde edilebilen ve hastalık yapmayan bir bakteri çeşididir. *S. pasteurii* aktif üreaz enzimine sahip olması ve eksi yüzey yükü sayesinde biyomineralizasyon üzerine yapılan çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Stocks-Fischer, Galinat, ve Bang 1999; De Muynck, De Belie ve Verstraete 2010). Bu suşun çimento esaslı malzemelerde biyomineralizasyon üzerine yapılan araştırmalarda kullanılmasının en önemli nedeni yüksek alkali ortamlara olan toleransı ve endospor oluşturabilme özelliğidir. Bu çalışmada bakteriler hiçbir koruma mekanizması olmadan büyütüldükleri sulu besi yeri ile çimento harcı karışımına eklenmiştir. Bu sebeple *S. pasteurii* hücrelerinin dayanıklılığı büyük önem taşımaktadır.

DSMZ 33 *S. pasteurii* suşunun büyümesi için gerekli besiyeri solüsyonu 1 litre artılmış suya (DI su) 0.13 M tris bazı, 20 g/L maya özütü ve 10 g/L üre hazırlanmıştır. Agar plaka gerektiğinde besiyeri solüsyonuna 12g/L agar eklenmiştir. Üre-maya özütü (ÜMÖ) besi yerinin pH'ı 9 olarak ayarlanmıştır.

Hazırlanan besiyeri solüsyonu otoklav (HIRAYAMA HV 25-L, Japonya) yardımı ile (121°C de 100 kPa) sterilize edilmiştir. Besiyeri solüsyona eklenen bakteriler IKA KS 4000 model inkübatörde (Almanya) 30°de, dakikada 180 devir sayısı (rpm) çalkalanarak büyütülmüştür. Periyodik olarak alınan örnekler, besi yeri-agar petri kaplarına yayılmış ve 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından zaman içinde solüsyonlardaki bakteri konsantrasyonu (kob/mL) belirlenmiş ve bakteri büyüme eğrisi elde edilmiştir. Bu ilişki çalışmanın ileriki safhalarında çimento hamuru içine katılacak bakteri kültüründeki hücre sayısını belirlemek için kullanılmıştır. Şekil 1 DSMZ 33 *S. pasteurii* suşunun ÜMÖ besi yerindeki büyüme eğrisini göstermektedir.



**Şekil 1:** *S. pasteurii* hücrelerinin ÜMÖ besiyeri solüsyonunda büyüme eğrisi (pH 9). Gösterilen veri noktaları üç tekrardan elde edilen ortalamayı, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

### 2.2.Sulu besi yerinde biyomineralizasyonun incelenmesi:

Biyomineralizasyon oluşumunun incelenmesi için, *S. pasteurii* hücreleri 200 mL sulu besi yeri içinde üssel büyüme (log fazı) safhasına gelene kadar büyütülmüş ve ardından bu sulu ortama kalsiyum ([Ca+2] kaynağı eklenmiştir. Bu aşamada kalsiyum kaynağı olarak Kalsiyum Nitrat- Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (40 gram /Litre ) kullanılmıştır. Kalsiyum kaynağı eklendikten 24 saat sonra oluşan ürün/çökelti 20°C'de 6300g (15 dakika) hız ile santrifüj ile toplanmıştır. Toplanan çökelti tarayıcı elektron mikroskobu (SEM, JEOL JIB-4501 Multi-Beam Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope-(Freising, Germany)) ve X-ışınları kırınım analizi (XRD, BRUKER D8 Advance X-ray Diffractometer (Karlsruhe, Germany)) ile incelenmiştir. SEM analizi için toplanan CaCO<sub>3</sub> için altın kaplama kullanılmış ve analiz sırasında çalışma mesafesi 9-12 mm ve voltaj 5 kV olarak ayarlanmıştır. XRD için ise toplanan CaCO<sub>3</sub> çökeltileri 24 saat 40°C lik fırında kurutulduktan sonra analiz için numune kabına yerleştirilmiştir. XRD analizi 10-90° açıları (2θ) arasında 0.02°lik artışlar ile yapılmıştır

### 2.3. Kullanılan çimento ve agregata

Bu çalışmada özgül yüzey alanı 3954 cm<sup>2</sup>/g olan TS EN 197-1 CEM I 42.5 R Portland çimentosu kullanılmıştır. Çimento harcı yapımında ise TS 706/ EN 12620 standartlarıncaya onaylanmış ince agregata kullanılmıştır. Agregatanın özgül ağırlığı ve su emme kapasitesi ASTM C 128-12 standardına göre belirlenmiş ve bu değerler sırasıyla 2.56 ve %0.67 olarak bulunmuştur.

### 2.4. Besi yerlerinde büyütülen bakterilerin çimento hamuru içine katılması

*S. pasteurii* hücreleri yukarıda belirtildiği gibi sulu besiyerinde üssel büyüme safhasına erişene kadar büyütülmüştür. Ardından elde edilen bakteri çimento ile karıştırılmıştır. Çimento hamurunun karışımında kullanılan su bu oluşturulan bakteri kültürü ile değiştirilmiştir (Bak. kültürü / çimento: 0.45). Burada değinilmesi gereken bir nokta ise bu solüsyonun ağırlığının %96'sının saf su olduğu ve bakterilerin ağırlığının su-çimento oranını etkilemeyeceğidir. Kontrol numuneleri sadece su ve sulu besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Hava sürükleyici ve süper akışkanlaştırıcının gerektiği serilerde karboksil eter bazlı süper akışkanlaştırıcı (1 kg / 100 kg çimento) ve nitrat tuz bazlı hava sürükleyici katkı (HSK) kullanılmıştır (0.1 kg/100 kg çimento). Karışımlar hazırlanırken, gerekli su/solüsyon miktarının %70 ilk olarak çimento ve agregata ile karıştırılmış, son 1 dakika da geri kalan suya/solüsyona süper akışkanlaştırıcı ve HSK eklenmiştir.

### 2.5. Vikat iğnesi testi

Vikat iğnesi testi ASTM C191-13 standardına göre yapılmıştır. Ancak bu standartta belirtilen kıvam noktası yerine sabit su/çimento (solüsyon/çimento) olarak 0.45 kullanılmıştır. Tablo 2'de belirtilen çimento hamuru numuneleri ASTM C305-14 standardına göre hazırlanmıştır. Test süresince numunelere ıslak bez ile nem sağlanmış, sıcaklık 21 °C'de sabit tutulmuştur. Her seri 3 kere tekrarlanmıştır). Bakteri içeren numunelerde *S. pasteurii* hücre sayısı 2 x 10<sup>8</sup> – 8 x 10<sup>8</sup> CFU/mL arasında tutulmuştur. Vikat iğnesi testi için karışımlar 3 kere tekrarlanmıştır. Tablo 1 çalışmada hazırlanan çimento hamuru/harcı numuneleri göstermektedir.

**Tablo 1:** Çalışmada test edilen çimento hamuru numune serileri. SP: Süperakışkanlaştırıcı; HSK: Hava Sürükleyici Katkı, ÜMÖ: Üre + Maya özütü besiyeri

| Numune Adı | Malzeme Karışımı |     |                     | Katkı Malzemesi |     |
|------------|------------------|-----|---------------------|-----------------|-----|
|            | Su               | ÜMÖ | ÜMÖ bakteri kültürü | SP              | HSK |
| A1         | X                |     |                     |                 |     |
| C1         | X                |     |                     | X               |     |
| D1         | X                |     |                     |                 | X   |
| A1-MÖ      |                  | X   |                     |                 |     |
| C1-MÖ      |                  | X   |                     | X               |     |
| D1-MÖ      |                  | X   |                     |                 | X   |
| A1-MÖ-Ç    |                  |     | X                   |                 |     |
| C1-MÖ-Ç    |                  |     | X                   | X               |     |
| D1-MÖ-Ç    |                  |     | X                   |                 | X   |

### 2.6 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Tablo 1'de belirtilen çimento hamuru numunelerde biyomineralizasyonun anlaşılması için TGA analizi yapılmıştır. Deneyler için yine su/çimento oranı 0.45 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu numuneler 2 x 3 x 4 cm boyutunda kalıplara dökülerek 1 gün boyunca nemli odada kür edilmiş. Bakterilerin ek besin sağlanması ve canlılıklarının korunması için kalıplar söküldükten sonra numuneler test gününe kadar ÜMÖ sulu besiyeri içinde kür edilmiştir. TGA analizi 3, 7 ve 28 günlük numuneler için yapılmıştır. Test gününde numuneler kür solüsyonlarından çıkarılarak, orta kısımlarından alınan örnekler seramik havanda etanol ile dövülmüştür. Numuneler tam kuruma için 24 saat desikatörde tutulmuş Netzsch STA 449 Jupiter TGA-DTA analizörü ile 40°C -1100 °C arası ısıtılarak ağırlık kaybı hesaplanmıştır. Ardından DTG grafiği kullanılarak, ağırlık kaybının olduğu sıcaklık aralıkları belirlenmiştir. Bu aralıklardan ilki (400-450°C arası) ile kalsiyum hidroksit (CH) ve ikincisi (650-800°C arası) kullanılarak CaCO<sub>3</sub> oranları belirlenmiştir.

## 2.7. Basınç dayanımı testi

Basınç dayanımı testi için gerekli çimento harcı numuneler Tablo 1’de belirtilen çimento hamuru numunelere çimento: kum oranı 1:3 olacak şekilde kum eklenerek hazırlanmıştır. Numuneler ASTM 305 standardına göre karıştırılmıştır. Hazırlanan taze çimento harçları 5 x 5 x 5 cm<sup>3</sup> küp numune kalıplarına alınarak 24 saat rutubetli ortamda tutulmuştur. Ardından kalıplar sökülerek, numuneler test gününe kadar Bölüm 2.6’da belirtilen nedenlerden dolayı ÜMÖ sulu besi yeri içinde kür edilmiştir. Numunelerin basınç dayanımları 3., 7., 28. ve 90. günlerde ASTM 109 standardına göre ölçülmüştür. Bakteri içeren numunelerde *S. pasteurii* hücre sayısı 2 x 10<sup>8</sup> – 8 x 10<sup>8</sup> CFU/mL arasında tutulmuştur. Test sırasında yükleme hızı 1.3 kN/ sn. olarak belirlenmiştir. Basınç dayanımı testi için karışımlar iki kere tekrarlanmış, her test gününde üçer numune test edilmiştir. Toplam 6 numunedan ortalama ve standart sapma belirlenmiştir.

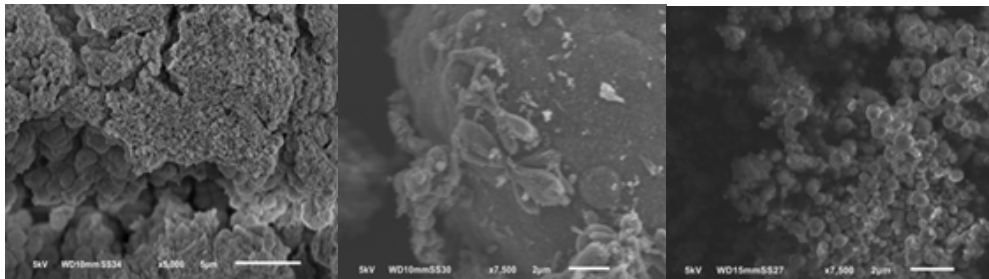
## 2.8. Çatlaklarda kendiliğinden iyileşmenin sağlanması

Kendiliğinden iyileşmenin belirlenebilmesi çimento harçları 40 x 40 x160 mm kirişler olarak hazırlanmış ve 24 saat rutubetli ortamda tutulmuştur. Harçlar hazırlanırken 6 mm uzunluğunda mikro sentetik fiber kullanılmıştır (700 g / m<sup>3</sup> harç). Ardından kalıplar sökülerek, çatlak kapanması gözlemlenene kadar ÜMÖ sulu besiyeri içinde kür edilmiştir. Yedinci günün sonunda numuneler servo hidrolik deplasman kontrollü bir cihaz kullanılarak eğilme yükü altında çatlatılmış ve çatlak boyutu 0.5 mm’den küçük tutulmuştur. Yükleme gerinim kontrollü yapılmış ve hızı 0.005 mm/sn olarak belirlenmiştir. Yükleme sırasında çatlak oluşumu takip edilmiş ve çatlak oluştuğu anda yükleme durdurulmuştur. Çatlaklar oluşturulduktan sonra kirişler 50 gün boyunca Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> içeren ÜMÖ sulu besiyeri içinde kür edilmiştir. Kendiliğinden iyileşmenin sağlanması için kür suyuna [Ca<sup>+2</sup>] kaynağı olarak Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (26 g/L su) eklenmiştir.

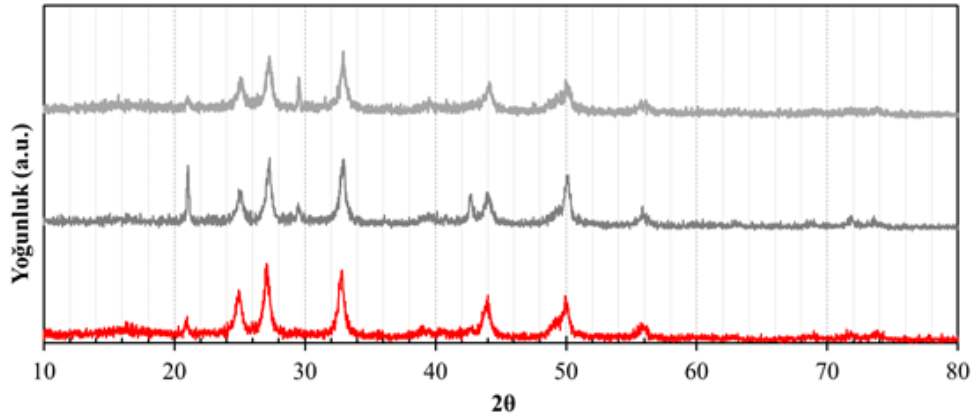
## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 3.1 Bakterilerin sulu ortamda CaCO<sub>3</sub> çökeltilmesi:

Kullanılan sulu besi yerlerinin ve eklenen [Ca<sup>+2</sup>] kaynağının biyomineralizasyona olan etkisini incelemek için ÜMÖ besi yerinde büyütülen bakteri kültürüne farklı [Ca<sup>+2</sup>] kaynakları eklenmiştir. Şekil 2 toplanan biyolojik CaCO<sub>3</sub> için yapılan SEM analizini göstermektedir. ÜMÖ besi kültüründe büyütülen hücrelere Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> eklenmesi vaterit çökmesi gözlemlenmiştir. SEM analizini destekleyici olarak bu numunelere XRD analizi de yapılmıştır. Şekil 3, ÜMÖ Besiyerinde büyütülmüş hücre kültüründen elde edilen biyominerallerin XRD analizlerini özetlemektedir. Solüsyonlarda kalsiyum kaynağı fark etmeden çoğunlukla vaterit kristallerinin çöktüğü belirlenmiştir. Kullanılan katkı malzemeleri de sonucu değiştirmemiştir. Bu iki analiz sonucuna bakıldığında ÜMÖ besi yeri ile hücreler vaterit kristallerinin çökmesini sağlamıştır. Vaterit bir ara faz olup, genellikle doğada çok nadir gözlemlenmektedir. Ancak biyomineralizasyon ile bu ara faz çok rahat bir şekilde çökeltilmektedir (S Mann 2001). Belirtilmesi edilmesi gereken diğer bir noktada çöken CaCO<sub>3</sub> çöken fazın vaterit ya da kalsit olması substrat malzemenin kimyasal birleşenleri ile de ilgilidir (Rodriguez-Navarro vd. 2012). Bu sebep ile kalsiyum esaslı çimento hamuru içinde kalsit gözlemlenmesi daha olasıdır (Z.B. Bundur, Kirisits, ve Ferron 2015).



**Şekil 2:** ÜMÖ besi yerinde *S. pasteurii* hücreleri ve Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ile elde edilen ürünün (CaCO<sub>3</sub>) SEM görüntüleri (a) Katkı malzemesiz (b) Hava sürükleyici katkı ile (c) Süperakışkanlaştırıcı ile

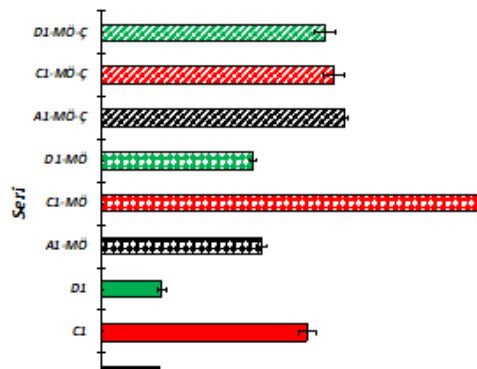


**Şekil 3:** ÜMÖ besi yerinde *S. pasteurii* hücreleri ve  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ile elde edilen ürünün ( $\text{CaCO}_3$ ) XRD analizleri (a) Katkı malzemesiz (b) Hava sürükleyici katkı (HSK) ile (c) Süperakışkanlaştırıcı (SP) ile

### 3.2 Katkı malzemelerinin ve bakteri kültürünün priz süresine olan etkisi

Kendiliğinden iyileşen betonun geliştirilmesindeki en önemli sorunlardan biri hücrelerle beraber maya özütü kullanımının priz süresini kullanılabilir limitlerin üstüne çıkarmasıdır. Çalışmalarında çimento hamuruna eklenen ÜMÖ besi yeri ve bakteri kültürünün priz süresini belirgin bir şekilde uzattığı belirlenmiştir (Bundur vd. 2015). Ayrıca bu uzamanın maya özütü (çimento ağırlığının %1'i kadar) kullanımı ile doğrudan ilişkili olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde Wang (J. Wang 2013) kullanılan maya özütü oranının çimento ağırlığının %0,35'inden %0,85'e çıkarılmasının priz süresini belirgin olarak uzattığı ve hamurun sertleşmesini geciktirdiğini belirlemiştir. Bunu en önemli nedeninin maya özütü içinde bulunan karbonhidratların geciktirici olarak etki etmesidir (Bolobova ve Kondrashchenko 2000). Şekil 4, ÜMÖ besiyeri ve besiyerinde büyütülen bakteri kültürünün çimento hamurunun priz süresine olan etkisini göstermektedir. Beklenildiği gibi hem ÜMÖ besi yeri hem de bu besi yerinde büyütülmüş bakteri kültürü priz süresini uzatmıştır. Bakteri kültüründe metabolik aktiviteler sonucu parçalanmış maya özütünden sentezlenen iyonların priz süresini daha da belirgin bir şekilde uzattığı düşünülmektedir. Bu sebep ile Amiri (Amiri ve Bundur 2018) maya özütü yerine atık bir ürün olan mısır mäsasyon sıvısının kullanılmasının priz süresindeki bu olumsuz etkileri azaltacağını belirtmiştir. Alternatif atık malzemelerin kullanılması bakteriler ile kendiliğinden iyileşmenin pratikte kullanılmasını daha olası kılacaktır.

Çalışmada kullanılan süper akışkanlaştırıcı 100 kg çimentoya 1 kg olacak şekilde kullanılmıştır. Üreticiden elde edilen kullanım detaylarında bu oran 100 kg çimentoya 0,5 kg ve 1,5 kg arasında sınırlandırılmıştır. Ayrıca, yine üreticinin belirttiği şekilde karışım ilk su/solüsyon miktarının %70 ile yapılmış, son 1 dakika da geri kalan suya/solüsyona süper akışkanlaştırıcı eklenmiştir. Bu açılarından ne oran da ne de kullanım şeklinde bir hata mevcuttur. Karboksil eter bazlı bu süperakışkanlaştırıcının neden böyle bir etki yaptığı bilinmez iken, besi yeri ve bakteri kültürü ile olan etkileşimi daha detaylı inceleme gerekmektedir. Bunun için özellikle süperakışkanlaştırıcı eklenmesi ile yüzey yüklerinde ve sulu ortamlardaki iyon konsantrasyonu değişimleri incelenmelidir.



**Şekil 4:** ÜMÖ besi yeri ve besi yerinde büyütülen bakteri kültürü ile hazırlanan çimento hamuru numunelerinin priz sürelerinin kontrol numunelerine (A1, C1 ve D1) olan bağlı oranları; MÖ: Maya özütü. A serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento; C serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento + SP ; D serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento + HSK. Su / Solüsyon- Çimento oranı 0.45 kullanılmıştır. Barlar üç tekrardan elde edilen ortalamayı, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

3.2 Çimento hamuru içinde ürün/CaCO<sub>3</sub> oluşumu ve mikro yapısındaki değişim

Çimento hamuru içinde biyomineralizasyonu gözlemlemek amacıyla TGA yapılmıştır. Tablo 2, tüm seri çimento hamurları için 3,7 ve 28. Günde CaCO<sub>3</sub> ve CH yüzdeleri özetlemektedir.

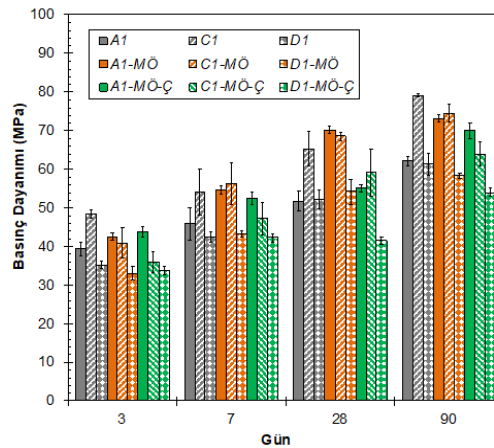
**Tablo 2:** Tüm seri çimento hamurları için 3, 7 ve 28 günlük CH ve CaCO<sub>3</sub> miktarlarının kontrol numunelerine (A1, C1 ve D1,) göre bağıl oranı; MÖ: Maya özütü; A serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento; C serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento + SP; D serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento + HSK. Su/ çimento ve solüsyon/çimento oranı 0,45 olarak kullanılmıştır

| Numune Adı | 3 Gün |                   | 7 Gün |                   | 28 Gün |                   |
|------------|-------|-------------------|-------|-------------------|--------|-------------------|
|            | CH    | CaCO <sub>3</sub> | CH    | CaCO <sub>3</sub> | CH     | CaCO <sub>3</sub> |
| A1         | 9,9   | 7,4               | 8,6   | 5,9               | 8,5    | 6,0               |
| C1         | 10,4  | 7,7               | 9,0   | 6,3               | 16,0   | 11,0              |
| D1         | 11,1  | 8,5               | 10,0  | 6,8               | 13,2   | 9,1               |
| A1-MÖ      | 4,2   | 6,9               | 7,7   | 6,8               | 11,3   | 7,3               |
| C1-MÖ      | 8,0   | 7,9               | 9,0   | 7,5               | 11,6   | 7,5               |
| D1-MÖ      | 8,0   | 7,3               | 8,2   | 6,6               | 12,3   | 7,1               |
| A1-MÖ-Ç    | 4,3   | 5,0               | 8,1   | 7,2               | 9,3    | 6,8               |
| C1-MÖ-Ç    | 1,2   | 3,1               | 4,1   | 5,8               | 10,7   | 7,8               |
| D1-MÖ-Ç    | 2,8   | 4,5               | 3,1   | 4,9               | 9,0    | 7,0               |

Bakteri kültürünün besi yeri ile çimento hamuru içine atılması çimento hamuru içine CaCO<sub>3</sub> miktarında bir artış sağlamamıştır. Bazı numunelerde (C1 ve D1) gözlemlenen belirgin artış CH'in karbonizasyonu dolayısıyla olduğu düşünülmektedir. Bu sonuç hücrelerin kullanım amacı ile uyusmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda bakterilerin karışımdan sonra en az yarısının canlı kaldığını ve endospor olarak yüksek alkali ortama dayanabildikleri belirlenmiştir (Z.B. Bundur, Bae, vd. 2017; Z.B. Bundur, Amiri, vd. 2017). Ancak, hücreler canlı olmalarına rağmen kür suyu ile sağlanan besilere ulaşabilmeleri yine tartışmalıdır. Bu sebeple hücrelerin ancak çatlak oluşuktan sonra oksijen ve besilerine ulaşabileceği ve biyomineralizasyona sağlayabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra bakterilerin biyomineralizasyon sağladıktan sonra canlı kalabilmeleri tartışmalıdır. Birçok hipoteze göre bakteriler CaCO<sub>3</sub> çekirdeklenmesini sağladıktan sonra ölmektedir. Biyomineralizasyonun çimento hamurunun içinde oluşmaması kendiliğinden iyileşme açısından olumlu bir etki sağlayacağı düşünülmektedir.

## 3.3 Bakteri kültürünün basınç ve eğilme dayanımına olan etkisi

Kendiliğinden iyileşmeyi sağlaması için çimento harcı içine katılan bakterilerin harcın performansına olan etkisinin belirlenmesi, geliştirilen katkının uygulanabilmesi için en önemli etkenlerden biridir. Bu amaçla Tablo 1'de belirtilen numune serileri için harçlar hazırlanmış ve basınç dayanımları Şekil 5'te özetlenmiştir.



**Şekil 5:** ÜMÖ besi yeri ve besi yerinde büyütülen bakteri kültürünün çimento harcının basınç dayanımına olan etkisi; MÖ: Maya özütü; A serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento; C serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento + SP; D serisi: su/ÜMÖ /Bak. Kültürü + Çimento + HSK. Su/ çimento ve solüsyon/çimento oranı 0,45 olarak kullanılmıştır Barlar 6 tekrardan elde edilen ortalamayı, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Basınç dayanımı testlerine göre su yerine ÜMÖ besi yerinin kullanılması (A1- MÖ) basınç dayanımındaki bu artışı değiştirmemiştir. Bu davranış C ve D serisi numunelerde de gözlemlenmiştir. Mikroorganizmaların çimento harcına eklenmesi basınç dayanımını olumsuz etkilememiştir ancak daha önceki çalışmalarında artırıcı bir etki gösterdiği belirlenmiş (Basaran Bundur, Kirisits, ve Ferron 2015) ve bu çimento hamuru içindeki CaCO<sub>3</sub> oranındaki artışla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada TGA sonuçlarına göre hücrelere çimento hamuru içinde biyomineralizasyon reaksiyonlarını tetiklememiştir. Dolayısı ile çimento harcı içine katılan bakterilerin basınç dayanımını arttırmamaları bununla açıklanabilir.

Her ne kadar, bakterilerin basınç dayanımına olumsuz bir etkisi yok dense de bu davranış HSK ve bakteri içeren numunelerde gözükmemiştir. Bu numunelerde basınç dayanımında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bunun bir olası açıklaması bu süre zarfında bakterilerin ölmesi ve bu hücrelerin zaman içinde tahrip olmasıdır. Tahrip olan hücrelerin yerini hava boşlukları almaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda HSK kullanımının bakterilerin canlılığını olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (Başaran Bundur, Amiri, vd. 2017). Ayrıca, bu hücreler canlı kalabilseler bile çoğunluğunun endospor oluşturduğu bilinmektedir (Başaran Bundur, Bae, vd. 2017). Endosporlar protein içerikli olup, zamanla yüksek alkali ortamda parçalanıp yerine hava boşlukları oluşmaktadır (Erşan, De Belie, ve Boon 2015). Bu sebeple besi yeri ve özellikle bakteri kültürü içeren harçların basınç dayanımlarında uzun vadede düşüş gözlenmesi mümkündür. Bu problem uygulamanın yapısal elemanlarda kullanılmasında ileri aşamalarda sorun yarabilmektedir. Bu nedenle bu uygulamanın şu anki bulgular ile yapısal olmayan harçlarda kullanılması daha uygundur.

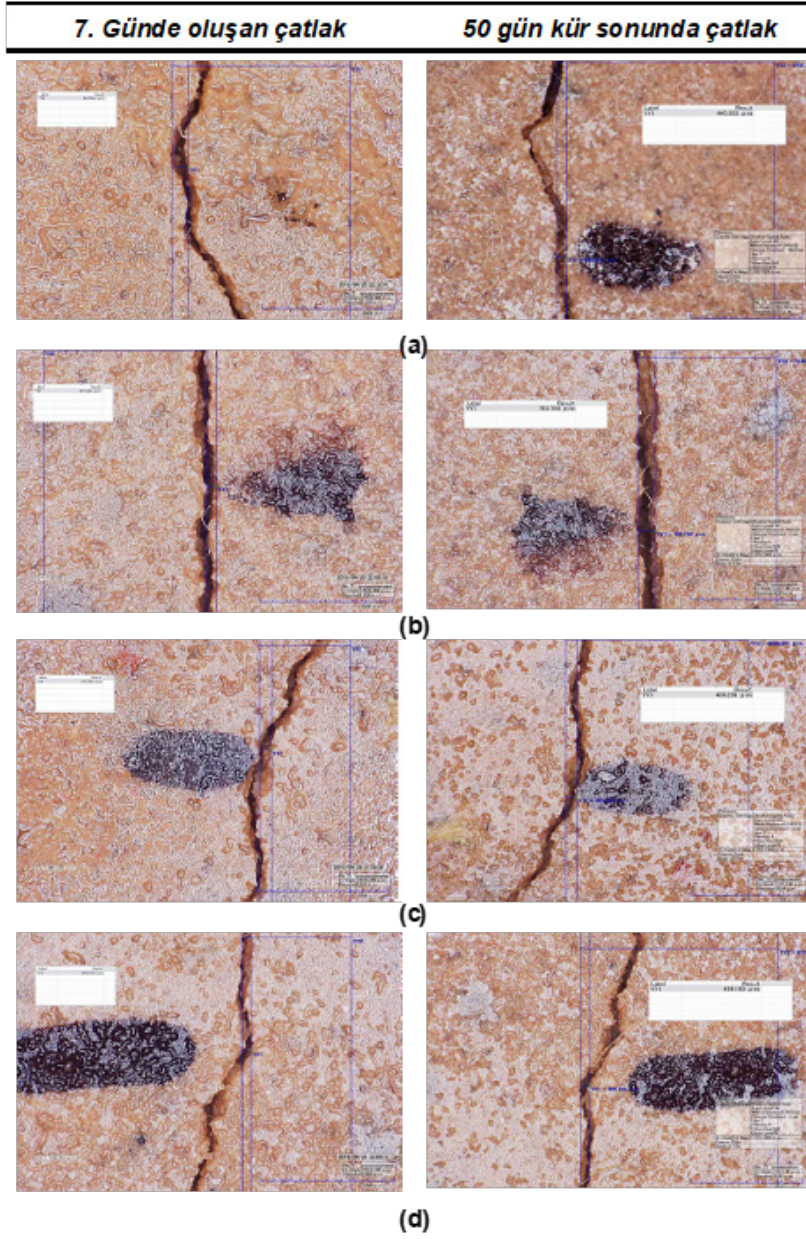
### **3.4 Biyomineralizasyon ile kendiliğinden iyileşmenin sağlanması**

Bu çalışmada mikroorganizmaları kullanarak çimento esaslı malzemede kendiliğinden iyileşmenin gerçekleşmesini amaçlamaktadır. Bu nedenle projenin en önemli adımı yukarıda belirtilen bakteri kültürü kullanımının harç yüzeyinde eğilme gerilmesi altında oluşan çatlakları kapatabilmesidir. Tablo 3 ve Tablo 4 çimento harçlarında eğilme dayanımı ile oluşan çatlakların kür öncesi ve sonrası çekilen optik mikroskop görüntülerini içermektedir.

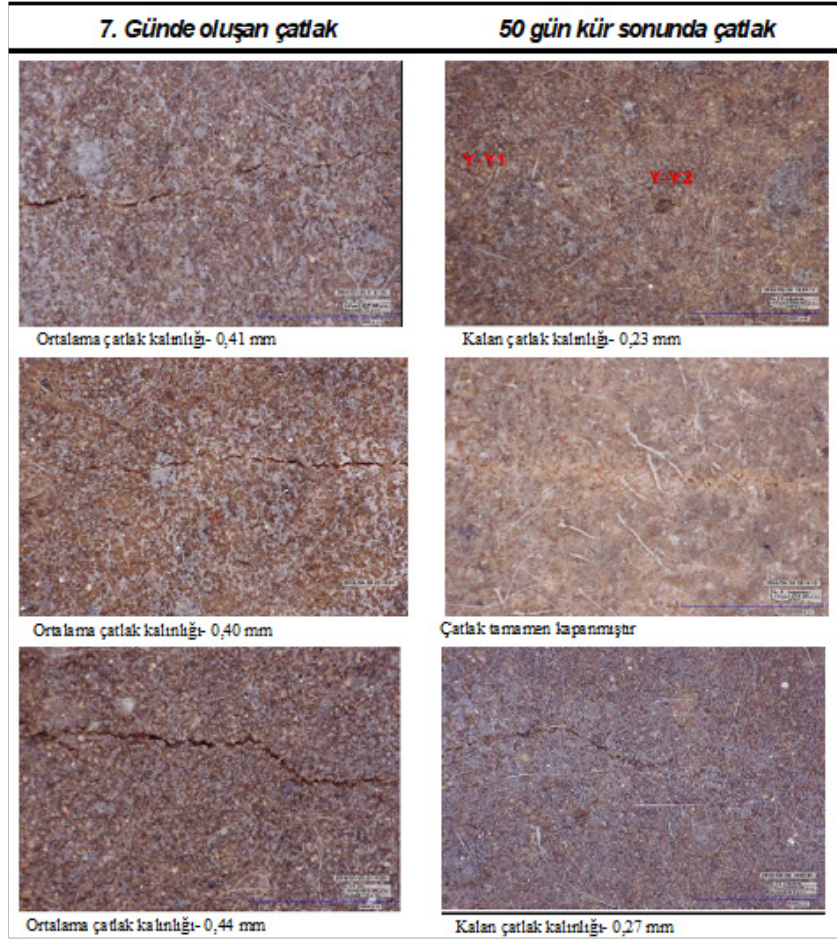
Beklenildiği üzere, bakteri içermeyen kontrol numunelerinde çatlaklarda çok az miktarda kristal oluştuğu ve çatlakların onarılmadığı gözlemlenmiştir. Bu numunelerde çatlak içinde çöken kristaller, çimento harçlarının su veya besi yerlerinde tutulmasından dolayı oluşan CH olduğu düşünülmektedir. Çimento harçlarına bakteri kültürünün eklenmesi sulu besi yerinin cinsine bakılmaksızın çatlak onarımını sağlamıştır. Çatlaklarda %80 oranında dolma gözlenirken, az da olsa kalan onarılamamış çatlakların genişliğinin azaldığı belirlenmiştir.



**Tablo 3:** Kontrol serileri için 7. Günde oluşan çatlaklar ve 50 gün kür sonrasında çatlakları durumu; MÖ: Maya özütü; (a) Kontrol: Su + Çimento; (b) ÜMÖ + Çimento (c) ÜMÖ + Çimento + SP ; (d) ÜMÖ + Çimento + HSK. Su/ çimento ve solüsyon/çimento oranı 0.45 olarak kullanılmıştır. Optik resimler 3'erli numunelerden temsili seçilmiştir. Çatlak boyu 0.3-0.5 mm arası; Ölçek: 1/5000µm. Numuneler sulu besi yerinde kür altında tutulmuştur.



**Tablo 4:** Bakteri içeren numuneler için 7. Günde oluşan çatlaklar ve 50 gün kür sonrasında çatlakları durumu; MÖ: Maya özütü; (a) Bakteri kültürü + Çimento (b) Bakteri kültürü + Çimento + SP ; (d) ÜMÖ + Çimento + HSK. Su/ çimento ve solüsyon/çimento oranı 0.45 olarak kullanılmıştır. Optik resimler 3'erli numunelerden temsili seçilmiştir. Çatlak boyu 0.3-0.5 mm arası; Ölçek: 1/5000µm. Numuneler sulu besi yerinde kür altında tutulmuştur.



Hiçbir koruma kullanılan bakterilerin sayısı gerek çimento hamurunun sertleşmesinden dolayı oluşan gerilme gerek besi yetersizliğinden karışından sonra gün geçtikçe azalmaktadır (Basaran 2013). Bu nedenle belirli bir gün sonunda biyomineralizasyonu gerçekleştirecek kadar yeterli hücre kalmamaktadır. Bundur vd. (Başaran Bundur, Bea vd. 2017) yaptığı çalışmada çimento- esaslı malzemelerde biyomineralizasyonun gözlemlenmesi için 1 gram harçta hücre miktarının en az 105 hücre olması gerektiği bulunmuştur. Benzer şekilde, Wang (2013) ve Ersan vd. (2015) biyomineralizasyonun 1 gram harçta hücre sayısının en az 106 hücre olduğu zamanlarda gerçekleştiği belirtmiştir. Ancak CEM I 42.5 R kullanılarak hazırlanan bu harçlarda hücre sayısı ancak 7 gün sonunda  $2 \times 10^5$  hücre / g çimento harcı olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada çatlak onarımı için en önemli parametre hücre canlılığıdır. Bu nedenle bu araştırma ile basit bir şekilde hiçbir koruma kullanmadan çimento harcına atılan bakteriler ile ancak erken yaştaki çatlakların (örn: rötre çatlakları) onarılacağı sonucuna varılmıştır. Eğer daha geç yaşta çatlak onarımı planlanıyorsa ya spor kullanımı ya da koruma bariyerlerinin kullanımı düşünülmelidir.

İlginç bir şekilde süper akışkanlaştırıcı kullanımı hem ÜMÖ hem de ÜMMS besi yeri ile eklenen bakterilerin çatlakları görsel olarak daha iyi kapatmalarını sağlamıştır (C ve CB serileri). Bunun tam olarak nedeni bilinmemekle beraber benzer bir etki sulu besi yerinde elde edilen çökeltilerde de gözlemlenmiştir. Süper akışkanlaştırıcı kullanımı yüksek yoğunluk değeri ile kalsit çökmesini tetiklemiştir. Bu katkı malzemesinin yüzey aktif bir madde olması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu etkinin daha iyi açıklanabilmesi süper akışkanlaştırıcıların bakteri canlılığına ve biyomineralizasyon mekanizmasına olan etkisinin daha derin bir araştırma yapılması gerekmektedir.

Projede incelenen diğer bir katkı malzemesi de HSK'dır. Süperakışkanlaştırıcılara kıyasla çatlak kapanmasını özellikle ÜMÖ besiyeri ile kullanıldığında olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Çatlaklarda görsel olarak boşluklu bir kapanma olmuş, çatlak içinde çöken  $\text{CaCO}_3$  miktarının görsel olarak diğer serilerden daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bunun önemli bir nedeni kullanılan HSK'nın ÜMÖ besiyeri kullanılarak çimento harcı içine eklenen bakterilerin canlılığına olan etkisi olduğu düşünülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda HSK kullanımının ÜMÖ besiyeri ile çimento harcı içine katılan bakterilerin canlılık oranını düşürdüğü gözlemlenmiştir (Bundur vd. 2017). Araştırmacılar bunu HSK'nın çalışma mekanizması ile ilişkilendirmişlerdir. HSK kullanımı ile oluşan hava boşluklarının içine mikroorganizmaların kolayca yerleşebileceği ancak gerekli besiyerinin bu boşluklara girememesinden bakterilerin sayısının azaldığı belirlenmiştir.

#### **4. SONUÇLAR**

Bu çalışmada hiçbir koruma kullanılmadan büyütüldükleri sulu besiyeri ile çimento harcına katılan *S. pasteurii* hücreleri ile eğilme gerilmesi altında oluşan çatlakların kendi kendine iyileşmesini incelemiştir. Bu proje sonunda elde edilen veriler ile çatlak onarımı ve biyomineralizasyon mekanizması daha iyi anlaşılmış, pratikte uygulanması için daha belirgin bir yöntem elde edilmiştir. Bu proje sayesinde geliştirilen bu biyomineralizasyonun basit bir yöntem ile çatlak onarımı için kullanılabilmesi gösterilmiştir. Bakteri kültürünün çimento hamurunun içine katılması malzemenin mikro yapısını ve dayanımını etkilememiştir. Piyasada sıkça kullanılan süper akışkanlaştırıcı ve hava sürükleyici katkı (HSK) gibi kimyasal katkı malzemelerinin biyomineralizasyona bir etkisi olmamıştır. ÜMÖ besiyerinde büyütüldükten sonra çimento harcına katılan bakteriler erken yaşta (7.Gün) oluşan 0.3mm'lik çatlakların kendiliğinden iyileşmesini sağlamıştır. Çatlaklar gözle görülür şekilde kapanırken, çatlak içinde ürün/ $\text{CaCO}_3$  oluşumu belirlenmiştir. Süperakışkanlaştırıcıların biyomineralizasyon ve çatlak onarımı üzerine belirgin bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Yöntemin geliştirilmesi için bu etkinin daha derin bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Benzer şekilde HSK kullanımının olumsuz etkileri incelenmelidir. Bu yöntem ile çimento harçlarında sadece erken yaşta çatlak onarımı sağlanmıştır. Bu özellikle rötre çatlakları için etkili bir kullanım alanı olabilir. Geliştirilen yöntem ile rötre çatlaklarının azalması ya da onarılması üzerine olan etkileri incelenmelidir.

#### **TEŞEKKÜRLER**

Bu proje TÜBİTAK-3501 Kariyer Geliştirme Programı (114M308) kapsamında gerçekleştirilmiştir. Projede yapılan tüm masraflar TÜBİTAK tarafından karşılanmıştır. Ayrıca, optik resimlerin çekilmesindeki desteklerinden dolayı EVATEG araştırma merkezi ve Prof. Mehmet Arık'a teşekkür ederiz. BASF, Nuh Çimento ve KORDSA'ya malzeme destekleri için teşekkür ederiz.

#### **KAYNAKÇA**

Achal, Varenayam, Xiangliang Pan, and Nilüfer Özyurt. 2011. "Improved strength and durability of fly ash-amended concrete by microbial calcite precipitation." *Ecological Engineering* 37 (4). Elsevier B.V.: 554–59. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.11.009.

Amiri, Ali, and Zeynep Başaran Bundur. 2018. "Use of corn-steep liquor as an alternative carbon source for biomineralization in cement-based materials and its impact on performance." *Construction and Building Materials* 165: 655–62. doi:10.1016/j.conbuildmat.2018.01.070.

Basaran, Zeynep. 2013. "Biomaterialization in Cement Based Materials: Inoculation of Vegetative Cells." Ph.D. Dissertation. Faculty of Civil, Architecture and Environmental engineering, University of Texas at Austin, Austin, TX, U.S.A.

Bolobova, A V, and V I Kondrashchenko. 2000. "Use of Yeast Fermentation Waste as a Biomodifier of Concrete ( Review )." *Applied Biochemistry and Microbiology* 36 (3): 205–14.

Bundur, Z.B., S. Bae, M.J. Kirisits, and R.D. Ferron. 2017. "Biomaterialization in Self-Healing Cement-Based Materials: Investigating the Temporal Evolution of Microbial Metabolic State and Material Porosity." *Journal of Materials in Civil Engineering* 29 (8). doi:10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001838.

- Bundur, Z.B., M.J. Kirisits, and R.D. Ferron. 2015. "Biomineralized Cement-Based Materials: Impact of Inoculating Vegetative Bacterial Cells on Hydration and Strength." *Cement and Concrete Research* 67: 237–45. doi:10.1016/j.cemconres.2014.10.002.
- Bundur, Zeynep Başaran, Ali Amiri, Yusuf Çağatay Ersan, Nico Boon, and Nele De Belie. 2017. "Impact of air entraining admixtures on biogenic calcium carbonate precipitation and bacterial viability." *Cement and Concrete Research* 98 (January): 44–49. doi:10.1016/j.cemconres.2017.04.005.
- Erşan, Yusuf Çağatay, Nele de Belie, and Nico Boon. 2015. "Microbially induced CaCO<sub>3</sub> precipitation through denitrification: An optimization study in minimal nutrient environment." *Biochemical Engineering Journal* 101. Elsevier B.V.: 108–18. doi:10.1016/j.bej.2015.05.006.
- Mann, Stephan. 2001. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. New York: Oxford.
- Muynck, Willem De, Nele De Belie, and W Verstraete. 2010. "Microbial carbonate precipitation in construction materials : A review." *Ecological Engineering* 36: 118–36. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.02.006.
- Rodriguez-Navarro, Carlos, Fadwa Jroundi, Mara Schiro, Encarnación Ruiz-Agudo, and María Teresa González-Muñoz. 2012. "Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: Implications for Stone Conservation." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (11): 4017–29. doi:10.1128/AEM.07044-11.
- Sahmaran, Mustafa, Gurkan Yildirim, and Tahir K. Erdem. 2013. "Self-healing capability of cementitious composites incorporating different supplementary cementitious materials." *Cement and Concrete Composites* 35 (1). Elsevier Ltd: 89–101. doi:10.1016/j.cemconcomp.2012.08.013.
- Stocks-Fischer, Shannon, Johnna K Galinat, and Sookie S Bang. 1999. "Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>." *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1563–71.
- Tittelboom, Kim Van, and Nele De Belie. 2013. "Self-healing in cementitious materials—A Review." *Materials* 6 (May): 2182–2217. doi:10.3390/ma6062182.
- Wang, J.Y., D. Snoeck, S. Van Vlierberghe, W. Verstraete, and N. De Belie. 2014. "Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete." *Construction and Building Materials* 68 (October). Elsevier Ltd: 110–19. doi:10.1016/j.conbuildmat.2014.06.018.
- Wang, J.Y., H. Soens, W. Verstraete, and N. De Belie. 2014. "Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores." *Cement and Concrete Research* 56 (February). Elsevier Ltd: 139–52. doi:10.1016/j.cemconres.2013.11.009.
- Wang, Jianyun. 2013. "Self-healing concrete by means of immobilized carbonate precipitating bacteria." Ghent University, Belgium.
- Wang, Jianyun, Kim Van Tittelboom, Nele De Belie, and Willy Verstraete. 2012. "Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete." *Construction and Building Materials* 26 (1). Elsevier Ltd: 532–40. doi:10.1016/j.conbuildmat.2011.06.054.
- Wiktor, Virginie, and Henk M. Jonkers. 2011. "Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete." *Cement and Concrete Composites* 33: 763–70. doi:10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012.