





## Development of a 2-phase bio-additive for self-healing cement-based materials

Mustafa Mert Tezer<sup>1,2</sup> , Zeynep Başaran Bundur<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Department of Civil Engineering, Ozyegin University, Cekmekoy, Istanbul, 34794 , Turkey

<sup>2</sup>Ghent University, Faculty of Biological Engineering, Ghent, Belgium

### Highlights:

- Self-healing in cement-based mortars were obtained through biomineralization.
- The bacterial cells were immobilized on pumice and diatomaceous earth
- There was app. 40% reduction water absorption upon crack healing

### Keywords:

- Self-healing
- Biomineralization
- Calcite
- Diatomaceous Earth
- Pumice

### Article Info:

Research Article  
Received:20.03.2020  
Accepted: 01.01.2021

### DOI:

10.17341/gazimmfd.695637

### Acknowledgement:

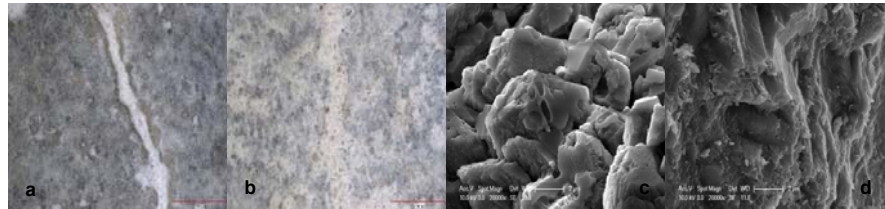
This research was conducted by financial assistance of the Scientific and Technical Research Council (TUBITAK) of Turkey Project: MAG-118M327.

### Correspondence:

Author: Zeynep B. Bundur  
e-mail:  
Zeynep.basaran@ozyegin.edu.tr  
phone: +90 216 564 9453

### Abstract

Recent research in the field of concrete materials suggested that it might be possible to develop a smart cement-based material that is capable of remediate cracks by triggering biogenic calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) precipitation. This paper summarizes a study undertaken to investigate the self-healing efficiency of *Sporosarcina pasteurii* (*S. pasteurii*) cells immobilized on both diatomaceous earth and pumice, to remediate flexural cracks on mortar in early ages (28 days after mixing).



**Figure A.** Visual analysis of the cracks in 28-day old specimens (a) Stereomicroscopy image of sample containing bacterial cells and DE (b) Stereomicroscopy image of sample containing bacterial cells and pumice (c) SEM image of sample containing bacterial cells and DE (d) SEM image of sample containing bacterial cells and pumice

**Purpose:** Throughout the literature, studies showed that among several alternatives such as diatomaceous earth (DE), metakaolin, zeolites and expanded clay could be suitable for protection of the bacteria based on their effects on compressive strength and setting, in particular DE was found to be effective in self-healing of cracks. A correct choice of the protection barrier and application methodology are of crucial for further development of self-healing concrete. This study presents a comparative study on the possible use of a mineral additive (DE) and a porous lightweight aggregate (pumice) as a protective barrier for bacterial cells.

### Theory and Methods:

To obtain a two-phase bio additive, half of the minerals were saturated with a nutrient medium consisting of urea, corn-steep liqueur (CSL) and calcium acetate and the cells with immobilized to the other half without nutrients. Screening of the healing process was done with stereomicroscopy imaging, ultrasonic pulse velocity (UPV) analysis and water absorption testing.

### Results:



Cracks with an average width of 0.4 mm in 28-day old mortar specimens were almost completely filled by bio-based precipitate depending on the curing regime. Cracks were sealed even in sample including relatively smaller dosage of nutrients and bacterial cells in presence of moisture. Moreover, the duration of crack healing was approximately 21 days, which was almost half of the duration to remediate the cracks when cells were directly incorporated to the mix.

### Conclusion:

With this approach, the cracks on mortar surface were sealed and the water absorption capacity of the so-called self-healed mortar decreased compared to its counterpart cracked mortar samples.



## Çimento-esaslı harçlarda kendiliğinden iyileşmenin sağlanması için 2 bileşenli biyolojik katkı maddesinin geliştirilmesi

Mustafa Mert Tezer<sup>1,2</sup> , Zeynep Başaran Bundur<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Özyeğin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, Çekmeköy, İstanbul

<sup>2</sup>Ghent Üniversitesi, Biyoloji Mühendisliği Fakültesi, Ghent, Belçika

### Ö N E Ç İ K A N L A R

- Çimento-esaslı harçlarda oluşan çatlaklar biyomineralizasyon ile onarılmıştır
- Bakteri hücreleri ponza ve diyatomlu toprak üzerine sabitlenmiştir
- Çatlak onarımı ile beraber numunelerin su emme kapasitesinde ortalama %40 azalma olmuştur

### Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi  
Geliş: 20.03.2020  
Kabul: 01.01.2021

### DOI:

10.17341/gazimmfd.695637

### Anahtar Kelimeler:

Kendiliğinden iyileşme,  
biyomineralizasyon,  
kalsit,  
çimento,  
harç

### ÖZ

Beton yapıların hizmet ömrünü etkileyen en önemli faktörlerden biri erken yaşta oluşan çatlaklardır. Son yıllarda yapılan araştırmalar kendiliğinden iyileşen çimento-esaslı malzemeler ile kılcal çatlakların onarılmasının mümkün olduğunu göstermiştir. Bu amaçla kullanılabilir en yenilikçi yöntemlerden biri biyomineralizasyondur. Bu reaksiyonda mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin sonucu ürün olarak kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) oluşur ve oluşan  $\text{CaCO}_3$  çökeltisinin çatlakları doldurması ile kendiliğinden iyileşme elde edilir. Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda farklı yöntemler ile harç içine katılan mikroorganizmaların (bakterilerin), beton içinde uzun süre canlı kalabildikleri, harç yüzeyinde oluşan mikro boyuttaki çatlakları onarabildiği ve geçirgenliğin azaltıldığı gözlemlenmiştir. Bu yöntemler çoğunlukla bakterilerin beton içine katılırken organik ya da sentetik kapsüller içine enjekte edilerek korunmasını içermektedir. Bu çalışmada harçlarda kendiliğinden iyileşmenin sağlanabilmesi için maliyeti düşük ve sürdürülebilir bir malzeme ile birleştirilip toz halinde bir biyolojik katkı malzemesi elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada çatlaklarda biyomineralizasyonun sağlanması için *Sporosarcina pasteurii* hücreleri diyatom ve ponza üzerine sabitlenmiştir. Numuneler, üretimden 28 gün sonra servo-hidrolik deplasman kontrollü bir cihaz kullanılarak çatlattılmıştır. Ardından numunelere su ve besi yeri olmak üzere 2 farklı kür uygulanmıştır. Bakteri-mineral birleşiminden olan biyolojik katkıyı içeren numunelerde, kür ortamı fark etmeksizin, 2 hafta içinde %80 oranında kapanma gözlemlenmiştir. Çatlakların onarılmasından sonra su emme kapasitelerinde belirgin bir azalma belirlenmiştir.

## Development of a 2-phase bio-additive for self-healing cement-based materials

### H I G H L I G H T S

- Self-healing in cement-based mortars were obtained through biomineralization
- The bacterial cells were immobilized on pumice and diatomaceous earth
- There was app. 40% reduction water absorption upon crack healing

### Article Info

Research Article  
Received:20.03.2020  
Accepted: 01.01.2021

### DOI:

10.17341/gazimmfd.695637

### Keywords:

Self-healing,  
biomineralization,  
calcite,  
cement,  
mortar

### ABSTRACT

Microcracks are one of the main reasons for a decrease in service life in concrete structures. Recent research in the field suggested that it might be possible to develop a smart cement-based material that is capable of remediate cracks by triggering calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) precipitation. Throughout the literature, studies showed that there could be various alternatives to incorporate the microorganisms (bacterial cells) where the cells could remain viable for a defined period and self-heal the cracks resultign with a decrease in permeability. These methods often involve encapsulation of bacterial cells in organic or synthetic capsules before incorporation to the mix. This study aims to develop a sustainable and cost-efficient bio-based additive to trigger self-healing in cement-based composites. To achieve this goal, *Sporosarcina pasteurii* cells were immobilized on diatomaceous earth (DE) and pumice. At the end of the 28th day of mixing, the samples were cracked using a servo hydraulic displacement-controlled device. Two different curing regimes, water and nutrient medium, were applied after crack formation. Self-healing was achieved in samples containing bio-based additive regardless of the curing regime. In average, 80% crack sealing was attained after 2 weeks of curing. There was a significant decrease in water absorption capacity upon crack healing.

\*Sorumlu Yazar/Yazarlar / Corresponding Author/Authors : mert.tezer@ozu.edu.tr, \*zeynep.basaran@ozyegin.edu.tr /

Tel: +90 216 564 9453

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Beton yapılar da çatlak oluşumu dayanıklılığı olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Beton yüzeyinde özellikle erken yaşta oluşan çatlaklar betonun geçirgenliğini artırır, dayanımını düşürür, dolayısı ile hizmet ömrünü kısaltır. Betonda çatlak onarımı için kullanılan klasik yöntemlerde (örn: epoksi enjeksiyonu), onarım malzemesi çatlak yüzeyine uygulanır ve geniş çatlakların içine nüfuz edebilmektedir. Bununla beraber mikro çatlaklarda bu malzemelerin uygulanması ve çatlakların derinliklerine ulaşabilmesi zordur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, biyomineralizasyon ile çimento-esaslı malzemelerde erken yaşta (28 günden önce) oluşan mikro çatlakların kendiliğinden iyileşme özelliği ile onarımının mümkün olduğu görülmüştür [1, 2]. Biyomineralizasyon, mikroorganizmaların üre hidrolizi, demir indirgenmesi, fotosentez, denitifikasyon gibi metabolik aktivitelerinin mineral oluşumunu tetiklediği bir biyokimyasal reaksiyonlar zinciridir [3]. Bu reaksiyonlarla elde edilecek minerallerin listesi uzun olmasına rağmen çimento esaslı malzemelerde sıkça kullanılan üre hidrolizi sonrasında elde edilen ana ürün kalsiyum karbonattır ( $\text{CaCO}_3$ ). Üreaz enzimine sahip ve negatif yüklü bakteriler, ortamda bulunan üreyi, karbonat ve amonyak olarak hidrolize edebilmektedirler. Bakteriler, negatif yüklü yüzeyleri sayesinde ortamdaki kalsiyum iyonlarını elektrostatik olarak çekmekte ve kalsiyum karbonat çökeltisinin yüzeyinde çekerdeklemlenmesini sağlamaktadır [4, 5].

Çimento-esaslı malzemelerin içine katılan bakteriler ile kendiliğinden iyileşme yeteneği sağlanırken ele alınması gereken önemli bir nokta mikroorganizmaların çimento hamuru içerisinde canlı kalabilmesinin sağlanmasıdır. Çimentonun alkali yapısı ve devam eden hidrasyon 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. Bu amaçla Jonkers vd. [6] çalışmalarında canlı bakteri hücreleri yerine endosporları çimento harcı karışım suyuna katmışlardır. Bu yöntem ile çimento harcı içine katılan endosporlar 4 aya yakın canlı kalabilmişlerdir. Mikroorganizmaların çimento içinde canlı kalma süresini uzatmak amacıyla literatürde kullanılan bir başka yöntem ise, hücrelerin sentetik malzemelerle kapsül içine alınmasıdır. Wiktor ve Jonkers [1] Delft Üniversitesi'nde geliştirdikleri sistem ile endosporları (kalsiyum laktat ile beraber) kendilerinin ürettiği genleştirilmiş hafif kil agregaların içine enjekte etmişlerdir. Çatlak oluşumunda yüzeyle beraber kırılan agregaların içindeki karışım sayesinde yüzey çatlakları kalsiyum karbonat çökeltisi ile tamamen kapatılmış ve malzemenin geçirgenliği azaltılmıştır. Wang vd. [7] yaptıkları çalışmada bakterileri sırasıyla poliüretan ve silika jel kapsüllerin içine yerleştirip, iki farklı sistemin verimliliğini karşılaştırmışlardır. Silika jel kapsüllerin bakterilerin metabolik aktivitelerini daha az etkiledikleri ve üre ayrışımının daha fazla olduğu

gözlemlenmiştir [7]. Wang vd. (2014a) diğer bir çalışmalarında ise endosporları mikro kapsüller içerisine yerleştirip; üre, maya özütü ve kalsiyum nitrat ( $\text{CaNO}_3$ ) ile beraber çimento harcının içine karıştırmışlardır. Bu çalışma ile 0,97 mm genişliğindeki çatlaklar onarılmış ve geçirgenlik azaltılmıştır. Yine Wang vd. [8] bakterileri hidrojel içerisine yerleştirip, harç içine karıştırmışlardır. Bu yöntem ile 28 günlük numunelerde 0,5 mm kadar olan çatlaklar kapatılmıştır. Yapılan araştırmalarda en iyi performans inorganik genleştirilmiş kil agrega ve hidrojel kullanımı ile elde edilmiştir. Ancak, bu yöntemler uygulandığında harcın basınç dayanımında azalma gözlemlenmiş olup maliyetinin yüksek olması ve özel işçilik gerektirmesi nedeniyle piyasa şartlarına uyum gösterememiştir.

Ancak yapılan çalışmalarda doğru hücre seçimi ve karışım yöntemi ile bakterilerin uzun süre harç içinde canlı kalabildikleri ve erken yaşta oluşan çatlakları onarabildikleri gözlemlenmiştir. Bundur vd. [9] büyütüldükleri besiyeri ile beraber çimento harcına eklenen *Sporosarcina pasteurii* hücrelerinin, üretimden 1 sene sonra bile canlı kalabildiklerini gözlemiştir. Ayrıca bu yöntem ile bakterilerin çimento hamuru içinde  $\text{CaCO}_3$  üretebildikleri [10] ve basınç altında oluşan iç mikro çatlakların onarılabilirdiği belirlenmiştir [11]. Benzer bir yöntem Achal vd. [12] tarafından kullanılmıştır ve besiyeri ile katılan bakterilerin, uçucu kül ile hazırlanmış çimento harcı ve beton içinde 28 günlük testler sırasında canlı oldukları belirtilmiştir. Ancak bu yöntemlerde de çimento hamuru karışımında bakteriler için gerekli besiyerinin çimento hamurunun priz süresini 13 saat kadar uzattığı belirlenmiştir (Bundur vd. 2015). Bunun sebebi olarak besiyeri içerisinde kullanılan maya özütü h5 (MÖ) gösterilmiştir. Maya özütünün priz süresini uzattığı ve de bakterilerin de çimento hamuruna katılması ile bu sürenin daha da uzadığı belirlenmiştir [10]. Ardından, MÖ kullanımına alternatif olarak besiyerinde mısır maserasyon sıvısı (MMS) kullanılmasının *S. pasteurii* suşunun büyümesine olumsuz bir etkisi olmadığı, priz süresini kontrol numunelerine oranla 2 saat uzattığı ve harç basınç dayanımını arttırdığı bulunmuştur [13]. Vejetatif *S. pasteurii* hücrelerinin büyütüldükleri üre-MMS besiyeri ve kalsiyum nitrat ile beraber çimento harcı içine katıldıklarında 7 günlük numunelerde eğilme gerilimi altından oluşturulan 0,2 mm'den küçük çatlakları 1 ay içinde onarabildikleri ve su emme kapasitesini azalttığı belirlenmiştir [14]. Bu yöntem ile çatlakların onarımı gerçekleştirilmiş olmasına rağmen bakterilerin büyütüldükleri sulu besiyeri ile harç içine katılması ilerisi için büyük hacimli harç üretimini kısıtlamaktadır. Bunun yanı sıra, her ne kadar bakterilerin harç içinde 1 yıla kadar canlı kalabildikleri bilinse de [9], çatlak onarımı için belirli bir konsantrasyonun üzerinde bakteri gerekmektedir [15]. Bu nedenle hiçbir koruma olmadan eklenen vejetatif hücreler ile 7. Günden sonra onarım sağlanmamıştır. Literatürde daha önce denenen inorganik kapsüllerin maliyet ve işçilik gereksinimleri sebebiyle pratikte kullanımı yine zorlaştırmaktadır. Bunun yerine ülkemizde bol rezervi olan, boşluklu ve harç içinde

kullanımı uygun mineral bulunmaktadır. Literatürde kısıtlı da olsa bazı doğal mineraller bakteri koruması için kullanılmıştır. Ersan vd. [16] çalışmalarında zeolit, diyatumlu toprak, hava sürükleyici katkı, taneli aktif karbon ve geliştirilmiş kil gibi birden çok inorganik ve organik malzemeyi bakterileri korumak için kullanmıştır. Ancak araştırmacılar bu malzemelerin sadece priz süresine ve basınç dayanımına olan etkilerini incelemek ile yetinmiş, kendiliğinden iyileşmeye olan etkilerini belirlememişlerdir. Wang vd. [17] ince taneli diyatumlu toprak, besiyeri ile bakterilerden oluşan bir karışım hazırlayıp harç içine eklemiştir. Bu yöntem ile çatlaklar 40 gün içinde onarılmış ve kapatılan çatlaklar ile su emme kapasitesi azaltılmıştır. Son olarak Alazhari vd. [18], geliştirilmiş perlit agregaları bakterileri korumak için kullanmışlardır. Araştırmacılar kullandıkları geliştirilmiş perlit agregaların belirli bir kısmına endosporları sabitleyen, kalan kısmında üre ve kalsiyum asetatın oluşan solüsyonu yedirmişler ve agregaları sodyum silikat ile kaplamışlardır. Oluşturdukları bu sistem ile, çatlak onarımı sağlanmış, ancak hiçbir kürlenme uygulanmayan numunelerde ancak 165 gün sonunda onarım gerçekleşebilmiştir. Bu çalışmada çimento-esaslı malzemelerde oluşan çatlaklarda kısa sürede kendiliğinden iyileşmenin sağlanması için doğal mineraller ve bakterilerden oluşan 2- birleşimli biyolojik katkı geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Çalışma kapsamında bakteriler ülkemizde bolca rezervi bulunan diyatumlu toprak ve ponza üzerine basit bir yöntem ile sabitlenmiştir. Karışımdan 28 gün sonra eğilme yüklemesi ile oluşturulan çatlaklarda biyomineralizasyonun etkileri mikroskopik ve UPV analizleri takip edilmiştir. Çatlak onarımının malzemenin performansına olan etkisi su emme kapasitesi belirlenerek ölçülmüştür.

## 2. MALZEME VE DENEYSEL METOT (MATERIALS AND EXPERIMENTAL METHODS)

### 2.1. Bakterilerin besi yerinde çoğaltılması (Microorganism growth)

Alman mikroorganizma ve hücre kültürleri koleksiyonundan (DSMZ) 33 nolu suşu olan *Sporosarcina pasteurii* (*S. pasteurii*) steril olarak hazırlanan 0,13 M Tris Bazı, 20 g/L üre, 10 g/L mısır maserasyon sıvısı (MMS) ve 10 g/L sodyum asetat içeren besiyerinde (pH 9), 30°C'de büyütülmüştür. Hücre konsantrasyonu Şekil 1'deki grafiğe göre mililitrede  $10^9$  koloni oluşturan birim (KOB /mL) bakteri kültürü inkübasyondan alınmıştır (ortalama 36 saat sonra). Ardından, hücreler 6300g'de 15 dakika santrifüj edilerek büyütüldükleri besi yerlerinde ayrıştırılmış ve sterilize edilmiş fosfat çözeltisi (PBS) ile 3 kere yıkanmıştır. Hücreler kullanıma kadar 4°C de saklanmıştır.

### 2.2. Koruma için kullanılan minerallerin karakterizasyonu (Characterization of immobilization barriers)

Diyatom tanecik boyut dağılımı ıslak dispersiyon ünitesine sahip bir partikül büyüklüğü analiz cihazı (Malvern, Hydro MU 2000 Worcestershire, UK) ile belirlenmiştir. Diyatomonun yanı sıra deneyler sırasında kullanılan CEM I 42.5 R

çimentosunun da partikül boyutu analizi yapılmıştır. Ponza taşının ise tanecik dağılımı elek analizi ile belirlenmiştir.

Diyatom ve ponza taşının su emme kapasitesi asıl olarak ASTM C-128 standardı örnek alınarak belirlenmiştir. Ancak diyatomonun su emme kapasitesinin belirlenmesi için bu standart kısmen değiştirilmiştir. Mineral ve agregada su emme kapasitesini belirlemek için ilk olarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Test için 50 gramlık numuneler 175 g su içine konularak 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından, ortalama partikül boyutuna (20 µm) uygun bir filtre kâğıdı kullanılarak süzülmesi ve numuneler görsel olarak kuruduğu belirlenene kadar oda sıcaklığında tutulmuştur (ortalama 6 saat kadar). Benzer bir yaklaşım ile ponza taşının emme kapasitesi belirlenmiştir. Öncelikle ponza taşı tane boyu 300 µm ve 2,5 mm arasında olacak şekilde ayrıştırılmıştır. Ardından, 200g numune 500g su içine konulmuş ve 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra, fazla su uygun elekten (175µm) geçirilerek ayrıştırılmış ve numuneler görsel olarak kuruduğu belirlenene kadar oda sıcaklığında tutulmuştur. Ardından, mineral ve agregada numuneler 24 saat boyunca 110°C fırında tutulduktan sonraki ağırlık kaybı belirlenmiş, bu su emme kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir. Tablo 1 farklı diyatomon, ponza taşı ve CEM I 42.5 R çimentosu için karakterizasyonu değerlerini özetlemektedir.

Ayrıca kullanılacak minerallerin mikroyapısının incelenmesi için çevresel taramalı elektron mikroskopu (FEI-Philips XL30 Environmental Scanning Electron Microscope with Field Emission Gun (ESEM)) analizi yapılmıştır. Şekil 2 kuru mineral ve ponza taşının görüntülerini göstermektedir.

### 2.3. Hücrelerin minerallere sabitlenmesi (Immobilization of cells on minerals)

Çimento-esaslı harçlarda kendiliğinden iyileşmenin sağlanabilmesi için canlı bakteri hücreleri 2 farklı mineral üzerine 2 farklı yöntem kullanılarak sabitlenmiştir. Sabitleme işleminin adımları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

(1) Hücreler üre-MMS besi yerinde ~40 saat büyütüldükten sonra 6300g'de 15 dakika santrifüj edilerek besi yerinden ayrılmış ve sterilize edilmiş fosfat çözeltisi (PBS) ile 3 kere yıkanmıştır. Eğer, kullanımdan önce hücreler 4°C'de (ya da derin dondurucuda) saklanmış ise, öncelikle oda sıcaklığına getirilmişlerdir.

(2) İlk sabitleme işlemi olarak hücreler besi yeri olmadan mineral ya da agregalara sabitlenmiştir. İnce tanecikli yapısı nedeni ile 22,5 gram (kullanılacak çimento miktarının %5'i kadar) diyatomon kullanılırken. Tane boyutunun büyük olması nedeni ile 67,5 gram (kullanılacak kum miktarının %5'i kadar) ponza taşı kullanılmıştır.

a. İki gram *S. pasteurii* hücreleri 90 mL steril PBS ve 22,5 gram diyatomon içeren solüsyona eklenmiştir. Elde edilen karışım 30°C'de 24 saat 170 rpm'de çalkalanmıştır.

b. Diyatomonun 3 katı kadar ponza kullanıldığından ponzaya ile hazırlanan numunelerde hücre miktarı 6 grama çıkarılmıştır. Bu işlemde 6 gram *S. pasteurii* hücreleri 90 mL steril PBS ve 67,5 gram ponza taşı içeren solüsyona

eklenmiştir. Elde edilen karışım 30°C’de 24 saat 170 rpm’de çalkalanmıştır.

(3) İkinci sabitleme işleminde minerallerin yarısı PBS+ hücre içeren su ile doyurulurken, diğer yarısı hücre içermeyen besi yeri ile doyurulmuştur.

a. Diyatom ile hazırlanan karışımlarda 1 gram *S. pasteurii* hücresi 45 mL steril PBS ve 11,25 gram diyatom içeren solüsyona eklenmiştir. Benzer şekilde geri kalan 11,25 gram mineral 45 mL üre- MMS-KA besi yeri içine eklenmiş ve 30°C’de 24 saat 170 rpm’de çalkalanmıştır.

b. Ponza ile hazırlanan karışımlarda 3 gram *S. pasteurii* hücresi 45 mL steril PBS ve 33,75 gram ponza içeren solüsyona eklenmiştir. Benzer şekilde geri kalan 33,75 gram agrega 45 mL üre- MMS-KA besi yeri içine eklenmiş ve 30°C’de 24 saat 170 rpm’de çalkalanmıştır.

(4) Her iki yöntem ile de elde edilen karışımlar 8 saat 40°C’de kurutulmuş ve üzerlerinde kalan fazla su (sıvı) miktarı hesaplanarak karışım suyundan çıkarılmıştır. Besi yerinde üre-MMS- KA miktarı sırasıyla 20 g/L, 15 g/L ve 10g/L olarak kullanılmıştır.

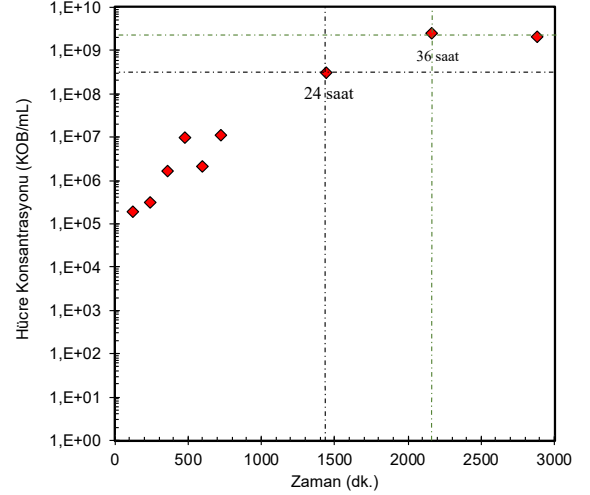
Şekil 3. sabitleme işleminden sonra minerallerden elde edilen ESEM görüntülerini içermektedir.

#### 2.4. Çimento harcı numunelerin hazırlanması ve çatlak oluşturulması

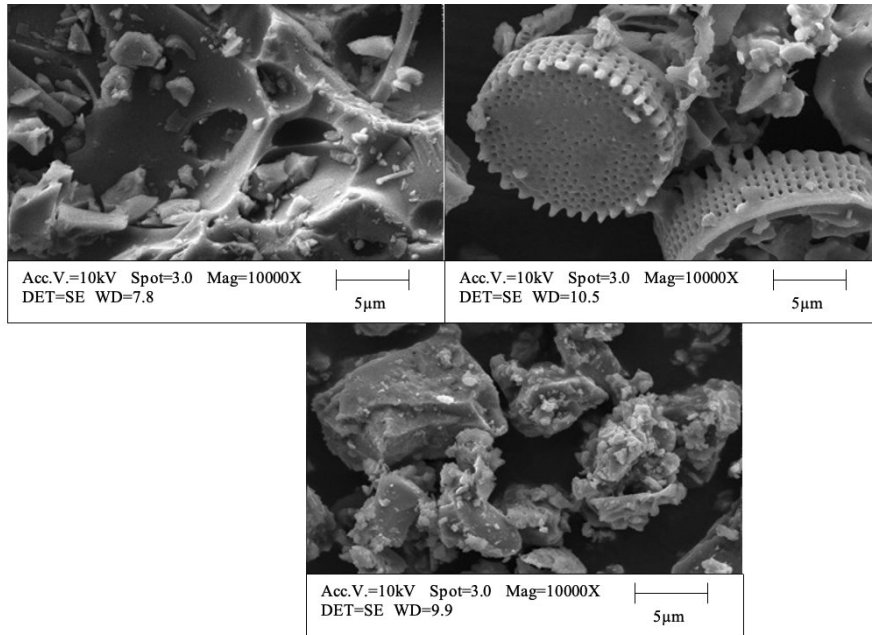
(Preparation of mortar samples and crack formation)

Çimento-esaslı malzemelerde çatlak onarımının belirlenmesi için CEM I 42.5R çimento ile ASTM C 305 standardına göre hazırlanan çimento harcı numuneler 40 x 40 x 160 mm boyutunda kalıplara dökülmüştür. Karışımlarda su/çimento oranı 0,45 olarak kullanılırken, karışımlarda EN 196 normlarına uygun standart kum kullanılmıştır. Çatlak

oluşturma sırasında numunelerin eğilme dayanımını güçlendirebilmek için 12 mm boyutunda sentetik fiber kullanılmıştır (%1,3 w/w çimento). Bu fiber oranı istenilen çatlak aralığının kontrolünün sağlanması daha önce yapılan çalışmalarımızda belirlenmiştir [19]. Su azaltıcı miktarı belirlenirken aynı numune grupları içinde %20 oranında sapma ile yayılma elde edilmesi hedeflenmiştir. Karışımın ardından numuneler yükleme gününe kadar nemli odada tutulmuştur. Tablo 2 çalışmada kullanılan numunelerin karışım oranlarını özetlemektedir.

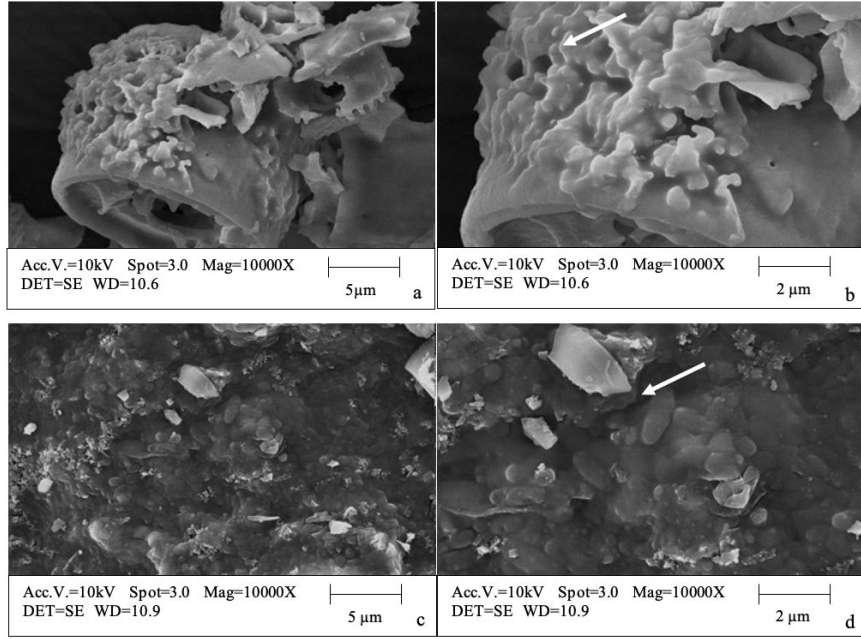


Şekil 1. *S. pasteurii* suşunun üre- MMS içeren sulu besi yerinde hücre sayısı- zaman grafiği. KOB: Koloni oluşturan birim (Growth profile for *S. pasteurii* averaged from viable plate counts (cell concentration vs. time) in urea UCSL media)



Şekil 2. Kullanılan minerallerin ve çimentonun ESEM görüntüleri (a) Ponza (b) Diyatom (c) CEM I 42.5R Çimento.

Ölçek 5 µm (ESEM images of the minerals and cement used in the study (a) Pumice (b) Diatomaceous earth (c) Cement. Scale: 5µm)



**Şekil 3.** Sabitleme işleminden sonra elde edilen biyolojik katkıının ESEM görüntüleri. Görüntüler için kullanılan mineraller (11,25 diyatom ya da 33,75 gram ponza) belirtilen bakteri miktarını içeren PBS içinde tutulmuştur; (a)Diyatom (b) ponza ile hazırlanan biyolojik katkı. Bakteri hücreleri beyaz ok ile belirtilmiştir. Ölçek 5 µm (ESEM images of biological additive after immobilization process. The minerals (11,25 g of diatomaceous earth or 33,75 g of pumice) were submerged in PBS solution containing bacterial cells. Biological additive containing (a) diatomaceous earth (b) pumice. White arrows indicate the bacterial cells)

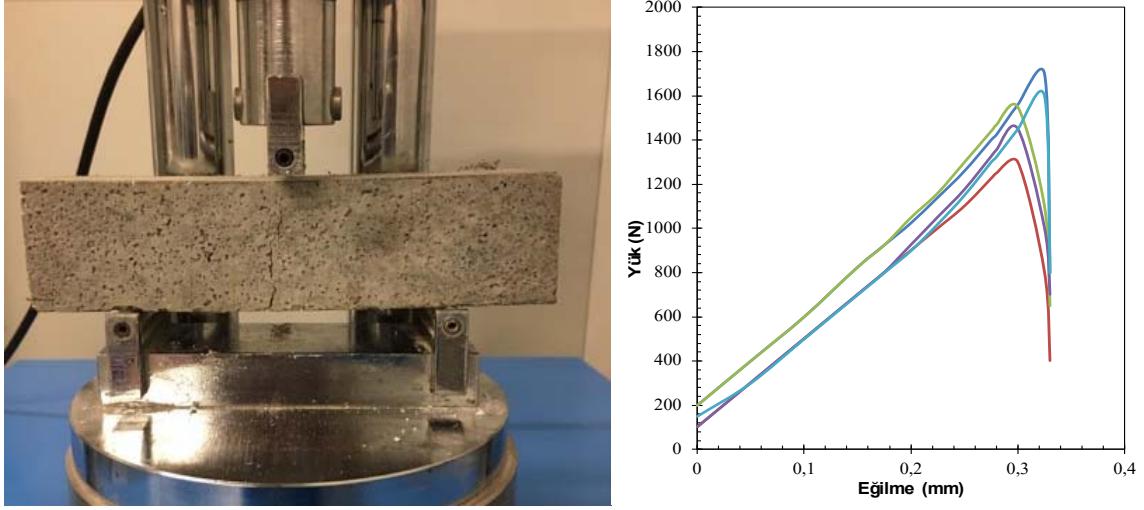
**Tablo 2.** Kendiliğinden iyileşmenin incelenmesi için hazırlanan numuneler. DE: Diyato Pum: Ponza Taşı; PBS: Fosfat Çözeltisi; SP: Süperakışkanlaştırıcı. C: Sadece mineral; Bac: Mineral + PBS + Bakteri; 2P: Mineral + Bakteri + PBS ve Mineral+ Besi yeri içeren iki birleşenli biyolojik katkı içeren numuneleri göstermektedir. (Samples prepared for self-healing evaluation. DE: Diatomaceous earth; PUM: Pumice; PBS: Phosphate buffer solution; SP: Superplasticizer; C: Only includes minerals; B: All mineral content was saturated with bacterial cells and PBS; 2P: Bio additive containing bacterial cells immobilized to minerals with nutrients.)

Numune	Çimento (g)	Kum (g)	Bakteri miktarı (g)	Mineral Miktarı (g)	PBS (g)	Besi yeri(g)	SP (g)	Yayımla %
Kontrol	450 g	1350 g	-	-	-	-	3	21 ± 0,4
DE-C	450 g	1350 g	-	22,5g	-	-	4,5	30 ± 0,4
Pum-C	450 g	1282,5g	-	67,5g	-	-	3	25 ± 0,4
DE-Bac	450 g	1350 g	2g	22,5g	90g	-	3	36 ± 0,4
Pum-Bac	450 g	1282,5g	6g	67,5g	90g	-	3	25 ± 0,4
DE-2P	450 g	1350 g	1g	22,5g	45g	45g	3	34 ± 0,4
Pum-2P	450 g	1282,5g	3g	67,5g	45g	45g	3	32 ± 0,4

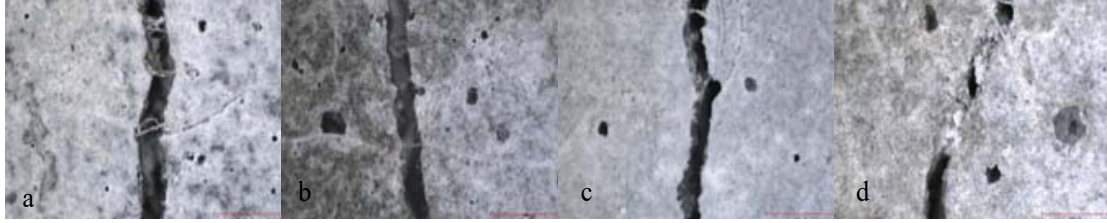
Karışımlarda su/çimento (s/ç) oranı olarak 0,45 kullanılmıştır. Çimento-kum oranı 1:3'e kullanılmıştır. Karışıma diyatom ile sağlanan biyolojik katkı çimento miktarının %5'i olarak eklenmiştir. Ponza taşı ile hazırlanan biyolojik katkı kullanımında ise kum miktarının %5'i katkı ile değiştirilmiştir.

Karşımdan 28 gün sonra çimento harcı kırımler servo-hidrolik deplasman kontrollü bir cihaz kullanılarak 3 nokta eğilme

testiyle çatlatılmıştır. Test sırasında yükleme hızı 0,005 mm/sn olarak kaydedilmiştir. Numunelerde ortalama çatlak genişliği 0,36 ± 0,05 mm olarak belirlenmiştir. Her set numuneye 2 farklı kür yöntemi uygulanmıştır. Deneysel çalışmalarda her seri numune için (örneğin: DE-2P) toplamda 9 kırımler hazırlanmıştır. Bu kırımlerden 3'ü çatlatılmış ancak sadece oda sıcaklığında tutularak ortalama 40. günde kontrol numunesi olarak ölçümleri alınmıştır. Şekil 4, eğilme deneyi ve yük-deplasman grafiğini göstermektedir.



Şekil 4. Eğilme deneyi ve yük-deplasman grafiği (Flexural strength test set-up and load-displacement curve)



Şekil 5. Bakteri içermeyen numunelerde 28 günde oluşturulan çatlaklarda kürlenme sonrası kapanma (0,3- 0,4 µm arası) (a) DE-C numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası (b) DE-C numunesinde 28 gün besi yeri kürlenmesi sonrası (c) PUM-C numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası ve (d) PUM-C numunesinde 28 gün besi yeri kürlenmesi sonrası çatlak onarımı. (Crack healing (between 0.3 to 0.4 µm) in 28-day old control specimens without any bacterial cells (a) DE-C sample after 28 days of water curing (b) DE-C sample after 28 days of nutrient medium curing (c) PUM-C sample after 28 days of water curing and (d) PUM-C sample after 28 days of nutrient medium curing)

#### 2.4. Çatlak oluşumu sonrası numunelerin kürlenmesi ve kendiliğinden iyileşmenin belirlenmesi

(Curing condition and evaluation of crack healing)

Belirtilen günlerde çatlatılan numunelerin yarısına su ile kürlenme uygulanırken, diğer yarısına ise üre-MMS-KA içeren solüsyon ile kürlenme uygulanmıştır. Kür uygulamasında numuneler 48 saat su/solüsyon içine batırılırken, 48 saat oda sıcaklığında tutulmuştur. Toplamda 4 gün süren bu döngü 7 kere tekrarlanmış ve çatlak sonrası kür süresi 28 gün içinde tamamlanmıştır. Çatlaklardaki fiziksel kapanma periyodik olarak stereo mikroskop analizi ve ultrason dalga hızı (UPV) testi ile takip edilmiştir.

Stereo mikroskop (Nikon SMZ745T, Japonya) ile elde edilen resimler Clemex yazılımı incelendikten sonra, çatlaklarda % olarak kapanma miktarı belirlenmesi için ileri analizler yapılmıştır. Çatlaklarda kapanma oranının belirlenmesi için etmek için Java tabanlı görüntü işleme programı olan "ImageJ" kullanılmıştır. İlk olarak mikroskoptan alınan 50X fotoğrafların ölçekleri pixel/µm düzenlenmiştir. Ölçeği ayarlanan fotoğraflara çatlak daha belirgin hale getirmek amacıyla, özellikle ilk çatlak ölçümü olan görüntülerde, "Threshold" filtresinden yararlanılmıştır.

Ölçüm almaya uygun hale getirilen fotoğraflardan ilk çatlak t=0 olmak üzere, çatlak oluşumundan 7., 14., 21. ve 28. Gün sonra çatlak boyunca 10'ar adet ölçüm alınmıştır. Çatlak kapanmasını daha iyi gözlemlemek amacıyla farklı günlerde alınan ölçümlerin aynı noktalardan alınmasına özen gösterilmiştir. Çatlak kapanma yüzdesini hesaplamak için aşağıdaki Eş. 1'deki formülden yararlanılmıştır.

$$\% \text{ Çatlak Kapanma} = \frac{\sum_{n=1}^{10} w_i - \sum_{n=1}^{10} w_{7.,14.,21.,28.}}{\sum_{n=1}^{10} w_i} \quad (1)$$

w<sub>i</sub>: ilk çatlak ölçümü

w<sub>(7.,14.,21.,28.)</sub>: 7.,14.,21. ve 28. günlerde alınan çatlak ölçümleri

Her numune için çatlak kapanma oranı ayrı ayrı olarak hesaplanmıştır. Sonrasında aynı set içerisindeki ve aynı gün, kür koşullarındaki farklı mineraller içeren numunelerin çatlak kapanma oranları hesaplanmıştır.

UPV testi için CONTROLS marka test düzeneği kullanılmıştır. UPV ölçümleri kirişlerin uzun olan aksında (160mm) uzunlukta yapılmıştır. Çatlak oluşumundan hemen

sonra başlayan ölçümler, çatlak oluşturulduktan sonra 0, 7, 14, 21 ve 28. Günlerde devam etmiştir. Ölçümler için transdüörler ile kiriş arasında cihaz üreticisi tarafından tavsiye edilen jel sürülmüş ve hava ile temas etmesi engellenmiştir. Çatlak onarımını değerlendirme için belirlenen günlerdeki UPV değerinin ilk çatlak oluşturduğunda elde edilen UPV değerine olan farkı alınmıştır (Eş. 2).

$$\% \text{ UPV değişimi} = \text{UPV}_{t=i} - \text{UPV}_{t=0} \quad (2)$$

Ardından biyolojik katkı malzemesinin kendiliğinden iyileşmeye olan etkisi su emme kapasitesi RILEM 25 PEM II-6'ya dayanılarak belirlenmiştir (RILEM25 PEM Commission, 1980). Numuneler kütle değişimi  $\pm 0,1$  seviyesine düşene kadar  $40^\circ\text{C}$ 'de kurutulduktan sonra çatlak olmayan yüzeyler sızdırma yaptırmayacak şekilde parafin ile kaplanmıştır. Ardından, kuru numune ağırlıkları ölçüldükten sonra ( $W_d$ ), çatlak olan kaplanmamış yüzey ise  $2 \pm 1$  mm yüksekliğinde su banyosu içine yerleştirilmiştir. Su seviyesinin deney sırasında değişmemesi gerektiğinden, gerektiğinde su eklenmiştir. Periyodik olarak (1, 3, 5, 8, 24, 48, 72 and 120 saat) numuneler su banyosundan çıkarılıp, yüzeydeki su temizlendikten sonra, hassas terazi ile tartılmıştır ( $W_w$ ). Bu işlemler sonunda numunelerin su emme katsayısı aşağıda Eş. 3'te belirtilen formül ile hesaplanmıştır:

$$k(t^{1/2})=W/A \quad (3)$$

$k$  : su emme kat sayısı ( $\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1/2}$ )  
 $Q$  : Numunede periyodik olarak ölçülen su miktarı ( $W_w - W_d$ ) (g)  
 $A$  : Suya batırılan yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ )

Su emme deneyinden sonra numuneler çatlakların geçtiği bölgelerden kırılarak, kırılma yüzeyinde biriken ürünün mikro yapısı ESEM analizi ile incelenmiştir.

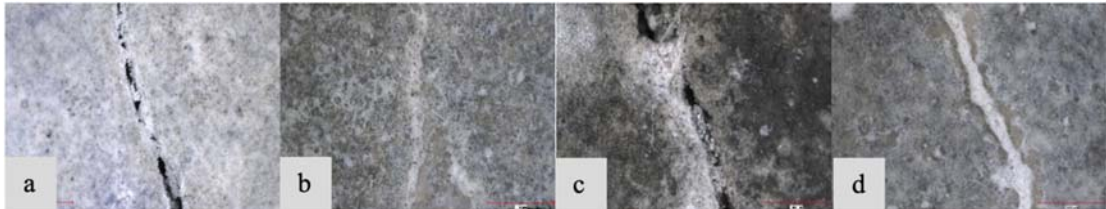
### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

#### 3.1. Çatlaklarda kendiliğinden iyileşmenin değerlendirilmesi (Evaluation of self-healing in cracks)

Bu çalışma doğada kolayca bulunabilen diyatom ve ponza taşına bakteri hücrelerini sabitleyerek çimento-esaslı harçlar

için iki birleşenli, kendiliğinden iyileşmeyi sağlayan bir katkı geliştirmeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle çalışmanın en önemli adımı geliştirilen bu katkının harç yüzeyinde eğilme gerilmesi altında oluşan çatlakları kapatabilme yeteneğidir. Tamamlanan deneysel sonuçlara göre bakteri içermeyen numunelerde kür yöntemine bakılmaksızın, 60 günlük sürede onarım gözlemlenmemiştir. Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6 bakteri içermeyen kontrol serileri (C) ve bakteri içeren serilerin (Bac ve 2P) stereomikroskop resimlerini göstermektedir. Her seriden 3'er kiriş incelenmiş olup, hepsinde benzer davranış gözlemlendiğinden aynı set numune için sadece bir numunenin resmi sunulmuştur. Şekil 5, 28 günlük bakteri içermeyen kontrol numunelerini göstermektedir. Kısmen de olsa çatlak ağzında mineral çökmesi gözlemlenmiştir. Bu özellikle besi yeri kür uygulanması numunelerde gözlemlenmiştir. Hatta çoğu numunede bu kristal çökmesi çatlak oluşumundan önce gözlemlenmiştir. Literatürde daha önce yapılan tüm çalışmalarda, bu mineraller mümkün olduğunca bildirilmişti kendiliğinden iyileşme sağlayabilen puzolan davranışları olan çimentomsu malzeme adayları olarak rapor edilmiştir. Konu ile ilgili olarak, diyatomun içerisindeki yüksek  $\text{SiO}_2$  miktarı sebebi ile puzolan olarak kullanılabilirdiği gözlemlenmiştir [20, 21]. Seraj [21], çok ince tanecikli ponzanın da yavaş da olsa reaksiyona girebildiğini gözlemlenmiştir. Bu minerallerin suya doyurulmuş olarak eklenmesi de iç kürlenmeye neden olduğu düşünülmektedir. Bu sayede, özellikle daha çok nem hapseden ponza içeren numunelerde, kısıtlı miktarda yüzeye kristal oluşumunun tetiklendiği düşünülmektedir. Ancak, aynı sürede bakteri içeren numunelerde gözlemlenen kapanma miktarı düşünüldüğünde sadece mineral kullanımı ile çatlaklarda kısa vadede görsel olarak daha etkin bir çatlak onarımının sağlanması mümkün gözükmemektedir.

Şekil 6'da gözlemlendiği üzere diyatom içeren numunelerde üretimden 28 gün sonra çatlaklar özellikle besi yeri ile kürlenme sağlandığında tamamen kapanmıştır. Su ile uygulanan kürlenmede ise çatlaklar kısmen kapanmıştır. Burada dikkat edilmesi gereken bir nokta, DE-Bac numunesinde besi yeri bulunmamasına rağmen sadece su ile kürlendiğinde bile çatlak ağzında kısmen  $\text{CaCO}_3$  çökeltisi oluşturabildiğidir. Bu kristal çökmesini doğrudan bakteri kullanımı ile ilişkilendirmek çok zordur. Çünkü, bakteri hücrelerinin  $\text{CaCO}_3$  çökeltilemeleri için besi yerine,



**Şekil 6.** Diyatom -bakteri içeren numunelerde 28 günde oluşturulan çatlaklarda kürlenme sonrası kapanma (0,3 - 0,4  $\mu\text{m}$  arası) (a) DE-Bac numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası (b) DE-Bac numunesinde 28 gün besi yeri kürlenmesi sonrası (c) DE-2P numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası ve (d) DE-2P numunesinde 28 gün besi yeri kürlenmesi sonrası çatlak onarımı. (Crack healing (between 0.3 to 0.4  $\mu\text{m}$ ) in 28-day old samples containing diatomaceous earth and bacterial cells (a) DE-Bac sample after 28 days of water curing (b) DE-Bac sample after 28 days of nutrient medium curing (c) DE-2P sample after 28 days of water curing and (d) DE-2P sample after 28 days of nutrient medium curing)



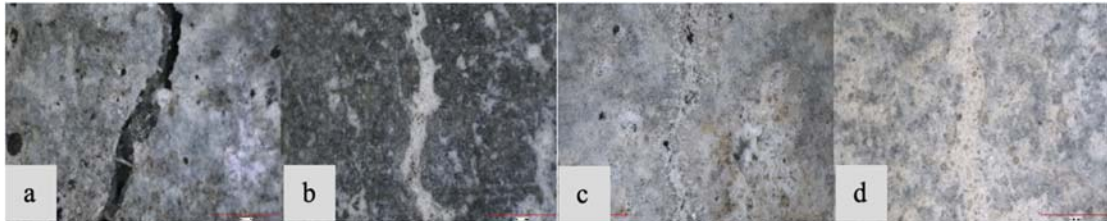
özellikle üreye ihtiyaçları vardır. Ancak sadece diyatom içeren DE-C numunesinde görsel olarak hiç bir çatlak onarımı gözlemlenmemiştir. Literatürde, daha önce yapılan çalışmalarda metakaolin ve bentonit gibi killerin çimento esaslı malzemelerde çatlakların kendiliğinden iyileşmesini sağlamak için kullanıldığı belirtilmiştir [22]. Karışımda bu mineralleri içeren harçlarda oluşan kılcal çatlaklarda bir sene boyunca nemli ortamda tutulmalarının sonucunda kısmen ya da tamamen iyileşme gözlemlenmiştir [22]. Benzer bir etkinin diyatomda da olması olağandır. Kontrol numunesi DE-C’de bir onarım gözlemlenmeyip, sadece bakteri içeren DE-Bac numunesinde nemli koşullarda CaCO<sub>3</sub> çökeltisinin gözlemlenmesi bakterilerin varlığının bu mekanizmayı hızlandırdığını göstermektedir. Burada belirtilmesi gereken bir nokta da su kürlenmesi uygulanan DE-2P numunesinde ilk bir hafta içinde çatlaklarda %80 üzeri kapanma gözlemlenirken, ilerleyen süreçte bu kristallerin onarım sürecinin 7. Gününden sonra çözündüğü gözlemlenmiştir. Ancak, takip eden günlerde onarım devam etmiş ve kür uygulamasının 28. Gününde su kürü uygulaması ile kısmen and besi yeri kür uygulaması ile çatlakın neredeyse tüm yüzeyi çökelti ile kaplanmıştır. Sadece DE içeren numune gözlemlendiğimiz kür uygulamasında çökeltide oluşan çözünmenin nedenlerini anlamak için ileri çalışmalar yapılmaktadır.

Benzer şekilde, ponza ile karışma eklenen bakteriler de üretimden 28 gün sonra oluşturulan çatlaklarda kendiliğinden iyileşmeyi sağlayabilmişlerdir (Şekil 6). Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda biyomineralizasyonun gerçekleşmesi ve çatlak onarım yeteneğinin bakteri miktarı ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir [15]. Diyatom küçük tane boyu ile daha homojen bir dağılım sağlasa bile ponza kum yerine kullanılması nedeni ile daha fazla miktarda, daha fazla bakteri içererek eklenmiştir. Ponza daha büyük taneçikli olması sebebi ile hem karışımda diyatoma göre daha fazla kullanılmış, hem de ponza ile beraber karışıma diyatoma kıyasla daha fazla bakteri sağlanmıştır. Benzer şekilde, hem DE-Bac hem de PUM-Bac numunelerinde bakteri miktarı iki bileşenli 2P numunelerinin iki katı kadar kullanılmıştır. Bu şekilde farklı uygulamanın yapılmasının nedeni “Bac” seri numunelerde tüm mineraller kullanılarak hücrelerin sabitlenmesi gerçekleştirilmiş iken, “2P” seri numunelerde hücreler kullanılan mineralin yarısına sabitlenmiştir. Bu

işlemden emdirilme sırasında kullanılan PBS de yarıya düşürülmüştür. Bu nedenle “2P” seri numunelerde hücre sayısı da yarıya düşürülerek sabitleme işleminde hücre-mineral birleşiminin denk tutulması hedeflenmiştir. Aksi takdirde, aynı hücre miktarının yarı oranda minerale sabitlenmesi gerekmekte olup, bu işlem sırasında hücrelerin bir kısmının minerallere sabitlenmeden bileşende kalabileceği düşünülmektedir. Şekil 6 ve Şekil 7’deki görsel veriler kıyaslandığında ponza içeren numunelerde bu doğrultuda çatlak kapanmasının daha etkin olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, resimler bahsedildiği üzere 3erli setlerden temsili olarak seçilen numunelerden elde edilmiştir. Tablo 3 mikroskop analizi ile beraber hesaplanan 3 numuneden elde edilen çatlak kapanma yüzdelere göstermektedir. Bu analize göre, Bac seri numunelerde iki mineralin de benzer oranda çatlak onarımı sağlanmasına rağmen özellikle az bakteri kullanılan 2P serilerinde diyatom ile kullanılması daha etkin bir onarım sağlamıştır. Su kürü uygulanan DE-2P numunesinde çatlak kapanma oranı muadil Pum-2P numunesine göre %25 daha fazladır.

Daha önce, metabolik olarak aktif olan mikroorganizmaların yüksek miktarda DE ile karıştırılarak pasif halde uzun bir süre tutulabileceği gösterilmiştir [17, 23]. Bu durumda, aktif *S. pasturii* hücrelerinin DE üzerine sabitlenmesi hücrelerde benzer bir pasif uyku hali (spor benzeri) sağlayabilir ve numunelerde çatlama meydana geldikten sonra, sağlanan besi yeri ile CaCO<sub>3</sub>’ü çökeltmek için tekrardan aktif hale gelmiş olabilecekleri düşünülmektedir. Besi yeri kısıtlı ile karışıma eklenen ve çatlak oluşumundan sonra sadece su sağlanan 2P numunelerinde diyatom kullanılması bakterilerin daha uzun süre uyku halinde korunmasını sağladığı düşünülmektedir [24].

Kontrol numunelerinden elde edilen veriler sonucunda (DE-C ve PUM-C), minerallerin çatlaklardaki kapanmaya olan etkisi %15’in altındadır (Bkz. Tablo 3). Bu da Bac ya da 2P numunelerden elde edilen herhangi bir artışın mikroorganizmalardan kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Bununla alakalı olarak bakteri içeren numunelerde, kür ortamı fark etmeksizin çatlak onarımında bir artış gözlemlenmiştir. Su kür uygulaması ile kısmen bir artış gözlemlenmiş olsa da besi yeri sağlandığında %80 üzeri kapanma sağlanmıştır. Su kür uygulamasında özellikle 2P numunelerde çatlak onarım oranının %40 mertebelerinde



**Şekil 7.** Ponza -bakteri içeren numunelerde 28 günde oluşturulan çatlaklarda kürlenme sonrası kapanma (0,3 - 0,4 µm arası) (a) Pum-Bac numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası (b) Pum-Bac numunesinde 28 gün besi yeri kürlenmesi sonrası (c) Pum-2P numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası ve (d) Pum-2P numunesinde 28 gün besi yeri kürlenmesi sonrası çatlak onarımı. (Crack healing (between 0.3 to 0.4 µm) in 28-day old samples containing pumice and bacterial cells (a) PUM-Bac sample after 28 days of water curing (b) PUM-Bac sample after 28 days of nutrient medium curing (c) PUM-2P sample after 28 days of water curing and (d) PUM-2P sample after 28 days of nutrient medium curing)

olması, bakteriler ile karışıma eklenen besi yerinin çatlak onarımı için kullanılabilirliğini ancak bunun göreceli olarak kısıtlı kaldığı anlaşılmıştır. Bu sebep ile dışarıdan sağlanan besi yeri kür uygulamasının daha fazla besi sağlaması ile daha fazla onarım elde edilmiştir. Ayrıca, karışım sırasında belirli oranda besi kullanılmıştır. Bakteriler ihtiyaç halinde içeriden sağlanan bu besileri tükettiklerinde, ek besi sağlanmadığı sürece metabolik aktivelerine devam edemeyecekleri bilinmektedir. Besi yeri kür uygulamasında ise sürekli besiler sağlanmış ve kür solüsyonu haftada bir değiştirilmiştir. Bu sayede hücreler sürekli tazelenen bir besi yeri uygulaması ile daha etkili olmuşlardır.

**Tablo 3.** Çatlaklardaki kapanma yüzdesi. DE: Diyatom; Pum: Ponza Taşı. C: Bakteri hücresi olmayan sadece mineral içeren kontrol numuneleri; Bac: Minerallere PBS ile sabitlenmiş bakteri içeren numuneler; 2P: Minerallere besi yeri ile sabitlenmiş bakteri içeren numuneler

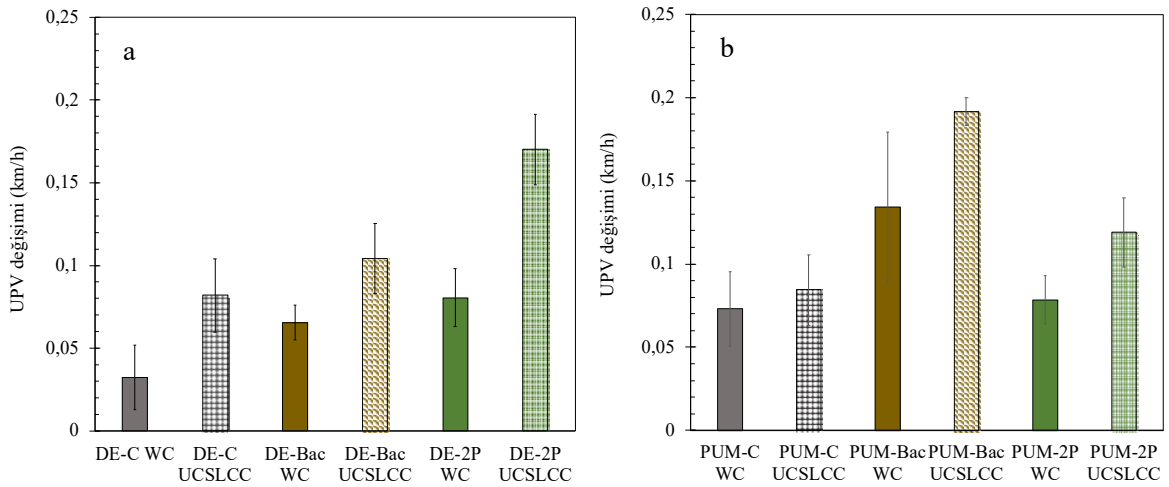
(% crack healing, DE: Diatomaceous earth; PUM: Pumice; PBS: Phosphate buffer solution; SP: Superplasticizer; C: Only includes minerals; B: All mineral content was saturated with bacterial cells and PBS; 2P: Bio additive containing bacterial cells immobilized to minerals with nutrients.)

Numune Adı	KÜR UYGULAMASI	
	Su	Besi yeri
DE-C	%6,1	%2,8
DE-BAC	%29,2	%84,7
DE-2P	%46,0	%96,8
PUM-C	%9,5	%14,3
PUM-BAC	%17,3	%84,4
PUM-2P	%36,8	%90,1

Oksijen kullanarak yaşayan aerobik bakteriler kullanılarak sağlanan kendiliğinden iyileşmede gözlemlenen olası bir

sorun çatlak onarımının çatlakın sadece yüzeyinde gerçekleşmesidir [14, 25]. Bu sebep ile numunelerde görsel analiz yanı sıra UPV değişimi de incelenmiştir (Şekil 8). Su ile kürlenmiş ve de hiçbir çatlak onarımı gözlemlenmeyen DE-C numunesindeki değişim referans alındığında, yine görsel bir çatlak onarımı gözlemlenmeyen ancak kürlenme sırasında besi yeri sağlanan DE-C numunesinde çatlak içinde bir değişime sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu eğilim bakteri içeren DE-Bac ve DE-2P numunelerinde de gözlemlenmiştir. Bunun iki olası nedeni olduğu düşünülmektedir. İlk olarak, besi yerinde kullanılan kimyasalların zamanla çatlak içinde birikip dalga hızını azalttığı düşünülmektedir. Diğer olası neden ise diyatomun aslında kendisinin de alglerden oluşan doğal bir mineral olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [20]. Besi yeri ile sağlanan kaynakların kısmen de olsa diyatomun kristalleşmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Görsel analiz ile orantılı olarak hem diyatom hem de ponza kullanılarak hazırlanan numunelerde besi yeri kür döngüsünün uygulanmasının çatlak onarımı için daha etkili olduğu UPV sonuçları ile de desteklenmiştir. Ancak su ile kürlenmiş PUM-Bac numunesinde görsel bir onarım olmasa bile UPV değişiminde eş değer kontrol numunesi PUM-C'ye göre belirgin bir artış olduğu gözlemlenmektedir. Bu numunede gerçekleşen onarımın çatlak ağzından çok çatlak içinde olduğu düşünülmektedir. İlerleyen aşamalarda biyomineralizasyonun karakterizasyonu için her numune çatlak yüzeylerinden iki parçaya bölünmüştür. Bu noktada, numunelerin çoğunda CaCO<sub>3</sub> oluşumunun çatlak derinliğine yayıldığı görsel olarak belirlenmiştir. Besi yeri olmadan çatlak onarımının sağlanması teorik açıdan pek mümkün olmasa da inkübasyon sırasında bakteri yüzeyinde tutunan [CO<sup>3-</sup>] iyonlarının santrifüj esnasında tam olarak temizlenemediğini göstermektedir. Belirtilmesi gereken bir diğer noktada, literatürde net UPV değerlerinde kaydedilen çok yüksek hızlar (> 4570 m/s) çok iyi beton kalitesinin bir



**Şekil 8.** Kendiliğinden iyileşen numunelerde UPV değerlerindeki değişim (a) Diyatom ve bakteri içeren numuneler (b) Ponza ve bakteri içeren numuneler. WC: Su ile kürlenme; UCSLCC: üre-MMS-KA Besi yeri ile kürlenmenin sağlandığı numuneler. (Change in UPV values upon self-healing in samples containing (a) diatomaceous earth and bacterial cells (b) pumice and bacterial cells. WC: Water Curing; UCSLCC: Nutrient medium curing-containing urea-CSL-Calcium Acetate)

göstergesi olarak kabul edilirken, çok düşük hız aralıkları ise ( $<3050$  m/s) zayıf beton kalitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir [26]. Ayrıca, UPV değerlerinde belirlenen değişikliklerin betonun kalitesindeki olası değişikliği gösterebileceği belirtilmiştir [26, 27]. Bir başka deyiş ile çatlak oluşumundan sonra UPV değerlerindeki artışın harcın kalitesindeki artış ile ilişkilendirilebileceği bilinmektedir. Çatlaklarda kendiliğinden iyileşmenin sağlanması ile harcın kalitesinde bir artış olduğu gözlemlenmektedir. Bunun sayısal değerler ile anlaşılması için onarım sonrası su emme kapasitesi belirlenmiştir.

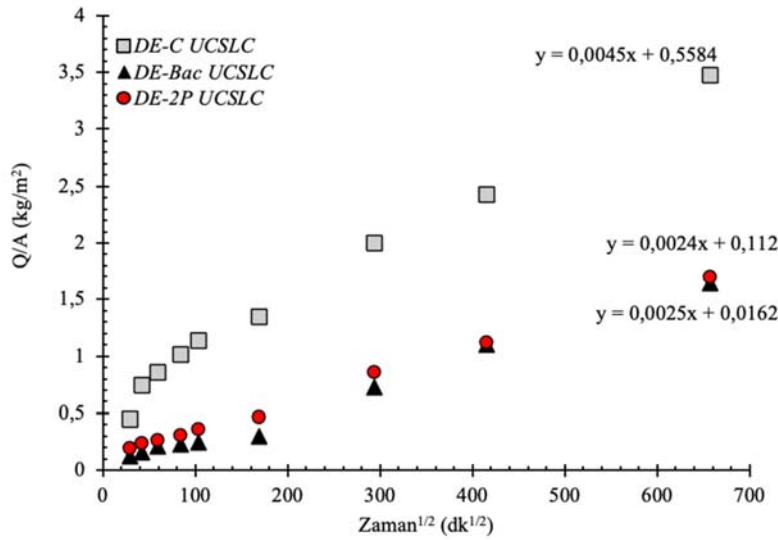
### 3.2. Kendiliğinden iyileşmenin su emme kapasitesine olan etkisinin belirlenmesi (Effects of self-healing on water absorption)

Kendiliğinden iyileşmenin malzeme performansına olan önemli etkisinin su emme kapasitesi ya da geçirgenliğe olan etkisi olduğu bilinmektedir. Bu sebep ile görsel olarak çatlak onarımı gözlemlenen numunelerde kendiliğinden iyileşmenin malzemenin performansına olan etkisinin belirlenmesi için numunelere RILEM 25 PEM II-6'ya dayanılarak su emme kapasitesi deneyleri yapılmıştır. Bu amaç ile numunelerdeki zamana bağlı ağırlık değişiminin grafiği çizilmiş ve su emme kapasitesi bir fonksiyon katsayısı (k) olarak grafiğin eğimi alınarak hesaplanmıştır. Şekil 9 ve Şekil 10 temsili olarak seçilmiş numunelerde ağırlık değişimi-zaman grafiğini ve tüm numuneler için su emme kat sayısı, k, değerlerini göstermektedir. Elde edilen değerlere göre, kendiliğinden iyileşmenin sağlanmasından sonra numunelerin su emme kapasitesinde onarım olmayan kontrol numunelerine göre (DE-C ve PUM-C) belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Diatom ile hazırlanan numunelerde gözlemlenen su emme kapasitesi değerleri görsel değerlendirme ve UPV analizi ile tutarlıdır. Kapanma

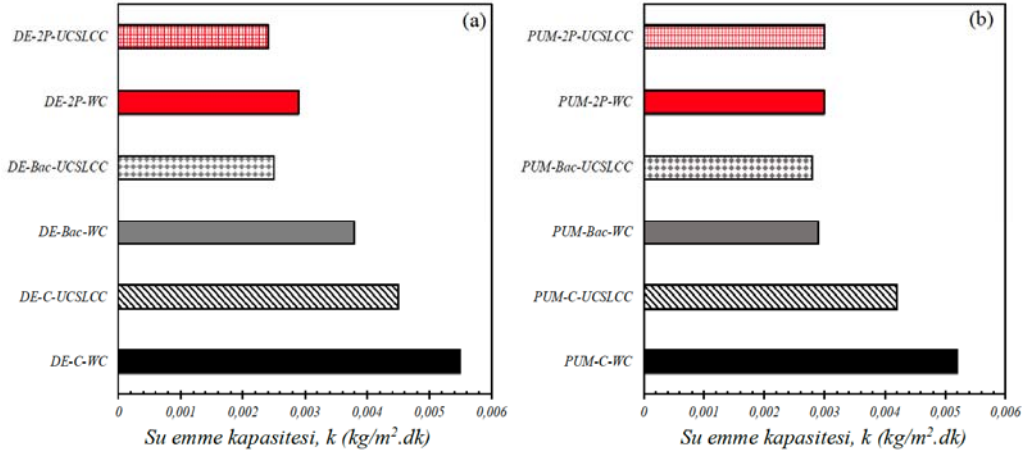
gözlemlenmeyen DE-C (hem su hem besi yeri ile kürlen) numunelerinde ve su ile kürlen DE-Bac numunesinde su emme kapasitesi 0,004'ün üzerindedir. Bununla beraber görsel olarak tam kapanma gözlemlenen ve en fazla UPV değişiminin belirlendiği besi yeri ile kürlen DE-Bac ve DE-2P numunelerinde kontrol numunesi DE-C'ye göre (su ile kürlen) su emme kapasitesinde %50 mertebesinde bir azalma olmuştur. Kısmen kapanmanın gözlemlendiği su ile kürlen DE-2P numunesinde de kontrol numunesine göre su emme kapasitesinde %40'a yakın bir azalma sağlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda diatomun kendiliğinden iyileşmeyi sağlayabilmek için *S. pasteurii* hücreleri için uygun bir bariyer olduğu ve çimento-esaslı malzemelerde 0,4 mm'den ince kılcal çatlaklarda onarımı sağlayabildiği belirlenmiştir. Benzer şekilde ponza ile hazırlanan numunelerde ise çatlaklarda biyomineralizasyon ile sağlanan kendiliğinden iyileşme sonrasında su emme kapasitesinde ortalama %45 azalma sağlanmıştır. Burada yine değinilmesi gereken bir nokta su ile kürlen PUM-Bac numunesinde UPV sonuçları ile uyumlu olarak, su emme kapasitesinde kontrol PUM-C numunesine göre %42 azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda onarımın diğer numunelerden farklı olarak çatlak ağzında olmadığı ve çatlak kapanmasının daha çok çatlak yüzeyinde olduğu söylenebilir.

### 3.3. Çatlak ara yüzünde biyomineralizasyonun karakterizasyonu (Characterization of biominerals through crack surface)

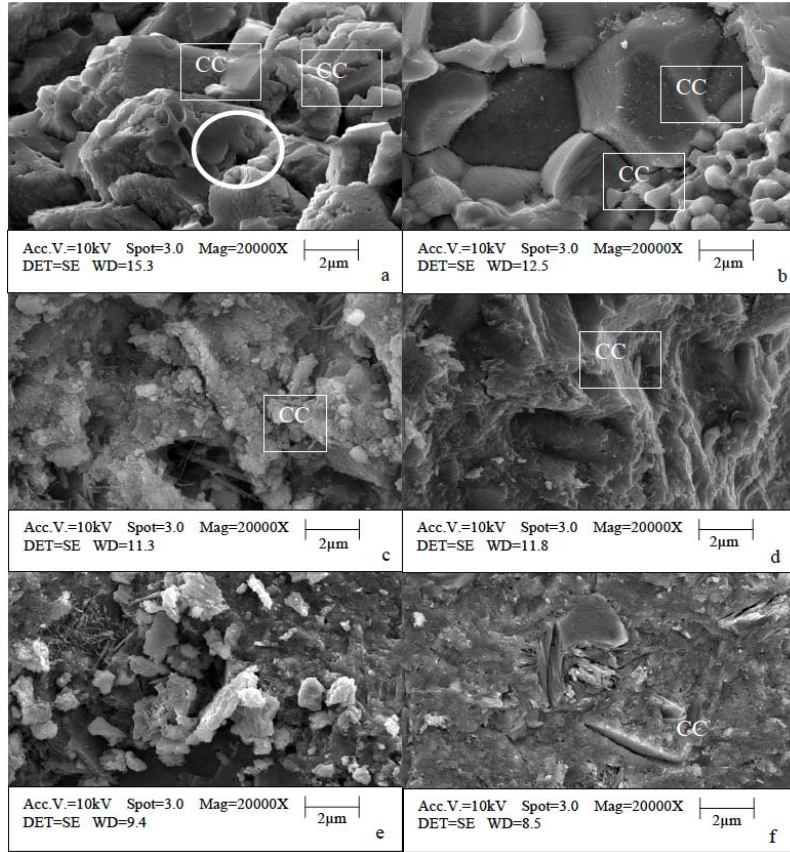
Numunelerde su emme kapasitesi belirlendikten sonra her numune çatlak onarımı olan noktalardan bölünmüş ve çatlak yüzeyinde SEM analizi yapılmıştır. Şekil 11 çatlak onarımı ve çökelti gözlemlenen numunelerden elde edilen SEM görüntülerini göstermektedir.



**Şekil 9.** Kendiliğinden iyileşmenin su emme kapasitesine olan etkisi: Temsili örneklerden ağırlık değişimi-zaman eğrileri  
WC: Su ile kürlenme; UCSLCC: Üre-MMS-KA besi yeri ile kürlenmenin sağlandığı numuneler  
(Effects of self-healing to water absorption capacity: representative Q vs. t curve for DE-C samples WC: Water Curing; UCSLCC: Nutrient medium curing-containing urea-CSL-Calcium Acetate)



**Şekil 10.** Kendiliğinden iyileşmenin su emme kapasitesine olan etkisi (a) Diyatom ve bakteri içeren numuneler (b) Ponza ve bakteri içeren numuneler. WC: Su ile kürlenme; UCSLCC: Üre-MMS-KA besiyeri ile kürlenmenin sağlandığı numuneler (Effects of self-healing to water absorption capacity (a) samples containing diatomaceous earth and bacterial cells (b) samples containing pumice and bacterial cells. WC: Water Curing; UCSLCC: Nutrient medium curing-containing urea-CSL-Calcium Acetate)



**Şekil 11.** Kendiliğinden iyileşen numunelerde çatlak ara yüzü ESEM analizi (a) DE-Bac numunesinde 28 gün besiyeri kürlenmesi sonrası (b) DE-2P numunesinde 28 gün besiyeri kürlenmesi sonrası (c) PUM-Bac numunesinde 28 gün besiyeri kürlenmesi sonrası (d) PUM-2P numunesinde 28 gün besiyeri kürlenmesi sonrası çatlak ara yüzü (e) PUM-Bac numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası çatlak ara yüzü (f) PUM-2P numunesinde 28 gün su kürlenmesi sonrası çatlak ara yüzü (ESEM images of crack surfaces from self-healed samples (a) DE-Bac sample after 28 days of nutrient medium curing (b) DE-2P sample after 28 days of nutrient medium curing (c) PUM-Bac sample after 28 days of nutrient medium curing (d) PUM-2P sample after 28 days of nutrient medium curing (e) PUM-Bac sample after 28 days of water curing and (f) PUM-2P sample after 28 days of water curing)

Hem DE-Bac hem de DE-2P örneklerinde benzer kristal morfolojileri gözlenmiştir (Şekil 11'a ve Şekil 11'b). Her iki numunede de çoğunlukla kalsit çöktüğü gözlemlenmiştir (CC ile işaretlenmiştir). Ayrıca, kalsit kristallerinin üzerinde *S. pasteurii* hücrelerinin kalıntıları belirlenmiştir. Bununla beraber MICP reaksiyonu için mikroorganizmaların büyük rol oynadığı anlaşılmaktadır.

Benzer şekilde onarım gözlemlenen PUM-Bac ve PUM-2P numunelerinde de çoğunlukla kalsit gözlemlenmiştir (Şekil 11'c, Şekil 11'd). Bunun yanı sıra bu numunelerde etrenjit olduğu düşünülen iğne şekilli kristaller (Şekil 11'e) ve bol miktarda kalsiyum hidroksit (Şekil 11'e) gözlemlenmiştir. Bu kristal yapılarının çatlak içinde oluştuğu, ayrıca yapılan ek Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi analizleri ile de belirlenmiştir [24]. Ayrıca, stereomikroskop analizi ile çatlak ağzında bir kapanma gözlemlenmeyen su ile kürlenmiş PUM-Bac numunesinde de genel olarak çatlak yüzeyinde kalsit gözlemlenmiştir. Bu da onarımın çatlak derinliğinde başladığını desteklemektedir. Ancak, bu çökeltinin oluşmasının biyomineralizasyon ile ilişkisinin belirlenmesi için ileri analizler gerekmektedir.

Burada değinilmesi gereken diğer bir nokta ise diyatom ile sağlanan kalsit biyominerallerinin rombohedral kristal yapısının ponza ile sağlanan numunelere göre daha düzgün olduğudur. Bunun tam olarak neden bilinmesi de diyatomun kendisinin de hali hazırda bir biyolojik formasyon olmasının bakterileri taşımak ve mineral çekirdeklenmesi için daha uygun bir ortam sağladığı düşünülmektedir.

#### 4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Bu çalışmada çimento-esaslı malzemelerde oluşan çatlakların biyomineralizasyon ile onarılması için *S. pasteurii* hücreleri ponza ve diyatom minerallerinin üzerine sabitlenerek 2-bileşenli bir biyolojik katkı tasarlanmıştır. Bu katkının harç içine katılması ile üretimden 28 gün sonra oluşturulan çatlaklar 28 gün gibi kısa bir sürede kapatılmıştır. Onarım sürecinde görsel olarak her iki mineralinde etkili olduğu gözlemlenmiş olsa da özellikle su kürü uygulanan numunelerde diyatomun daha etkili olduğu, bunu da diyatomun hücreleri koruma özelliğinden kaynakladığı düşünülmüştür. Ayrıca, onarım için nemli bir ortamın, hatta besi yerinin olması gerektiği belirlenmiştir. Görsel çatlak onarımı UPV değişimi ile desteklenmiş ve genel olarak %30 üzeri çatlak onarımı sağlanmış numunelerde çatlak onarımı ile UPV değişimi arasında tutarlılık gözlemlenmiştir. Çatlak onarımının akabinde numunelerin su emme kapasitesinde çatlak onarımı sağlanmamış kontrol numunelerine göre belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Son olarak, çatlak ara yüzünde genel olarak CaCO<sub>3</sub>'ün stabil formu kalsit olduğu belirlenmiştir. Diyatom küçük tane boyutu ile harç içine homojen dağılımı sağlaması ve biyolojik bir zemin oluşturması dolayısıyla uygulamada etkin bulunurken, ponza numunelerinin üzerine boyutları dolayısıyla daha fazla bakteri sabitlenmesi avantaj olmuştur. Sonuçlar doğrultusunda her iki sistemin de etkili bakteriler ile çatlak onarımını sağlamak amacı ile kullanılabilirliği

belirlenmiştir. Çatlak onarımının mekanik özelliklere ve korozyon üzerine olan etkileri üzerine çalışmalar devam etmektedir.

#### TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)1001 Programı (MAG-118M327) kapsamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yapılan tüm masraflar TÜBİTAK tarafından karşılanmıştır. Ayrıca, SEM analizleri Boğaziçi Üniversitesi İleri Teknolojiler Araştırma Geliştirme Merkez Laboratuvarında yapılmış olup, analizler sırasında yardımcı geçen Dr. Bilge Gedik Uluocak'a teşekkür ederiz. Son olarak, istatistiksel analize yardımları için İlgin Sandalcı'ya teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Wiktor V., Jonkers H.M., Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete, Cement and Concrete Composites, 33, 763–770, 2011.
2. Wang J.Y., Soens H., Verstraete W., De Belie N., Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores, Cement and Concrete Research, 56, 139–152, 2014.
3. Mann S., Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford, New York, A.B.D.2001.
4. Stocks-Fischer S., Galinat J.K., Bang S.S., Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>, Soil Biology and Biochemistry, 31, 1563–1571, 1999.
5. De Muynck W., De Belie N., Verstraete W., Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review, Ecological Engineering, 36,118–136, 2010.
6. Jonkers H.M., Thijssen A., Muyzer G., Copuroglu O., Schlangen E., Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete, Ecological Engineering, 36, 230–235, 2010.
7. Wang J., Van Tittelboom K., De Belie N., Verstraete W., Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete, Construction and Building Materials, 26, 532–540, 2012.
8. Wang J.Y., Snoeck D., Van Vlierberghe S., Verstraete W., De Belie N., Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete, Construction and Building Materials, 68, 110–119, 2014.
9. Bundurn Z.B., Bae S., Kirisits M.J., Ferron R.D., Biomineralization in self-healing cement-based materials: Investigating the temporal evolution of microbial metabolic state and material porosity, Journal of Materials in Civil Engineering, 29, 1–8, 2017.
10. Bundurn Z.B., Kirisits M.J., Ferron R.D., Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength, Cement and Concrete Research, 67, 237–245, 2015.
11. Liu S., Bundur Z.B., Zhu J., Ferron R.D., Evaluation of self-healing of internal cracks in biomimetic mortar using coda wave interferometry, Cement and Concrete Research, 83, 70–78, 2016.

12. Achal V., Pan X., Özyurt N., Improved strength and durability of fly ash-amended concrete by microbial calcite precipitation, *Ecological Engineering*, 37, 554–559, 2011.
13. Amiri A., Bundur Z.B., 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, 655–662, 2018.
14. Amiri A., Azima M., Bundur Z.B., Crack remediation in mortar via biomineralization: Effects of chemical admixtures on biogenic calcium carbonate, *Construction and Building Materials*, 190, 317–325, 2018.
15. Bundur Z.B., Amiri A., Ersan Y.C., Boon N., De Belie N., Impact of air entraining admixtures on biogenic calcium carbonate precipitation and bacterial viability, *Cement and Concrete Research*, 98, 44–49, 2017.
16. Erşan Y.Ç., Da Silva F.B., Boon N., Verstraete W., De Belie N., Screening of bacteria and concrete compatible protection materials, *Construction and Building Materials*, 88, 196–203, 2015.
17. Wang J.Y., De Belie N., Verstraete W., Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete., *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 39, 567–77, 2012.
18. Alazhari M., Sharma T., Heath A., Cooper R., Paine K., Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete, *Construction and Building Materials*, 160, 610–619, 2018.
19. Amiri A., Use of biomineralization in self-healing cement-based materials, *Özyeğin Üniversitesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye* 2017.
20. Li J., Zhang W., Li C., Monteiro P.J.M., Green concrete containing diatomaceous earth and limestone: Workability, mechanical properties, and life-cycle assessment, *Journal of Clean Production*, 223, 662–679, 2019.
21. Seraj S., Evaluating Natural Pozzolans for Use as Alternative Supplementary Cementitious Materials in Concrete, The University of Texas at Austin, Cockrell School of Engineering Civil, Architectural and Environmental Engineering. 2014.
22. Suleiman A.R., Nelson A.J., Nehdi M.L., Visualization and quantification of crack self-healing in cement-based materials incorporating different minerals, *Cement and Concrete Composites*. 103, 49–58, 2019.
23. AH L.V., Method of preparing stowable dormant bacteria- United States Patent 3898132, 3898132, 1975.
24. Tezer M.M., Development of two-phase biological self-healing agents for cement-based mortar, *Özyeğin Üniversitesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye*, 2020.
25. Erşan Y.C., Verbruggen H., De Graeve I., Verstraete W., De Belie N., Boon N., Nitrate reducing  $\text{CaCO}_3$  precipitating bacteria survive in mortar and inhibit steel corrosion, *Cement and Concrete Research*. 83, 19–30, 2016.
26. Ramachandran V.C., Beaudoin J.J., *Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology: Principles, Techniques and Applications*, 1<sup>st</sup> Edition, Noyes Publications, Norwich, New York, 2001.
27. Tayfur S., Alver N., Imaging of voids in concrete by impact-echo and ultrasonic-echo methods, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*. 33, 167–176, 2018.