

Ocena mikrobiologicznego wytrącania węglanów w procesie naprawy zapraw cementowych przy użyciu spektroskopii ramanowskiej

Evaluation of microbially induced carbonate precipitation in repairing process of cement mortars by Raman spectroscopy

Martyna Janek¹, Joanna Fronczyk², Barbara Gieroba³, Grzegorz Kalisz³, Anna Sroka-Bartnicka³, Wojciech Franus^{1*}

¹Lublin University of Technology, Faculty of Civil Engineering and Architecture, Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin, Poland

²Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Institute of Civil Engineering, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Poland

³Independent Unit of Spectroscopy and Chemical Imaging, Medical University of Lublin, W. Chodźki 4a, 20-970 Lublin

*Corresponding author: W. Franus, e-mail: w.franus@pollub.pl

Streszczenie

Zastosowanie mikroorganizmów stymulujących wytrącanie węglanów, które mogą wypełniać powstające w mikrostrukturze kompozytów cementowych spękania [MICP], zyskuje w ostatnich latach zainteresowanie jako alternatywny sposób samonaprawy tych materiałów. W artykule przeanalizowano efektywność powierzchniowej aplikacji środków naprawczych z zeolitu NaX i bentonitu, spor bakterii *Bacillus subtilis* oraz roztworów cementujących [prekursorów wytrącania] jako metody naprawy spękanych powierzchni zapraw cementowych. Efekty tej metody oceniono na podstawie analizy obrazu oraz badań mikrostruktury osadów wytrąconych w warunkach kontrolowanych i na powierzchniach zaleczonych kompozytów. Do charakterystyki mikrostruktury wykorzystano spektroskopię ramanowską oraz dyfrakcję rentgenowską XRD. Przeprowadzone badania potwierdziły wytrącanie węglanów w przełomie leczonych rys [maksymalnie 31,9 % zajęcia powierzchni przez wytworzony osad], co świadczy o efektywności zajęcia procesu MICP, równocześnie wskazując na udział w mechanizmie wytrącania osadów abiotycznego wytrącania form krystalicznych obecnych w roztworach cementujących. Dodatkowo, potwierdzono efektywność zastosowania spektroskopii ramanowskiej do charakterystyki powierzchni kompozytu cementowego oraz węglanów wytrąconych przez mikroorganizmy.

Słowa kluczowe: kompozyty cementowe, mikrostruktura, powierzchniowe zaleczanie, mikrobiologicznie indukowane wytrącanie węglanów, spektroskopia ramanowska

Summary

The use of microorganisms that stimulate the precipitation of carbonates, which can fill the cracks that form in the structure of cementitious composites [MICP], has been gaining interest in recent years as an alternative method of self-healing of these materials. This article analyses the effectiveness of surface application of repair agents composed of zeolite NaX and bentonite, *Bacillus subtilis* bacteria spores and cementing solutions [precursors of precipitation reactions] as a method of repairing cracked cement mortar surfaces. The effects of this method were evaluated by image analysis and microstructure studies of precipitates precipitated under controlled conditions and on the surfaces of healed composites. Raman spectroscopy and X-ray diffraction were used to characterize the microstructure. The conducted tests confirmed the precipitation of carbonates in the breakthrough of the healed cracks [maximum 31.9% occupation of the surface by the precipitate produced], which proves the effectiveness of the MICP process incident, at the same time indicating the participation in the mechanism of abiotic precipitation of crystalline forms present in the cementing solutions. Additionally, the effectiveness of using Raman spectroscopy to characterise the surface of the cement composite and the carbonates precipitated by microorganisms was confirmed.

Keywords: cement composites, microstructure, surface healing, microbially induced carbonate precipitation, Raman spectroscopy

1. Wprowadzenie

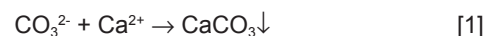
W ciągu ostatnich dwóch dekad jedną z dynamicznie rozwijających się gałęzi w inżynierii lądowej jest implementacja tak zwanych inteligentnych materiałów lub inteligentnych rozwiązań inspirowanych procesami zachodzącymi w środowisku naturalnym lub wykorzystujących procesy metaboliczne mikroorganizmów jak przepuszczalne bariery aktywne, monitorowane samooczyszczanie gruntów oraz indukowane mikrobiologicznie wzmocnienie gruntów i zaleczanie spękanych powierzchni (1–4). W obszarze materiałów budowlanych samoregeneracja [lub samozaleczanie] jest często definiowana jako zdolność materiału do naprawy defektów powstałych podczas eksploatacji materiału bez interwencji zewnętrznej. W przypadku kompozytów cementowych powstałe spękania mogą ulec wypełnieniu w konsekwencji procesów autogenicznych, takich jak fizyczne zamykanie spękań w wyniku pęcznienia materiałów obecnych w matrycy betonowej, chemiczne tworzenie węglanów wapnia w obrębie spękania, mechaniczne wypełnianie spękania cząstkami stałymi przenoszonymi przez wodę (5) lub procesów autonomicznych [głównie poprzez dodatek kapsułek zawierających środki lecznicze takie jak żywica epoksydowa, poliuretan czy spory bakteryjne] (6). Jedną z najszerzej rozwijanych w ostatnim czasie metod inspirowanych zjawiskami przyrodniczymi jest koncepcja samonaprawy kompozytów cementowych z wykorzystaniem techniki mikrobiologicznie indukowanego wytrącania węglanów [z ang. MICP]. Koncepcja ta jest głównie realizowana poprzez bezpośredni dodatek bakterii w formie przetrwalnikowej lub żywych komórek lub poprzez dodatek do matrycy cementowej kapsułek bądź specjalnie wyselekcjonowanych materiałów będących nośnikami bakterii (4). Jednakże najprostszym sposobem implementacji tej koncepcji jest powierzchniowa aplikacja na spękaną powierzchnię roztworów lub past zawierających bakterie oraz składniki chemiczne niezbędne do przebiegu reakcji wytrącania (7). Charakter reakcji zachodzących wewnątrz rysy jest ściśle zależny od wprowadzonego szczepu bakterii oraz związku stanowiącego źródło węgla. Na tej podstawie można wyróżnić sześć głównych ścieżek wytrącania węglanów: ścieżkę ureolityczną opartą na procesie hydrolizy mocznika oraz ścieżki nieureolityczne oparte na procesach fotosyntezy, denitryfikacji, amonifikacji, redukcji siarczanów oraz utleniania metanu (8). Konsekwencją wspomnianych procesów jest uwolnienie do kompozytu cementowego jonów CO_3^{2-} , które reagując z dostępnymi jonami metali, głównie Ca^{2+} , tworzą wypełniające przestrzeń rysy formy krystaliczne węglanu wapnia: kalcytu, aragonitu lub waterytu, zgodnie z poniższym wzorem (9):



Pomimo że powierzchniowa aplikacja została zaproponowana jako pierwsza praktyczna implementacja techniki MICP do renowacji powierzchni zabytkowych (7), w literaturze światowej można znaleźć nieliczne doniesienia z jej zastosowania na spękane powierzchnie kompozytów cementowych. De Muynck i in. (10) zanotowali w warunkach laboratoryjnych, że zanurzanie zapraw w roztworze zawierającym komórki bakterii [*B. sphaericus*] i składniki cementujące: octan wapnia i chlorek wapnia, może skutkować

1. Introduction

Over the past two decades, one of the rapidly growing areas in civil engineering has been the implementation of so-called smart materials or intelligent solutions inspired by environmental processes or employing metabolic processes of microorganisms [permeable active barriers, monitored self-cleaning of soils, microbiologically induced soil strengthening and healing of damaged surfaces] (1–4). In the field of construction materials, self-recovery [or self-healing] is often defined as the ability of a material to repair defects formed during its service life without external intervention. When dealing with cementitious composites, formed cracks may be filled as a consequence of autogenous processes, such as physical closing of cracks due to swelling of materials contained in the concrete matrix, chemical formation of calcium carbonates within the crack, mechanical filling of the crack by water-borne particles (5) or autonomous processes, mainly through the addition of capsules containing healing agents such as epoxy resin, polyurethane or bacterial spores (6). One of the most rapidly developed methods inspired by natural phenomena is the concept of self-healing of cementitious composites using Microbiologically Induced Carbonate Precipitation (MICP) technique. This method is mainly implemented through the direct addition of bacteria, in the form of spores or living cells, or through the addition of capsules or specially selected bacteria-bearing materials to the cement matrix (4). Nevertheless, the simplest way to introduce this approach is through the surface application of solutions or pastes containing bacteria and the necessary chemical components onto the cracked surface to induce the precipitation reaction (7). The nature of the reactions occurring within the crack is closely dependent on the introduced bacterial strain and the carbon source compound. Based on this, six main pathways of carbonate precipitation can be distinguished: the ureolytic pathway based on the urea hydrolysis process and non-ureolytic pathways based on: photosynthesis, denitrification, ammonification, sulfate reduction and methane oxidation (8). As a consequence of these processes, CO_3^{2-} ions are released into the cementitious composite. These ions, reacting with available metal ions, primarily Ca^{2+} , form space-filling crystalline forms of calcium carbonate: calcite, aragonite or vaterite, according to the following equation (9):



Although surface application was proposed as the first practical implementation of the MICP technique for the restoration of historic surfaces (7), few reports of its application to cracked cementitious composite surfaces can be found in the world literature. De Muynck et al. (10) observed in laboratory conditions that the immersion of mortars in a solution containing bacterial cells [*B. sphaericus*] and cementing components [calcium acetate and calcium chloride] could result in reduced water and gas permeability, as well as improved resistance to carbonation, chloride migration and freeze-thaw cycles. However, in the case of these studies, it was the result of only superficial calcium carbonate precipitation. Furthermore, the durability of the crystalline forms bonding may depend,

zmniejszeniem przepuszczalności dla wody i gazu, jak również poprawą odporności na karbonatyzację, migrację chlorków oraz zamrażanie i rozmrażanie. Jednakże w przypadku tych badań było to wynikiem jedynie powierzchniowego wytrącenia węglanu wapnia. Ponadto, trwałość wiązania powstałych form krystalicznych może zależeć m.in. od szczepu bakterii wykorzystanego do indukowania procesów MICP. Kim i in. (11) odnotowali tworzenie się trwalszej i grubszej warstwy CaCO_3 na powierzchni betonu zwykłego i lekkiego w obecności szczepu *B. sphaericus* w porównaniu ze szczepem *S. pasteurii*. Należy podkreślić, że skuteczność aplikacji roztworów bakterii i prekursorów reakcji w warunkach in-situ została potwierdzona przez Wiktor'a i Jonkers'a (12), którzy zaobserwowali wzrost odporności na zamrażanie/rozmrażanie oraz widoczne uszczelnienie spękanej posadzki garażu, co może być przesłanką do podejmowania dalszych badań w omawianym obszarze tematycznym, również pod kątem możliwości zastosowania nowoczesnych metod analitycznych do oceny stopnia zachodzenia procesów mikrobiologicznie indukowanego wytrącania węglanów.

Spektroskopia oscylacyjna, do której zalicza się spektroskopię w podczerwieni oraz spektroskopię Ramana, to potężne, uniwersalne narzędzie do identyfikacji i badania szerokiego spektrum związków chemicznych. Spektroskopia ramanowska opiera się na zjawisku polegającym na nieelastycznym rozpraszaniu promieniowania przez próbkę. W zarejestrowanym widmie analizuje się pasma odpowiadające oddziaływaniom cząsteczek znajdujących się w stanie podstawowym z promieniowaniem (13). Technika pomiarowa rozpraszania Ramana może okazać się przydatna w przypadku oceny samozaleczania materiałów cementowych, ponieważ umożliwia ona, między innymi poprzez zastosowanie różnych parametrów pomiarowych, badanie większości cech strukturalnych określających właściwości badanego materiału. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi (14) charakterystyczne pasma dla węglanów, typowych form krystalicznych powstających podczas zachodzenia procesów MICP, mogą zmieniać swoje właściwości spektralne wraz ze zmianą struktury uporządkowania i form polimorficznych. Dodatkową zaletą metody jest brak konieczności specjalnego przygotowania lub barwienia próbek poddawanych badaniu. Metoda ta jest uznawana za niedestrukcyjną, o ile dobierze się moc lasera, która nie powoduje miejscowego wypalania próbki oraz nie istnieje potrzeba osuszania próbek, gdyż woda nie zakłóca pomiarów. Ograniczeniem tej techniki analitycznej jest natomiast fluorescencja, która może utrudniać m.in. pomiar widm niektórych minerałów (15). Często stosowaną metodą jest obrazowanie ramanowskie [z ang. imaging], które opiera się na połączeniu dwóch technik analitycznych - spektroskopii ramanowskiej i mikroskopii. W tym podejściu pomiary mogą być prowadzone punktowo, co pozwala uzyskać widmo w miejscu pomiaru. Niemniej jednak obecnie powszechna staje się technika obrazowania, która umożliwia zebranie mapy widm wyznaczonego obszaru próbki oraz, przy użyciu algorytmów obróbki widm, różnicowanie obszaru próbki pod kątem rozmieszczenia wybranych składników i tym samym uzyskanie mapy dystrybucji poszczególnych składowych próbek (16).

Głównym celem badań omawianych w niniejszym artykule była

among other things, on the bacterial strain used to induce MICP processes. Kim et al. (11) noted the formation of a more durable and thicker CaCO_3 layer on the surface of plain and lightweight concrete in the presence of the *B. sphaericus* strain compared to the *S. pasteurii* strain. It is worth emphasizing that the effectiveness of in-situ application of bacterial solutions and reaction precursors has been confirmed by Wiktor and Jonkers (12), who observed an increase in freeze-thaw resistance and an apparent sealing of the cracked garage floor. This finding could be a premise for further research in discussed area, particularly regarding the applicability of modern analytical methods to assess the extent of microbiologically induced carbonate precipitation processes.

Vibrational spectroscopy, which includes infrared spectroscopy and Raman spectroscopy, is a powerful, versatile tool for identifying and studying a wide range of chemical compounds. Raman spectroscopy is based on the phenomenon of inelastic scattering of radiation within a sample. In the spectra, bands corresponding to the scattering of photons interacting with molecules are analysed (13). Raman scattering measurement might be useful for the assessment of the self-healing of cementitious materials as it enables, through the use of various measurement parameters, the examination of the structural features that determine the properties of the tested material. According to literature reports (14), the characteristic bands for carbonates, the typical crystalline forms created during MICP processes, may change their spectral properties as the structure and polymorphic forms change. An additional advantage of the method is no need for special preparation or staining of investigated samples. The method is considered non-destructive with properly chosen laser power. Moreover, there is no need to dry the samples, as water does not interfere with scattering, however, a limitation of this analytical technique is fluorescence, which can hinder the measurement of certain minerals (15). A frequently used approach is Raman imaging, which is based on a combination of Raman spectroscopy and microscopy. With this technique, measurements can be carried out point-wise to obtain a spectrum at a particular location matrix - map. Currently, imaging allows using spectral processing algorithms, to spectrally differentiate the distribution of selected compounds and thus obtain a distribution map of the individual sample components (16).

The main objective of this research was to evaluate the effectiveness of surface application of pastes prepared based on a mixture of bentonite and zeolite NaX impregnated with *Bacillus subtilis* spores and cementing solutions containing urea or calcium lactate. Evaluation of the effectiveness of the discussed processes was carried out based on image analysis of the treated samples and microstructure studies using XRD and Raman spectroscopy techniques.

2. Research materials and methods

2.1. Materials

In this study, the ability of endospores of *Bacillus subtilis* bacteria [at a concentration of 10^8 cfu/ml] to induce carbonate precipita-

ocena efektywności powierzchniowej aplikacji past przygotowanych na bazie mieszanki bentonitu i zeolitu NaX impregnowanego sporami bakterii *Bacillus subtilis* oraz roztworów cementujących zawierających mocznik lub mleczań wapnia. Ocena efektywności omawianych procesów została przeprowadzona na podstawie analizy obrazu zaleczonych próbek oraz badań mikrostruktury przy wykorzystaniu technik XRD i spektroskopii ramanowskiej.

2. Materiały i metody badawcze

2.1. Materiały

W pracy określono zdolność endospor bakterii *Bacillus subtilis* [w stężeniu 10^8 jtk/ml] do indukowania procesów wytrącania węglanów, a tym samym do zaleczania spękanych zapraw cementowych w obecności dwóch rodzajów roztworów cementujących, w skład których wchodziły: [I] mleczań wapnia 0,1 M, azotan wapnia 0,1 M i azotan magnezu 0,1 M oraz [II] mocznik 0,25 M, azotan wapnia 0,1 M i azotan magnezu 0,1 M.

Przygotowano 15 próbek zapraw cementowych o wymiarach $40 \times 40 \times 160$ mm o składzie mieszanki cement : piasek : woda : włókna polipropylenowe PP w stosunku masowym wynoszącym 1 : 3 : 0,5 : 0,005. Zastosowano cement CEM I 42,5 R o gęstości $3,07 \text{ g/cm}^3$ oraz lokalny piasek o gęstości $2,65 \text{ g/cm}^3$ i uziarnieniu 0,0 - 2,0 mm. Włókna PP zostały dodane do mieszanki, aby uniknąć zniszczenia próbki podczas procedury wytwarzania sztucznych spękań. Zaprawy po rozformowaniu dojrzewały w wodzie, w temperaturze 20 ± 2 °C.

Jako środki naprawcze aplikowane na powierzchnię spękanych zapraw cementowych stosowano roztwory bakterii i składników cementujących [prekursorów reakcji wytrącania węglanów] oraz zawiesinę zeolitu typu NaX i bentonitu w stosunku objętościowym odpowiednio 60 : 40. Zeolit typu NaX został wyprodukowany na Politechnice Lubelskiej w procesie syntezy zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Bandurę i in. (17), natomiast komercyjnie dostępny bentonit został dostarczony z kopalni zlokalizowanej na terenie Turcji [Karakaya Bentonite Inc., Karakaya, Reşadiye].

2.2. Metody badawcze

Wytrącanie osadów w warunkach kontrolowanych

W pierwszym etapie badań w celu określenia właściwości węglanów wytrączanych w procesie MICP przeprowadzono badania w warunkach kontrolowanych [bez kontaktu z zaprawą cementową]. Roztwory składników cementujących [oznaczone jako I i II oraz scharakteryzowane w podrozdziale 2.1] w ilości 50 ml przygotowano w 3 wariantach różniących się między sobą obecnością bakterii i/lub początkowym odczynem: [1] składniki cementujące bez bakterii po modyfikacji pH [pH = $11 \pm 0,1$], [2] składniki cementujące z bakteriami bez modyfikacji pH oraz [3] składniki cementujące z bakteriami po modyfikacji pH [pH = $11 \pm 0,1$]. Modyfikacja pH prowadzona była poprzez dodatek roztworu NaOH. Zwiększenie odczynu roztworu miało na celu symulację

tion processes and hence to heal cracked cement mortars was determined in the presence of two types of cementitious solutions consisting of: [I] calcium lactate 0.1 M, calcium nitrate 0.1 M and magnesium nitrate 0.1 M; and [II] urea 0.25 M, calcium nitrate 0.1 M and magnesium nitrate 0.1 M.

A total of 15 cement mortar specimens [$40 \times 40 \times 160$ mm] were prepared with a mixture composition of cement : fine sand : water : PP fibres in a mass ratio of 1 : 3 : 0.5 : 0.005. CEM I 42.5 R with a density of 3.07 g/cm^3 and local sand with a density of 2.65 g/cm^3 and a grain size of 0.0 - 2.0 mm were used. PP fibres were added to the mix to avoid destroying the sample during the artificial cracks formation procedure. After demoulding, the mortars were cured in water, at 20 ± 2 °C.

Solutions of bacteria and cementitious components [precursors of carbonate precipitation reactions] and a suspension of NaX-type zeolite and bentonite in a volume ratio of 60 : 40, respectively, were used as repair agents applied to the surface of cracked cement mortars. NaX-type zeolite was produced at the Lublin University of Technology by a synthesis process according to the procedure proposed by Bandura et al. (17), while commercially available bentonite was supplied from a mine located in Turkey [Karakaya Bentonite Inc., Karakaya, Reşadiye].

2.2. Research methods

Precipitation of sediments under controlled conditions

As a first step in the study, in order to characterise the carbonates precipitated during the MICP process, tests were carried out under controlled conditions [without contact with the cement mortar]. Cementing component solutions [labelled I and II and characterised in subsection 2.1] of 50 ml were prepared in 3 variants differing in the presence of bacteria and/or initial pH: [1] cementing components without bacteria after pH modification [pH = 11 ± 0.1], [2] cementing components with bacteria without pH modification and [3] cementing components with bacteria after pH modification [pH = 11 ± 0.1]. The pH modification was carried out by adding a NaOH solution. Increasing the pH of the solution was intended to simulate the alkaline environment of the cementitious composites matrix. Seven days after preparation, the solution was poured off the sediments in the tubes and the formed precipitates were washed three times with distilled water to remove the easily soluble crystalline forms. Then, after drying at 40 °C, the masses of the precipitated sediments were determined. For each variant, tests were performed in triplicate. Selected samples were subjected to phase composition analysis by X-ray diffraction using a Panalytical X'pert PRO ujnMPD X-ray diffractometer equipped with a copper lamp [$\text{CuK}\alpha = 1.54178 \text{ \AA}$]. Identification of mineral phases was based on the PDF-2 database (2010), formalised by JCPDS/ICDD.

Surface application of repair agents

In the next stage of the study, 28-day-old cement mortar specimens were subjected to a procedure of creating artificial cracks with a width of 0.3 - 0.4 mm by loading on a bending test machine accor-

zasadowego środowiska matrycy kompozytów cementowych. Po 7 dniach od przygotowania roztworów znad wytrąconych w próbkach osadów odlano roztwór, a następnie trzykrotnie płukano wytworzony osad wodą destylowaną w celu usunięcia łatwo rozpuszczalnych form krystalicznych. Następnie, po wysuszeniu w 40 °C, określono masę wytrąconych osadów. Dla każdego wariantu wykonano badania w trzech powtórzeniach. Wybrane próbki poddano analizie składu fazowego metodą dyfrakcji rentgenowskiej XRD przy użyciu dyfraktometru Panalytical X'pert PRO MPD X-ray wyposażonego w miedziową lampę [CuK α = 1.54178 Å]. Identyfikacja faz mineralnych została oparta na bazie danych PDF-2 (2010), sformalizowanej przez JCPDS/ICDD.

Powierzchniowa aplikacja środków naprawczych

W kolejnym etapie badań dojrzewające 28 dni próbki zapraw cementowych poddano obciążeniu w celu wytworzenia spękań o szerokości 0,3 – 0,4 mm poprzez obciążanie na maszynie wytrzymałościowej w układzie zginania zgodnie z metodologią opisaną w poprzedniej pracy autorów (18). Obszar dookoła rysy na powierzchni próbki, gdzie rysa była najszersza, uszczelniono silikonem sanitarnym, w celu wyodrębnienia powierzchni, na którą aplikowano powierzchniowe środki naprawcze. Dodatkowo, silikonem uszczelniono powierzchnie boczne próbek tak, aby uniemożliwić wyciekanie aplikowanych na powierzchnię środków. Środki naprawcze aplikowano na wyodrębniony obszar rysy w sekwencji podanej w Tab. 1, w 3 powtórzeniach dla każdej serii. Serie IA, IB, IIA, IIB różniły się między sobą zastosowanym źródłem węgla w roztworach cementujących [I – mleczan wapnia 0,1 M oraz II – mocznik 0,25 M] oraz stężeniem zawiesin [A i B]. Serię referencyjną stanowiły próbki leczone w wodzie wodociągowej, która została aplikowana w takich samych ilościach i powtórzeniach jak wszystkie roztwory naprawcze omówione w Tab. 1. Warunki te zostały zastosowane w celu symulacji standardowych warunków pielęgnacji kompozytów cementowych wodą wodociągową. Po zakończeniu aplikacji środków naprawczych próbki były pielęgnowane w temperaturze 20 ± 2 °C przez 28 dni. Po tym czasie próbki przełamano w miejscu spękania. Powierzchnie przełomu rys zaleczonych próbek zostały poddane analizie obrazu przy zastosowaniu mikroskopu optycznego Keyence VHX-7000 z obiektywem VHX-E20. Opierając się na narzędziach pomiarowych oprogramowania mikroskopu określono powierzchnię zajmowaną przez wytrącony osad jako procentowy udział w powierzchni całego obszaru przełomu. Na podstawie rozpoznania i zliczenia białych punktów osadów rozpoznanych przez oprogramowanie na obrazie całego przełomu otrzymano współczynnik obszaru [η], określający procentowy udział tych punktów na całej powierzchni skanu. Wartość średnią [η] dla każdej serii obliczono jako średnią arytmetyczną z pomiarów dla 3 powtórzeń.

Analiza spektroskopią ramanowską

W celu oceny efektywności procesów zaleczania rys wykorzystano mikrospektroskop ramanowski Witec alpha300 R [Witec GmbH, Ulm, Niemcy]. Badaniom poddano zarówno próbki osadów otrzymanych podczas badań w warunkach kontrolowanych, jak

ding to the methodology described in the authors' previous work (18). The widest section of the crack on the specimen's surface was sealed with sanitary silicone to isolate the area where surface repair agents were applied. In addition, silicone was used to seal the side surfaces of the specimens to prevent leakage of the surface-applied agents. The repair agents were applied to the isolated scratch area in the sequence given in Table 1, in 3 repetitions for each series. Series IA, IB, IIA, IIB differed in the carbon source used in the cementing solutions [I - calcium lactate 0.1 M and II - urea 0.25 M] and the concentration of the suspensions [A and B]. The reference series consisted of specimens treated in tap water, which was applied in the same quantities and repetitions as all the repair solutions discussed in Table 1. These conditions were used to simulate standard conditions for treating cementitious composites with tap water. After the application of the repair agents, the samples were cured at 20 ± 2 °C for 28 days. Then, the specimens were broken at the cracked area. The breakthrough surfaces of the healed specimens were subjected to image analysis using a Keyence VHX-7000 optical microscope with a VHX-E20 objective. Based on the measuring tools of the microscope software, the area occupied by the precipitate was determined as a percentage of the area of the entire fracture area. Based on the recognition and counting of the white sediment points by the software in the image of the entire breakthrough, an area factor [η], was obtained, indicating the percentage of these points in the entire scan area. The mean value [η] for each series was calculated as the arithmetic mean of the measurements for 3 repetitions.

Analysis by Raman spectroscopy

The Witec alpha300 R spectrometer [Witec GmbH, Ulm, Germany] was used to assess the effectiveness of the crack healing process. Both sediment samples obtained in controlled conditions and the fracture surfaces of the healed samples, in which precipitation was observed, were examined. The spectra were measured using a 532 nm wavelength laser with 4 mW excitation power, with an acquisition time of 5 s, and using a x20 magnification objective [Zeiss Neofluar, Jena, Germany], the Witec UHTS 300 spectrometer was equipped with a G2 diffraction grating 600 g/mm. Three line map measurements [20 spectra, 10 acquisitions] were made for each sample, in three areas: P1 - the upper part of the breakthrough near the surface of the cracked composite, P2 - the upper half of the sample where the precipitation was present, P3 - the lower half of the sample where the precipitation was present [Fig. 1] with a step of 10 μ m. The resulting spectral data were analysed using Project SIX software [6.1.10.135, Witec, Ulm, Germany] by averaging, removing cosmic rays and baseline correction using the 'polynomial' algorithm. Similarly, for the maps, randomly selected 200 μ m x 200 μ m areas were imaged from the P1 position of the breakthrough of healed surfaces using a 40 μ m step.

Etap Stage	Aplikowany roztwór / Applied solution		Odstęp pomiędzy aplikacją kolejnego etapu Interval between application of the next stage
	SERIA I / SERIES I	SERIA II / SERIES II	
1	Spory bakterii [10 ⁸ spor/ml] oraz roztwór składników cementujących* Bacterial spores [10 ⁸ spores/ml] and cementing components solution*		-
2	Woda wodociągowa / Tap water		1 dzień / 1 day
3	Zawiesina 50 : 1000 [masa mieszanki zeolitu i bentonitu : objętość roztworu spor bakterii i składników cementujących] Suspension 50 : 1000 [mass of zeolite and bentonite mixture : volume of solution of bacterial spores and cementing components]	Zawiesina 100 : 1000 [masa mieszanki zeolitu i bentonitu : objętość roztworu spor bakterii i składników cementujących] Suspension 100 : 1000 [mass of zeolite and bentonite mixture : volume of solution of bacterial spores and cementing components]	1 dzień / 1 day
4	Roztwór składników cementujących* / Cementing components solution*		1 dzień / 1 day
5	Zawiesina 100 : 1000 [masa mieszanki zeolitu i bentonitu : objętość roztworu spor bakterii i składników cementujących] Suspension 100 : 1000 [mass of zeolite and bentonite mixture : volume of solution of bacterial spores and cementing components]	Zawiesina 100 : 1000 [masa mieszanki zeolitu i bentonitu : objętość roztworu spor bakterii i składników cementujących] Suspension 100 : 1000 [mass of zeolite and bentonite mixture : volume of solution of bacterial spores and cementing components]	2 dni / 2 days
6	Roztwór składników cementujących* / Cementing components solution*		1 dzień / 1 day
7	Roztwór składników cementujących* / Cementing components solution*		2 dni (powtórzone 3 krotnie co 2 dni) / 2 days (repeated 3 times every 2 days)

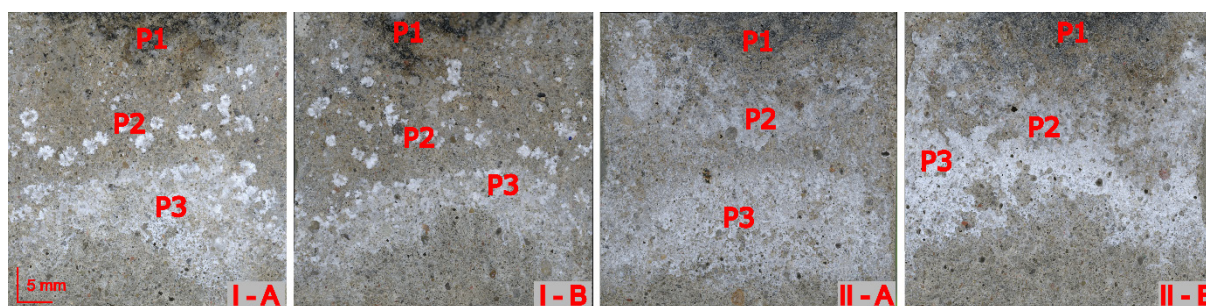
* Dwa warianty roztworów składników cementujących: w serii I - mleczan wapnia 0.1 M, azotan wapnia 0.1 M, azotan magnezu 0.1 M; w serii II - mocznik 0.25 M, azotan wapnia 0.1 M, azotan magnezu 0.1 M / Two variants of cementing component solutions: in series I - calcium lactate 0.1 M, calcium nitrate 0.1 M, magnesium nitrate 0.1 M; in series II - urea 0.25 M, calcium nitrate 0.1 M, magnesium nitrate 0.1 M

i powierzchni przełomu rys zaleczonych próbek, w których zaobserwowano wytrącenie białych osadów w przełomie zaleczonych rys. Pomiar widm wykonano z użyciem lasera ze wzbudzeniem długości fali 532 nm o mocy 4 mW przy założeniu czasu akwizycji równego 5 s i z użyciem obiektywu o powiększeniu 20x [Zeiss Neofluar, Jena, Niemcy], spektrometr Witec UHTS 300 był wyposażony w siatkę dyfrakcyjną G2: 600 g/mm. Następnie dla każdej próbki wykonano trzy pomiary map liniowych [20 widm, 10 akwizycji], w trzech obszarach: P1 - górna części przełomu przy powierzchni spękanego kompozytu, P2 - górna połowa próbki w miejscu występowania wytrąconego osadu, P3 - dolna połowa próbki w miejscu występowania wytrąconego osadu [rys. 1] z krokiem 10 µm.

3. Results and discussion

3.1. Precipitation of sediments under controlled conditions

Determination of the theoretical mass of sediments under controlled conditions [Fig. 2] allowed verification of the ability of the *Bacillus Subtilis* bacterial strain to induce carbonate precipitation in the presence of two carbon source compounds [calcium lactate or urea]. The study showed that modification of the cementing components solution pH resulted in precipitates weighing as much as 250.3 mg for the series with calcium lactate and 289.3 mg for



Rys. 1. Schemat wyodrębnionych obszarów pomiarowych w przełomach rys

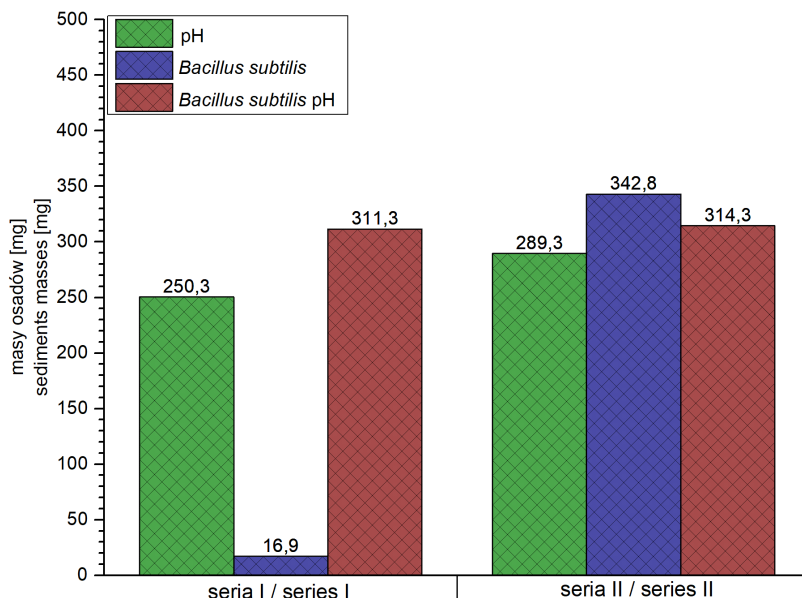
Fig. 1. Schematic diagram of the isolated measurement areas in breakthroughs of cracks

Uzyskane dane spektralne zostały przeanalizowane z użyciem oprogramowania Project SIX [6.1.10.135, Witec, Ulm, Niemcy] poprzez uśrednienie, usunięcie promieniowania kosmicznego i korekcję linii bazowej z użyciem algorytmu „polynomial”. Podobnie w przypadku map wykonano obrazowanie wybranych losowo obszarów 200 μm x 200 μm z pozycji P1 przelomu zaleczonych rys stosując krok 40 μm .

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Wytrącanie osadów w warunkach kontrolowanych

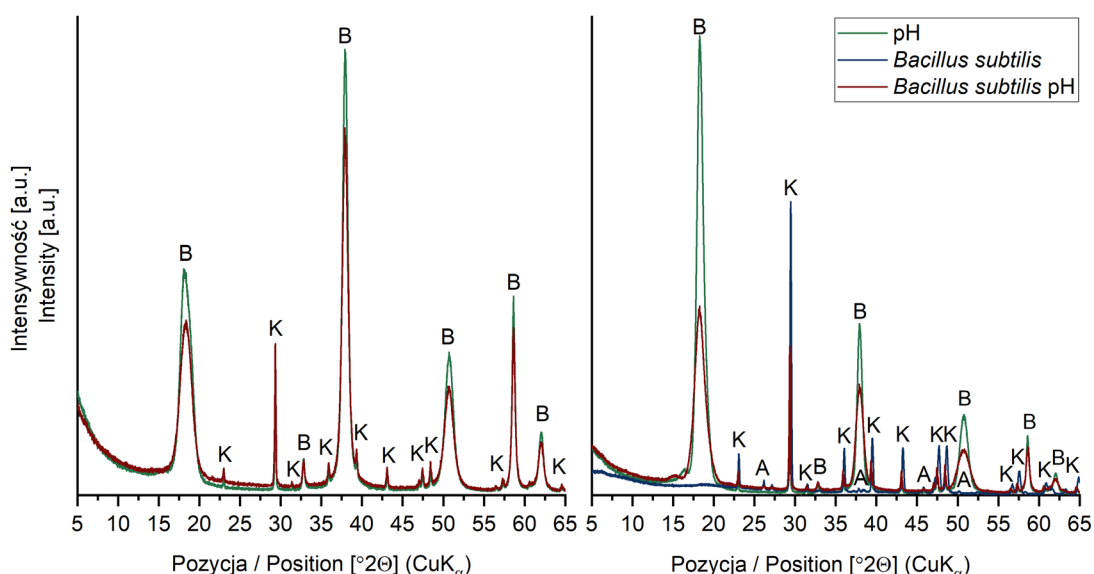
Określenie teoretycznej masy wytrąconych osadów w warunkach kontrolowanych [rys. 2] pozwoliło na weryfikację zdolności indukowania wytrącania węglanów przez szczep bakterii *Bacillus Subtilis* w obecności dwóch związków będących źródłem węgla [mleczanu wapnia lub mocznika]. Badanie pokazało, że sama modyfikacja pH roztworu składników cementujących skutkowałą wytrąceniem osadu o masie aż 250,3 mg dla serii z mleczanem wapnia oraz 289,3 mg dla serii z mocznikiem. Znacznie większe różnice w masie wytrąconych osadów zanotowano dla serii roztworów o niemodyfikowanym pH z dodatkiem bakterii *Bacillus subtilis* – odpowiednio 16,9 mg oraz 342,8 mg [rys. 2]. Świadczyć to może o abiotycznym charakterze wytrącania osadów bądź krystalizacji zastosowanych związków chemicznych w warunkach podwyższonego odczynu roztworu oraz o niskiej efektywności procesu mikrobiologicznego wytrącania węglanów potwierdzonej stosunkowo niewielką masą osadu pochodzącego z roztworu o niemodyfikowanym pH dla wariantu z mleczanem wapnia jako źródła



Rys. 2. Masy osadów [mg] wytrąconych w warunkach kontrolowanych dla dwóch serii roztworów cementujących: I – mleczan wapnia 0,1 M, azotan wapnia 0,1 M, azotan magnezu 0,1 M, II – mocznik 0,25 M, azotan wapnia 0,1 M, azotan magnezu 0,1 M [wartości średnie z trzech powtórzeń]

Fig. 2. Sediments masses [mg] precipitated under controlled conditions for two series of cementing solutions: I - calcium lactate 0.1 M, calcium nitrate 0.1 M, magnesium nitrate 0.1 M, II - urea 0.25 M, calcium nitrate 0.1 M, magnesium nitrate 0.1 M [average values from three replicates]

the series with urea. Significantly greater differences in precipitated sediments masses were observed for the series of solutions with unmodified pH with the addition of *Bacillus subtilis* bacteria - 16.9 mg and 342.8 mg, respectively [Fig. 2]. This may indicate the abiotic nature of the precipitation or crystallisation of the chemical compounds used under conditions of increased solution pH and the low efficiency of the microbial process of carbonate precipitation,



Rys. 3. Skład fazowy osadów wytrąconych w warunkach kontrolowanych dla serii I [warianty 1 i 3] oraz serii II [warianty 1, 2, 3], K – kalcyt, A – aragonit, B - brucyt

Fig. 3. Phase composition of sediments precipitated under controlled conditions for series I [variants 1 and 3] and series II [variants 1, 2, 3], K – calcite, A – aragonite, B - brucite

dłem węgla. W środowisku o zwiększonym odczynie w obecności bakterii intensywność procesów wytrącania była największa [rys. 2], co mogło być efektem jednoczesnego zachodzenia procesów wytrącania indukowanych [1] aktywnością mikroorganizmów oraz [2] modyfikacją pH. Należy podkreślić, że zastosowanie mocznika jako składnika roztworu cementującego [seria II] zwiększyło intensywność wytrącania osadów dla wariantu tylko z dodatkiem bakterii [rys. 2]. Pomimo że modyfikacja pH nieco zmniejszyła masę uzyskanego osadu, można wnioskować, że wytrącanie węglanów indukowane aktywnością szczepu *Bacillus subtilis* było efektywniejsze dla serii zawierających mocznik.

Dyfraktogramy rentgenowskie osadów wytrąconych w warunkach kontrolowanych przedstawiono na rys. 3. Analizie poddano warianty obu serii poza wariantem z dodatkiem *Bacillus subtilis* [2] serii I [z mleczanem wapnia], ponieważ dla tej serii otrzymano niewystarczającą masę wytrąconych osadów. Badanie potwierdziło występowanie form krystalicznych węglanu wapnia [kalcytu i aragonitu] oraz form pochodzących od związków magnezowych [brucytu]. Najczęściej zidentyfikowaną formą węglanu wapnia był kalcyt [$d_{hkl} = 3,03 \text{ \AA}, 2,28 \text{ \AA}, 2,09 \text{ \AA}$], który dla wszystkich analizowanych wariantów charakteryzował się wysoką intensywnością refleksów. Dla serii II [z mocznikiem] zanotowano, obok kalcytu, również aragonit [$d_{hkl} = 3,37 \text{ \AA}, 1,99 \text{ \AA}, 3,27 \text{ \AA}$] stanowiący mniej stabilną/przejściową formę tego węglanu wapnia (19). W obu analizowanych seriach stwierdzono występowanie brucytu [$d_{hkl} = 2,36 \text{ \AA}, 4,77 \text{ \AA}, 1,79 \text{ \AA}$], który wytrącał się jednak jedynie w środowisku o zwiększonym odczynie pH. Można więc wnioskować, że jego obecność była w większym stopniu skutkiem intensyfikacji wytrącania przy zwiększonym pH. Potwierdzać to może stwierdzona dla serii I mała efektywność wytrącania osadów dla wariantu z dodatkiem bakterii bez modyfikacji pH.

3.2. Powierzchniowa aplikacja środków naprawczych

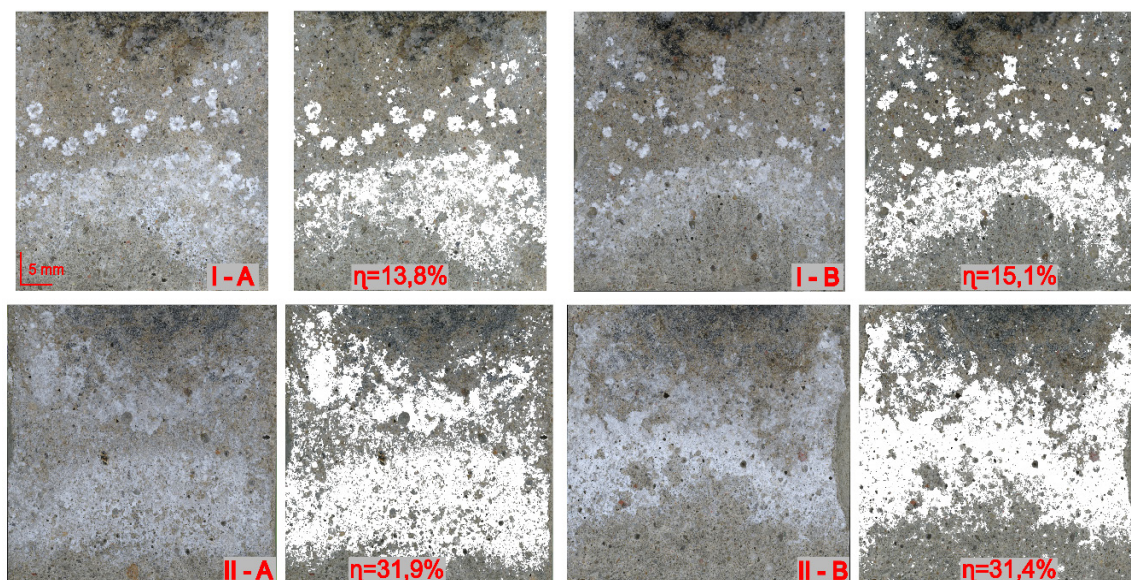
Na rys. 4 zaprezentowano obraz przełamów beleczek zapraw cementowych po procesie leczenia pastami naprawczymi, odpowiednio dla serii IA, IB, IIA oraz IIB, wraz z wyodrębnioną powierzchnią przełamu próbki zajętej przez wytrącone w procesie leczenia osady. Przełamy próbek po okresie leczenia zostały poddane ocenie makroskopowej, na podstawie której stwierdzono brak osadów w serii referencyjnej. Ze względu na brak wytrąconych osadów próbki te nie były poddane analizie stopnia pokrycia przełamu spękania wytrąconymi w procesie naprawy produktami reakcji. Ponadto zauważono, że dla próbek leczonych biologicznymi środkami naprawczymi stopień pokrycia przełomu rys wytrąconymi osadami i wygląd samych osadów były bardzo podobne w obrębie każdej serii. W związku z tym, przedstawione na rys. 4 skany prezentują tylko po 1 próbce z każdego wariantu. Na próbkach serii I [mleczan wapnia jako źródło węgla] odnotowano mniejszą powierzchnię wytrąconych osadów w porównaniu do serii II [mocznik jako źródło węgla]. Osady były widoczne głównie w dolnej połowie przełamów, natomiast w górnej połowie zaobserwowano punktową lokalizację osadów, których wygląd przypominał kryształy mleczanu wapnia, a nie węglanów mogących być produktem procesów mikrobiologicznych. Obserwacje te są

confirmed by the relatively low mass of the precipitate coming from the solution with unmodified pH for the variant with calcium lactate as the carbon source. In the enhanced pH environment and the presence of bacteria, the intensity of precipitation processes was the highest [Fig. 2], which could be due to the simultaneous occurrence of precipitation processes induced [1] by microbial activity and [2] by pH modification. Notably, the use of urea as a component of the cementing solution [series II] increased the intensity of sediment precipitation for the variant with only the addition of bacteria [Fig. 2]. Although the pH modification slightly reduced the weight of obtained sediments, it can be concluded that carbonate precipitation induced by the activity of the *Bacillus subtilis* strain was more effective for the series containing urea.

X-ray diffractograms of the sediments precipitated under controlled conditions are shown in Fig. 3. Variants of both series were analysed, except for the variant with *Bacillus subtilis* [2] of series I [with calcium lactate], because insufficient precipitated mass was obtained for this one. The study confirmed the presence of crystalline forms of calcium carbonate [calcite and aragonite] and forms derived from magnesium compounds [brucite]. The most commonly identified form of calcium carbonate was calcite [$d_{hkl} = 3,03 \text{ \AA}, 2,28 \text{ \AA}, 2,09 \text{ \AA}$], which was characterised by high reflection intensity for all analysed variants. For series II [with urea], in addition to calcite, aragonite [$d_{hkl} = 3,37 \text{ \AA}, 1,99 \text{ \AA}, 3,27 \text{ \AA}$] was also observed, representing a less stable or transitional form of this mineral (19). The presence of brucite [$d_{hkl} = 2,36 \text{ \AA}, 4,77 \text{ \AA}, 1,79 \text{ \AA}$], was observed in both analysed series, but it precipitated only in increased pH environments. Therefore, it can be inferred that its presence was largely a result of intensified precipitation at increased pH. This can be confirmed by the low sediment precipitation efficiency observed for series I for the variant with the addition of bacteria without pH modification.

3.2. Surface application of repair agents

Fig. 4 presents an overview of the breakthrough of the cement mortar beams after treatment with the repair pastes, for series IA, IB, IIA and IIB, respectively, together with an isolated surface of the sample breakthrough occupied by the sediments precipitated during the treatment process. The sample breakthroughs after the treatment period were subjected to macroscopic evaluation, from which the absence of precipitates in the reference series was determined. Due to the absence of precipitates, these samples were not analysed for the degree of coverage of the crack breakthrough by reaction products precipitated during the repair process. Furthermore, it was observed that for the samples treated with biological repair agents, the degree of crack breakthrough coverage by precipitates and the appearance of the precipitates themselves were very similar within each series. Therefore, the scans shown in Fig. 4 present only 1 sample from each variant. Samples from series I [calcium lactate as carbon source] showed a smaller area of precipitates compared to series II [urea as carbon source]. The precipitates were mainly visible in the lower half of the breakthroughs, while in the upper half a pinpoint location of precipitates was observed, the appearance of which resembled



Rys. 4. Obrazy przełamów spękań po aplikacji past naprawczych wraz ze średnią wartością stopnia zaleczenia powierzchni przełomu [η]

Fig. 4. Images of crack fractures after the application of repair agents, together with the average value of the degree of healing of the breakthrough surface [η]

zgodne z mniejszą efektywnością procesu MICP odnotowaną w badaniach prowadzonych w warunkach kontrolowanych w obecności mleczanu wapnia dla serii z dodatkiem bakterii bez modyfikacji pH. Pomimo że efektywność wytrącania węglanów przy zastosowaniu mleczanu wapnia została wielokrotnie potwierdzona w literaturze (20–22), brak jest szeroko omówionego wpływu poszczególnych czynników determinujących analizowany proces [m.in. środowisko matrycy cementowej, typ stosowanych bakterii], co z kolei może prowadzić do mylnego przypisania efektywności procesu samym mikroorganizmom, a nie np. wytrącania związków chemicznych obecnych w roztworze cementującym. Przełamy próbek serii II miały około dwukrotnie większy stopień pokrycia wytrąconymi osadami, równomiernie rozmieszczonymi na całej powierzchni przełamu. Ponadto zaobserwowano, że stężenie aplikowanej zawiesiny [50 : 1000 lub 100 : 1000] nie wpłynęło na efektywność transportu mikroorganizmów oraz składników cementujących w głąb rysy, ponieważ stopień pokrycia powierzchni osadem był podobny dla wariantów A i B obu serii [I i II]. Z tego względu można również wnioskować, że materiały w zawiesinach [zeolit oraz bentonit] stanowiły głównie wypełnienie górnej części przełamu rysy, natomiast osad obserwowany na większych głębokościach przełamu powstał na skutek aktywności mikroorganizmów oraz obecności składników cementujących transportowanych grawitacyjnie do wnętrza rysy wraz z aplikowanymi roztworami. Pomimo braku widocznych osadów węglanowych przy górnej powierzchni spękań, aplikacja roztworów naprawczych i zawiesin materiałów [w tym przypadku zeolitu oraz bentonitu], wydaje się być efektywną metodą pozwalającą na jednoczesne uszczelnienie przypowierzchniowej warstwy rysy materiałami porowatymi oraz wypełnienie rysy na większych głębokościach kryształami uformowanymi w wyniku abiotycznych i biotycznych procesów wytrącania.

calcium lactate crystals rather than carbonates that could be a product of microbiological processes. These observations are consistent with the lower efficiency of the MICP process recorded in studies conducted under controlled conditions in the presence of calcium lactate for the series with the addition of bacteria without pH modification. Although the efficiency of carbonate precipitation using calcium lactate has been repeatedly confirmed in the literature (20–22), the influence of the various factors determining the process analysed [e.g. the environment of the cement matrix, the type of bacteria used] is not widely discussed, which in turn may lead to a misleading attribution of the efficiency of the process to the microorganisms themselves, rather than, for example, to the precipitation of chemical compounds present in the cementing solution. The breakthroughs of the series II samples were characterised by approximately twice the degree of coverage with precipitated sediments, evenly distributed over the entire breakthrough surface. Furthermore, it was observed that the concentration of the applied suspension [50 : 1000 or 100 : 1000] did not affect the efficiency of transport of microorganisms and cementing components deep into the crack, as the degree of sediment coverage was similar for variants A and B of both series [I and II]. Therefore, it can also be deduced that the materials in suspensions [zeolite and bentonite] were mainly filling the upper part of the crack fracture, while the sediment observed at larger depths of the fracture formed as a result of microbial activity and the presence of cementing components transported by gravity into the crack with the applied solutions. Despite the lack of visible carbonate deposits near the upper surface of the cracks, the application of repair solutions and material suspensions [in this case zeolite and bentonite], appears to be an effective method to simultaneously seal the near-surface layer of the crack with porous materials and fill the crack at greater depths with crystals formed by abiotic and biotic precipitation processes.

3.3. Analiza spektroskopią ramanowską

Najważniejszym pasmem zarejestrowanym w widmach ramanowskich osadu wytrąconego w warunkach kontrolowanych [rys. 5] przypisano rodzaj drgań wraz z grupami chemicznymi [tab. 2]. W analizowanych próbkach wykryto zarówno część nieorganiczną, jak i organiczną [drgania rozciągające C=O oraz C≡N], co świadczy o obecności pozostałości komórek i spor bakteryjnych *Bacillus subtilis* oraz w konsekwencji o aktywności tych bakterii. Zarejestrowano również maleimid, który jest związkiem chemicznym o wzorze $H_2C_2(CO)_2NH$ będącym ważnym budulcem w syntezie organicznej. Dodatkowo, różnorodne rodzaje drgań przypisane węglanom $(CO_3)^{2-}$ dowodzą efektywnego przebiegu procesu MICP. Prawdopodobnie $CaCO_3$ oraz drgania węglanowe oznaczają występowanie form krystalicznych, takich jak kalcyt i jego polimorfy – rombowy aragonit i heksagonalny wateryt. W próbkach zaobserwowano także glinokrzemiany, w formie minerałów skaleni [anortyt].

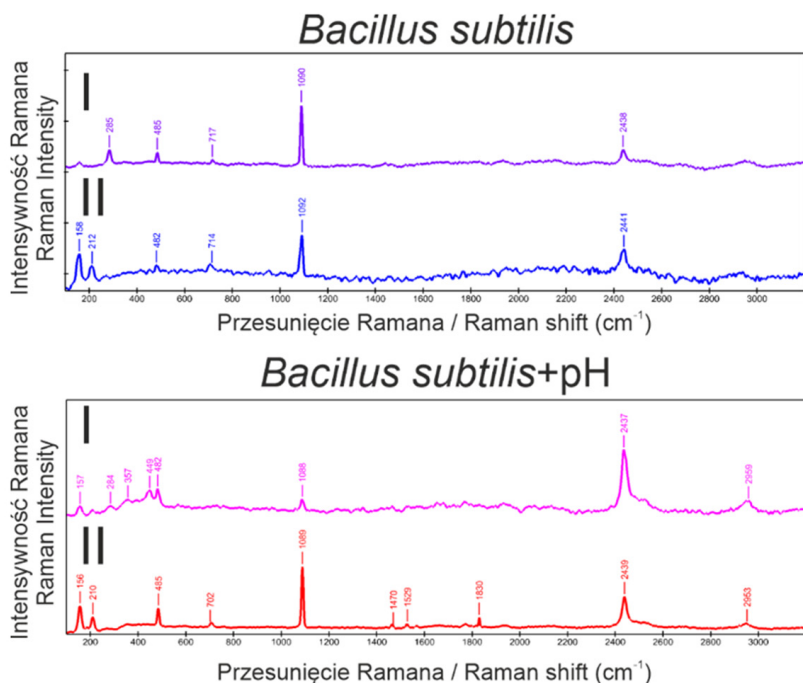
Spektroskopia Ramana została następnie wykorzystana do analizy przekroju rysy w przełamanych beleczkach zapraw cementowych. Wykonane pomiary w pozycjach P1, P2 i P3 przedstawiono na rys. 6. Badany materiał, analizowany w kontekście różnic składu chemicznego, wykazał interesującą zależność sygnału ramanowskiego w poszczególnych warstwach pomiaru. Najwyższą intensywność pasm materii nieorganicznej i organicznej w stosunku do szumu zaobserwowano w górnej części przełamu przy powierzchni spękanego kompozytu [P1], natomiast stosunek sygnału do szumu [S/N] był najniższy w przypadku uśrednionych widm wykonanych w dolnej połowie próbki [linie zielone], co objawiało się zwiększoną fluorescencją oraz obniżeniem stosunku S/N (36–38).

W widmach uzyskanych dla górnej części przełamu przy powierzchni spękanego kompozytu [P1] w beleczce IIA w odróżnieniu od pozycji P2 zaobserwowano wyraźne piki w zakresie $1200-1800\text{ cm}^{-1}$ przypisywane komponente organicznej, pochodzącej od amidów I-III oraz grup węglowodanowych (39). Ponadto, na podstawie widm otrzymanych z pomiaru beleczek można stwierdzić, że w każdym przypadku są obserwowane pasma 486 cm^{-1} , przypisane anortytowi. Najmniej pasm zaobserwowano w centrum beleczki [pozycja P2]. Dla tego obszaru zaobserwowano pasmo 2439 cm^{-1} odpowiadające Si-H [występuje ono w każdej próbce z delikatnym przesunięciem] oraz 3655 cm^{-1} charakterystyczne dla brucytu. Widma dla obszaru P3 bardziej przypominają widma uzyskane dla obszaru pęknięcia, co świadczy o występowaniu w tym obszarze związków w postaci wytrąconego przez bakterie azotanu oraz mocznika. Pasma charakterystyczne dla zeolitów, w zakresie $600-500\text{ cm}^{-1}$, widoczne jest jedynie dla próbki z serii IA [rys. 6A]. Jak podają Gil i in. (40), pasmo to może być również wykorzystywane do oceny krystaliczności. Zgodnie z danymi literaturowymi (41) charakterystycznymi pasmami dla krzemianów są 1006 cm^{-1} [brak tego piku w zmierzonych widmach], 726 cm^{-1} [pik 709 cm^{-1}

3.3. Analysis by Raman spectroscopy

The most important bands in the Raman spectra of the sediments precipitated under controlled conditions [Fig. 5] were assigned with a type of chemical group vibration [Table 2]. Both inorganic and organic parts [C=O and C≡N stretching vibrations] were identified in the analysed samples, indicating the presence of residual *Bacillus subtilis* cells and spores and, consequently, the activity of these bacteria. The presence of maleimide with the molecular formula $H_2C_2(CO)_2NH$ as an important building block in organic synthesis was observed. In addition, the various types of vibrations attributed to $(CO_3)^{2-}$ carbonates demonstrate the efficient occurrence of the MICP process. Presumably, $CaCO_3$ and carbonate vibrations imply the presence of crystalline forms such as calcite and its polymorphs - rhombohedral aragonite and hexagonal vaterite. Aluminosilicates were also observed in the samples, in the form of feldspar minerals [anorthite].

Raman spectroscopy was furtherly used to analyse the crack cross-section of cement mortar samples. The results of measurements carried out at positions P1, P2 and P3 are shown in Fig. 6. In the context of differences in chemical composition, the tested material showed an interesting relation of the Raman signal in the different depths. The highest intensity of inorganic and organic matter peaks relative to noise was observed in the upper part of the breakthrough, near the surface of the cracked composite [P1], while the signal-to-noise [S/N] ratio was lowest for the spectra



Rys. 5. Widma ramanowskie osadów wytrąconych w warunkach kontrolowanych w obecności I - mleczanu wapnia, azotanów wapnia i magnezu oraz bakterii *Bacillus subtilis* w niezmodyfikowanym [fioletowy] i zmodyfikowanym pH [różowy] oraz II - mocznika, azotanów wapnia i magnezu oraz bakterii *Bacillus subtilis* w niezmodyfikowanym [niebieski] i zmodyfikowanym pH [czerwony]

Fig. 5. Raman spectra of the sediments precipitated under controlled conditions in the presence of I - calcium lactate, calcium and magnesium nitrates and *Bacillus subtilis* bacteria at unmodified [violet] and modified pH [pink] and II - urea, calcium and magnesium nitrates and *Bacillus subtilis* bacteria at unmodified [blue] and modified pH [red]

Tablica 2 / Table 2

NAJISTOTNIEJSZE PASMA REJESTROWANE W WIDMACH RAMANOWSKICH OSADÓW WRAZ Z RODZAJAMI DRGAŃ Z PRZYPISANYMI POSZCZEGÓLNYMI ZWIĄZKAMI

THE MOST SIGNIFICANT BANDS RECORDED IN THE RAMAN SPECTRA OF THE SEDIMENTS, WITH THE ASSIGNED COMPOUNDS VIBRATION

Przesunięcie Ramana / cm ⁻¹ / Raman shift / cm ⁻¹				Rodzaj wibracji wraz z przypisaniem Type of vibration and assignment
Seria I wariant 2 Series I variant 2	Seria I wariant 3 Series I variant 3	Seria II wariant 2 Series II variant 2	Seria II wariant 3 Series II variant 3	
-	158	157	157	Na ₃ Mg(PO ₄)(CO ₃) (23), aragonit / aragonite (24)
-	-	-	210	v _s (OH...O) (25)
285	285	284	286	v _{as} CaCO ₃ , kalcyt / calcite (26)
-	-	448	-	vSiO, vFe-CN (27)
486	485	485	485	CaAl ₂ Si ₂ O ₈ (28)
659	-	-	-	podwójnie zdegenerowane δ _{as} w płaszczyźnie (CO ₃) ²⁻ / double degenerate δ _{as} in the (CO ₃) ²⁻ plane (29), CaO (30)
-	716	716	-	δ _{as} (CO ₃) ²⁻ , kalcyt, δ C-O-C (29)
1090	1090	1090	1090	niezdegenerowane v _{as} / non-degenerate v _{as} (CO ₃) ²⁻ , wateryt / vaterite (29)
-	-	1465	1465	v _s (C=C) (31)
-	-	1528	1528	va _s (C=C) (31)
-	-	-	1772	v _s (C=O), H ₂ C ₂ (CO) ₂ NH (32)
-	-	-	1830	v C=O (33)
-	-	2318	-	v (C≡N) (33)
2437	2440	2439	2439	Si-H (34)
2951	-	2951	2951	v _s i va _s (C-H) (31)
3655	3655	3654	-	brucyt / brucite, vMg(OH) ₂ (35)

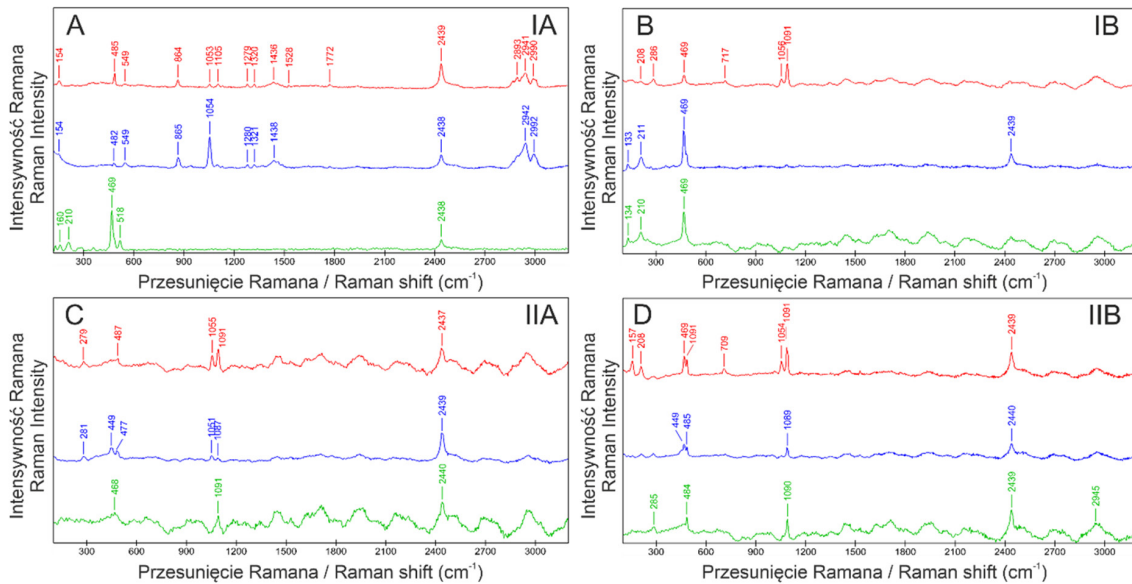
v – drgania rozciągające, δ – drgania zginające [deformacyjne], s – symetryczne, as – asymetryczne / v – stretching vibrations, δ – bending [deformational] vibrations, s – symmetrical, as – asymmetrical

na rys. 6C oraz 718 cm⁻¹ na rys. 6B - tylko w obszarach P1], 670 cm⁻¹ [brak tego pasma w zmierzonych widmach], 555 cm⁻¹ rys. 6A 548 cm⁻¹ - w obszarze P1 i P2], 468 cm⁻¹ [rys. 6B 469 cm⁻¹ - P3 i 470 cm⁻¹ - P1 i P2] oraz 377 cm⁻¹ [rys. 6A - przesunięcie w kierunku 358 cm⁻¹ - P2 i P3]. Detekcja wyżej wymienionych związków świadczy o występowaniu krzemianów w próbkach przy stosunkowo niewielkiej zawartości związków zawierających glin. Niektórzy badacze zanotowali występowanie w mikrostrukturze kompozytu cementowanego po hydratacji fazę C-S-H, dla której charakterystyczne są pasma ramanowskie przy ~ 130 i ~ 670 cm⁻¹. Jednak w przypadku badanych mikrobiologicznych procesów naprawczych pasma te nie występowały, co wskazuje na inny mechanizm zaleczania rys niż poprzez formowanie fazy C-S-H (42). Nie zarejestrowano także występowania wodorotlenku wapnia Ca(OH)₂, któremu przypisane są pasma 260 cm⁻¹, 359 cm⁻¹ i 3620 cm⁻¹ oraz szerokie pasmo przy 684 cm⁻¹, natomiast zidentyfikowano tlenek wapnia CaO z typowym pasmem przy 658 cm⁻¹ (30) w serii I wariantu II.

Charakterystycznymi pasmami dla bentonitu są te zlokalizowane przy 3625, 1638, 916, 785, 710, 430 i 200 cm⁻¹ jednak w przypadku zastosowanego lasera o długości fali 532 nm są one niskiej intensywności i nie zostały zidentyfikowane (43, 44). Brak obecności pasm dotyczy zarówno uśrednionych widm punktów [rys. 6], jak i widm osadów na rys. 8. W tym ostatnim przypadku ostatniego pasmo 710 cm⁻¹ jest wprawdzie obecne, jednak przypisanie należy do kalcytu (45).

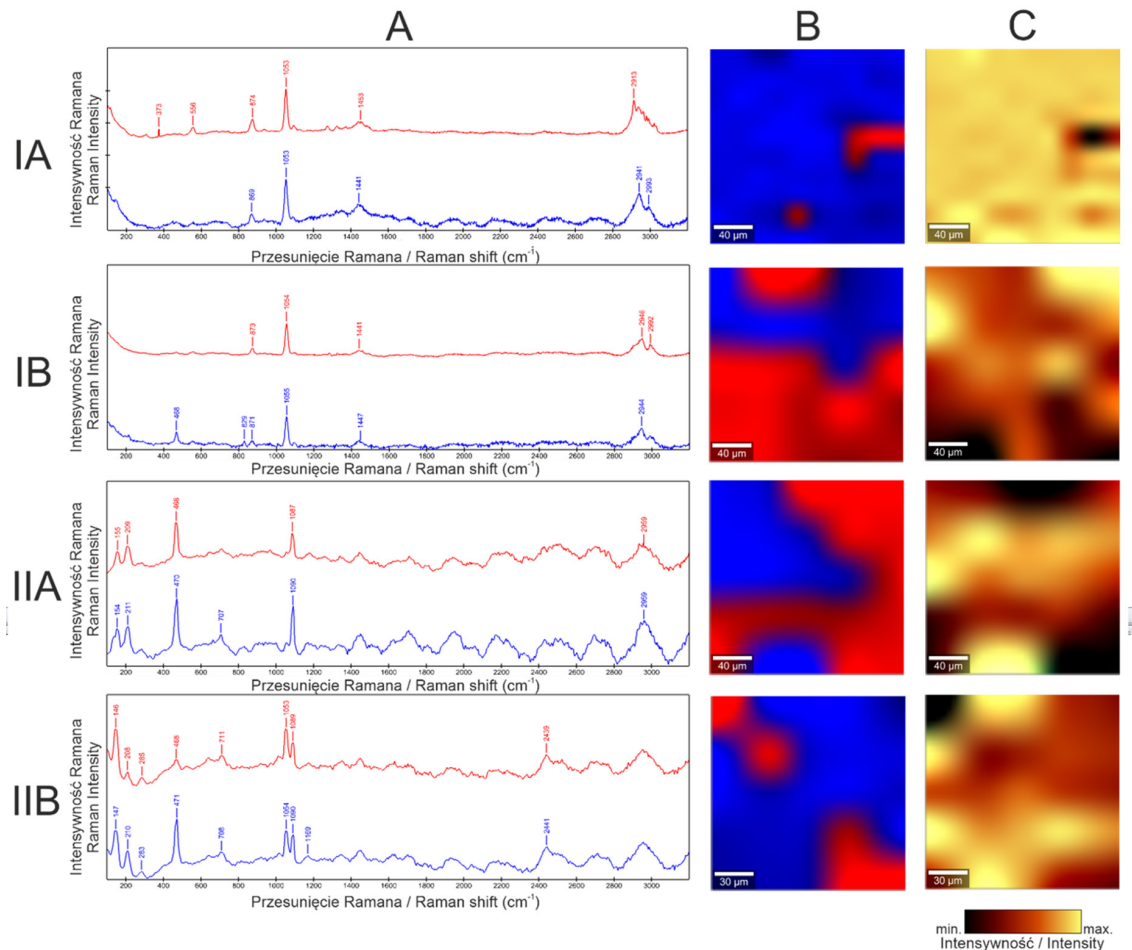
recorded in the lower layers of the sample [green lines], which was manifested by an increased fluorescence and a decrease in the S/N ratio (36–38).

In the spectra obtained for the upper part of the surface near to the crack [P1], distinct bands in the 1200–1800 cm⁻¹ range attributed to the organic component, derived from amides I-III and carbohydrate groups, were observed in sample IIA in contrast to the P2 position (39). Furthermore, bands of 486 cm⁻¹, attributed to anorthite, were noted in each case. The fewest bands were observed in the centre of the sample [position P2]. For this area, a band of 2439 cm⁻¹ corresponding to Si-H was observed [it is present in each sample with a slight shift] and 3655 cm⁻¹ characteristic of brucite. The spectra for the P3 area resemble those obtained for the upper crack area, indicating the presence of organic compounds in the area in the form of nitrate and urea precipitated by bacteria. The band characteristic of zeolites, in the range of 600–500 cm⁻¹, is only visible for the IA sample [Fig. 6A]. As reported by Gil et al. (40), this band can be used to assess crystallinity. According to the literature (41), the characteristic bands for silicates are 1006 cm⁻¹ [however, this peak was not observed in the measured spectra], 726 cm⁻¹ [peak 709 cm⁻¹ in Fig. 6C and 718 cm⁻¹ Fig. 6B - in P1 areas only], 670 cm⁻¹ [not observed in measured spectra], 555 cm⁻¹ [Fig. 6A 548 cm⁻¹ - in P1 and P2 areas], 468 cm⁻¹ [Fig. 6B 469 cm⁻¹ - P3 and 470 cm⁻¹ - P1 i P2] and 377 cm⁻¹ [Fig. 6A - shift towards 358 cm⁻¹ - P2 and P3]. The detection of the above-mentioned compounds



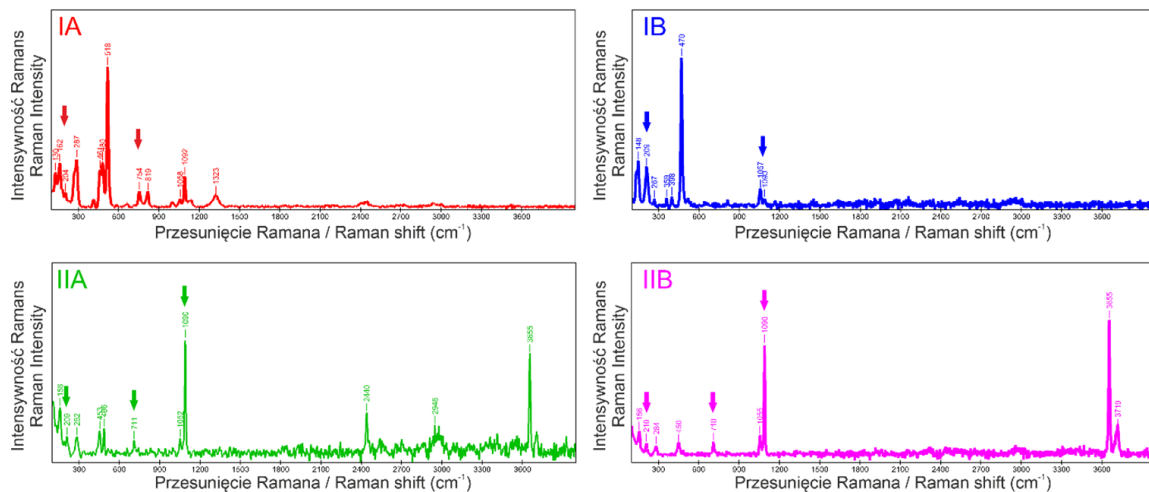
Rys. 6. Uśrednione widma z obszarów pęknięcia z pozycji P1 [linia czerwona], P2 [linia niebieska] i P3 [linia zielona] próbek IA [A], IB [B], IIA [C] i IIB [D]. Intensywność znormalizowana do najwyższego pasma

Fig. 6. Averaged spectra from the fracture areas from positions P1 [red line], P2 [blue line] and P3 [green line] of samples IA [A], IB [B], IIA [C] and IIB [D]. Intensity normalised to the highest band



Rys. 7. Mapy ramanowskie z obszarów zaleczonego pęknięcia analizowanych próbek, [A] Widma dwóch głównych składowych z analizy map techniką TrueMatch, [B] mapy dystrybucji przestrzennej dwóch głównych składników chemicznych [kolory na mapie odpowiadają kolorom widm w kolumnie A], [C] mapa dystrybucji osadów wytrąconych w warunkach kontrolowanych w obecności mleczanu wapnia lub mocznika – analiza nadzorowana z użyciem widm wytrąconych osadów zaprezentowanych na rysunku 5

Fig. 7. Raman maps from areas of healed fracture of the analysed samples, [A] spectra of the two principal components from map analysis using the TrueMatch technique, [B] maps of the spatial distribution of the two main chemical components [colours on the map correspond to the colours of the spectra in column A], [C] map of the distribution of precipitates precipitated under controlled conditions in the presence of calcium lactate or urea - supervised analysis using the spectra of precipitates precipitated presented in Figure 5



Rys. 8. Widma ramanowskie wytrąconych osadów z zaleczonych pęknięć dla badanych próbek, strzałkami zaznaczone pasma pochodzące od drgań związanych z kalcytem lub aragonitem i waterytem

Fig. 8. Raman spectra of precipitated sediments from healed cracks for the samples studied, peaks from vibrations associated with calcite or aragonite and vaterite are indicated by arrows

Z użyciem oprogramowania TrueMatch wyodrębniono 2 główne składniki obecne w obszarach zaleczonych pęknięć, których rozkład przestrzenny przedstawiono na podstawie widm z użyciem kolorów czerwonego [odpowiadającego składnikowi 1] i niebieskiego [odpowiadającego składnikowi 2] przedstawionych w kolumnach A i B. Następnie przedstawione na rys. 7 mapy chemiczne zostały poddane analizie nadzorowanej z wykorzystaniem widm osadów uzyskanych na rys. 5, odpowiednio dla prób z mleczanem wapnia i mocznikiem. Rozkład ten przedstawiono w kolumnie C. Można zauważyć, że dystrybucja przestrzenna pokrywa się w każdym przypadku z wyselekcjonowanym składnikiem oznaczonym kolorem niebieskim. Na tej podstawie można wyciągnąć wniosek, że odpowiednie substancje wytrącone wskutek działalności bakterii stanowią istotny składnik w procesie uzupełniania powstałego ubytku we wszystkich badanych próbkach.

W celu identyfikacji wytworzonych w procesie leczenia pęknięcia minerałów porównano widma osadów ze szczególnym uwzględnieniem pików przypisywanych trzem naturalnym formom krystalicznym CaCO_3 : kalcytowi, waterytowi i aragonitowi (rys. 8). W żadnej z badanych próbek nie zaobserwowano dubletu 1076 i 1087 cm^{-1} charakterystycznego dla waterytu, co może świadczyć o jego braku lub bardzo małej ilości (46). Przesunięcia Ramana obserwowane poniżej 350 cm^{-1} przypisuje się drganiom strukturalnym Ca-O, a w zakresach 1076-1090 oraz 700-750 cm^{-1} rozciągającym grup CO_3^{2-} (47–50). Aragonit charakteryzuje się obecnością pasm w zakresie 204-209 cm^{-1} oraz 1076/1090 cm^{-1} obecnych w próbkach IA oraz IB, gdzie wytrącanie zachodziło w obecności mleczanu wapnia. Interesująco w próbce IA zaobserwowano też pasmo 754 cm^{-1} , które można przypisać obecności waterytu, jednak bez obserwacji wspomnianego powyżej dubletu. Może to świadczyć o obecności struktur przejściowych waterytu i aragonitu w procesie wytrącania ze wspólnego prekursora (45). Z kolei struktury kalcytu zostały zaobserwowane w przypadku próbek IIA oraz IIB, poprzez obecność pasm 710 i 1090 cm^{-1} , odpowiadających drganiom roz-

is indicative of the silicates presence in the samples at relatively low levels of Al-containing compounds. Some researchers have observed the occurrence of a C-S-H phase in the microstructure of a cemented composite after hydration, for which Raman bands are characteristic at ~ 130 and ~ 670 cm^{-1} . However, in the case of the microbial repair processes studied, these bands were not present, indicating a different mechanism of healing than through the formation of a C-S-H phase (42). The occurrence of calcium hydroxide Ca(OH)_2 , attributed to bands at 260 cm^{-1} , 359 cm^{-1} and 3620 cm^{-1} and a broad band at 684 cm^{-1} , was also not recorded, while calcium oxide CaO was identified with a typical band at 658 cm^{-1} (30) in variant II of series I.

Characteristic bands for bentonite are those located at 3625, 1638, 916, 785, 710, 430 and 200 cm^{-1} however, for the 532 nm laser used, they are of low intensity and were not identified (43, 44). The absence of bands applies to both the averaged spectra [Fig. 6], and the sediment spectra in Fig. 8. In the latter case, the 710 cm^{-1} band is assigned to the bending of calcite (45).

With the use of TrueMatch software, the 2 main components present in the areas of healed cracks were visualised, for which the distribution and spectra were presented using the red [corresponding to component 1] and blue [corresponding to component 2] colours shown in columns A and B. The chemical maps presented in Fig. 7 were then subjected to a supervised analysis using the experimental spectra of the precipitates obtained in Fig. 5 for the calcium lactate and urea samples, respectively. This distribution is shown in column C. It can be observed that the spatial distribution coincides in each case with the selected component marked in blue. Therefore, it can be concluded that the respective substances precipitated by the bacterial activity are an important component in the replenishment of the resulting defects in all samples tested.

For the identification of the minerals produced in the treatment, the spectra of the sediments were compared, with particular

ciągającym $\nu_4\text{CO}_3^{2-}$ oraz $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ (48,51). Dodatkowo zaobserwowano obecność pasm 209 cm^{-1} przypisywanych aragonitowi (47). Na rys. 8 w próbkach IIA i IIB, zaleczanych z udziałem mocznika, można zaobserwować również pasmo 3655 cm^{-1} o dużej intensywności charakterystyczne dla brucytu. Pasma to jest przypisane do drgań rozciągających grup hydroksylowych $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (52,53). Ta forma krystaliczna była również zidentyfikowana w widmach osadów oraz w XRD omówionych we wcześniejszej części artykułu. Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem techniki spektroskopii ramanowskiej wyraźnie wskazały na obecność form krystalicznych węglanów wapnia, co w zestawieniu z przedstawionymi badaniami mikroskopowymi i dyfrakcji rentgenowskiej potwierdza udział aktywności mikrobiologicznej w procesach zaleczania spękanych kompozytów cementowych. Jednakże krystalizacja brucytu jednoznacznie wskazuje na jednoczesne zachodzenie abiotycznych procesów wytrącania nowych form krystalicznych wewnątrz rysy.

4. Wnioski

W niniejszej pracy oceniono efektywność naprawy spękanych zapraw poprzez aplikację środków naprawczych zawierających mieszanki bentonitu i zeolitu NaX impregnowanego sporami bakterii *Bacillus subtilis* oraz roztwory cementujące. Badania potwierdziły efektywność wytrącania węglanów w rysach kompozytów cementowych zarówno dla serii z roztworami cementującymi, które oprócz azotanów wapnia i magnezu, zawierały mleczan wapnia (I) oraz mocznik (II). Niemniej jednak, powierzchnie przełamu rys zajęte przez wytrącone osady były około dwukrotnie mniejsze dla serii I [średnio 14,5%] niż dla serii II [średnio 31,7%]. Różnica ta może wynikać z dwójakiej natury procesu wytrącania osadów, zaobserwowanej zarówno w warunkach kontrolowanych jak i na powierzchni zaleczonych przełomów spękań. Oprócz potwierdzenia efektywnego wytrącania węglanu wapnia, świadczącego o zajściu procesu MICP, stwierdzono krystalizację występujących w roztworach związków chemicznych, szczególnie w warunkach zwiększonego odczynu środowiska [modyfikacja pH oraz powierzchnia zaprawy cementowej]. Zwiększoną intensywność wytrącania przy alkalicznym pH odnotowano szczególnie dla serii I [mleczan wapnia], co może wskazywać na znaczący udział procesów abiotycznych dla tej serii. Analiza obrazu potwierdziła większą efektywność procesu MICP inicjowanego aktywnością bakterii *Bacillus subtilis* dla serii II zawierającej mocznik. Analiza mikrostruktury osadów wytrąconych w warunkach kontrolowanych, jak i powierzchni zaleczonych przełomów rys, potwierdziła występowanie węglanów wapnia w trzech formach krystalicznych: kalcytu, aragonitu i waterytu oraz, dla części wariantów, brucytu. Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej pozwoliły na szczegółowe scharakteryzowanie wytrączanych minerałów oraz potwierdziły efektywność samozaleczania spękanych kompozytów cementowych, wskazując na jednoczesne zachodzenie procesów MICP i abiotycznego wytrącania form krystalicznych.

Praca została sfinansowana przez NAWA w ramach Projektu Internationalization of the Doctoral School of Lublin University of Technology – IDEaS of LUT

emphasis on the peaks attributed to the three natural crystalline forms of CaCO_3 : calcite, vaterite and aragonite [Fig. 8]. The 1076 i 1087 cm^{-1} doublet characteristic of vaterite was not observed in any of the samples tested, which may indicate its absence or very low concentration (46). Raman shifts observed below 350 cm^{-1} are attributed to structural vibrations of Ca-O, and in the ranges 1076 - 1090 and 700 - 750 cm^{-1} to stretching of CO_3^{2-} groups (47-50). Aragonite is characterised by the presence of peaks in the range 204 - 209 cm^{-1} and $1076/1090\text{ cm}^{-1}$ present in samples IA and IB, where precipitation occurred in the presence of calcium lactate. Interestingly, a 754 cm^{-1} band was also observed in sample IA, which could be attributed to the presence of vaterite, but without the observation of the above-mentioned doublet. This may indicate the presence of transitional structures of vaterite and aragonite in the precipitation from a common precursor (45). On the other hand, calcite structures were found in samples IIA and IIB by the presence of 710 i 1090 cm^{-1} bands, corresponding to $\nu_4\text{CO}_3^{2-}$ and $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ stretching vibrations (48,51). Additionally, the presence of 209 cm^{-1} bands attributed to aragonite was observed (47). In Fig. 8, a 3655 cm^{-1} high-intensity band characteristic of brucite can also be observed in urea-healed samples IIA and IIB. This band is attributed to the stretching vibrations of the hydroxyl groups of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (52,53). This crystalline form was also identified in the sediment and XRD spectra discussed earlier. Raman spectroscopy analyses indicated the presence of crystalline forms of calcium carbonate, which, in combination with the microscopic and X-ray diffraction studies presented, confirms the involvement of microbial activity in the healing processes of cracked cement composites. However, the presence of brucite clearly indicates the simultaneous occurrence of abiotic processes of precipitation of new crystalline forms within the crack.

4. Conclusions

In the present study, the effectiveness of healing cracked mortars by applying repair agents containing mixtures of bentonite and NaX zeolite impregnated with *Bacillus subtilis* bacterial spores and cementing solutions was evaluated. The study confirmed the effectiveness of carbonate precipitation in the cracks of the cement composites for both series with cementing solutions that contained calcium lactate (I) and urea (II) in addition to calcium and magnesium nitrates. Nevertheless, the crack breakthrough areas occupied by the precipitates were about twice as small for series I (average 14.5 %) as for series II (average 31.7 %). This difference could be attributed to the twofold nature of the precipitation process, observed both under controlled conditions and on the surface of healed crack breakthroughs. In addition to confirming the effective precipitation of calcium carbonate, evidencing the occurrence of the MICP process, crystallisation of compounds present in solution was observed, particularly under conditions of increased environmental pH (pH modification and cement mortar surface). Increased precipitation at alkaline pH was recorded particularly for series I [calcium lactate], which may indicate a significant contribution of abiotic processes for this series. Image analysis confirmed a more

Literatura / References

1. J. T. DeJong, M. G. Gomez, A. C. San Pablo, C. M. R. Graddy, D. C. Nelson, M. Lee, K. Ziotopoulou, M.E. Kortbawi, B.M. Montoya, T. H. Kwon, State of the Art: MICP soil improvement and its application to liquefaction hazard mitigation, 405-509, Proceedings of the 20th ICSMGE Sydney, Australia, Australian Geomechanics Society, Rahman and Jaksa, 2022.
2. M. Fukue, Z. Lechowicz, Y. Fujimori, K. Emori, C.N. Mulligan, Incorporation of Optical Density into the Blending Design for a BioceMENT Solution. *Materials* (Basel). **15**, 1951 (2022). <https://doi.org/10.3390/ma15051951>
3. J. Fronczyk, Artificial road runoff water treatment by a pilot-scale horizontal permeable treatment zone. *Ecol. Eng.* **107**, 198–207 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.07.025>
4. J. Fronczyk, M. Janek, M. Szelać, A. Pyzik, W. Franus, Immobilization of (bio-)healing agents for self-healing concrete technology: Does it really ensure long-term performance? *Compos. Part B Eng.* **266**, 110997 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110997>
5. M.R. de Rooij, E. Schlangen, C. Joseph, Self-Healing Phenomena in Cement-Based, M.R. de Rooij, K.V. Tittelboom, N.D. Belie, E. Schlangen, Springer, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6624-2>
6. M. Rajczakowska, K. Habermehl-Cwirzen, H. Hedlund, A. Cwirzen, Autogenous Self-Healing: A Better Solution for Concrete. *J. Mater. Civ. Eng.* **31**, 03119001 (2019). [https://doi.org/10.1061/\(asce\)mt.1943-5533.0002764](https://doi.org/10.1061/(asce)mt.1943-5533.0002764)
7. J.P. Adolphe, J.F. Loubiere, J. Paradas, F. Soleihavoup, Procédé de iratemente biologique d'une surface artificielle. European Patent 90400G97.0. (after French patent 8903517, 1989) 1990.
8. T. Zhu, M. Dittrich, Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: A review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **4** (2016). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00004>
9. V. Ramakrishnan, S. Bang, K. Deo, A novel technique for repairing cracks in high performance concrete using bacteria. Proceedings of the International Conference on HPHSC, 597–618, 1998.
10. W. De Muynck, D. Debrouwer, N. De Belie, W. Verstraete, Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cem. Concr. Res.* **38**, 1005–1014 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2008.03.005>
11. H.K. Kim, S.J. Park, J.I. Han, H.K. Lee, Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete. *Constr. Build. Mater.* **38**, 1073–1082 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.07.040>
12. V. Wiktor, H.M. Jonkers, Field performance of bacteria-based repair system: Pilot study in a parking garage. *Case Stud. Constr. Mater.* **2**, 11–17 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2014.12.004>
13. J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, Handbook of vibrational spectroscopy. Vol. 5, Wiley, New York, 2002.
14. T. Mi, Y. Li, W. Liu, W. Li, W. Long, Z. Dong, Q. Gong, F. Xing, Y. Wang, Quantitative evaluation of cement paste carbonation using Raman spectroscopy. *Npj Mater. Degrad.* **5** (2021). <https://doi.org/10.1038/s41529-021-00181-6>
15. P. McMillan, Structural studies of silicate glasses and melts—applications and limitations of Raman spectroscopy. *American Mineralogist*, **69**, 622-644 (1984).
16. N. Gierlinger, M. Schwanninger, The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research. *Spectroscopy*, **21**, 69-89 (2007). <https://doi.org/10.1155/2007/498206>
17. L. Bandura, R. Panek, J. Madej, W. Franus, Synthesis of zeolite-carbon composites using high-carbon fly ash and their adsorption abilities towards

efficient MICP process initiated by *Bacillus subtilis* activity for series II containing urea. Analysis of the microstructure of the sediments precipitated under controlled conditions, as well as the surface of healed crack fractures, confirmed the occurrence of calcium carbonates in three crystalline forms: calcite, aragonite and vaterite and, for some variants, brucite. Raman spectroscopy analyses allowed detailed characterisation of the precipitated minerals and confirmed the effectiveness of the self-healing of the cracked cement composites, indicating the simultaneous occurrence of MICP processes and abiotic precipitation of crystalline forms.

This work was supported by NAWA STER Programme Internationalization of the Doctoral School of Lublin University of Technology – IDEaS of LUT

- petroleum substances. *Fuel*. **283**, 119173 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119173>
18. M. Janek, J. Fronczyk, A. Pyzik, M. Szeląg, R. Panek, W. Franus, Diatomite and Na-X zeolite as carriers for bacteria in self-healing cementitious mortars. *Constr. Build. Mater.* **343**, 128103 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.128103>
19. Ç.M. Oral, B. Ercan, Influence of pH on morphology, size and polymorph of room temperature synthesized calcium carbonate particles. *Powder Technol.* **339**, 781–788 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.066>
20. V. Wiktor, H.M. Jonkers, Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cem. Concr. Compos.* **33**, 763–770 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012>
21. H.F. Li, Z. Li, Y. Liu, X.Y. Wang, K. Zhang, G.Z. Zhang, Effect of basalt fibers on the mechanical and self-healing properties of expanded perlite solid-loaded microbial mortars. *J. Build. Eng.* **62**, 105201 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jobbe.2022.105201>
22. W. Khaliq, M.B. Ehsan, Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. *Constr. Build. Mater.* **102**, 349–357 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.11.006>
23. E.N. Kozlov, E.N. Fomina, V.N. Bocharov, M.Y. Sidorov, N.S. Vlasenko, V.V. Shilovskikh, A Raman spectroscopic study of the natural carbonophosphates $\text{Na}_3\text{MCO}_3\text{PO}_4$ (M is Mn, Fe, and Mg). *Eur. J. Mineral.* **33**, 283–297 (2021). <https://doi.org/10.5194/ejm-33-283-2021>
24. U. Wehrmeister, D. E. Jacob, A. L. Soldati, T. Häger, W. Hofmeister, Vaterite in freshwater cultured pearls from China and Japan. *J. Gemmol.* **31**, 399–416 (2007). <https://doi.org/10.15506/JoG.2007.30.7.399>
25. R.L. Frost, S. Bahfenne, J. Čejka, J. Sejkora, J. Plášil, S.J. Palmer, E.C. Keeffe, I. Němec, Dussertite $\text{BaFe}^{3+}_3(\text{AsO}_4)_2(\text{OH})^5$ - a Raman spectroscopic study of a hydroxy-arsenate mineral. *J. Raman Spectrosc.* **42**, 56–61 (2011). <https://doi.org/10.1002/jrs.2612>
26. Z. Tomić, P. Makreski, B. Gajić, Identification and spectra-structure determination of soil minerals: Raman study supported by IR spectroscopy and x-ray powder diffraction. *J. Raman Spectrosc.* **41**, 582–586 (2010). <https://doi.org/10.1002/jrs.2476>
27. X. Dong, X. Fang, Y. Wang, X. Song, Raman spectra and optical properties of the chalcogen-hyperdoped silicon: a first-principles study. *Opt. Express*. **26**, 796–805 (2018). <https://doi.org/10.1364/oe.26.00a796>
28. M. Szurgot, A. Tomasik, Micro-Raman spectroscopy of hah 286 eucrite, 1719, 1335, 44th Lunar and Planetary Science Conference, The Woodlands, Texas, 2013.
29. N. Buzgar, A. I. Apopei, The Raman study of certain carbonates. *Geologie. Tomul LV*, **2**, 97–112 (2009).
30. T. Schmid, P. Dariz, Shedding light onto the spectra of lime: Raman and luminescence bands of CaO , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and CaCO_3 . *J. Raman Spectrosc.* **46**, 141–146 (2014). <https://doi.org/10.1002/jrs.4622>
31. M.A. Pimenta, A. Marucci, S.D.M. Brown, M.J. Matthews, A.M. Rao, P.C. Eklund, R.E. Smalley, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, Resonant Raman effect in single-wall carbon nanotubes. *J. Mater. Res.* **13**, 2396–2404 (1998). <https://doi.org/10.1017/S0884291400045696>
32. K. Moazzen, M.J. Zohuriaan-Mehr, R. Jahanmardi, K. Kabiri, Toward poly(furfuryl alcohol) applications diversification: Novel self-healing network and toughening epoxy–novolac resin. *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 45921 (2018). <https://doi.org/10.1002/app.45921>
33. A.E. Williams, N.I. Hammer, R.C. Fortenberry, D.N. Reinemann, Tracking the Amide I and αCOO – Terminal $\nu(\text{C}=\text{O})$ Raman Bands in a Family of L-Glutamic Acid-Containing Peptide Fragments: A Raman and DFT Study. *Molecules*. **26**, 4790 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26164790>
34. D. Kumar, U. Rizal, S. Das, B.S. Swain, B.P. Swain, Micro-Raman and FTIR Analysis of Silicon Carbo-Nitride Thin Films at Different H_2 Flow Rate. **443**, 77–83, *Advances in Electronics, Communication and Computing, Lecture Notes in Electrical Engineering*, Springer, Singapore, A. Kalam, S. Das, K. Sharma (eds), 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4765-7_9
35. X. Zhu, X. Guo, J.R. Smyth, Y. Ye, X. Wang, D. Liu, High-Temperature Vibrational Spectra Between $\text{Mg}(\text{OH})_2$ and $\text{Mg}(\text{OD})_2$: Anharmonic Contribution to Thermodynamics and D/H Fractionation for Brucite. *J. Geophys. Res. Solid Earth*. **124**, 8267–8280 (2019). <https://doi.org/10.1029/2019JB017934>
36. J. Ibáñez, L. Artús, R. Cuscó, Á. López, E. Menéndez, M.C. Andrade, Hydration and carbonation of monoclinic C_2S and C_3S studied by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **38**, 61–67 (2007). <https://doi.org/10.1002/JRS.1599>
37. E. Wiercigroch, E. Szafraniec, K. Czamara, M.Z. Pacia, K. Majzner, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, K. Malek, Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **185**, 317–335 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>
38. G. Kalisz, A. Przekora, P. Kazimierzczak, B. Gieroba, M. Jedrek, W. Grudzinski, W.I. Gruszecki, G. Ginalska, A. Sroka-Bartnicka, Application of Raman spectroscopic imaging to assess the structural changes at cell-scaffold interface. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–16 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22020485>
39. S.E.J. Villar, H.G.M. Edwards, Raman spectroscopy in astrobiology. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 100–113 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0029-2>
40. B. Gil, W.J. Roth, W. Makowski, B. Marszałek, D. Majda, Z. Olejniczak, P. Michorczyk, Facile evaluation of the crystallization and quality of the transient layered zeolite MCM-56 by infrared spectroscopy. *Catal. Today*. **243**, 39–45 (2015). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.07.031>
41. M. Sitarz, W. Mozgawa, M. Handke, Vibrational spectra of complex ring silicate anions — method of recognition. *J. Mol. Struct.* **404**, 193–197 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(96\)09381-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(96)09381-7)
42. J. Higl, M. Köhler, M. Lindén, Confocal Raman microscopy as a non-destructive tool to study microstructure of hydrating cementitious materials. *Cem. Concr. Res.* **88**, 136–143 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2016.07.005>
43. J. Lv, J. Feng, Y. Liu, Z. Wang, M. Zhao, Discriminating Paints with Different Clay Additives in Forensic Analysis of Automotive Coatings by FT-IR and Raman Spectroscopy. *Spectrosc.* **27**, 36–43 (2012).
44. M. Ritz, L. Vaculíková, J. Kupková, E. Plevová, L. Bartoňová, Different level of fluorescence in Raman spectra of montmorillonites. *Vib. Spectrosc.* **84**, 7–15 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.02.007>
45. R. Ševčík, P. Mácová, M. Pérez-Estébanez, Crystallization of Aragonite from Vaterite Precursor during Various Refluxing Times. *Adv. Mater. Res.* **1119**, 466–470 (2015). <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1119.466>
46. C. Tang, T.-C. Ling, K.H. Mo, Raman spectroscopy as a tool to understand the mechanism of concrete durability—A review. *Constr. Build. Mater.* **268**, 121079 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121079>
47. L. Black, C. Breen, J. Yarwood, K. Garbev, P. Stemmermann, B. Gasharova, Structural Features of C–S–H(I) and Its Carbonation in Air—A Raman Spectroscopic Study. Part II: Carbonated Phases. *J. Am. Ceram. Soc.* **90**, 908–917 (2007). <https://doi.org/10.1111/J.1551-2916.2006.01429.X>
48. R. Ševčík, P. Mácová, Localized quantification of anhydrous calcium carbonate polymorphs using micro-Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **95**, 1–6 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.12.005>
49. S. Martinez-Ramirez, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, C. Fortes, M.T. Blanco-Varela, Micro-Raman spectroscopy applied

- to depth profiles of carbonates formed in lime mortar. *Cem. Concr. Res.* **33**, 2063–2068 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0008-8846\(03\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0008-8846(03)00227-8)
50. U. Wehrmeister, A.L. Soldati, D.E. Jacob, T. Häger, W. Hofmeister, Raman spectroscopy of synthetic, geological and biological vaterite: A Raman spectroscopic study. *J. Raman Spectrosc.* **41**, 193–201 (2010). <https://doi.org/10.1002/jrs.2438>
51. J. Bensted, Uses of Raman Spectroscopy in Cement Chemistry. *J. Am. Ceram. Soc.* **59**, 140–143 (1976). <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1976.tb09451.x>
52. C. Liu, D. Wang, H. Zheng, T. Liu, A dehydroxylation kinetics study of brucite $\text{Mg}(\text{OH})_2$ at elevated pressure and temperature. *Phys. Chem. Miner.* **44**, 297–306 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00269-016-0857-y>
53. A.S. Templeton, E.T. Ellison, Formation and loss of metastable brucite: does Fe(II)-bearing brucite support microbial activity in serpentinizing ecosystems? *Phil. Trans. R. Soc. A.* **378** (2020). <https://doi.org/10.1098/rsta.2018.0423>