



HAL
open science

Biodétérioration des matériaux cimentaires dans les ouvrages d'assainissement : étude comparative du ciment d'aluminate de calcium et du ciment Portland

Jean Herisson

► **To cite this version:**

Jean Herisson. Biodétérioration des matériaux cimentaires dans les ouvrages d'assainissement : étude comparative du ciment d'aluminate de calcium et du ciment Portland. Autre. Université Paris-Est, 2012. Français. NNT : 2012PEST1135 . tel-00780619

HAL Id: tel-00780619

<https://theses.hal.science/tel-00780619>

Submitted on 24 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ —
— PARIS-EST

Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-Est

Spécialité : Structures et Matériaux

par

Jean Herisson

Ecole Doctorale : SCIENCES, INGENIERIE ET ENVIRONNEMENT

***Biodétérioration des matériaux cimentaires dans les
ouvrages d'assainissement – Etude comparative du
ciment d'aluminat de calcium et du ciment Portland***

Thèse soutenue le 16 octobre 2012 devant le jury composé de :

Françoise Feugeas	<i>Rapporteur</i>
Etienne Paul	<i>Rapporteur</i>
Véronique Bourgier	<i>Examinateur</i>
Piet Lens	<i>Examinateur</i>
Pascal Taquet	<i>Examinateur</i>
Patrice Chatellier	<i>Président</i>
Thierry Chaussadent	<i>Directeur de thèse</i>
Eric van Hullebusch	<i>Co-Directeur de thèse</i>



Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-Est

Spécialité : Structures et Matériaux

par

Jean Herisson

Ecole Doctorale : SCIENCES, INGENIERIE ET ENVIRONNEMENT

Biodétérioration des matériaux cimentaires dans les ouvrages d'assainissement – Etude comparative du ciment d'aluminate de calcium et du ciment Portland

Thèse soutenue le 16 octobre 2012 devant le jury composé de :

Françoise Feugeas	<i>Rapporteur</i>
Etienne Paul	<i>Rapporteur</i>
Véronique Bourgier	<i>Examineur</i>
Piet Lens	<i>Examineur</i>
Pascal Taquet	<i>Examineur</i>
Patrice Chatellier	<i>Président</i>
Thierry Chaussadent	<i>Directeur de thèse</i>
Eric van Hullebusch	<i>Co-Directeur de thèse</i>

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à son élaboration par leurs encouragements et leur soutien.

Le support financier de cette thèse CIFRE a été assuré par la société Kerneos. J'aimerais tout d'abord remercier les personnes à l'origine de ce partenariat : François Saucier, responsable de la *Business Unit Waste Water* qui a su apporter un point de vue industriel et appliqué à ce travail tout en montrant une totale confiance en mes capacités de recherches. Sa mise en évidence des applications du projet de recherche a été motrice pour moi. Mes remerciements vont également à Dominique Guinot, directeur de projets chez Kerneos, qui m'a jugé capable de mener à bien ce travail il y a trois ans et qui m'a accueilli dans son centre de recherche tout comme Christophe Eychenne-Baron après lui. Mes remerciements vont également à Séverine Lamberet, chef de projet R&D Plaque ciment chez Saint Gobain, qui a tout mis en œuvre pour que cette thèse se déroule dans de bonnes conditions dès son commencement et qui a suivi ma thèse pendant un an et demi pour Kerneos. Je tiens également à remercier les personnes impliquées plus tardivement : Pascal Taquet, Directeur technique chez Kerneos, pour avoir supervisé ma thèse et pour la confiance qu'il accorde en mes capacités et en mes compétences, et Christophe Eychenne-Baron pour son encadrement lors des derniers mois de ma thèse. J'apprécie tout particulièrement le fait qu'il ai pu dégager du temps pour relire ce travail.

Cette étude a été menée à l'Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux au sein du groupe Comportement Physico-chimique et Durabilité des Matériaux (CPDM) du Département Matériaux et en collaboration avec le Laboratoire Géomatériaux et Environnement (LGE) de l'Université Paris-Est.

Je remercie tout d'abord Loïc Divet, chef du groupe CPDM de m'avoir accueilli et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail dans de bonnes conditions. Je tiens à montrer ma gratitude à Mehmet Oturan, responsable du LGE pour m'avoir accueilli dans ses locaux.

Je remercie Thierry Chaussadent, mon Directeur de thèse, d'avoir suivi et encadré ce travail de près. Je soulignerais la confiance et les libertés qu'il m'a accordées dès mon arrivée en thèse et qui m'ont permis de considérer ce travail de recherche comme mon propre projet de recherche. Je tiens également à le remercier pour les conseils avisés qu'il a pu me donner tout au long de ses trois années.

Je remercie Eric van Hullebusch, mon co-directeur de thèse, qui a toujours été présent quand j'avais besoin de lui et qui s'est toujours totalement impliqué dans ce projet de recherche. Il m'a donné une vision enthousiaste et dynamique de la recherche avec de nombreux conseils éclairés.

Je voudrais également dire un grand merci à Marielle Guéguen-Minerbe, chargée de recherche à l'Ifsttar pour son implication dans l'étude. Malgré le fait qu'elle soit arrivée durant la dernière année de mon doctorat, elle a su apporter une aide plus que précieuse tant au niveau des expériences que de la façon de retranscrire au mieux mon travail.

Je suis également très reconnaissant à Françoise Feugeas et à Etienne Paul de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Mes remerciements vont également à Véronique Bourgier, Patrice Chatellier, Piet Lens et Pascal Taquet pour avoir accepté d'être examinateurs. Je tenais à leur exprimer mes remerciements pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture critique de mon manuscrit ce qui a permis d'avoir une discussion enrichissante lors de la soutenance.

Merci à Frédéric Boinski, chef de l'unité Chimie et Matériaux Ouvrages d'Art au département Laboratoire Eco-Matériaux du CETE Ile-de-France, de m'avoir encadré, guidé et conseillé durant les six mois de stage qui ont précédés ma thèse et les premiers mois de ses débuts. Sans lui, je n'aurais pas été intégré aussi rapidement dans l'équipe CPDM.

Merci à Marina Moletta-Denat, Ingénieure en microbiologie moléculaire au CSTB, pour avoir accordé de son temps pour que je puisse obtenir et comprendre les profils SSCP des biofilms formés sur site.

Je voudrais remercier Veolia EAU et plus particulièrement Véronique Bourgier et Vincent Parez pour leur implication sur les essais sur site. Il est toujours agréable d'avoir des personnes motivées, impliquées et disponibles dans un tel projet. Je voudrais également remercier Sabine Jeandenand du Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon ainsi que Pierre Claval, Alain Charlet et Lilian Mounede de la Société d'Assainissement du Bassin d'Arcachon pour nous avoir permis d'utiliser leurs réseaux et d'avoir toujours mis à notre disposition l'ensemble des moyens techniques et humains dont nous avons besoin.

Je tiens à remercier très sincèrement l'ensemble des stagiaires qui ont travaillé sur ce sujet de recherche : Amélie Michineau, Sonia Nacer-Bey, Gabrielle Poulet et Kévin Hebert. Les avoir encadrés a été très formateur.

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont accordés de l'aide pour les expériences ou les essais et sans qui ce travail n'aurait pas cette tournure : Charlène Castella, Nadia Dominique, Béatrice Duchesnes, Céline Marty, Jean-Michel Bertinot, Pierre Brigandat, Franck Ladouceur, Stéphane Lavaud, Arnaud Plantet, Gérard Platret et Bruno Zitoun.

Travailler au jour le jour dans de bonnes conditions est pour moi un gage de réussite. Ces conditions ont été rassemblées grâce à toute l'équipe de CPDM, du LGE et au personnel du KRC. Mes remerciements vont plus particulièrement à Carlota, Florent, Clément, Mathieu, Sandrine Mo., Amélie, Anaïs, Annabelle, Arnaud P., Arnaud R., Aurélie, Catherine, Céline, Caroline, Charlène, Christiane, Dinarzed, Emilie, Fabien, Frédéric, Gaëlle, Guillaume D., Guillaume G., Issam, Jean-Noël, Jessica, Johann, Laëtitia, Manuela, Maryline, Nicolas, Philippe, Pierre, Sandrine Ma., Stéphane, Véronique mais je n'oublie pas les nombreuses autres personnes qui ont participé à la bonne ambiance générale de ces trois équipes.

Enfin je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude à mes amis et à ma famille pour m'avoir toujours encouragé et soutenu. Je les remercie infiniment pour leur patience et leur présence. Ils ont su s'imposer ou s'effacer quand il le fallait. Je sais que je pourrais toujours compter sur eux. Merci pour tout!

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I- Introduction	9
I-1. La biodétérioration des matériaux	12
I-1.1. Le milieu.....	14
I-1.2. Les microorganismes.....	15
I-1.3. Le matériau	16
I-2. Les matériaux rencontrés dans les réseaux d’assainissement.....	16
I-2.1. Répartition des matériaux dans les réseaux d’assainissement.....	17
I-2.2. Détériorations rencontrées dans les réseaux d’assainissement.....	17
I-2.3. Les matériaux	19
I-3. La biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d’assainissement ...	22
I-3.1. La production d’hydrogène sulfuré	24
I-3.2. Le processus de biodétérioration des matériaux cimentaires	35
I-4. Les essais accélérés de dégradation des matériaux cimentaires	47
I-4.1. Les essais chimiques	48
I-4.2. Les essais biochimiques	50
I-4.3. Les essais <i>in situ</i>	56
I- Conclusion.....	60
I- Références bibliographiques	61
MATERIAUX, MATERIELS ET METHODES	69
II- Introduction	71
II-1. Choix des matériaux cimentaires	71
II-2. Souches bactériennes	74
II-2.1. Choix des bactéries	75
II-2.2. Milieux de culture	77
II-2.3. Matériel	79
II-3. Méthodologie expérimentale.....	79
II-3.1. Essais <i>in situ</i>	79
II-3.2. Réacteurs	80
II-3.3. Enceinte de biodétérioration	80
II-4. Méthodes analytiques.....	81

II-4.1. Etude des mortiers.....	81
II-4.2. Etude des biofilms.....	85
II- Références bibliographiques	91
ESSAIS SUR SITE.....	95
III- Introduction.....	97
III-1. Matériels et méthodes	97
III-1.1. Présentation des sites d'exposition	97
III-1.2. Matériels d'exposition	99
III-1.3. Méthodologie	100
III-2. Résultats.....	101
III-2.1. Suivi des caractéristiques environnementales	101
III-2.2. Observations visuelles des échantillons de mortier.....	104
III-2.3. Suivi de la masse des échantillons.....	109
III-2.4. Suivi du pH des échantillons	111
III-2.5. Etude de l'eau de condensation	113
III-2.6. Analyse de la diversité microbienne.....	114
III-3. Discussion.....	118
III- Conclusion	123
III- Références bibliographiques	124
ETUDE DES MECANISMES DE BIODETERIORATION.....	127
IV- Introduction	129
IV-1. Oxydation abiotique de l'H ₂ S.....	129
IV-1.1. Matériaux, matériels et méthodes.....	130
IV-1.2. Résultats	131
IV-1.3. Discussion.....	139
IV-1.4. Conclusion.....	145
IV-2. Influence de la source de soufre sur la croissance des bactéries sulfo-oxydantes. 146	
IV-2.1. Matériels et méthodes.....	147
IV-2.2. Résultats	150
IV-2.3. Discussion.....	155
IV-2.4. Conclusion.....	163
IV-3. Attaque acide	164
IV-3.1. Matériels et méthodes.....	164
IV-3.2. Résultats	165
IV-3.3. Mécanisme de l'attaque acide	177

IV-3.4. Conclusion.....	178
IV-4. Influence de l'alumine hydratée	179
IV-4.1. Réserve alcaline.....	180
IV-4.2. Capacité de neutralisation à l'acide.....	183
IV-4.3. Formation du gel d'alumine hydraté	184
IV-4.4. Influence du trihydrate d'alumine sur la croissance de bactéries.....	186
IV-4.5. Conclusion.....	187
IV- Conclusion	188
IV- Références bibliographiques.....	189
MISE AU POINT D'UN ESSAI ACCELERE.....	193
V-Introduction.....	195
V-1. Définition de l'essai	196
V-1.1. Enceinte de biodétérioration	196
V-1.2. Système de ventilation	200
V-1.3. Approvisionnement en hydrogène sulfuré.....	201
V-1.4. Approvisionnement en bactéries sulfo-oxydantes	202
V-1.5. Prélèvement des échantillons.....	203
V-2. Résultats.....	203
V-2.1. Premières conditions expérimentales.....	204
V-2.2. Seondes conditions expérimentales	215
V-3. Discussion	222
V- Conclusion	226
V- Références bibliographiques.....	226
CONCLUSION GENERALE	229
ANNEXES.....	235

Liste des Figures

Figure I-1 : Photographies de la <i>Cloaca maxima</i> à Rome.....	9
Figure I-2 : Estimation de l'évolution, entre 1962 et 1998, du linéaire de conduites d'eaux usées sur l'ensemble de la France métropolitaine [3].....	10
Figure I-3 : Proportion de la population utilisant des installations sanitaires améliorées [6]. .	12
Figure I-4 : Exemples de biodétérioration de différents matériaux : canalisation métallique, dents, pierres dans une rivière.	13
Figure I-5 : Paramètres menant à la biodétérioration.	14
Figure I-6 : Etapes de formation d'un biofilm [10].	15
Figure I-7 : Photographies de canalisations de réseaux d'assainissement réalisées à partir de différents matériaux (pierre, polymère, béton).....	17
Figure I-8 : A – Biodétérioration d'une canalisation en béton avec mise à nu des armatures métalliques [28]. B – Biodétérioration d'un trou d'homme mise en évidence après 5 ans de service [28]. C – Attaque par H ₂ S d'une voûte non-immersée [29]. D – Attaque par H ₂ S d'un collecteur. E – Attaque par H ₂ S d'une rehausse en fonte [29]. F – Attaque par H ₂ S dans un dessableur [29].	23
Figure I-9 : Cycle schématique du soufre dans un réseau d'assainissement, dessin F. Boinski, 2009.....	24
Figure I-10 : Cycle du soufre [31].....	25
Figure I-11 : Diagramme de prédominance des sulfures en fonction du pH.	26
Figure I-12 : Impact de la quantité d'oxygène sur la production d'H ₂ S dans une canalisation d'assainissement, d'après [30].	28
Figure I-13 : Concentration en hydrogène sulfuré à la sortie du réseau de Long Beach, Etats-Unis [30].....	30
Figure I-14 : Maximum, minimum et moyenne typiques de concentrations d'H ₂ S rencontrées dans le réseau expérimental de Virginia durant les mois d'été (S) et d'hiver (W) [41].....	30
Figure I-15 : Technologies chimique et biologique pour le contrôle de l'émission d'H ₂ S dans les réseaux d'assainissement [44].	33
Figure I-16 : Boule de curage des égouts de Paris.	34
Figure I-17 : Schéma de la pile microbienne dans un réseau d'assainissement convertissant les sulfures en soufre élémentaire [44].	35
Figure I-18 : Oxydation de l'hydrogène sulfuré [57].....	37
Figure I-19 : Modèle d'oxydation du soufre élémentaire par les bactéries acidophiles, d'après [62].	38
Figure I-20 : Changements théoriques des propriétés biologiques et physiques du béton, à base de ciment Portland, en fonction du temps durant le processus de détérioration ; NSOM : bactéries neutrophiles sulfo-oxydantes, ASOM : bactéries acidophiles sulfo-oxydantes [71].	40
Figure I-21 : Succession bactérienne intervenant sur un béton de ciment Portland exposé à de l'H ₂ S [57].	41
Figure I-22 : domaine de stabilité du gel d'alumine (Al(OH) ₃) [80].	44
Figure I-23 : Echantillons de béton exposés pendant 17 mois dans le cadre du projet Virginia [41].	45
Figure I-24 : Evolution du nombre de publications portant sur « sewer - H ₂ S » et sur « sewer - H ₂ SO ₄ » dans Science Direct.	47
Figure I-25 : Appareil pour l'essai de détérioration accéléré développé par l'Université de Gand en 1999 [79].	49
Figure I-26 : Schéma du montage de la chambre de simulation d'Heidelberg [95].	51
Figure I-27 : Schéma de la deuxième étape du test de l'équipe de Gand [97].	52

Figure I-28 : Chambre de biodétérioration de l'équipe d'Hambourg, durant son fonctionnement en 1983 et 25 ans après son installation [98].	53
Figure I-29 : Schéma de montage de la chambre de simulation d'Hambourg [98].	54
Figure I-30 : Perte de masse due à l'attaque biogénique de ciment alumineux, Portland après un an de test accéléré, équivalent environ à 24 ans dans un réseau [73].	55
Figure I-31 : Schéma du réseau de Virginia montrant le réseau gravitationnel alimentant la section expérimentale 600 mètres plus bas que le poste de relevage [41].	56
Figure I-32 : Profils en profondeur effectué sur un la couche gypseuse d'un béton exposé un an. A : Dénombrement de la totalité des cellules présentes (DAPI), d' <i>A. thiooxidans</i> (Thio820), d' <i>Acidiphilum</i> (ACD840) et de <i>Leptospirillum</i> (LF655). B : Profils d'oxygène et de pH dans les 2000 premiers micromètres de la couche d'altération [103].	57
Figure II-1: Schéma de l'obtention des échantillons cubique à partir d'une barre 2x2x16 cm.	74
Figure II-2 : Schéma de la réalisation d'un échantillon cylindrique.	74
Figure II-3 : Succesion de colonisation retrouvée sur du béton biodétérioré d'après [].	75
Figure II-4 : Développement des différentes souches bactériennes dans leur milieu de culture.	79
Figure II-5 : Schéma d'un « cube » pour illumination en épifluorescence.	86
Figure II-6 : Molécule de DAPI.	86
Figure II-7 : Exemple d'une suspension bactérienne colorée au DAPI.	86
Figure II-8 : Molécule d'Adénosine TriPhosphate (ATP).	87
Figure II-9 : Réaction d'ATPmétrie.	88
Figure II-10 : Profil de SSCP. Chaque flèche correspond à une espèce microbienne différente.	89
Figure II-11 : Schéma des quatre premiers cycles d'une PCR.	90
Figure II-12 : Principe de l'analyse SSCP.	91
Figure III-1 : Visuel de l'environnement direct (A) et de l'intérieur de S1 (B).	98
Figure III-2 : Visuel de l'environnement direct (A) et de l'intérieur de S2 (B).	98
Figure III-3 : Visuels de l'environnement direct de S3.	99
Figure III-4 : Schéma de montage d'une caisse d'exposition.	99
Figure III-5: Zones de mesure du pH.	100
Figure III-6 : Répartition en série de chaque échantillon par caisse d'exposition.	101
Figure III-7 : Evolutions des températures sur les sites d'exposition S1 et S2.	102
Figure III-8 : Evolutions des concentrations en H ₂ S sur les sites S1 et S2 (Nota Bene : l'analyseur H ₂ S du site S2 a eu des problèmes de fonctionnement).	103
Figure III-9 : Evolutions de la concentration d'H ₂ S et de la température du site S2 pour une journée type.	103
Figure III-10 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CEM I sur les deux sites d'exposition français.	104
Figure III-11 : Détail de la face supérieure d'un échantillon de mortier CEM I exposé 375 jours sur le site S1.	105
Figure III-12: Détails des dégradations observées sur des échantillons de mortier CEM I sur le site S2. A – exposé 132 jours, B – exposé 375 jours.	105
Figure III-13 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CEM III sur les deux sites d'exposition français.	106
Figure III-14 : Détails des dégradations observées sur des échantillons de mortier CEM III sur le site S2.	106
Figure III-15: Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CAC+S sur les deux sites d'exposition français.	107
Figure III-16 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CAC+L sur les deux sites d'exposition français.	108

Figure III-17 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CAC+A sur les deux sites d'exposition français.....	109
Figure III-18 : Evolution de la masse des échantillons au cours du temps (moyenne sur 2 mesures, barres d'erreur : écart du minimum et du maximum par rapport à la moyenne). ...	110
Figure III-19 : Pourcentage massique des produits de dégradation après brossage suivant le type d'échantillon et le site d'exposition au cours du temps.	111
Figure III-20 : Evolution du pH moyen de surface de la face supérieure des échantillons (moyenne sur 3 échantillons, barres d'erreur : écart-type).....	112
Figure III-21 : Evolution du pH moyen de surface de la partie latérale des échantillons (moyenne sur 3 échantillons avec 2 mesures par échantillon, barres d'erreur : écart-type). .	112
Figure III-22 : Evolution du pH moyen de surface de la partie inférieure des échantillons (moyenne sur 3 échantillons, barres d'erreur : écart-type).....	113
Figure III-23 : Mesure d'ATP dans l'eau des manches des échantillons en fonction de la concentration en aluminium total.	114
Figure III-24 : Profil SSCP procaryotiques des échantillons du site S1 exposés 132 jours...	116
Figure III-25 : Profil SSCP procaryotiques des échantillons du site S2 exposés 132 jours...	116
Figure III-26 : Profil SSCP procaryotiques du mortier CEM I au cours du temps sur le site S2.	117
Figure III-27 : Profil SSCP eucaryotiques du mortier CEM I au cours du temps sur le site S2.	117
Figure III-28 : Richesse (nombre de pics) des échantillons de mortiers obtenue par SSCP des fragments d'ADN procaryotiques après 132 jours d'exposition dans les réseaux d'assainissement.	118
Figure III-29: Evolution du pH et des pertes de masses des échantillons de mortier exposés <i>in situ</i> par Okabe <i>et al.</i> [3].	119
Figure III-30 : Evolution des souches bactériennes au cours du temps, d'après Okabe <i>et al.</i> [3]. A : <i>Thiothrix spp.</i> , B : <i>Thiobacillus plumbophilus</i> , C : <i>Thiomonas intermedia</i> , D : <i>Halothiobacillus neapolitanus</i> , E : <i>Acidiphilium spp.</i> , F : <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	119
Figure III-31 : Effet de la température sur la vitesse de croissance [21].	120
Figure III-32 : Visuels des échantillons de mortier CEM I et CEM III des séries 1 et 3 exposés 496 jours sur le site S2.	121
Figure III-33 : Evolution des différentes espèces de l'aluminium en fonction du pH [28]. ...	122
Figure IV-1 : Représentation schématique des quatre étapes de la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement.	129
Figure IV-2 : Schéma du montage pour étudier l'oxydation abiotique de l'H ₂ S.	130
Figure IV-3 : Observations MEB des échantillon de mortier CEM I (A à C), CAC+S non converti (D à F), CAC+S converti (G à I), CAC+A non converti (J à L) et CAC+A converti (M à O) exposé à 20 ppm d'H ₂ S et 75% d'humidité relative pendant un mois, (A, D, G, J et M) en électron secondaire, (B, E, H, K et N) cartographies du silicium, (C, F, I, L et O) cartographies du soufre. La barre blanche représente 1 mm.	133
Figure IV-4 : (A) Observation au MEB de l'échantillon de fer exposé trois mois à 20 ppm d'H ₂ S et (B) cartographie du soufre associée.	134
Figure IV-5 : Evolution du pourcentage de la proportion de soufre à la surface des échantillons de mortiers au cours du temps pour 20 et 50 ppm d'H ₂ S.	135
Figure IV-6 : (A) Observation au MEB de l'échantillon de mortier CEM I exposé deux mois à 20 ppm d'H ₂ S en électron rétrodiffusé et (B) cartographie du soufre associée.	136
Figure IV-7 : Cristal de soufre observé au MEB sur un échantillon de mortier CEM I après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H ₂ S.	136
Figure IV-8 : Cristaux de soufre observé au MEB sur un échantillon de mortier CEM III après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H ₂ S.	137

Figure IV-9 : Cristal de soufre observé au MEB sur un échantillon de mortier CAC+S après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H ₂ S.....	137
Figure IV-10 : Cristaux de soufre observés au MEB sur un échantillon de mortier CAC+L après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H ₂ S, sur un granulat (A) et sur un gel d'alumine (B).	138
Figure IV-11 : Cristaux de soufre observés au MEB sur un échantillon de mortier CAC+A après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H ₂ S, sur un granulat (A) et sur un gel d'alumine (B).	139
Figure IV-12 : Vitesse d'oxydation d'H ₂ S en fonction du temps de latence [8].....	140
Figure IV-13 : Taux d'oxydation spécifique des sulfures en fonction du pH à 25°C [8].....	143
Figure IV-14 : A- Cristal de soufre orthorhombique. B- Cristal de soufre monoclinique [13].	144
Figure IV-15 : Evolution des valeurs moyennes du pourcentage de l'aire des pores, de la portlandite (CH) et du ciment anhydre en fonction de la distance du granulat d'un béton [14].	145
Figure IV-16 : Schéma d'une croissance bactérienne type en quatre phases. 1- Phase de latence, 2- Phase de croissance exponentielle, 3- Phase stationnaire, 4- Phase de déclin [19].	147
Figure IV-17 : Spectre UV des milieux de culture de <i>Starkeya novella</i> (A) et de <i>Thiomonas intermedia</i> (B).	150
Figure IV-18 : Suivi de la croissance de <i>Starkeya novella</i> en présence d'extraits de levures.	151
Figure IV-19 : Suivi de la croissance de <i>Starkeya novella</i> sans extraits de levures.	152
Figure IV-20 : Suivi de la croissance de <i>Thiomonas intermedia</i> en présence d'extrait de levures.	153
Figure IV-21 : Suivi de la croissance d' <i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	154
Figure IV-22 : Suivi de la croissance d' <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	155
Figure IV-23 : Schéma supposé de l'oxydation du soufre par une bactérie [38].	158
Figure IV-24 : Micrographie électronique de soufre excrété par <i>Thiobacillus</i> [35].	160
Figure IV-25 : Croissance de <i>T. intermedia</i> sous différentes conditions de culture [22].	161
Figure IV-26 : Modélisation des températures sous COMSOL d'une canalisation d'eau usée [48].	162
Figure IV-27 : A – Résultat de l'essai de compétition entre <i>P. versutus</i> , <i>H. neapolitanus</i> et <i>S. G7</i> [49]. B – Compétition en culture continue entre <i>P. versutus</i> , <i>H. neapolitanus</i> et <i>S. G7</i> pour la culture sur thiosulfate et acétate en condition limitante en fonction du nombre de changement. Les deux milieux ont été apportés successivement durant 4 h [50].	163
Figure IV-28 : Modèle prédisant l'apparition de bactéries sulfo-oxydantes en fonction du taux de renouvellement relatif des composés soufré inorganique réduit et des substrats organique durant des conditions de croissance limitées en énergie dans des eaux douces [52].	163
Figure IV-29 : Mortiers à base de ciment Portland (OPC) et de ciment d'aluminate de calcium (CAC) avant immersion (A) et après 5 jours d'immersion dans l'acide sulfurique sans renouvellement (B).	165
Figure IV-30 : Photographies des échantillons immergés 5 jours dans de l'acide sulfurique sans renouvellement, vue de dessus.	166
Figure IV-31 : Photographies des échantillons immergés 5 jours dans de l'acide sulfurique sans renouvellement, vue oblique.	166
Figure IV-32 : Photographies des échantillons immergés 5 jours dans de l'acide sulfurique avec renouvellement.	167
Figure IV-33 : Evolution du pH de la solution pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.	167

Figure IV-34 : Evolution du pH de la surface du mortier pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.	168
Figure IV-35 : Evolution du pH de la solution pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminate de calcium.	168
Figure IV-36 : Evolution du pH de la surface du mortier (B) pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminate de calcium. .	169
Figure IV-37 : Evolution du pH de la solution pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.	169
Figure IV-38 : Evolution du pH de la surface du mortier pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.	170
Figure IV-39 : Evolution du pH de la solution pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminate de calcium.	170
Figure IV-40 : Evolution du pH de la surface du mortier pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminate de calcium.	171
Figure IV-41 : Evolution de la perte de masse au cours du temps et comparaison avec les résultats d'Espinosa <i>et al.</i> [53].	172
Figure IV-42 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 1.	173
Figure IV-43 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 1.	173
Figure IV-44 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 1.	174
Figure IV-45 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 1.	174
Figure IV-46 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 1 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).	175
Figure IV-47 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 1 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).	176
Figure IV-48 : Evolution des vitesses d'extraction de différents éléments en fonction du pH.	177
Figure IV-49 : Schéma d'une attaque acide d'un matériau cimentaire.	178
Figure IV-50 : A) Microstructure du gel d'Al(OH) ₃ bloquant la porosité. B) Domaine de stabilité de l'Al(OH) ₃ [29].	180
Figure IV-51 : Dosage de la réserve alcaline des différents matériaux cimentaires par de l'acide nitrique à 1M.	181
Figure IV-52 : Dosage de la réserve alcaline des différents matériaux cimentaires par de l'acide sulfurique à 0,5 M.	181
Figure IV-53 : Dosage de la réserve alcaline des mortiers CEM I non carbonaté et carbonaté par de l'acide nitrique à 1M et par de l'acide sulfurique à 0,5 M.	182
Figure IV-54 : Dosage de la réserve alcaline des mortiers CAC+S non carbonaté et carbonaté par de l'acide nitrique à 1M et par de l'acide sulfurique à 0,5 M.	183
Figure IV-55 : Capacité de neutralisation à l'acide des mortiers CEM I et CAC+S à 44 et 48 h après l'ajout d'acide nitrique.	184
Figure IV-56 : Photographie de l'échantillon de mortier CAC+S immergé pendant 40 jours dans une solution d'acide sulfurique présentant la formation d'un gel en surface de l'éprouvette.	185

Figure IV-57 : Diffractogramme du produit blanc formé en surface de l'échantillon de CAC+S immergé dans une solution d'acide sulfurique.	185
Figure IV-58 : Test à la phénolphtaléine sur la section de l'échantillon de mortier CAC+S immergé pendant 40 jours dans une solution d'acide sulfurique à pH 4,5.	186
Figure IV-59 : Impact du trihydrate d'alumine (moitié gauche) sur la croissance de <i>Starkeya novella</i> (A), <i>Halothiobacillus neapolitanus</i> (B), <i>Thiomonas intermedia</i> (C) et <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (D).	187
Figure V-1 : A – Schéma de l'enceinte de biodétérioration, 1 - Panneau de contrôle, 2 – Capteurs de température et d'humidité relative, 3 – Buse de diffusion, 4 – Résistance chauffante, 5 – Solution diffusée dans l'enceinte, 6 – Echantillons, 7 – Pompe péristaltique pour la solution à pulvériser. B - L'enceinte de biodétérioration de cette étude.	197
Figure V-2 : Suivi de la température en trois points dans l'enceinte de biodétérioration (consignes : 30°C, 100% HR). Moyenne : $30,6 \pm 0,45^\circ\text{C}$	198
Figure V-3 : Suivi de l'humidité relative en trois points dans l'enceinte de biodétérioration (consignes : 30°C, 100% HR). Moyenne : $98 \pm 0,45$	198
Figure V-4 : Contrôle de l'homogénéité de la pulvérisation.	199
Figure V-5 : Suivi de la masse des verres utilisés pour contrôler l'homogénéité du système de pulvérisation.	199
Figure V-6 : Système de ventilation de l'enceinte de biodétérioration.	200
Figure V-7 : Evolution au cours du temps des concentrations d'H ₂ S en bouteille apportées dans l'enceinte de biodétérioration.	201
Figure V-8 : Diagramme de prédominance des sulfures en fonction du pH.	202
Figure V-9 : Système de production de l'hydrogène sulfuré.	202
Figure V-10 : Evolution de la concentration en H ₂ S mesurée dans la chambre d'essai pour 500 ppm introduit.	204
Figure V-11 : Suivi de l'augmentation et de la baisse de la concentration en H ₂ S dans un réacteur contenant de l'air ou de l'eau. L'H ₂ S est introduit avec une concentration de 20 ppm.	205
Figure V-12 : Détails des faces des échantillons exposés 87 et 311 jours dans la chambre d'essai approvisionnée en H ₂ S en bouteille.	205
Figure V-13 : Evolution des échantillons de mortier exposés pendant 374 jours dans l'enceinte de biodétérioration suivant les premières conditions expérimentales.	206
Figure V-14 : Evolution de la masse des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.	207
Figure V-15 : Evolution du pH de surface des matériaux cimentaires soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.	208
Figure V-16 : Dénombrement de la population microbienne présente à la surface des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.	208
Figure V-17 : Evolution de la quantité d'ATP mesurée à la surface des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.	209
Figure V-18 : Evolution de la concentration en protéines par cm ² des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.	210
Figure V-19 : Observation au MEB de phosphates de calcium sur les échantillons de mortiers CEM I (A), CAC+S (B) et CAC+A (C) exposés 316 jours.	210
Figure V-20 : Observation au MEB de la surface du mortier CEM I exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Biofilm recouvrant la matrice cimentaire et cristal de soufre détérioré. B- Biofilm recouvrant la matrice.	211

Figure V-21 : Observation au MEB de la surface du mortier CEM III exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Biofilm et phase détériorée. B- Amas de bactéries associées en chaînette.....	211
Figure V-22 : Observation au MEB de la surface du mortier CAC+S exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Bactéries réparties sur la surface. B- Phase détériorée.	212
Figure V-23 : Observation au MEB de la surface du mortier CAC+L exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Amas de bactéries cohésives. B- Microchampignon sur gel d'alumine.....	212
Figure V-24 : Observation au MEB de la surface du mortier CAC+A exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Fibre riche en carbone colonisée par des bactéries. B- Spores (fongiques ou bactériens).	213
Figure V-25 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CEM I exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristaux de soufre détériorés. B- Bactéries sur un cristal de soufre.....	213
Figure V-26 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CEM III exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristaux de soufre détériorés. B- Gros plan d'un cristal de soufre détérioré	214
Figure V-27 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CAC+S exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristal de soufre rhomboédrique bioaltéré. B- Cristal de soufre monoclinique bioaltéré.....	214
Figure V-28 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CAC+A exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristaux de soufre détériorés. B- Cristal de soufre sur gel d'alumine.....	215
Figure V-29 : Suivi de la concentration d'H ₂ S dans la chambre d'essai.	216
Figure V-30 : Echantillons de mortier soumis à l'essai accéléré avec production d'H ₂ S au laboratoire et milieu de culture unique.....	217
Figure V-31 : Evolution de la masse des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.....	218
Figure V-32 : Evolution du pH de surface des matériaux cimentaires soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.....	218
Figure V-33 : Dénombrement de la population microbienne présent à la surface des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.....	219
Figure V-34 : Evolution de la quantité d'ATP mesurée à la surface des échantillons de mortier soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.....	219
Figure V-35 : Evolution de la concentration en protéines par cm ² des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.....	220
Figure V-36 : Marquage du biofilm formé en 28 jours sur les différentes matrices cimentaires à l'aide du kit Live/Dead®. A- CEM I, B- CEM III, C- CAC+S, D- CAC+L, E- CAC+A. Les barres blanches correspondent à 20 µm et les barres noires à 100 µm.	221
Figure V-37 : Marquage du biofilm formé en 58 jours sur un mortier au ciment CEM I (A) et sur un mortier au ciment CAC+S (B) à l'aide du kit Live/Dead®. Les barres blanches correspondent à 200 µm.	222
Figure b-1 : Processus d'hydratation d'un ciment courant.....	241
Figure b-2 : Processus d'hydratation d'un ciment d'aluminate de calcium.....	242
Figure c-1 : Courbes ATD et ATG du mortier CEM I non exposé.....	246
Figure c-2 : Courbes ATD et ATG du mortier CEM III non exposé.....	247
Figure c-3 : Courbes ATD et ATG du mortier CAC+S non exposé.....	248
Figure c-4 : Courbes ATD et ATG du mortier CAC+L non exposé.....	249

Figure c-5 : Courbes ATD et ATG du mortier CAC+A non exposé.	250
Figure j-1 : Evolution des profils SSCP procaryotiques au cours du temps du mortier au ciment CEM I sur le site S2.	263
Figure j-2 : Evolution des profils SSCP procaryotiques au cours du temps du mortier au ciment CAC+S sur le site S2.....	264
Figure j-3 : Profil SSCP procaryotiques du mortier au ciment CAC+A sur le site S2.	264
Figure j-4 : Evolution des profils SSCP eucaryotiques du mortier au ciment CEM I sur le site S2.....	265
Figure j-5 : Evolution des profils SSCP eucaryotiques du mortier au ciment CAC+S sur le site S2.....	266
Figure j-6 : Evolution des profils SSCP eucaryotiques du mortier au ciment CAC+A sur le site S2.	266
Figure k-1 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 2.	269
Figure k-2 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 2. ...	269
Figure k-3 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 2.	270
Figure k-4 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 2. ...	270
Figure k-5 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 3.	271
Figure k-6 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 3. ...	271
Figure k-7 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 3.	272
Figure k-8 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 3. ...	272
Figure k-9 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 4,5.....	273
Figure k-10 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 4,5. 273	273
Figure k-11 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 4,5.	274
Figure k-12 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 4,5. 274	274
Figure k-13 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 5,5.....	275
Figure k-14 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 5,5. 275	275
Figure k-15 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 5,5.	276
Figure k-16 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 5,5. 276	276
Figure l-1 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 2 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).	277
Figure l-2 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 2 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).	277

Figure 1-3 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 3 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).	277
Figure 1-4 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 3 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).	278
Figure 1-5 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 4,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).....	278
Figure 1-6 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 4,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).....	278
Figure 1-7 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 5,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).....	279
Figure 1-8 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 5,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).....	279

Liste des Tableaux

Tableau I-1 : Evolution de la longueur du réseau d'assainissement à Paris, d'après [2].....	10
Tableau I-2 : Matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement allemand, d'après [11].	17
Tableau I-3 : Distribution des défauts des canalisations en Allemagne, d'après [11].....	18
Tableau I-4 : Dégradations et dysfonctionnements observés lors d'une enquête du CSTB en 1989 [12].	18
Tableau I-5 : Définition de la classe d'agressivité chimique en fonction de la concentration (ppm) en H ₂ S [16].	21
Tableau I-6 : Valeurs de perte d'épaisseur de matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement.....	22
Tableau I-7 : Genres et espèces de BSO et conditions de cultures [71].....	43
Tableau I-8 : Détérioration des mortiers dans le test de l'université d'Hambourg [101].....	55
Tableau I-9 : Comparaison d'études de terrain sur différents matériaux cimentaires (CAC : Calcium Aluminate Cement ; OPC : Ordinary Portland Cement).	59
Tableau II-1 : Descriptif des formulations cimentaires utilisées pour cette étude.	72
Tableau II-2 : Composition des ciments et du laitier. Valeurs en pourcentage massique (ND : Non Défini).	73
Tableau II-3 : Informations fournies par DSMZ sur <i>Starkeya novella</i>	76
Tableau II-4 : Informations fournies par DSMZ sur <i>Thiomonas intermedia</i>	76
Tableau II-5 : Informations fournies par DSMZ sur <i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	76
Tableau II-6 : Informations fournies par DSMZ sur <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	76
Tableau II-7 : Milieu de culture de <i>Starkeya novella</i>	77
Tableau II-8 : Milieu de culture de <i>Thiomonas intermedia</i>	78
Tableau II-9 : Milieu de culture d' <i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	78
Tableau II-10 : Milieu de culture d' <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	78
Tableau II-11 : Solution d'éléments traces.	79
Tableau II-12 : Valeurs de porosité (en %) des échantillons de mortier sains.....	83
Tableau II-13 : Valeurs des aires BET (en m ² g ⁻¹) et du volume total adsorbé cumulé (en cm ³ g ⁻¹) pour les différents échantillons sains.....	85
Tableau III-1 : Concentration en H ₂ S et température des sites S1 et S2 mesurées par les analyseurs sur une période d'un an.	102
Tableau III-2 : Mesures de pH et d'ATP réalisées sur l'eau condensée dans les manches en PVC des échantillons exposés 375 jours.....	114
Tableau III-3 : Quantité d'ADN total (en ng cm ² de matériau) extrait à la surface des échantillons.....	115
Tableau III-4 : Mécanismes de la toxicité de l'aluminium chez les microorganismes [28]. ..	123
Tableau IV-1 : Pourcentage de soufre mesuré à la surface des échantillons exposés à une humidité relative variable à 20 ppm d'H ₂ S pendant un mois (moyenne de 6 mesures).	132
Tableau IV-2 : Pourcentage de soufre mesuré à la surface des échantillons exposés pendant trois mois à 20 ppm d'H ₂ S (moyenne de 6 mesures).....	135
Tableau IV-3 : Milieux de culture de <i>Starkeya novella</i>	148
Tableau IV-4 : Milieux de culture de <i>Thiomonas intermedia</i>	148
Tableau IV-5 : Milieu de culture d' <i>Halothiobacillus neapolitanus</i> sans source de soufre. ...	149
Tableau IV-6 : Solution d'éléments traces sans source de soufre.	149
Tableau IV-7 : Milieu de culture d' <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> sans source de soufre.	149
Tableau IV-8 : Caractéristiques associées à la croissance de <i>Starkeya novella</i> en présence d'extrait de levures à 30 ± 1°C et à un pH de 6,8.	151

Tableau IV-9 : Caractéristiques associées à la croissance de <i>Starkeya novella</i> sans extrait de levures à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 6,8.....	151
Tableau IV-10 : Caractéristiques associées à la croissance de <i>Thiomonas intermedia</i> en présence d'extraits de levures à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 5,5.....	152
Tableau IV-11 : Caractéristiques associées à la croissance d' <i>Halothiobacillus neapolitanus</i> à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 6,8.....	153
Tableau IV-12 : Caractéristiques associées à la croissance d' <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 4,7.....	154
Tableau IV-13 : Synthèse des données relatives à la croissance des souches bactériennes retrouvées dans la littérature. Toutes les souches bactériennes sont cultivées sur du thiosulfate.....	156
Tableau IV-14 : Paramètres chimiques d'eaux usées selon [46, 47].....	161
Tableau IV-15 : Evolution du rapport Ca/Al suivant le pH.....	175
Tableau IV-16 : Concentration en acide nitrique contenu dans les 150 mL de chaque flacon.....	183
Tableau IV-17 : Résultat de l'impact du trihydrate d'alumine sur la croissance de bactéries. Dénombrement réalisé en triplicata.....	187
Tableau V-1: Composition pour un litre de milieu de culture utilisé pour l'enceinte de biodétérioration, d'après [10].....	203
Tableau b-1 : Composition des principaux types de ciment (extrait de la norme NF EN 197-1, article 6, tableau 1).....	240
Tableau b-2 : Hydratation des composés du ciment.....	241
Tableau b-3 : Composition des ciments alumineux.....	242
Tableau b-4 : Types d'hydrates majoritairement formés suivant la température de prise.....	243
Tableau c-1 : Valeurs des porosités (en %), des aires BET (en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), du volume total adsorbé cumulé (en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) et du pH de surface pour les différents échantillons de mortier sains.....	245
Tableau g-1 : Préparation de la gamme étalon.....	257
Tableau i-1 : Mesures de la concentration en ions, du pH et de l'ATP réalisées sur l'eau condensée dans les manches en PVC des échantillons exposés 375 jours sur le site S1.....	261
Tableau i-2 : Mesures de la concentration en ions, du pH et de l'ATP réalisées sur l'eau condensée dans les manches en PVC des échantillons exposés 375 jours sur le site S2.....	261
Tableau j-1 : Valeurs des indices de richesse, de Shannon et de Simpson sur les analyses SSCP procaryotiques.....	265
Tableau j-2 : Valeurs des indices de richesse, de Shannon et de Simpson sur les analyses SSCP eucaryotiques.....	267

INTRODUCTION GENERALE

A l'heure actuelle, il existe un besoin croissant de construction, de réhabilitation et de rénovation des réseaux d'assainissement. Dans la plupart des pays industrialisés, les réseaux d'assainissement ont en moyenne quarante à cinquante ans mais ont été construits pour des durées de vie de l'ordre de soixante à quatre-vingt ans. Des travaux de rénovations et de réhabilitations importants sont donc nécessaires pour maintenir la qualité de l'assainissement dans ces pays. Le conseil de l'Union Européenne (UE) a par ailleurs adopté en 1991 une directive qui impose à ses pays membres de collecter et de traiter les eaux usées des agglomérations de plus de 2 000 équivalent-habitants en prenant en compte la sensibilité des milieux récepteurs. Il y a donc une nécessité de construction de structures d'assainissement et de traitement des eaux usées efficaces et durables. Enfin, l'assemblée générale des Nations Unies a établi huit Objectifs du Millénaire pour le Développement en 2011 dont le septième est d'assurer un environnement durable entre autres en réduisant de moitié, d'ici 2015, le nombre de personnes n'ayant pas accès à l'eau potable et à une structure de traitement des eaux usées. Tout ceci mène les gestionnaires et les fabricants de matériaux impliqués dans l'assainissement à se questionner sur la construction de réseaux durables et sur les protocoles de gestion optimaux à mettre en place pour ces structures.

Le fonctionnement durable d'un réseau d'assainissement passe également par sa bonne conception hydraulique. Elle consiste à évaluer le débit des effluents, puis à dimensionner les ouvrages en tenant compte des perspectives d'évolution de la collecte et du degré de protection contre les inondations. De nos jours, les réseaux d'assainissement sont des structures construites à partir d'éléments préfabriqués essentiellement en béton pour les canalisations de gros diamètres et tous les points de connexion (regards, chambre de pompage, station de relevage,...) puis assemblés directement sur place pour optimiser la durée des travaux de construction en assurant une mise en fonctionnement rapide de l'ensemble du réseau. Cependant ce type d'assemblage est soumis à de nombreuses dégradations causées par le principe même de construction (déplacement de joint, défaut de connexion, *etc.*), par l'environnement (croissance de racine dans les réseaux, mouvement de terrains, *etc.*) ou encore par l'effluent et la biomasse qu'il transporte (production d'hydrogène sulfuré, *etc.*).

La gestion du patrimoine d'ouvrage d'assainissement passe donc nécessairement par la mise en place de traitements et de réparations très souvent difficiles, onéreux et causant de nombreux désagréments. En effet, ce type d'intervention nécessite la plupart du temps d'éventrer les routes pour accéder aux canalisations, de créer des déviations routières le temps des travaux, d'utiliser du matériel spécialisé et donc des personnels qualifiés. Ainsi, il semble nécessaire de hiérarchiser les interventions de réparation mais également de trouver des solutions de construction et de réhabilitation qui soient adaptées et durables. L'amélioration de la fiabilité des réseaux va ainsi passer par la réalisation d'un diagnostic du système d'assainissement et des sources possibles de détérioration qui nécessite l'approfondissement des connaissances sur les facteurs déterminants et le développement de modèles de durée de vie.

L'hydrogène sulfuré est un problème majeur dans les réseaux d'assainissement puisqu'il entraîne des risques sanitaires importants et peut conduire, dans le pire des cas, à la ruine des structures. Ce gaz se forme dans les zones anaérobies des boues et sédiments qui s'accumulent dans le fond des canalisations, quand l'effluent a un temps de séjour élevé associé à une faible vitesse d'écoulement, peu ou pas de turbulences et de fortes concentrations en sulfates. 40 à 50% des postes de refoulement présentent des concentrations

en hydrogène sulfuré qui préoccupent les exploitants, ce pourcentage peut atteindre 70% en zone rurale. Trois facteurs principaux favorisent sa formation :

- les réseaux d'assainissement prennent souvent en compte un développement futur. Ils sont donc surdimensionnés et s'étendent sur des distances de plus en plus grandes,
- la diminution de la consommation en eau conduit à limiter les vitesses d'écoulement des effluents,
- le réchauffement climatique conduit à une augmentation des vitesses de réactions biochimiques.

L'hydrogène sulfuré entraîne un certain nombre de nuisances. Tout d'abord, des nuisances olfactives puisque ce gaz sent l'œuf pourri pour de faibles concentrations (< 5 ppm). Il représente également un danger pour les égoutiers comme pour les riverains puisqu'il peut être mortel même à des concentrations faibles. Il entraîne aussi des dysfonctionnements au niveau des processus biologiques dans les stations d'épuration des eaux usées, les rendant moins efficaces. Enfin, ce gaz est à l'origine de la détérioration prématurée des réseaux d'assainissement.

Cette détérioration, induite par des microorganismes, est un processus se déroulant en plusieurs étapes avec tout d'abord la sédimentation des boues et sédiments présents en suspension dans les eaux usées qui vont former des zones anoxiques (privées d'oxygène) dans lesquelles des bactéries sulfato-réductrices vont pouvoir se développer en réduisant les molécules organiques et les sulfates en sulfures. L'hydrogène sulfuré ainsi formé peut ensuite se dégazer plus en aval, quand l'effluent rencontre des zones de turbulences. Une fois dans la partie aérienne de la canalisation, l'H₂S va servir de source d'énergie à d'autres types de bactéries (bactéries sulfo-oxydantes) qui vont l'oxyder en acide sulfurique sur les parois de la canalisation et entraîner la dégradation de cette dernière.

Néanmoins, tous les matériaux ne sont pas équivalents face à cette attaque biogénique. En s'intéressant uniquement aux matériaux cimentaires, on constate des différences de durabilité en fonction des formulations employées. Les expositions sur sites et les retours terrains réalisés dans divers réseaux à travers le monde montrent que les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium ont de meilleures performances que ceux à base de ciment Portland, les taux de corrosion étant de trois à douze fois inférieurs dans le cas du ciment d'aluminate de calcium. Le ciment Portland étant majoritairement utilisé dans les réseaux d'assainissement, il a été bien étudié et des mécanismes de biodétérioration ont été proposés. Au contraire, le ciment d'aluminate de calcium, malgré ses bonnes performances, occupe une part du marché de l'assainissement beaucoup plus restreinte et ainsi une plus faible occurrence dans les travaux de recherche. La bonne tenue des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium serait due à un certain nombre de facteurs : une capacité de neutralisation à l'acide plus importante, la formation d'un gel d'alumine ayant une zone de pH stable importante, une concentration en aluminium suffisante pour inhiber la croissance des microorganismes impliqués dans les processus de biodétérioration.

Ce travail de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement en s'intéressant plus particulièrement à la différence de comportement entre les ciments d'aluminate de calcium et les ciments Portland. En parallèle, il a pour but de mettre au point un essai accéléré normalisable en laboratoire qui recrée les conditions des réseaux d'assainissement pour pouvoir classer les matériaux du point de vue de leur durabilité.

Pour répondre à ces problématiques, des essais *in situ* et en laboratoire ont été menés et les résultats sont rassemblés dans ce manuscrit subdivisé en cinq chapitres.

Le premier est dédié à une étude bibliographique qui s'intéresse tout d'abord à la biodétérioration des matériaux. Ce chapitre décrit ensuite les différents matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement et détaille les aspects spécifiques de la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les systèmes de traitement des eaux usées. Enfin, les différents essais accélérés mis au point sur la biodétérioration des matériaux cimentaires sont présentés. Le chapitre suivant présente les matériaux, les matériels et les méthodes utilisés et mis au point dans le cadre de cette étude. Le troisième chapitre expose les résultats relatifs aux essais réalisés sur sites destinés à mieux comprendre l'impact de l'environnement et de la formulation cimentaire dans les processus de biodétérioration. Il est suivi d'un chapitre regroupant l'ensemble des résultats des expériences qui ont été menées en laboratoire et qui permettent de mieux appréhender certaines phases du mécanisme de biodétérioration. Le dernier chapitre est dédié à la mise au point d'un essai accéléré qui se base sur les résultats obtenus dans les deux précédents chapitres. Enfin, les principaux résultats de ce travail sont rassemblés dans une dernière partie ainsi que les nouvelles perspectives de recherche qui en découlent.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Introduction

Les premiers réseaux d'assainissement connus ont été datés de l'époque romaine. Il est reconnu que ce peuple aimait les eaux de qualité et n'hésitait pas à construire de grands ouvrages tels que les aqueducs. Mais l'eau qui entre dans une ville doit également en ressortir, c'est pourquoi les romains ont imaginé un système d'évacuation. C'est la genèse des égouts qui avaient pour unique fonction le transport des eaux usées. Le plus ancien réseau d'égouts connus est la *cloaca maxima* de Rome qui a été entrepris par Tarquin l'Ancien à la fin du VII^{ème} siècle avant J.C. (Figure I-1). Les matériaux employés à cette époque dépendaient des ressources locales. On trouve donc la brique maçonnée et la pierre de taille mais des fouilles faites à Bordeaux montrent que le bois était également employé comme matériau de construction [1].



Figure I-1 : Photographies de la *Cloaca maxima* à Rome.

A l'époque des barbares (III^{ème} au V^{ème} siècle), les égouts n'étaient plus entretenus. Ils finissaient par s'engorger et n'étaient plus utilisables. L'eau stagnante et croupie était porteuse de nombreux désagréments allant des mauvaises odeurs aux maladies. L'évacuation des eaux usées était réalisée grâce au dénivelé, les eaux se dirigeaient vers les rivières impactant directement le milieu naturel. Par nécessité et peut-être par mesures d'hygiène, des tranchées ont ensuite été creusées au milieu des voies et étaient parfois recouvertes de dalles. Ce système rudimentaire était curé lors des orages qui entraînaient les différents détritiques et sédiments.

Vers 1200, Philippe Auguste a fait paver les rues de Paris en prévoyant en leur milieu une rigole d'évacuation. Il faut cependant attendre 1325 pour qu'apparaisse pour la première fois la présence d'une galerie couverte (archives de Paris). Hugues Aubriot, prévôt de Paris, fit construire en 1374 un égout vouté et maçonné d'une centaine de mètres rue Montmartre qui rejoignait le ruisseau de Ménilmontant. Il avait également prévu le développement de ce réseau et la couverture de certains sites, certainement à cause des odeurs. A cette époque le réseau d'assainissement était composé de peu de canalisations inégalement raccordées et mal entretenues. Pour répondre aux débuts d'engorgement des égouts, la ville de Paris se dota en 1740 d'un réservoir pour stocker une grande quantité d'eau permettant de faire des curages réguliers.

Au début du XIX^{ème} siècle, le réseau d'assainissement de la ville de Paris était incohérent, vétuste et ne faisait que 25 km. Les canalisations de petit diamètre n'étaient pas ou peu entretenues. Emmanuel Bruneseau, inspecteur des Egoûts de Paris, réclama donc un curage général du réseau et sa cartographie.

En 1832, l'épidémie de choléra qui toucha Paris fit prendre conscience de l'utilité des réseaux d'assainissement. De grands travaux furent alors entrepris pour transformer le réseau parisien. Les canalisations devinrent ainsi des galeries ovoïdes suffisamment grandes pour permettre l'intervention des ouvriers.

En 1852, une loi est publiée à Paris sur l'obligation de raccorder les nouvelles constructions à l'égout si celui-ci existait, puisque les canalisations parisiennes ne représentaient que 160 km. Il faut ensuite attendre 1854 pour que les travaux du Baron Haussmann, préfet de la Seine, et de l'ingénieur Eugène Belgrand permettent le développement du réseau d'assainissement et d'approvisionnement en eau de la ville de Paris. Par la suite, le réseau de canalisation se développa lentement pour passer de 600 km en 1878 à 2450 km aujourd'hui.

L'évolution du réseau d'assainissement de la ville de Paris (Tableau I-1) est similaire à celle de la plupart des grandes villes françaises et européennes.

Tableau I-1 : Evolution de la longueur du réseau d'assainissement à Paris, d'après [2].

Date	Longueur du réseau (en km)
1806	23
1815	28
1825	34
1830	45
1848	134
1852	157
1878	600
Fin du XIX ^e	1000
Aujourd'hui	2450

Le linéaire de conduite d'eaux usées sur l'ensemble de la France métropolitaine a été estimé par l'office international de l'eau [3] pour la période entre 1962 et 1998 (Figure I-2). Ces données permettent de reconstituer un historique du linéaire de conduites des réseaux d'assainissement.

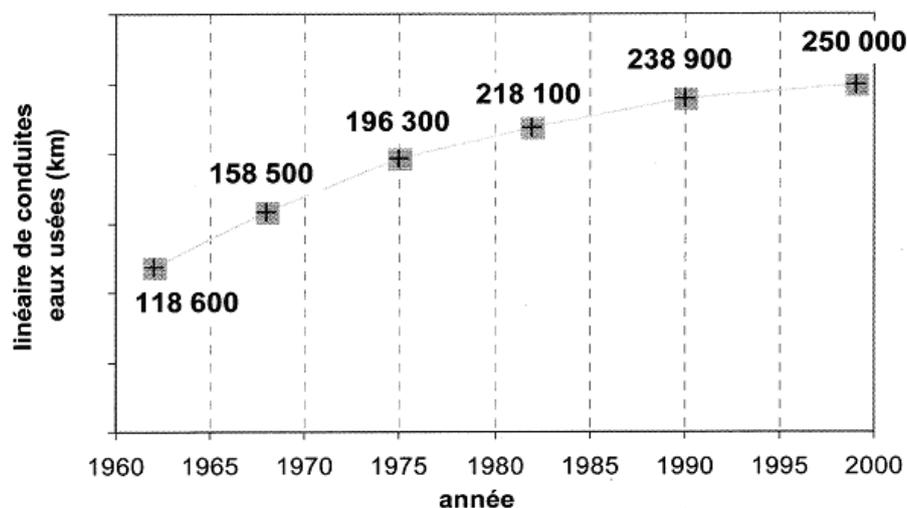


Figure I-2 : Estimation de l'évolution, entre 1962 et 1998, du linéaire de conduites d'eaux usées sur l'ensemble de la France métropolitaine [3].

En France, les réseaux d'assainissement urbains sont âgés pour la plupart de 40 à 50 ans et nécessitent aujourd'hui des travaux de réhabilitation importants. Il est estimé par Satin et Selmi [4] que 10% des linéaires ont plus de 60 ans alors qu'ils ont été initialement construits pour une durée de vie comprise entre 60 et 80 ans.

Dans un autre contexte, au niveau européen, des mesures ont été mises en place pour réduire la pollution de l'eau (cours d'eau, nappes phréatiques, lacs,...). Le conseil des communautés européennes a arrêté le 21 mai 1991 la directive européenne (Directive 91/271/CEE) relative au traitement des eaux urbaines résiduaires fixant des objectifs à atteindre par les Etats membres mais les laissant libres du choix des moyens pour y parvenir. Cette directive impose, par les articles 3 et 4, aux agglomérations de l'Union Européenne de collecter et de traiter leurs eaux urbaines résiduaires. L'article 7 indique que la date butoir de mise en service de ces infrastructures était le 31 décembre 2005. En 2008, la France ne respectait toujours pas la directive bien qu'elle ait été condamnée par la cour de justice des communautés européennes pour ce motif. Il est à noter que beaucoup d'agglomérations n'ont toujours pas de station d'épuration. La directive cadre sur l'eau de 2006 précise également dans l'article L1331-1 que « le raccordement des immeubles aux réseaux publics de collectes ... est obligatoire dans un délai de deux ans à compter de la mise en service du réseau public de collecte ». L'article L1331-13 précise que « les zones d'urbanisation future ne peuvent être urbanisées que sous réserve de l'existence ou du début de réalisation d'un équipement de traitement et d'évacuation des effluents des futures constructions, installations et aménagements ». Le respect de ces règlements va conduire à une augmentation de la construction de réseaux d'assainissement et de stations d'épurations dans les prochaines années.

Par ailleurs, au niveau international, l'assemblée générale des Nations Unis a déclaré l'année 2008 année internationale de l'assainissement avec dans le cadre des objectifs du millénaire pour le développement un engagement à réduire de moitié le nombre de personnes n'ayant pas accès à l'eau potable et à un assainissement convenable d'ici 2015. En effet, beaucoup de pays en voie de développement ne sont pas encore équipés de réseaux d'assainissement (Figure I-3). Selon un rapport conjoint de l'UNICEF et de l'Organisation Mondiale de la Santé, en Afrique, seulement 45% de la population dispose d'installations sanitaires et 62% n'a pas accès à des installations convenables [5]. L'Union Européenne n'est pas épargnée puisque des pays comme la Roumanie ont jusqu'à 40% de leur population qui n'est pas reliée à un système d'assainissement. Les besoins en assainissement dans le monde sont donc très importants.

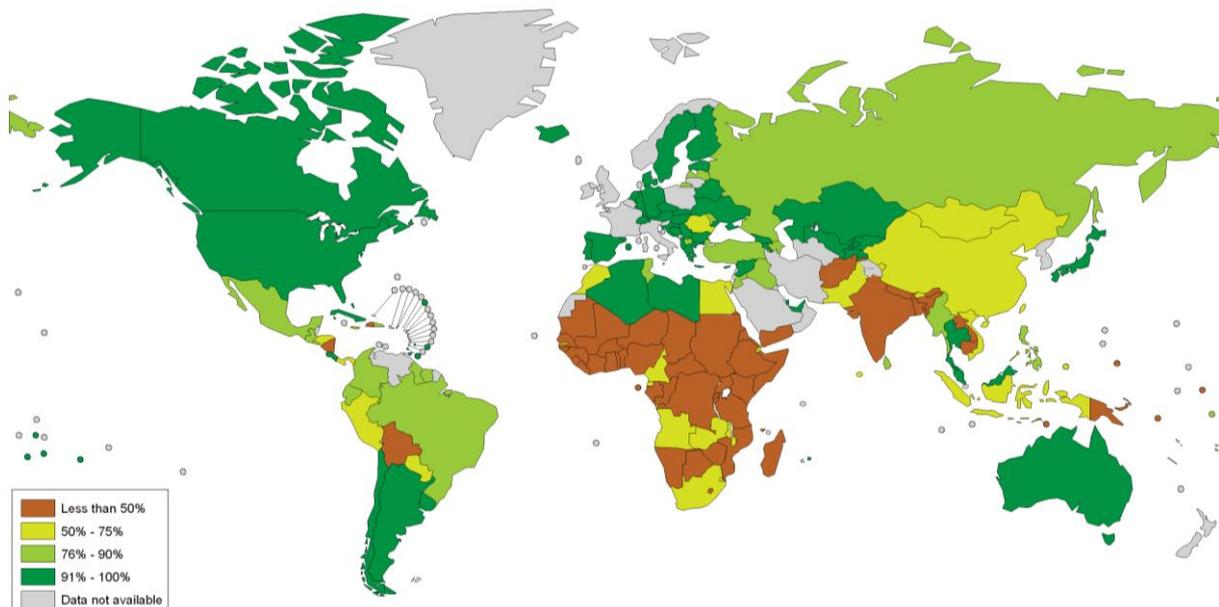


Figure I-3 : Proportion de la population utilisant des installations sanitaires améliorées [6].

Ainsi, la nécessité de réhabiliter certaines parties du réseau d'assainissement des grandes villes, la construction de nouveaux réseaux découlant des directives européennes sur l'eau et le souhait des Nations Unies de réduire le nombre de personnes n'ayant pas accès à des systèmes d'assainissement dans le monde et notamment dans les pays en voie de développement conduisent aujourd'hui les gestionnaires et les fabricants de produits manufacturés à s'interroger sur la construction de réseaux d'assainissement durables et sur l'optimisation des protocoles de gestion vis-à-vis d'un usage donné.

Ce travail de recherche s'inscrit dans une des problématiques liées à la pérennité des structures d'assainissement : la dégradation des matériaux cimentaires par des processus bio-physico-chimiques. Dans ce chapitre consacré à la bibliographie, nous allons détailler les différents aspects de cette dégradation. La première partie de ce chapitre traitera de manière générale de la biodétérioration des matériaux et la deuxième partie présentera les matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement. Une troisième partie développera les différentes étapes des processus de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement. Enfin, une dernière partie sera consacrée à l'analyse des expérimentations *in situ* et des essais en laboratoire mis en œuvre pour l'étude de la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement. Cet état de l'art permettra de définir les objectifs de notre recherche.

I-1. La biodétérioration des matériaux

Un matériau depuis sa fabrication et pendant toute sa vie en service peut subir des agressions qui vont modifier ses propriétés initiales. Ces agressions peuvent être physiques, chimiques ou biologiques suivant l'environnement en contact du matériau.

Les détériorations induites par des microorganismes, ou biodétérioration, sont des phénomènes très souvent rencontrés qui touchent de nombreux matériaux qu'ils soient

métalliques, minéraux, polymères ou biologiques (Figure I-4). Dans certains cas, la biodétérioration mène à la destruction totale du matériau.

Le terme microorganismes est utilisé pour désigner l'ensemble des êtres vivants microscopiques. Ainsi, ce terme regroupe les bactéries, les champignons, les levures, les micro-algues, les lichens et les mousses. Certains y incluent également les virus.



Figure I-4 : Exemples de biodétérioration de différents matériaux : canalisation métallique, dents, pierres dans une rivière.

D'un point de vue terminologique, il est essentiel de faire la distinction entre une bioaltération et une biodétérioration. Une bioaltération est caractérisée par des modifications de surfaces générées par l'action de microorganismes, ces modifications généralement visibles ne diminuant pas les propriétés du matériau (c'est le cas par exemple pour la formation d'une patine ou le développement d'algues photosynthétiques sur une surface).

De la même façon, la biodétérioration ne doit pas être confondu avec la biodégradation qui est d'après la définition du journal officiel (JORF n°0087 texte 38) un processus conduisant à la décomposition de la matière organique en un ensemble de molécules simples et non dangereuses pour le milieu naturel. Ce phénomène est induit par des microorganismes tels que des bactéries, des champignons et des micro-algues et peut être assimilé à une bioconversion ou à une biotransformation du matériau.

La biodétérioration se définit comme l'endommagement non désiré d'un matériau sous l'action de microorganismes. Les processus de biodétérioration conduisent à la perte des propriétés du matériau, aux modifications de sa composition ou encore aux chutes de ses caractéristiques mécaniques. Quand le matériau est inclus dans un ouvrage, la biodétérioration peut entraîner un risque pour la structure.

De nombreux domaines sont touchés par la biodétérioration. On peut citer par exemple l'industrie pétrolière (puits d'extraction, plates formes,...), les installations portuaires maritimes et fluviales, les centrales de production d'électricité ou l'industrie aérospatiale (de la biocorrosion a été observée dans des réservoirs de kérosène) [7]. Les matériaux du patrimoine sont également touchés par ces détériorations d'origine biologique [8]. En guise d'exemple, nous pouvons citer le cas du verre et celui du bois. La matrice siliceuse du verre peut-être attaquée par des champignons ou par des bactéries qui produisent des composés acides entraînant la dissolution progressive de la matrice, son opacification et la formation de taches noires. En extérieur, le bois est soumis à l'action de microchampignons et de bactéries. Les attaques fongiques principales du bois sont les pourritures blanches, brunes et molles. L'attaque du bois par des bactéries et des actinomycètes nécessite un fort contenu en eau trouvé par exemple dans les environnements marins et en extérieurs très humides.

Pour qu'un phénomène de biodétérioration impacte un matériau, il est nécessaire de rassembler trois paramètres : un matériau, des microorganismes et un milieu favorable (Figure I-5).

Durant les processus de biodétérioration, des interactions interviennent entre les différents paramètres : la surface du matériau est en interaction avec le milieu extérieur, les microorganismes présents sous forme de biofilm réagissent avec la surface du matériau et le biofilm est dépendant du milieu extérieur. Chaque interaction est importante et va influencer sur l'évolution des propriétés du matériau. Nous allons donner dans la suite de cette partie quelques éléments liés à chacun des paramètres et à leurs interactions.

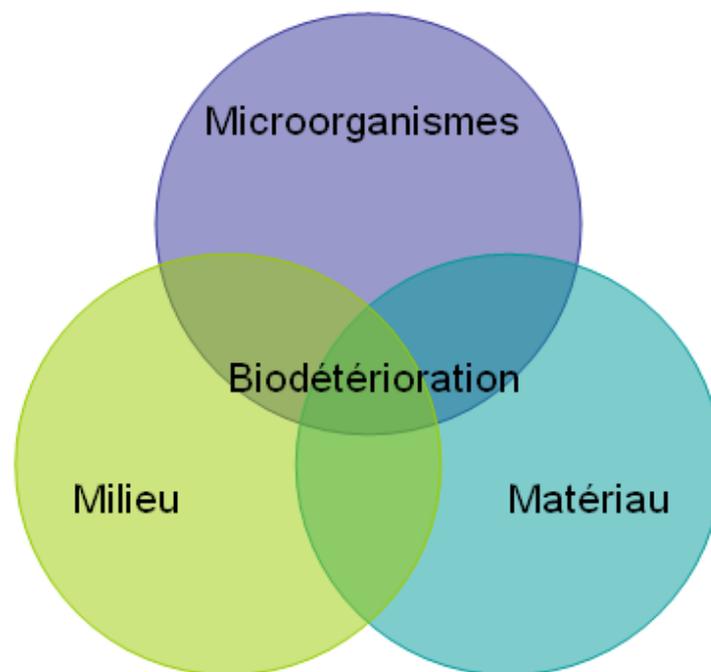


Figure I-5 : Paramètres menant à la biodétérioration.

I-1.1. Le milieu

Le milieu extérieur apporte les microorganismes et une partie des nutriments nécessaires à leur croissance. Il est donc le vecteur de la biodétérioration.

Suivant les paramètres du milieu, la biodétérioration sera plus ou moins favorisée. Les conditions d'humidité relative, de température et de pH sont les principaux paramètres qui vont régir la croissance des microorganismes, chacun des microorganismes nécessitant des conditions bien définies.

Les flux rencontrés dans le milieu vont aussi jouer un rôle majeur. La présence d'écoulements, de frottements ou de turbulences dans le milieu peut entraîner le détachement de certains microorganismes et ainsi favoriser la colonisation de nouvelles surfaces.

Le milieu extérieur peut aussi avoir une influence directe sur le matériau. Par exemple, la lumière a un effet catalytique sur de nombreuses réactions chimiques, le gaz carbonique peut agir sur certains composés, l'eau peut dissoudre les sels,... Ces modifications initient souvent

la colonisation de la surface du matériau par certains microorganismes qui sans ces transformations n'auraient pas trouvé les conditions nécessaires à leur croissance.

I-1.2. Les microorganismes

Les microorganismes sont les agents de la biodétérioration en ayant une action directe ou indirecte sur le matériau. Dans le cas d'une attaque directe, la détérioration va résulter de la simple présence des microorganismes. La détérioration peut alors résulter de la formation de matière biologique dans la porosité du matériau, créant des contraintes internes et aboutissant à la fissuration ou à l'éclatement du matériau. Dans le cas d'une attaque indirecte, les microorganismes sont à l'origine de la production d'une substance qui va réagir avec le matériau. Cette réaction peut entraîner la dissolution du matériau ou la formation de produits expansifs et/ou non cohésifs.

La plupart du temps, les microorganismes les plus nuisibles se développent sous forme de biofilm ce qui leur permet de se créer un environnement encore plus favorable en termes d'humidité relative, de nutriment et d'association entre différents types de microorganismes. Avec ce type d'organisation, les microorganismes peuvent devenir résistants à certaines conditions particulières du milieu environnant telles que les chocs thermiques ou hydriques, la présence d'inhibiteur de croissance, de radiations lumineuses ou d'antibiotiques.

Un biofilm se définit comme une communauté structurée de cellules microbiennes enrobées dans une matrice polymérique auto-produite et adhérentes les unes aux autres ou à une surface inerte ou vivante [9]. La formation d'un biofilm est un processus qui s'effectue de manière progressive (Figure I-6). Tout d'abord, des microorganismes planctoniques (ou libres) vont se déposer sur une surface et vont, soit s'en détacher, soit s'y fixer à l'aide de fimbriae (organite bactérien ayant la forme de cils ou de poils et permettant l'adhésion). L'état de surface du matériau est déterminant ; plus la rugosité est importante, plus la phase d'attachement est favorisée. Ces microorganismes vont ensuite se développer en micro-colonies et vont produire une matrice de substances polymériques extracellulaires. Ces substances sont principalement composées de polysaccharides et de protéines permettant l'adhésion des bactéries aux surfaces mais créant également un environnement favorable d'un point de vue osmotique et hydrique. Le biofilm suit ensuite une phase de maturation pendant laquelle une organisation peut apparaître. Au cours de la vie du biofilm, des fragments peuvent être arrachés ou libérés et coloniser d'autres surfaces. Un biofilm peut-être composé d'une seule souche bactérienne mais on retrouve en général une certaine organisation avec plusieurs souches bactériennes qui vivent en synergie.

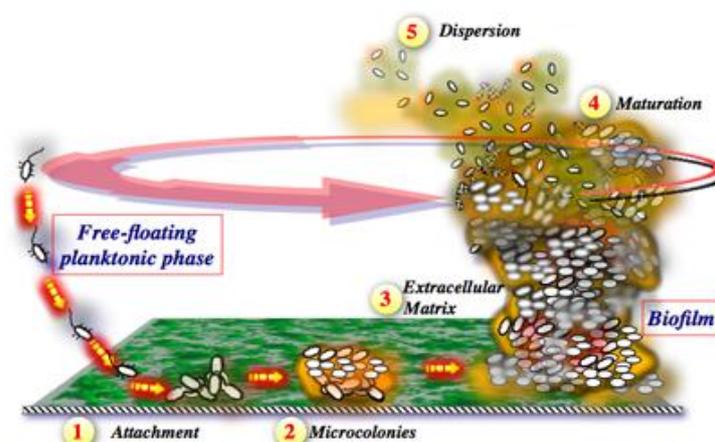


Figure I-6 : Etapes de formation d'un biofilm [10].

La présence d'un biofilm à la surface d'un matériau entraîne fréquemment son altération et, suivant le type de microorganismes, sa détérioration.

I-1.3. Le matériau

Le matériau est le support physique de la détérioration et différents paramètres liés à ce matériau vont intervenir lors du processus de biodétérioration parmi lesquels sa composition chimique, sa porosité et son état de surface.

La composition chimique du matériau va permettre ou non la croissance de certains types de microorganismes. Suivant l'espèce microbienne considérée, certains éléments présents dans la matrice du matériau pourront servir de nutriments ou au contraire d'inhibiteurs de croissance, voire de poisons.

La porosité est un paramètre à prendre en compte puisque si la taille, la géométrie et le positionnement des pores permettent l'entrée des microorganismes dans le matériau, ces derniers risquent d'augmenter la vitesse de dégradation. A titre d'exemple, les microchampignons utilisent en partie la porosité pour développer des hyphes (filaments plus ou moins ramifiés) leur permettant de récupérer les nutriments dissous dans l'eau piégée de la porosité du matériau.

Enfin, l'état de surface est un facteur aggravant lors de la colonisation microbienne. La présence d'une rugosité importante entraîne une augmentation de la surface de réaction entre le matériau et le milieu extérieur et peut favoriser le dépôt de nutriments ou de microorganismes. Par ailleurs, cette rugosité favorise l'accrochage et limite l'entraînement du biofilm en présence d'un flux liquide ou gazeux.

Comme le choix d'un matériau en fonction de son environnement apparaît essentiel pour sa pérennité, nous allons maintenant nous intéresser aux différents matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement et aux dégradations qu'ils subissent.

I-2. Les matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement

Les matériaux employés dans les réseaux d'assainissement sont très variés et dépendent en grande partie de l'époque de construction. Les techniques et les possibilités des concepteurs de réseaux ont évolué en fonction des avancées du génie civil et des coûts de mise en œuvre des matériaux. Les canalisations les plus anciennes qui sont parvenues jusqu'à nous étaient construites en pierres de taille mais ce mode de construction était long et coûteux ; les pierres extraites des carrières proches devaient être retaillées sur place pour optimiser les formes et permettre un assemblage parfait de la structure. Par la suite, la brique a été utilisée car elle permettait d'accélérer la construction des réseaux à un prix plus faible. L'arrivée du béton a profondément modifié la conception des réseaux d'assainissement. Les temps nécessaires aux travaux de constructions sont devenus plus courts. La préfabrication des canalisations en usine a encore amélioré la conception des réseaux d'assainissement puisqu'une simple tranchée est alors nécessaire à l'installation de canalisations réalisées en usine dans des conditions parfaitement maîtrisées. Le développement des polymères ces dernières années s'inscrit également dans une démarche de progrès notamment pour l'assainissement individuel.

I-2.1. Répartition des matériaux dans les réseaux d'assainissement

De nos jours, les matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement sont essentiellement le béton et la pierre mais on trouve également, et dans une plus faible proportion, la brique, les polymères et la fonte. Le Tableau I-2 présente à titre d'exemple la distribution de chaque matériau dans les réseaux allemands en 1999. La Figure I-7 donne des exemples de canalisations réalisées avec différents matériaux.

Tableau I-2 : Matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement allemand, d'après [11].

Matériau	Pourcentage (en %)
Béton	46
Pierre	38
Brique	6
Fonte	5
Polymère	5



Figure I-7 : Photographies de canalisations de réseaux d'assainissement réalisées à partir de différents matériaux (pierre, polymère, béton).

I-2.2. Détériorations rencontrées dans les réseaux d'assainissement

L'environnement qui règne dans les réseaux d'assainissement peut être agressif pour l'ensemble des matériaux. La plupart des dégradations rencontrées est générée par des fissures, des joints défectueux entre les canalisations, des déplacements de joints et par la corrosion (Tableau I-3). Ces dégradations sont essentiellement dues à une mauvaise conception, une mauvaise construction ou à un trop fort débit et sont quelquefois à l'origine de la pollution des eaux souterraines. Une estimation de 500 millions de mètres cube d'eau usée par an est donnée par Kaempfer et Berndt [11] concernant la pollution des sols et des eaux souterraines en Allemagne.

Face aux dégradations rencontrées dans les réseaux d'assainissement, un texte normatif a été rédigé pour établir un référentiel de codification des détériorations permettant de faciliter le dialogue entre les intervenants. Ainsi, les normes NF EN 13508-1¹ et NF EN 13508-2 s'appliquent à la détermination de l'état des réseaux d'évacuation et d'assainissement par inspection, la codification de l'état constaté et la prise en considération des facteurs extérieurs.

¹ Les références concernant les normes citées dans ce document sont rassemblées dans l'annexe a.

D'un point de vue du matériau, le Tableau I-3 nous indique que 9% des dégradations sont dues aux attaques bio-physico-chimiques, 6% à l'érosion de surface et 22% à la fissuration. L'ensemble de ces détériorations peut être causé par l'action plus ou moins directe de microorganismes, il y a donc un intérêt majeur à comprendre les mécanismes chimiques et biologiques de détérioration pour construire, réparer et réhabiliter les réseaux d'assainissement.

Tableau I-3 : Distribution des défauts des canalisations en Allemagne, d'après [11].

Défaut	Pourcentage (en %)
Défaut de connexion	24
Fissure	22,1
Déplacement de joint	22,1
Biodétérioration / Attaque de gaz	8,7
Erosion de surface	5,8
Trou	5,8
Déformation	3,8
Incrustation	3,8
Racines de végétaux	3,8

Une enquête réalisée en France par le Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB) en 1989 [12] auprès de 1106 gestionnaires pour un linéaire test de 49281 km recense les dégradations rencontrées dans les réseaux d'assainissement (Tableau I-4). Elles résultent dans 24% des cas traités, d'un mauvais choix de matériau. Dans ce cas, il est précisé que 65% des matériaux étaient fissurés, 9% avaient subi une abrasion importante et 26% avaient été impactés par des problèmes de corrosion. Pour cette dernière problématique liée à des mécanismes de biodétérioration, l'hydrogène sulfuré (H_2S) présent dans les réseaux d'assainissement constitue le paramètre moteur comme nous le verrons en détails dans la partie 3 de ce chapitre.

Tableau I-4 : Dégradations et dysfonctionnements observés lors d'une enquête du CSTB en 1989 [12].

Défaut	Pourcentage (en %)
Obstacle pénétrant	10,8
Eaux parasites	29,3
Mauvais choix de matériaux	23,6
Exfiltration	10
Ensablement	5,7
Affaissement	6,4
Ecrasement	4,4
Rugosité	4,4
Contre-pente	5,4

Ce gaz nocif et corrosif intervient dans des mécanismes biochimiques permettant aux bactéries de trouver leur énergie. La conséquence de ces mécanismes est l'oxydation de ce gaz en acide sulfurique particulièrement néfaste pour les matériaux cimentaires. On constate par exemple que 40 à 70% des postes de refoulements sont touchés par ce type de dégradation.

I-2.3. Les matériaux

I-2.3.1. Les matériaux anciens

Les ouvrages d'assainissement anciens sont réalisés en maçonnerie qui est un agencement de pierres ou de briques jointées [13]. De manière générale, du mortier est utilisé comme matériau de liaison.

La pierre la plus rencontrée dans les réseaux d'assainissement est le grès qui est une roche sédimentaire généralement siliceuse et a été utilisée pour la construction des premiers réseaux d'assainissement. Les pierres siliceuses, à condition d'avoir été posées parfaitement, sont résistantes aux conditions acides qui peuvent être rencontrées dans les réseaux d'assainissement alors que les pierres calcaires se dissolvent très rapidement.

Les canalisations réalisées en briques de terre cuite sont actuellement peu courantes. En effet, outre l'intervention d'une main d'œuvre qualifiée, la brique est fragile et particulièrement sensible aux changements fréquents d'humidité relative.

De manière générale, la maçonnerie n'est plus utilisée depuis des dizaines d'années dans les pays industrialisés et les interventions sur ces ouvrages se font dans l'unique optique de les réhabiliter. Il n'est pas rare de trouver sur les ouvrages en maçonnerie une couche de matériau cimentaire projetée lors de travaux de réhabilitation. En effet, cette technique permet de conserver la fonctionnalité de la canalisation en s'affranchissant d'une grande campagne de travaux de reconstruction.

I-2.3.2. La fonte

Une fonte est un alliage métallique dont l'élément essentiel est le fer et dont la teneur en carbone est supérieure à 2%. Suivant la composition de la fonte, le matériau va avoir des propriétés différentes. Les tuyaux en fonte d'assainissement ou « fonte intégrale » pour les ouvrages à écoulement libre sont conformes à la norme NF EN 598.

La plupart du temps, un revêtement en matériau cimentaire, typiquement un mortier, est projeté à l'intérieur de la canalisation pour servir de couche sacrificielle. La canalisation est ainsi isolée du milieu agressif ce qui prolonge sa durée de vie. Les détériorations observées sur ce matériau composite vont alors être les mêmes que sur un matériau cimentaire. D'après le Guide Technique de l'Assainissement rédigé par Satin et Selmi [4], les tuyaux en fonte ductile et revêtement intérieur en ciment alumineux ont des résistances aux attaques acides fiables.

I-2.3.3. Les polymères

Un des polymères le plus utilisé, le polyéthylène haute densité (PEHD), est un matériau flexible et relativement léger. Sa grande ductilité le préserve des cassures et lui confère une bonne résistance aux chocs. Cependant, sa faible dureté le rend sensible aux attaques des rongeurs et favorise les altérations de ses parois externes par friction. A cause de leur souplesse, les canalisations circulaires en polymère sont sujettes à l'ovalisation. Par ailleurs, d'un point de vue physico-chimique ou biochimique, le faible recul de temps sur l'utilisation de ce type de matériaux ne permet pas de donner une estimation correcte de leur durée de vie à long terme. En particulier, leurs propriétés mécaniques peuvent être modifiées dans le temps

par l'extraction de certains constituants présents dans les matériaux polymères comme les stabilisants, les plastifiants, ...

Dans une autre optique, des revêtements en résine époxyde sont parfois appliqués pour protéger ou réparer les structures existantes. Ce type de résine allie une grande stabilité chimique à une résistance importante à la rupture et aux fissures. Cependant cette solution présente un coût non négligeable et les revêtements en résine époxyde ne protègent pas toujours durablement les structures en béton contre la biodétérioration. Les conditions de réalisation et de mise en place de cette résine sont primordiales pour les propriétés finales du revêtement. De Muynck *et al.* [14] ont travaillé sur différents traitements de surface et ajouts à du béton de type Portland pour améliorer sa résistance aux attaques acides. Ils en concluent que la meilleure protection a été obtenue grâce au revêtement en résine époxyde et que les ajouts de silicate hydraté ou de composé antimicrobien n'ont pas amélioré la tenue du matériau cimentaire. Cependant Milde *et al.* [15] ont montré que des canalisations en béton nouvellement installées et recouvertes d'une fine couche de résine époxyde dans le réseau d'assainissement d'Hambourg ont subi une dégradation en quelques années seulement. La résine forme des pustules et des trous qui révèlent un matériau sous-jacent très dégradé. Les zones dans lesquelles vont se développer ces dégradations sont généralement des zones de défauts dues soit à une mauvaise application de la résine soit à des abrasions causées *a posteriori* par les déchets contenus dans l'effluent.

I-2.3.4. Les matériaux cimentaires

Les matériaux cimentaires sont des matériaux conçus à partir de ciment. On distingue trois types de matériau dans cette classe : les pâtes de ciments, les mortiers et les bétons. Les pâtes de ciments ne sont pas employées dans les réseaux d'assainissement mais les mortiers et les bétons y sont largement développés, sous forme d'éléments préfabriqués mais aussi au niveau des zones réhabilitées, réparées ou rénovées. Ainsi, les matériaux cimentaires sont très présents et leurs comportements doivent être étudiés avec soin.

I-2.3.4.1. Les ciments

Le ciment est un liant hydraulique, c'est-à-dire un matériau minéral finement moulu qui, mélangé avec de l'eau, forme une pâte qui fait prise et durci. Il existe différents types de ciments apportant des propriétés particulières en termes de durée de prise, de résistance,...

En décembre 2009, le fascicule de documentation FD P 18-011 a été publié par l'AFNOR pour définir et classer les environnements chimiquement agressifs. Ce nouveau fascicule se caractérise par l'introduction de l'hydrogène sulfuré comme agent agressif en milieu humide. Trois classes d'exposition ont été définies selon la norme NF EN 206-1 et correspondent à trois niveaux d'agressivité chimique (XA1, XA2 et XA3). Les valeurs des différents seuils concernant l' H_2S sont données dans le Tableau I-5. Une des recommandations de ce fascicule est d'incorporer dans le béton une addition hydraulique ou pouzzolanique (laitier de haut fourneau, cendres volantes, fumée de silice utilisés en substitution partielle de ciment CEM I ou incorporés au béton sans substitution de ciment) pour limiter la teneur en portlandite² ($Ca(OH)_2$) et ainsi conférer au ciment une bonne tenue au contact des solutions acides.

² Les mécanismes d'hydratation des ciments ainsi que la nature et les propriétés des composés formés sont donnés en annexe b.

Tableau I-5 : Définition de la classe d'agressivité chimique en fonction de la concentration (ppm) en H₂S [16].

	XA1	XA2	XA3
Concentration homogène	< 0,1	≥ 0,1 et ≤ 10	> 10 et ≤ 200
Concentration non homogène	< 0,1	≥ 0,1 et ≤ 7	> 7 et ≤ 25

Dans le cas d'un milieu acide et avec une classe d'exposition XA3, ce fascicule préconise l'utilisation de cinq types de ciments : les CEM III, CEM IV, CEM V ainsi que les ciments sursulfatés et d'aluminates de calcium. Ces ciments font l'objet de différentes normes : NF P 15-319 pour les CEM III et V, NF P 15-313 pour les ciments sursulfatés, NF EN 14647 pour les ciments alumineux et NF EN 197-1 pour les CEM IV.

La norme européenne EN 197-1 détaille les ciments courants. Ils sont divisés en cinq types selon leur composition :

CEM I	Ciment Portland
CEM II	Ciment Portland composé
CEM III	Ciment de Haut fourneau
CEM IV	Ciment pouzzolanique
CEM V	Ciment composé

Comme nous venons de le voir, les ciments CEM III, IV et V peuvent être utilisés dans les environnements agressifs. Ces trois types de ciments contiennent respectivement du laitier de haut fourneau, de la pouzzolane et des cendres volantes mélangées à du laitier de haut fourneau. Ces ciments se caractérisent par une proportion plus faible de portlandite ce qui leur permet d'être moins réactifs face à une attaque acide.

Le ciment sursulfaté est un ciment élaboré à partir de laitier de haut-fourneau (≥ 80%), de sulfate de calcium (≤ 20%) et d'un système d'activation. Le processus d'hydratation de ce ciment lui permet une consommation totale de la portlandite entraînant une bonne résistance vis-à-vis des attaques chimiques. Comme ce ciment libère une très faible chaleur d'hydratation, il est long à prendre et a été délaissé. Il est donc peu utilisé dans les réseaux d'assainissement.

La norme française NF P 15-315 décrit le ciment alumineux fondu comme un liant hydraulique qui résulte de la mouture, après cuisson jusqu'à la fusion, d'un mélange composé principalement d'alumine, de chaux, d'oxydes de fer et de silice, dans des proportions telles que le ciment obtenu renferme au moins 30% de sa masse d'alumine. Sa composition chimique particulière et l'absence de libération d'hydroxyde de calcium pendant son hydratation lui permettent de résister à de nombreux agents agressifs (eaux pures, sulfates, eaux de mer, acides organiques et minéraux,...).

I-2.3.4.2. Les mortiers

Le mortier est un mélange de liants (chaux ou ciment), de sable, d'eau et éventuellement d'adjuvants. Selon les performances souhaitées, on utilise des formulations variées, notamment en ce qui concerne les liants. Il n'est pas utilisé en matériau de construction mais comme revêtement ou comme joint pour les canalisations en pierres ou en briques. Les mécanismes impliqués dans la détérioration de ce matériau sont les mêmes que pour le béton.

I-2.3.4.3. Les bétons

Le terme béton est un terme générique désignant un matériau de construction composé à partir de granulats naturels ou artificiels, de sable, de ciment et d'eau. Les matériaux de base utilisés lors de la fabrication du béton vont influencer sur les propriétés du béton final. Le béton présente l'avantage d'être pré-fabricable, les canalisations des réseaux d'assainissement peuvent ainsi être fabriquées en usine et transportées sur le chantier pour une utilisation immédiate. Le choix du ciment et des granulats pour la confection des éléments en béton est conditionné par les données disponibles concernant l'agressivité de l'effluent.

Suivant les risques ou les problèmes rencontrés, la formulation du béton pourra être adaptée. Sur un site sans problème particulier, du béton au ciment Portland pourra être utilisé alors que sur un site présentant de fortes abrasions, un béton à base de ciment alumineux est préférable compte tenu de sa meilleure résistance. D'après les retours de terrains [17-19], les bétons au ciment alumineux présentent également l'avantage d'être plus durable dans les zones de biodétérioration.

I-3. La biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement

La biodétérioration est un phénomène extrêmement dangereux et dommageable pour les matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement. Elle a été étudiée pour la première fois en 1900 par Olmstead et Hamlin [20] qui ont décrit la détérioration d'un déversoir en briques du réseau de Los Angeles aux Etats-Unis. Le mortier jointif entre les briques se désintégrait et les ferronneries étaient fortement rouillées. Ces auteurs précisent également que le joint de mortier avait gonflé pour atteindre un volume de 2 à 3 fois son volume initial et que ceci a conduit à la destruction ou au déchaussement de certaines briques.

D'autres études ont été menées depuis et les exemples donnés dans le Tableau I-6 montrent que la perte de matière peut atteindre plusieurs millimètres par an.

Tableau I-6 : Valeurs de perte d'épaisseur de matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement.

Source	Perte de masse (en mm an ⁻¹)	Type de matériau
US EPA, 1991 [21]	2,5 – 10	béton
Morton <i>et al.</i> , 1991 [22]	2,7	béton
Mori <i>et al.</i> , 1992 [23]	4,3 – 4,7	béton
Ismail <i>et al.</i> , 1993 [24]	2 – 4	mortier
Davis, 1998 [25]	3,1	béton
Monteny <i>et al.</i> , 2001 [26]	1,0 – 1,3	mortier
Vincke <i>et al.</i> , 2002 [27]	1,1 – 1,8	béton

Ces phénomènes de biodétérioration peuvent conduire à la fragilisation, voire à l'effondrement de la structure. La Figure I-8 donne un aperçu de différents bétons de type Portland dans des réseaux d'assainissement à divers stades de détérioration.

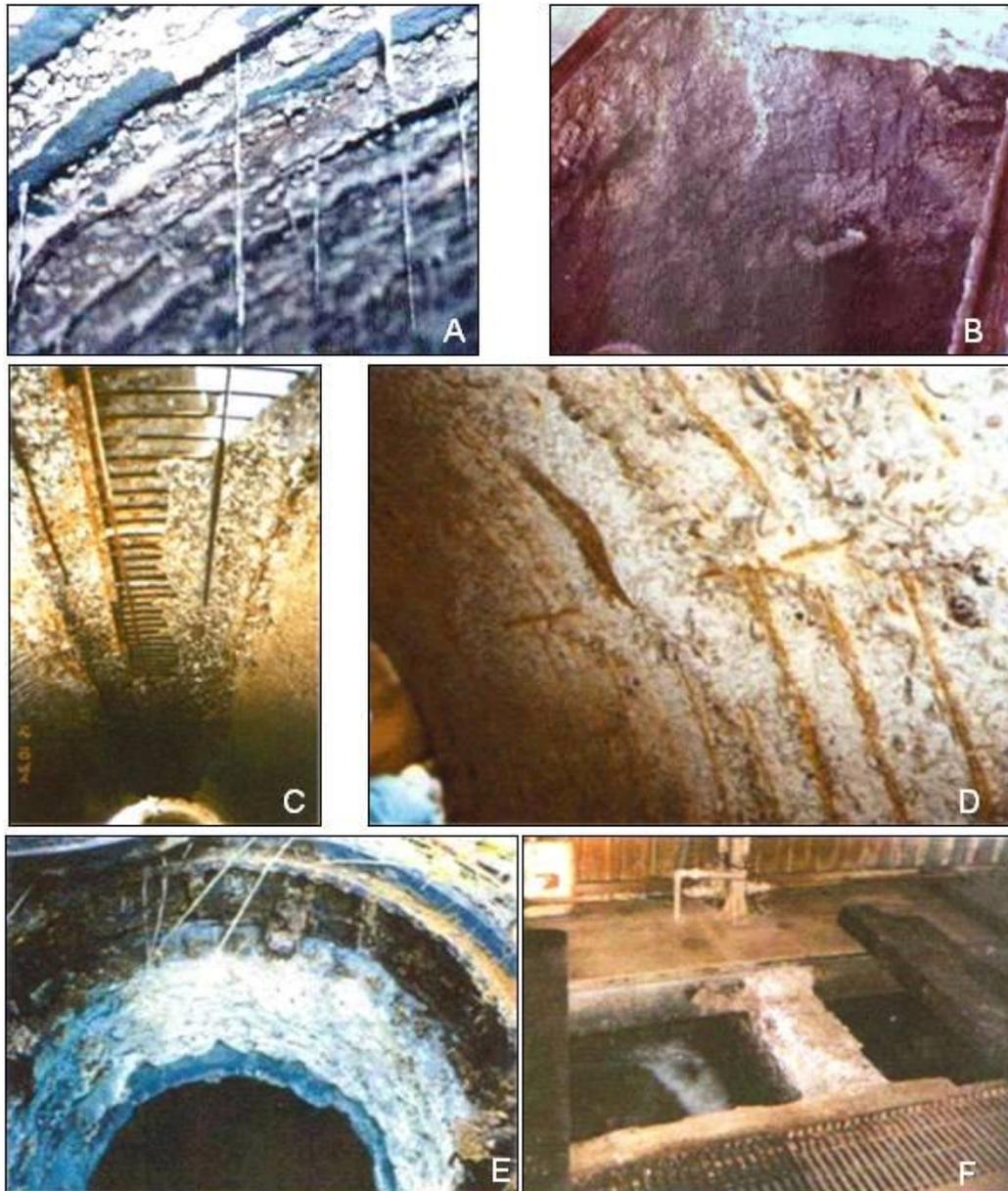


Figure I-8 : A – Biodétérioration d’une canalisation en béton avec mise à nu des armatures métalliques [28]. B – Biodétérioration d’un trou d’homme mise en évidence après 5 ans de service [28]. C – Attaque par H_2S d’une voûte non-immersée [29]. D – Attaque par H_2S d’un collecteur. E – Attaque par H_2S d’une rehausse en fonte [29]. F – Attaque par H_2S dans un dessableur [29].

Les phénomènes impliqués dans les processus de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d’assainissement sont schématisés sur la Figure I-9. Dans le fond des canalisations vont s’accumuler des couches de boues sédimentaires plus ou moins épaisses permettant l’établissement de zones privées oxygène. Dans ces conditions, des bactéries anaérobies sulfato-réductrice (BSR) vont se développer en utilisant les composés soufrés de l’effluent et vont excréter de l’hydrogène sulfuré (H_2S). Comme l’ H_2S est très peu soluble et fortement volatil, il va être dégazé dans la partie aérienne du réseau où il pourra impacter les matériaux cimentaires de deux façons. Soit directement en réagissant avec les matériaux cimentaires et en entraînant une diminution du pH, soit indirectement par son utilisation en tant que nutriment par des bactéries sulfo-oxydante (BSO) qui vont produire de l’acide sulfurique. Cet acide va ensuite ruisseler sur les parois de la canalisation et entraîner une

dissolution de la matrice cimentaire puis, suivant la composition de cette dernière, la formation de produits expansifs tels que le gypse et l'ettringite.

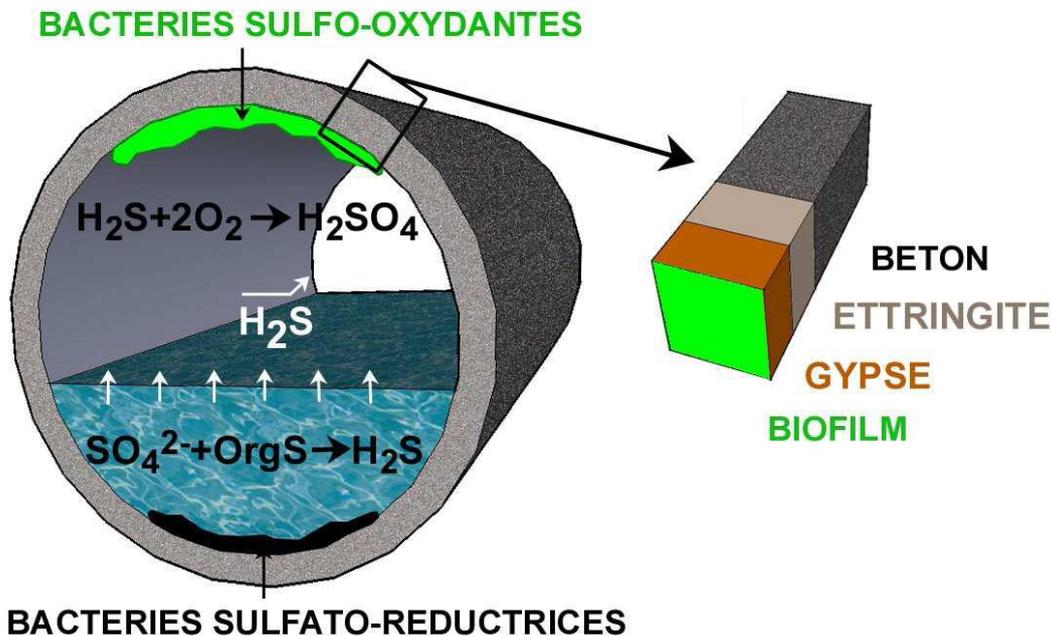


Figure I-9 : Cycle schématisé du soufre dans un réseau d'assainissement, dessin F. Boinski, 2009.

Les deux étapes de ce mécanisme de détérioration sont développées dans la suite de ce chapitre en précisant les paramètres influents ainsi que les moyens utilisés pour y remédier.

I-3.1. La production d'hydrogène sulfuré

I-3.1.1. Origine de l'hydrogène sulfuré

L'origine de l'hydrogène sulfuré dans les réseaux d'assainissement est multiple.

La majeure partie provient de la réduction de composés sulfurés par les bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui vont produire des sulfures (S^{2-}) ou des composés volatils comme les methylmercaptans (CH_3-SH) ou les dimethyl-disulfures ($CH_3-S-S-CH_3$). Les BSR se développent dans les couches de boue d'épaisseurs variables qui résultent de la sédimentation des matières en suspension dans les eaux usées. Ces boues sont principalement constituées de matières organiques, mais on trouve également des microorganismes filamenteux et de la matière gélatineuse (zooglae) dans laquelle se développent les BSR [30]. Les BSR généralement rencontrées sont les bactéries du genre *Desulfovibrio* et *Desulfobulbus*.

L'autre origine des sulfures dans les réseaux d'assainissement est l'apport d'eau industrielle contenant déjà des sulfures comme celles provenant par exemple de tanneries, de papeteries, d'abattoirs ou d'industries de raffinage d'huile.

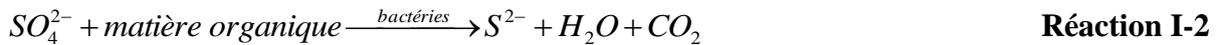
I-3.1.2. Formation de l'hydrogène sulfuré

Les molécules sulfurées, organiques ou minérales, rencontrées dans les eaux usées sont nombreuses. On retrouve par exemple des sulfates, des sulfites, des acides aminés sulfurés (méthionine, cystéine). Le soufre sous forme minérale existe à des degrés d'oxydation allant

de -2 à +6, respectivement du sulfure au sulfate. Des réactions d'oxydoréduction permettent de passer d'une molécule à une autre.

La Figure I-10 apporte une vision globale et schématique du cycle du soufre. Il est possible de constater que l'ensemble des espèces soufrées peut conduire aux sulfates et/ou au soufre élémentaire qui sont utilisés par les BSR pour la formation d'H₂S. La totalité des molécules soufrées de l'effluent sont donc à prendre en compte pour estimer le potentiel d'émission d'H₂S.

Les BSR utilisent les sulfates comme accepteur final d'électrons et le réduisent en hydrogène sulfuré selon les mécanismes suivants [31] :



L'ATP ou adénosine triphosphate est la molécule de stockage de l'énergie de tous les êtres vivants. L'énergie libérée par l'hydrolyse de la liaison phosphate permet aux bactéries d'être actives d'un point de vue chimique.

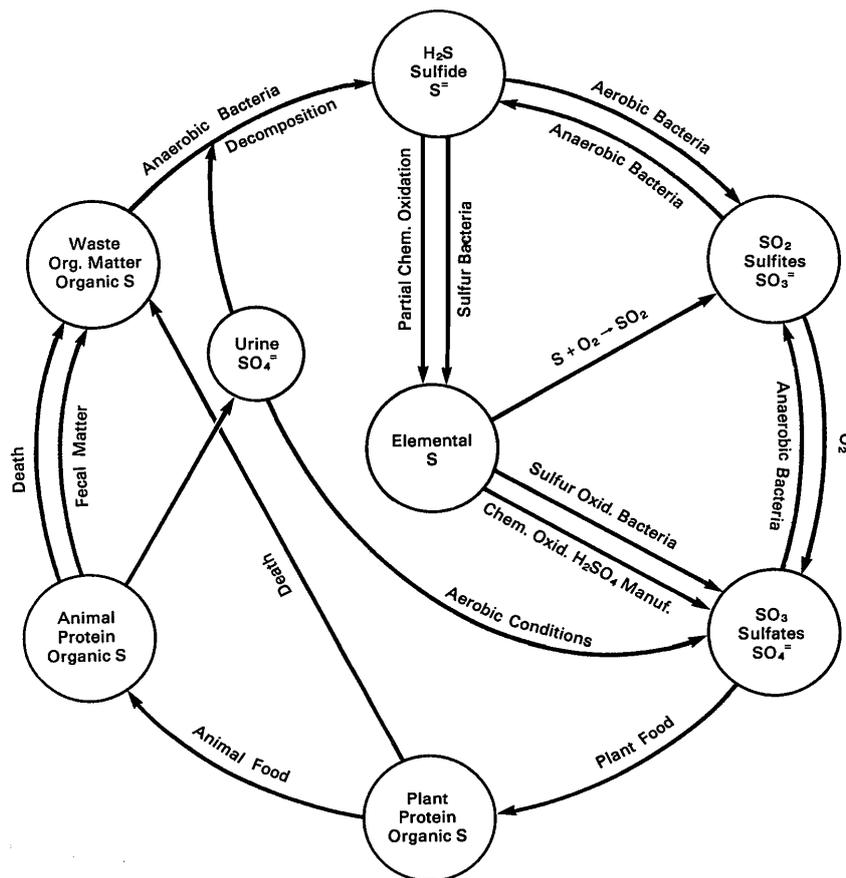


Figure I-10 : Cycle du soufre [31].

Les sulfures formés vont ensuite se mettre en équilibre chimique avec le milieu aqueux selon un double équilibre :



**Réaction I-4**

L' H_2S dans les réseaux d'assainissement peut donc être présent sous différentes formes qui dépendent du pH (Figure I-11), de la température et de la force ionique. Comme les effluents ont généralement un pH proche de la neutralité, deux espèces majoritaires cohabitent : HS^- et H_2S . La présence de S^{2-} n'est pas considérée dans les effluents car sa concentration reste négligeable.

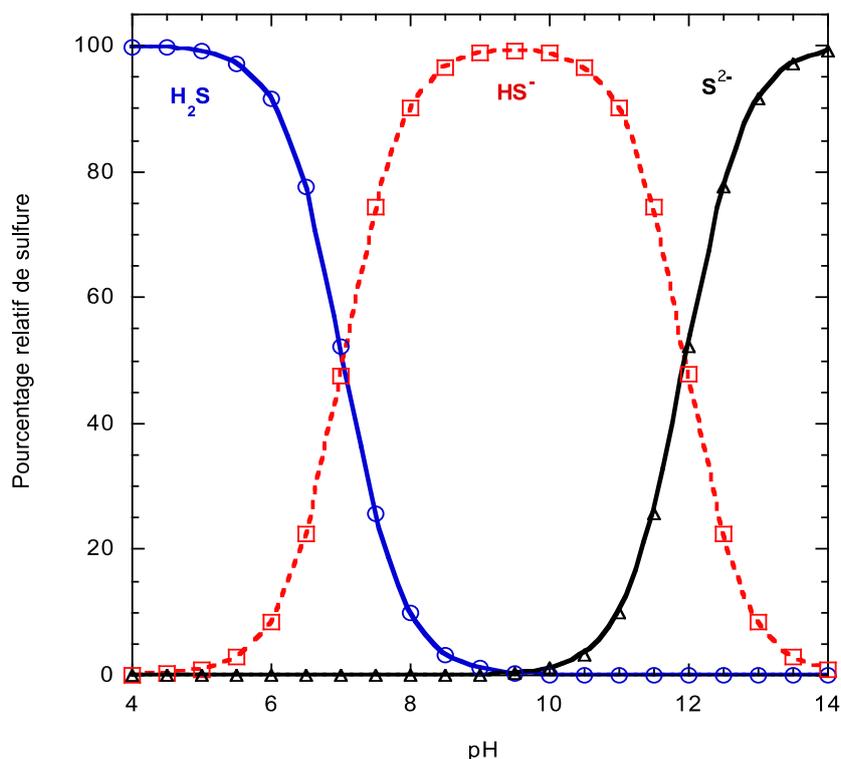


Figure I-11 : Diagramme de prédominance des sulfures en fonction du pH.

Du fait des équilibres thermodynamiques et de la loi de Henry, l' H_2S ainsi produit va être dégazé dans la partie aérienne du réseau selon l'équilibre suivant :

**Réaction I-5**

D'après les enquêtes réalisées par différents auteurs [32-34] dans plusieurs pays, respectivement les Etats-Unis, l'Australie et le Portugal, en moyenne la concentration maximale d' H_2S rencontrée dans les réseaux d'assainissement est de 300 mg m^{-3} , soit 300 ppm. Dans le bassin parisien, la concentration maximale rencontrée par les égoutiers reste inférieure à 100 ppm.

I-3.1.3. Influence de différents paramètres sur la formation d'hydrogène sulfuré

Selon le rapport de l'agence de protection environnementale américaine [31], la production d'hydrogène sulfuré va dépendre de nombreux paramètres physico-chimiques, topographiques et hydrauliques.

La concentration en oxygène est le paramètre principal dans la production d'hydrogène sulfuré [30].

Lorsque de l'oxygène est disponible dans la partie émergée de la canalisation, une certaine quantité va se dissoudre suivant un équilibre thermodynamique (Loi de Henry). Ainsi à 25°C, il y aura en théorie 9 mg L⁻¹ d'oxygène dissous. Cette valeur dépend de la température mais aussi de la quantité de matière organique présente dans les réseaux. Le dioxygène va être utilisé par des microorganismes aérobies pour dégrader la matière organique ou pour oxyder des composés réduits. Dans le cas d'une oxygénation suffisante, aucun sulfure n'est donc présent dans la canalisation sauf en cas d'apport externe (source extérieure ou production en amont).

Dans toutes les zones anoxiques des boues qui sédimentent dans le fond de l'effluent vont croître des microorganismes anoxiques. Dans les zones ne contenant ni oxygène, ni nitrate, les microorganismes sulfato-réducteurs et plus particulièrement les bactéries sulfato-réductrices (BSR) vont utiliser la réduction dissimilatrice (ou catabolique) du sulfate comme procédé de conservation de l'énergie. Le sulfate est d'abord activé en adénosine phosphosulfate (APS) [35] en réagissant avec de l'ATP avant d'être réduit en phosphate inorganique, en adénosine monophosphate (AMP) et en bisulfite.



Le bisulfite est ensuite réduit en sulfure. Deux mécanismes ont été proposés, le premier est une réduction à six électrons du bisulfite en H₂S en une seule étape et sans la formation d'intermédiaire libres. Dans le second, le bisulfite est réduit en sulfure en trois étapes *via* la formation de deux intermédiaires libres, le trithionate et le thiosulfate [36, 37]. La réduction des composés soufrés conduit donc à la formation de sulfure [31, 38]. En présence d'oxygène et de nitrate, les microorganismes réduisant les sulfates seront inhibés par le potentiel trop élevé de ces deux molécules. Pour que les BSR produisent de l'hydrogène sulfuré, il est donc nécessaire qu'il n'y ait ni oxygène, ni nitrate. La concentration critique en oxygène en dessous de laquelle la production de sulfure est possible est de 0,1 à 1 mg L⁻¹.

Avec une concentration en oxygène dans l'effluent faible (quelques dixièmes de milligrammes par litre), la quantité d'oxygène qui atteindra la surface de la couche de boue et du biofilm sera insuffisante pour oxyder la totalité des sulfures qui y sont produits. Les sulfures peuvent alors s'échapper dans l'effluent et de l'hydrogène sulfuré sera émis dans la partie aérienne de la canalisation.

La Figure I-12 illustre de manière schématique l'influence de la quantité d'oxygène dans une canalisation d'assainissement.

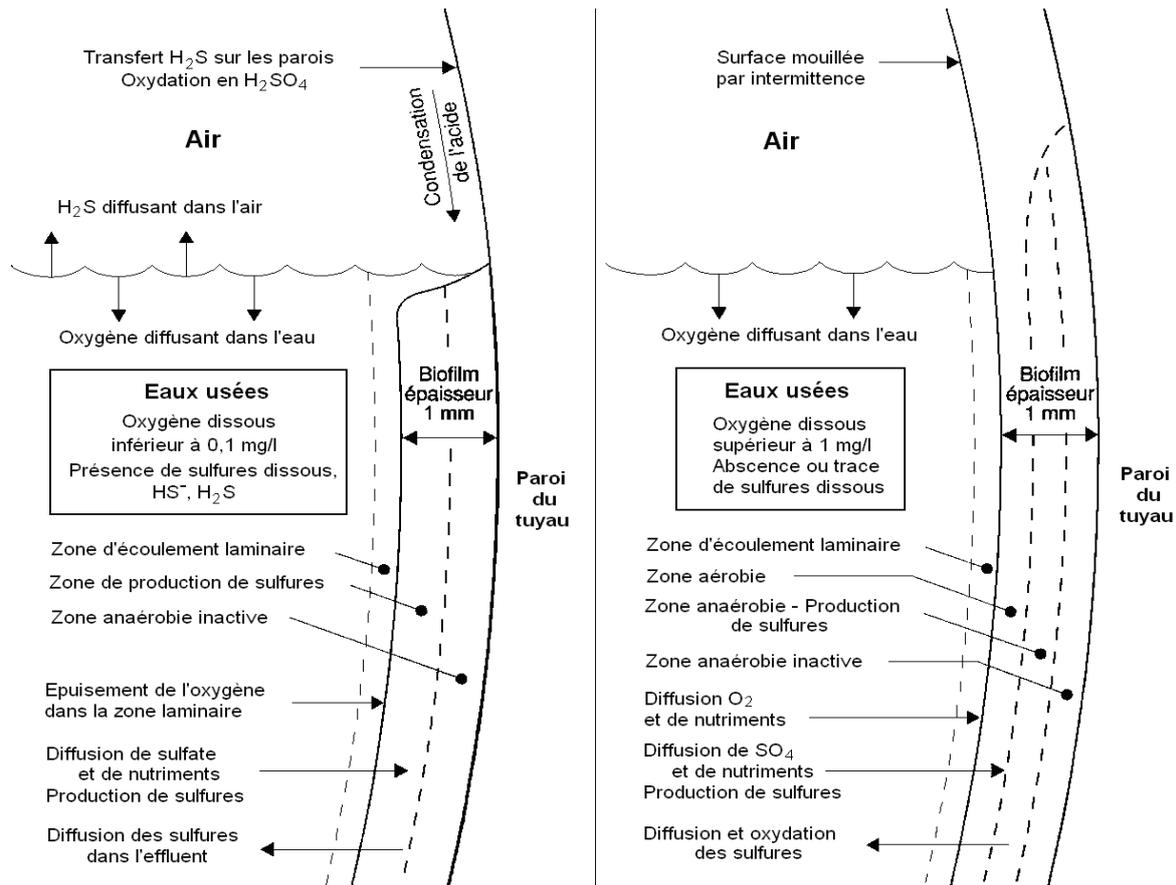


Figure I-12 : Impact de la quantité d'oxygène sur la production d' H_2S dans une canalisation d'assainissement, d'après [30].

La concentration en oxygène dissous détermine la limite entre les zones aérobie et anaérobie plutôt que le type de bactéries présentes. Si la quantité d'oxygène dissous augmente, la zone aérobie va devenir plus grande. Des microorganismes aérobies sont présents dans la zone anaérobie, prêts à utiliser les nutriments organiques mais ils restent en dormance aussi longtemps que l'oxygène n'est pas présent. Les microorganismes anaérobies, de leur côté, ne peuvent pas utiliser leurs métabolismes tant que l'oxygène est présent mais ils sont prêts à reprendre leurs activités quand il disparaît. Comme ces facteurs ne sont pas constants, la frontière entre les deux zones n'est pas fixée.

Un autre paramètre important pour la formation d'hydrogène sulfuré est la concentration en matières organiques et en nutriments qui serait corrélée dans la plupart des réseaux d'assainissement, d'après Pomeroy [30], à la Demande Biochimique en Oxygène (DBO). La DBO représente la quantité d'oxygène consommé, d'une part, par les phénomènes d'oxydation chimique et, d'autre part, par la dégradation des matières organiques par voie biologique aérobie. Dans le cas d'un excès de sulfates (typiquement 20 à 100 $mg L^{-1}$), la production de sulfure serait proportionnelle à la DBO. Thistlethwayte [39] a postulé que la vitesse de production des sulfures évoluait avec la DBO selon $(DBO)^{0,8}$.

D'après Pomeroy [30], la concentration en sulfate représente un paramètre majeur dans la production de sulfure. Si la concentration en sulfate dans l'effluent est faible, alors elle sera considérée comme un facteur limitant dans les réactions de réduction effectuées par les microorganismes donc pour la production d'hydrogène sulfuré. Au contraire, si la concentration en sulfate dans l'effluent est en excès, ce ne sera plus un facteur limitant dans la production de sulfure et il peut être considéré que ces deux paramètres sont globalement

indépendants. Thistlethwayte a élaboré en 1972 [39] une relation empirique entre la production de sulfure et la concentration en sulfate.

$$\frac{dS}{dt} = 0,5 \cdot 10^{-3} \cdot V_s \cdot (DBO_5)^{0,8} \cdot (SO_4^{2-})^{0,4} \cdot 1,139^{T-20^\circ C} \cdot r^{-1} \quad \text{Équation I-1}$$

Avec :

$\frac{dS}{dt}$	Cinétique de production de l'H ₂ S	mg L ⁻¹ h ⁻¹
V _s	Vitesse moyenne de l'effluent	m s ⁻¹
DBO ₅	Demande biochimique en oxygène à 5 jours	mg L ⁻¹
SO ₄ ²⁻	Concentration en SO ₄ ²⁻	mg L ⁻¹
T	Température de l'effluent	°C
r	Rayon hydraulique	m

Ce modèle prédit que la production de sulfure augmente avec la concentration de sulfate. Il a été montré par Pomeroy et Bowlus [34] que cette équation n'était pas fiable si les sulfates sont en excès.

Pour que la production de sulfures soit possible, il est nécessaire que le pH de l'effluent soit compris entre 5,5 et 9,0. Si cette gamme de pH est respectée, la croissance bactérienne est possible donc la production de sulfure également. Le pH optimal se situe entre 7,5 et 8,0. Le pH de l'effluent est également important car il va influencer comme nous l'avons déjà vu sur la proportion d'H₂S et d'HS⁻ (pKa ≈ 7 à 20°C).

La température influence également fortement l'activité bactérienne. En général, une augmentation de 10°C a pour conséquence un doublement de l'activité bactérienne [40]. En conséquence, plus la température est élevée, plus la réduction des sulfates est importante et la production d'H₂S élevée. L'US EPA [30] propose la relation suivante :

$$\phi_{se} = M \times [EBOD] \quad \text{Équation I-2}$$

$$EBOD = [BOD] \times (1,07)^{(T-20)} \quad \text{Équation I-3}$$

Avec :

f_{se}	Flux de sulfure	g m ⁻² h ⁻¹
M	Coefficient spécifique au flux de sulfure	m h ⁻¹
[EBOD]	DBO effective	mg L ⁻¹
[BOD]	DBO standard	mg L ⁻¹
T	Température	°C

Le terme DBO effective (EBOD) a été proposé par Pomeroy et Bowlus [34] pour combiner les effets de la température et de la DBO.

Cette équation a été mise au point à partir du réseau d'assainissement de Long Beach grâce au suivi de la production d'hydrogène sulfuré sur environ deux ans (Figure I-13).

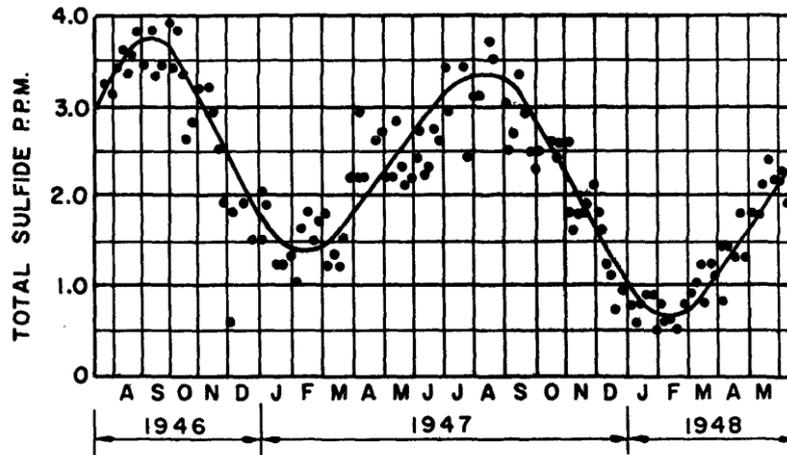


Figure I-13 : Concentration en hydrogène sulfuré à la sortie du réseau de Long Beach, Etats-Unis [30].

La production d' H_2S suit également des fluctuations au cours de la journée et de l'année. En 2000, le suivi de ce gaz a été effectué à Virginia en Afrique du Sud. La production est maximale en été à 16 heures avec 110 ppm alors qu'en hiver, le maximum se situe autour de 13 heures avec 50 ppm [41]. De manière générale, la concentration d'hydrogène sulfuré évolue dans le même sens que la température ; plus la température est élevée et plus la production d' H_2S sera importante.

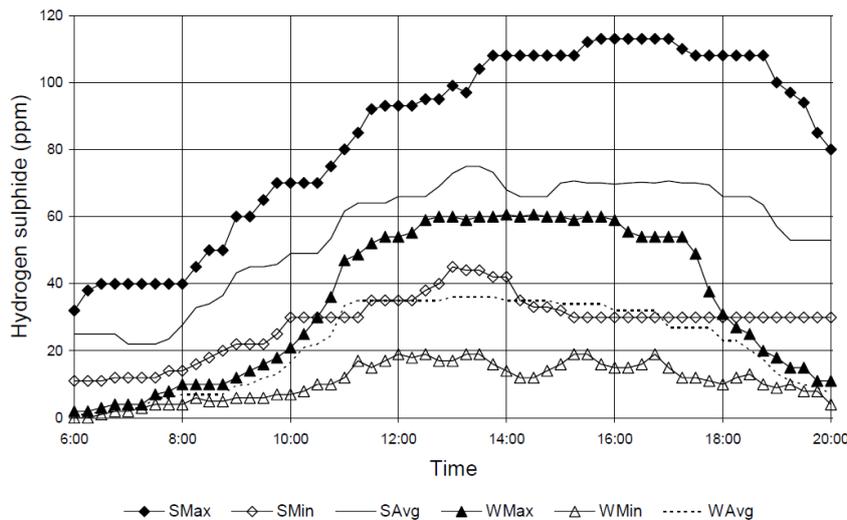


Figure I-14 : Maximum, minimum et moyenne typiques de concentrations d' H_2S rencontrées dans le réseau expérimental de Virginia durant les mois d'été (S) et d'hiver (W) [41].

La vitesse de l'effluent a une action sur la production d'hydrogène sulfuré puisqu'elle va agir sur l'épaisseur des boues qui s'accumulent. Plus la vitesse d'écoulement sera lente et plus l'épaisseur des boues sera importante, créant une zone anaérobie plus épaisse. Au contraire, si l'effluent est plus rapide, l'épaisseur des boues sera plus faible et la zone de croissance des microorganismes responsable de la production de sulfure sera moindre.

Un autre paramètre important dans la production d'hydrogène sulfuré est le temps de rétention. Plus le temps de rétention est faible et moins la production d'hydrogène sulfuré est importante. A l'inverse, l'augmentation du temps de rétention va favoriser les échanges entre la phase gazeuse et la phase liquide et va donc permettre de dégazer plus d' H_2S .

Pour finir, la charge hydraulique de l'effluent va agir de manière indirecte sur la production d'hydrogène sulfuré. Le Tableau I-4 (cf. paragraphe 2.2.) nous indique que 29% des problèmes rencontrés dans les réseaux d'assainissement sont liés à la présence d'eaux parasitaires dans les réseaux d'assainissement. C'est pourquoi une politique de diminution de ces eaux a été menée avec les réseaux séparatifs. Par ailleurs, les usagers font de plus en plus d'économies d'eau grâce à des matériels récents et économes en eau. Ainsi, ces deux nouvelles conditions entraînent une diminution de la charge hydraulique pour une charge polluante équivalente donc une possible augmentation des problèmes liés à l'H₂S.

Différents modèles numériques expérimentaux ont été établis par de nombreux auteurs pour prédire la cinétique de production de l'hydrogène sulfuré. La plupart des modèles ont été réalisés pour les conduites de refoulement. Outre le modèle de Thistlethwayte déjà présenté, on trouve celui de Pomeroy [30] :

$$\frac{dS}{dt} = 1,0 \cdot 10^{-3} \cdot (DBO_5) \cdot 1,07^{T-20^\circ C} \cdot r^{-1} \cdot (1 + 0,37 \cdot \mathcal{A}) \quad \text{Équation I-4}$$

Avec :

$\frac{dS}{dt}$	Cinétique de production de l'H ₂ S	mg L ⁻¹ h ⁻¹
DBO ₅	Demande biochimique en oxygène à 5 jours	mg L ⁻¹
T	Température de l'effluent	°C
r	Rayon hydraulique	m
\mathcal{A}	Diamètre de la conduite	m

Ce modèle a été développé grâce à l'étude de quarante conduites de refoulement. Toutefois, pour qu'il soit valable, plusieurs conditions doivent être respectées. Tout d'abord, les sulfures ne doivent provenir que des bactéries et non d'un apport extérieur. Ensuite, les sulfures ne doivent pas s'échapper de l'effluent vers la partie aérienne ou précipiter dans l'effluent. Enfin, ce modèle a été ajusté pour le cas des pires conditions de production d'hydrogène sulfuré c'est-à-dire avec une forte concentration de sulfates, sans inhibition des bactéries et en absence complète d'oxygène. Ce modèle n'est donc pas totalement réaliste et donne une vision pessimiste de la présence d'H₂S dans les réseaux d'assainissement.

Le modèle de Boon et Lister [42], très similaire à celui développé par Pomeroy, se base sur la demande chimique en oxygène (DCO) plutôt que la demande biochimique.

$$\frac{dS}{dt} = 0,228 \cdot 10^{-3} \cdot (DCO) \cdot 1,07^{T-20^\circ C} \cdot r^{-1} \cdot (1 + 0,37 \cdot \mathcal{A}) \quad \text{Équation I-5}$$

Avec :

$\frac{dS}{dt}$	Cinétique de production de l'H ₂ S	mg L ⁻¹ h ⁻¹
DCO	Demande chimique en oxygène	mg L ⁻¹
T	Température de l'effluent	°C
r	Rayon hydraulique	m
\mathcal{A}	Diamètre de la conduite	m

La DCO est un paramètre représentant la teneur totale d'une eau en matière organique, qu'elle soit ou non biodégradable. Contrairement à celle de la DBO₅, la mesure de la DCO est

reproductible et précise. Les limites de ce modèle sont similaires à celles avancées pour le modèle de Pomeroy.

Pomeroy a également travaillé avec Parkhurst [43] sur un modèle spécifique aux conduites gravitaires.

$$\frac{dS}{dt} = 0,32 \cdot 10^{-3} \cdot (DBO_5)^{1,07^{T-20^\circ C}} \cdot r^{-1} \cdot N \cdot (I \cdot V)^{\frac{3}{8}} \cdot d_m^{-1} \quad \text{Équation I-6}$$

Avec :

$\frac{dS}{dt}$	Cinétique de production de l'H ₂ S	mg L ⁻¹ h ⁻¹
DBO ₅	Demande biochimique en oxygène à 5 jours	mg L ⁻¹
T	Température de l'effluent	°C
r	Rayon hydraulique	M
N	0,64 pour une concentration maximale en sulfure 0,96 pour une concentration moyenne en sulfure	
I	Pente	mm m ⁻¹
V	Vitesse moyenne	m s ⁻¹
d _m	Profondeur hydraulique moyenne (surface de l'écoulement sur la largeur de la surface libre)	m

Ce modèle a été élaboré à partir d'informations collectées pendant 20 ans dans les réseaux d'assainissement de Los Angeles aux Etats-Unis. La formule est composée de deux parties. La première fait référence au taux de génération d'H₂S alors que la deuxième porte sur l'élimination par la phase liquide de l'hydrogène sulfuré, c'est-à-dire par oxydation par les processus biologiques et par dégazage vers la phase vapeur.

I-3.1.4. Traitement de l'hydrogène sulfuré

Il existe de nombreux moyens de lutte contre la formation d'H₂S. La Figure I-15 identifie de manière schématique les différentes possibilités d'action d'un gestionnaire de réseau pour contrôler la concentration d'H₂S. Les traitements peuvent être préventifs ou curatifs.

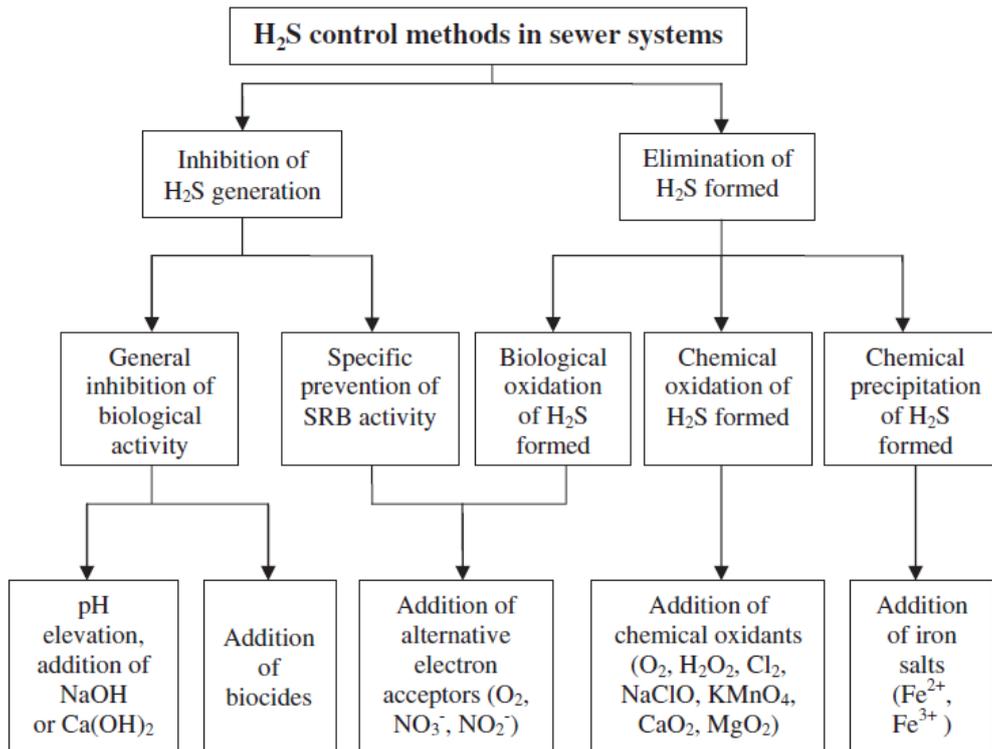


Figure I-15 : Technologies chimique et biologique pour le contrôle de l'émission d' H_2S dans les réseaux d'assainissement [44].

L'approche préventive de contrôle d' H_2S consiste à faire une simulation des conditions hydrauliques pour évaluer le potentiel d'émission en H_2S . D'un point de vue pratique, il est alors possible d'intervenir sur le maintien des conditions aérobies.

En introduisant de l'air ou de l'oxygène dans le réseau, il est possible d'inhiber la croissance des BSR donc la production d' H_2S . Cet ajout va également diluer les gaz potentiellement nocifs à la fois pour le matériau, l'environnement et les hommes. Raj Sherma *et al.* [45] proposent un modèle mathématique de la dynamique de production d' H_2S pour optimiser l'injection d'oxygène. A l'aide d'une étude sur deux sites australiens, les auteurs concluent que la position de l'injection de l'oxygène joue un rôle déterminant dans le contrôle de l'hydrogène sulfuré. En optimisant la position et la quantité d'oxygène apportée, les coûts de traitement sont grandement diminués et le rendement d'épuration est augmenté. On peut toutefois noter que ce procédé est bruyant et encombrant et que l'insertion doit être réalisée à contre courant de l'effluent (sens ascendant de la canalisation) [46].

Une autre façon de diminuer la production d' H_2S est l'ajout de nitrate aux effluents. C'est une méthode préventive et curative. Heukelelekan [47] a constaté que dans les systèmes pauvres en oxygène, les nitrates étaient réduits avant les sulfates. L'ajout de nitrate entraîne l'augmentation du potentiel redox de l'effluent et permet de contrôler la production d' H_2S aussi longtemps que le potentiel redox de l'effluent est maintenu au dessus de 300 mV/ENH par cet ajout [48]. Ce procédé est actuellement employé par la société Yara sous le nom Nutriox[®]. Cette application diffuse un mélange optimisé de nitrates et d'autres produits grâce à un système de dosage et de surveillance « intelligent ». Ce type de traitement s'élève à 410 euros par tonne de nitrate de calcium [46].

Le retrait des boues et des sédiments qui s'accumulent dans le fond des canalisations est un moyen d'éviter la formation de zones anaérobies donc le développement des bactéries

responsable de la synthèse de l'hydrogène sulfuré. C'est pour cela que les gestionnaires de réseaux curent les canalisations par exemple au moyen de wagon-vanne ou de boule de curage (Figure I-16). L'ensemble du réseau ne peut pas être traité de cette façon car les canalisations ont des tailles différentes et il est nécessaire que les procédés employés se déplacent dans la canalisation. Si le procédé obstrue la canalisation, l'écoulement des effluents va être grandement diminué en aval et la pression va augmenter en amont. Le nombre d'agents nécessaire à la mise en place de cette technique est important et son utilisation est limitée à certaines zones, c'est pourquoi cette technique est peu utilisée.



Figure I-16 : Boule de curage des égouts de Paris.

L'approche curative permet d'éliminer l'hydrogène sulfuré présent dans les canalisations des réseaux d'assainissement.

La chloration des eaux usées est une des premières solutions industrielles apportées aux problèmes d'odeurs, en particulier au Royaume-Uni et aux Etats-Unis [46]. Le chlore va avoir trois impacts : par voie chimique en oxydant les sulfures, par destruction des bactéries sulfato-réductrices et par maintien dans l'effluent d'un résiduel d'oxygène dissous non consommé. Suivant la quantité de chlore apportée, l'oxydation des sulfures sera plus ou moins complète et le produit final sera soit du soufre élémentaire soit des sulfates.

L'élimination de l'hydrogène sulfuré par l'introduction de sels de fer est la pratique la plus couramment employée à travers le monde. L'ajout aux effluents de sel ferreux ou ferriques, permet l'obtention d'un précipité de formule FeS ou Fe_2S_3 . De manière générale, il est recommandé de travailler en excès de sel mais il semblerait que la quantité apportée puisse être largement diminuée si un contrôle en ligne est effectué. Il est nécessaire de combiner les connaissances théoriques et les observations sur site pour permettre une prédiction plus juste de l'efficacité des sels [49]. Les coûts d'un tel traitement varient de 3,7 à 26 € / kg de soufre retiré [50, 51]. Ce type de traitement présente l'inconvénient de produire des boues noires supplémentaires.

Une autre solution consiste à apporter de la soude ou une autre base forte à l'effluent pendant 20-30 minutes, ce qui augmente artificiellement le pH à des valeurs de l'ordre de 12,5 – 13. A ce pH, la croissance des BSR est inhibée. Ce traitement a une efficacité s'échelonnant de quelques jours à deux semaines [21] et nécessite de diluer les eaux usées en station d'épuration pour réduire leur impact sur le milieu naturel.

D'autres possibilités sont à l'étude [44] telle que l'utilisation d'une pile microbienne (Figure I-17) qui permettrait d'oxyder les sulfures en soufre élémentaire à l'anode tout en produisant de l'électricité.

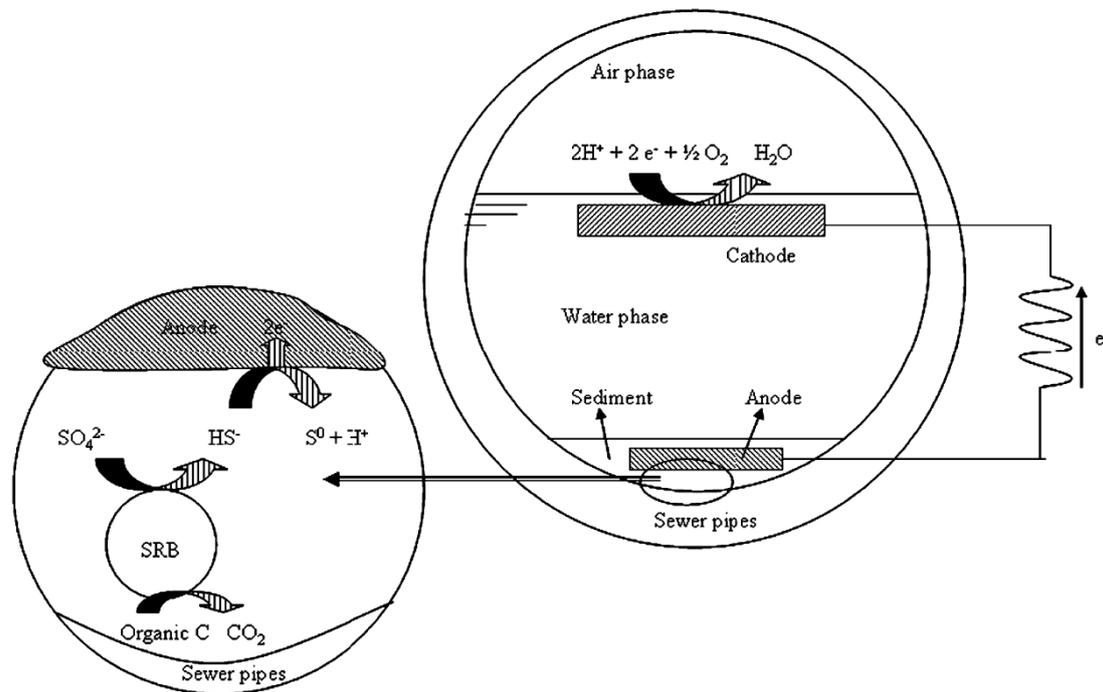


Figure I-17 : Schéma de la pile microbienne dans un réseau d'assainissement convertissant les sulfures en soufre élémentaire [44].

Une autre voie d'élimination du sulfure d'hydrogène serait l'utilisation de bactériophages spécifiques qui élimineraient les BSR [44]. Les bactériophages étant des virus infectant uniquement les bactéries.

I-3.2. Le processus de biodétérioration des matériaux cimentaires

L'hydrogène sulfuré formé dans les réseaux d'assainissement va se condenser sur les parois en béton des canalisations. Comme un béton frais a un pH alcalin, l' H_2S va se déprotoner à son contact. Suivant le pH du béton, il se transformera en HS^- ou en S^{2-} . Ceci va avoir pour conséquence directe une augmentation de la libération d' H_2S de l'effluent. Comme le processus d'oxydation du sulfure d'hydrogène sur du béton est rapide en comparaison de son émission par les eaux usées, il peut y avoir une faible quantité de gaz dans la partie aérienne mais une grande disponibilité de molécules soufrées à la surface du béton. Malgré la faible concentration en hydrogène sulfuré, la vitesse de détérioration peut donc devenir significative. Par exemple, 5 à 10 ppm d' H_2S gazeux peuvent induire une détérioration du béton de quelques millimètres par an [52].

I-3.2.1. Oxydation de l'hydrogène sulfuré en acide sulfurique

La corrélation entre la présence de sulfure d'hydrogène gazeux et celle de l'acide sulfurique responsable de l'attaque du béton est bien connue des gestionnaires de réseaux d'assainissement mais les mécanismes bio-physico-chimiques de transformation du gaz en acide restent partiellement identifiés.

En absence d'eau, l'oxydation directe de l' H_2S par de l'oxygène n'est pas possible aux températures rencontrées dans les réseaux d'assainissement, il est nécessaire de monter à de fortes températures pour que cette réaction devienne cinétiquement envisageable. Pour faciliter cette réaction, il est possible d'utiliser des catalyseurs [53], typiquement des oxydes de vanadium ou de molybdène comme c'est le cas pour la désulfurisation des fumées industrielles. Ainsi, la température d'activation peut-être ramenée à des valeurs comprises entre 200 et 350°C.

Selon Steudel [54], l'oxydation de l' H_2S passe par l'intervention d'un métal (M), représenté par le vanadium ou par le fer, selon la réaction suivante :



Comme l'ion métal réduit est ensuite oxydé par l'oxygène, il peut être considéré comme un catalyseur.



L'équation bilan devient donc :



Toutefois, les canalisations des réseaux d'assainissement sont des environnements humides qui permettraient, d'après Parker [55], l'oxydation de l'hydrogène sulfuré. En effet, Parker [55] a noté que sur du béton sain, les sulfures peuvent être oxydés de manière chimique et produire du thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) ou du tetrathionate ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$). Au contraire, sur du béton dégradé, donc avec un pH plus faible, les sulfures sont oxydés en soufre élémentaire. Il semblerait que l'oxydation de l'hydrogène sulfuré dans les réseaux d'assainissement puisse suivre deux voies (Figure I-18).

La première passe par le thiosulfate qui est oxydé en tetrathionate par différentes espèces bactériennes. Le tetrathionate peut être oxydé directement en sulfates ou bien il peut être utilisé pour donner du pentathionate ($\text{S}_5\text{O}_6^{2-}$) et du trithionate ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$). Le pentathionate pourra être dissocié en soufre élémentaire et en tetrathionate. Le trithionate est oxydé en dithionate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), et le dithionate en sulfate.

La deuxième voie passe par le soufre élémentaire. Comme la production de soufre est plus rapide à des pH faibles, elle peut être la voie prédominante au fur et à mesure que la biodétérioration du matériau cimentaire se met en place. Il a été démontré par Waksman et Starkey en 1921 [56] que l'oxydation du soufre en sulfate suivait une réaction totale et directe et qu'aucun composé oxydé intermédiaire du soufre ne s'accumulait.

La frontière entre ces deux voies n'est pas marquée, les deux peuvent se produire en même temps et des réactions passant d'une voie à une autre peuvent exister.

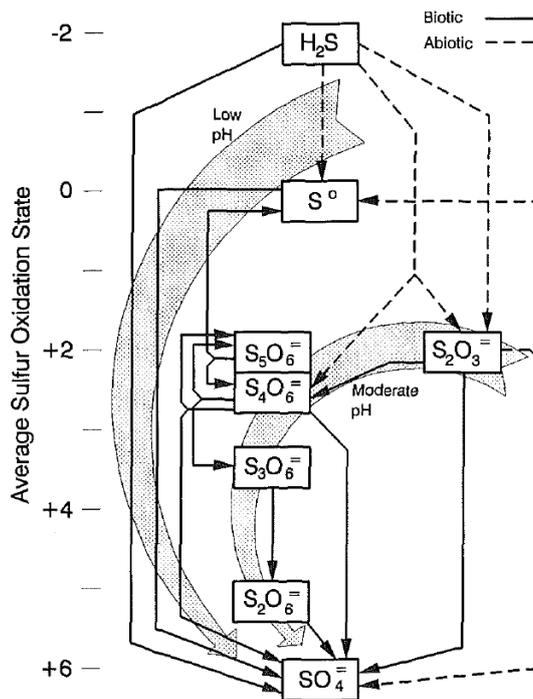


Figure I-18 : Oxydation de l'hydrogène sulfuré [57].

En parallèle aux réactions proposées par Parker, l'oxydation de l' H_2S en soufre élémentaire peut être réalisée par les microorganismes oxydant les sulfures [58] (*Acidithiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus*, *Paracoccus versutus*, *Sulfolobales*,...) selon la réaction suivante :



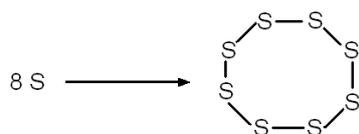
Cette réaction est catalysée par une enzyme, la sulfure oxydase. Les électrons excédentaires vont être utilisés pour la respiration bactérienne :



La réaction bilan de l'oxydation de l' H_2S par les microorganismes est donc :



Le soufre élémentaire va se réorganiser sous forme cristalline pour former un cycle à huit soufres qui est plus stable que la forme initiale S^0 [58].



Réaction I-15

Cet octet va pouvoir être utilisé par les bactéries sulfo-oxydantes comme source énergétique et être oxydé grâce à une sulfure-dioxygénase (SDO) en sulfite selon la réaction suivante :



Actuellement, la SDO n'a pas été directement caractérisée même si elle a été partiellement isolée mais son activité a été mise en évidence dans différents travaux [58-60]. Cette réaction a été partiellement vérifiée puisque des expériences de marquage à l'oxygène radioactif ^{18}O [61] ont mis en évidence l'implication de dioxygène et son incorporation dans les sulfites.

Rohwerder et Sand proposèrent en 2007 [62] une voie réactionnelle possible pour l'oxydation du soufre élémentaire par des bactéries acidophiles. D'après ce schéma réactionnel, la SDO et les autres enzymes impliquées dans l'oxydation des composés soufrés sont rassemblées dans l'espace périplasmique de la bactérie. En conséquence, le soufre élémentaire octamérique (S_8) extracellulaire doit passer la membrane externe de la bactérie avant toute oxydation. L'oxydation par la SDO peut uniquement se faire sur la liaison hautement réactive des thiols liés aux atomes de soufre des sulfures mais la réaction ne pourra pas se faire directement sur les sulfures ou sur le soufre élémentaire octamérique car les liaisons soufre relatives à ces composés sont faiblement réactives. Il est très probable que les protéines contenant des fonctions thiols dans la membrane externe et l'espace périplasmique sont utilisées pour le transport du soufre. En fixant le soufre du sulfane à la SDO, les groupements thiols se libèrent. Le produit de la dioxygénation est le sulfite qui est par la suite essentiellement oxydé en sulfate par l'oxydoréductase acceptant les sulfites (ou sulfite acceptor oxidoreductase : SAR). Une vision globale de ce schéma réactionnel est indiquée dans la Figure I-19.



Figure I-19 : Modèle d'oxydation du soufre élémentaire par les bactéries acidophiles, d'après [62].

En outre, Oprime *et al.* [63] démontrent que la présence de bactéries de type *Acidithiobacillus* (*ferrooxidans* et *thiooxidans*) entraîne une réduction significative de la concentration d' H_2S en solution, de l'ordre de 99% par rapport au témoin stérile. Les *Acidithiobacilli* seraient donc capable d'utiliser directement l' H_2S sous forme aqueuse. L'expérience a été réalisée dans des flacons agités à 150 tours par minutes et à 30°C avec une solution d'acide sulfurique à pH 2 contenant 5 ppm d' H_2S .

D'après l'ensemble des données retrouvées dans la littérature, le choix de la molécule soufrée utilisée par les bactéries reste donc mal connu. Prieur [64] propose les réactions bilans théoriques suivantes pour chaque molécule soufrée :



L'oxydation de l'hydrogène sulfuré en une autre molécule soufrée dans les réseaux d'assainissement peut, selon l'agence de protection de l'environnement américaine [65] être réalisée chimiquement ou biologiquement. La littérature est contradictoire sur la proportion relative de l'une ou de l'autre voie. Il est probable que les deux soient importantes car Wilmot

et al. [66] ont montré que l'oxydation biologique atteint 12 à 56% de l'oxydation totale de l' H_2S . Pour Kotronarou *et al.* [67] la part biologique représente 70% de l'oxydation. Au contraire, Jolley *et al.* [68] ont comparé le taux d'oxydation d'une eau synthétique tamponnée stérile à une eau usée et ont trouvé que le taux était plus rapide dans le milieu sans microorganismes. Cependant le taux d'oxydation mesuré dans l'eau synthétique n'est pas nécessairement représentatif d'une eau usée car certaines molécules présentes dans les eaux usées peuvent inhiber l'oxydation.

I-3.2.2. Dégradation du béton

Les bactéries peuvent altérer la qualité et la durabilité des matériaux cimentaires en produisant certains métabolites agressifs ou corrosifs à partir de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré. La pâte de ciment et certains granulats sont relativement vulnérables à ce type d'agression. A titre d'exemple, une expérience en laboratoire [69] sur des éprouvettes en béton à base de ciment Portland a conduit à une perte de masse de 16% en 39 jours pour le béton inoculé avec des bactéries tandis que la perte de masse était de seulement 0,8% pour l'échantillon de contrôle. Pour cette dernière expérience, les échantillons étaient directement plongés dans le milieu de culture des bactéries.

La connaissance de la succession de la colonisation microbienne est essentielle pour la compréhension et la gestion du phénomène de détérioration du béton induite par des microorganismes. Après un an d'étude sur cette succession de colonisation, Okabe *et al.* [70] ont mis en évidence, par des techniques de biologie moléculaire basées sur le séquençage de l'ARNr 16S, que six phylotypes sont impliqués : *Thiothrix*, *Thiomonas*, *Thiobacillus*, *Halothiobacillus*, *Acidiphilium* et *Acidithiobacillus*.

Les bactéries et les micro-champignons vont se fixer sur la surface alcaline du béton et ainsi réduire le pH de surface jusqu'à des valeurs inférieures ou égales à 5 [71] comme nous allons le décrire dans la suite de ce chapitre. C'est le début de la succession microbienne qui est déterminée non seulement par le pH de surface du béton, mais aussi par les différents types de composés soufrés qui sont présents à différents moments durant la succession microbienne. Les microorganismes neutrophiles sulfo-oxydants (NSOM) produisent des composés acides et convertissent une grande quantité de sulfure présent dans le milieu en soufre élémentaire et en acide polythionique ($H_2S_nO_6$). Lorsque les différents microorganismes se développent, les produits métaboliques acides s'accumulent et le pH de surface du béton chute. Aux environs d'un pH de 4-5, les microorganismes acidophiles sulfo-oxydants (ASOM), comme *Acidithiobacillus thiooxidans*, commencent à coloniser la surface et à oxyder le soufre et les acides polythioniques en une grande quantité d'acide sulfurique. Ainsi le cycle du soufre dans les réseaux d'assainissement est achevé.

L'état de surface du matériau est un paramètre important dans le phénomène de colonisation. En effet, l'accrochage du biofilm bactérien est favorisé si la surface présente des aspérités. Les principales étapes de fixation du biofilm peuvent se présenter de la façon suivante : une surface comportant des irrégularités de l'ordre de grandeur de la taille de la bactérie est nécessaire afin que les premières bactéries puissent s'y accrocher. Ensuite, des microcolonies amenées par l'effluent ou par aérosol vont se fixer aux bactéries présentes et former au fil du temps le biofilm. La croissance du biofilm est alors assurée par les nutriments constamment apportés par le flux de l'effluent.

D'après Okabe *et al.* [70] et Roberts *et al.* [71], le processus de corrosion induit par les microorganismes peut-être divisé en trois étapes (Figure I-20).

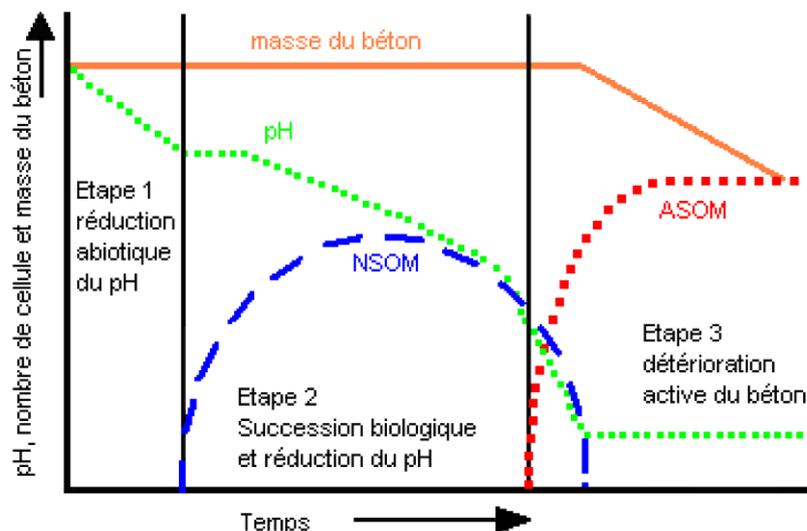


Figure I-20 : Changements théoriques des propriétés biologiques et physiques du béton, à base de ciment Portland, en fonction du temps durant le processus de détérioration ; NSOM : bactéries neutrophiles sulfo-oxydantes, ASOM : bactéries acidophiles sulfo-oxydantes [71].

La première étape est caractérisée pour les bétons de ciment Portland par une diminution modérée du pH de 13 à 9 résultant de la neutralisation essentiellement abiotique de la portlandite ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) par le CO_2 et par l' H_2S selon les réactions suivantes :



Pour ce type de béton, la carbonatation conduit à une diminution de la porosité [72]. Les cristaux de calcite précipitant autour des grains de portlandite conduisent à l'augmentation de la taille des hydrates. Parallèlement, la diffusion du CO_2 est freinée par l'enveloppe de calcite qui a une porosité faible. Les cristaux de calcite vont donc progressivement isoler la portlandite restante, réduisant ainsi la réaction de carbonatation.

L' H_2S induit la formation de sulfure de calcium (CaS) qui est un sel blanc peu soluble dans l'eau. Aucune information n'est disponible dans la littérature sur les effets de cette transformation dans les matériaux cimentaires.

Dans le cas des bétons formulés avec du ciment alumineux la réaction entre le CO_2 et le ciment va entraîner la formation de CaCO_3 et d' AH_3 , sans considération des hydrates initialement présents, selon les équations suivantes :



La carbonatation des bétons de ciment alumineux ne conduit pas systématiquement à une réduction de la porosité. Le type d'hydrate présent initialement est déterminant [73]. Pour un

matériau non converti (contenant essentiellement CAH_{10}) la carbonatation va s'accompagner d'une réduction du volume solide de l'ordre de 48% alors que pour un matériau totalement converti (contenant principalement du C_3AH_6) la carbonatation va entraîner une augmentation du volume solide de l'ordre de 17%.

Aucune information n'est disponible dans la littérature concernant l'impact direct de l' H_2S sur les bétons de ciment alumineux.

La deuxième étape est marquée par une autre diminution de pH résultant de l'apparition d'une succession de colonisation bactérienne neutrophile oxydant les sulfures (ou le soufre élémentaire) en acide sulfurique sans que la perte de masse du béton ne soit significative. Les microorganismes majoritaires présents sur le béton évoluent dans ce sens : *Thiothrix spp.*, *Thiobacillus plumbophilus*, *Thiomonas sp.* et *Halothiobacillus neapolitanus*. Ces espèces sont très certainement responsables de la production d'acide sulfurique conduisant à la diminution de pH. On peut noter que ces microorganismes ont des plages de croissance suivant le pH qui se recoupent permettant cette diminution continue du pH (Figure I-21).

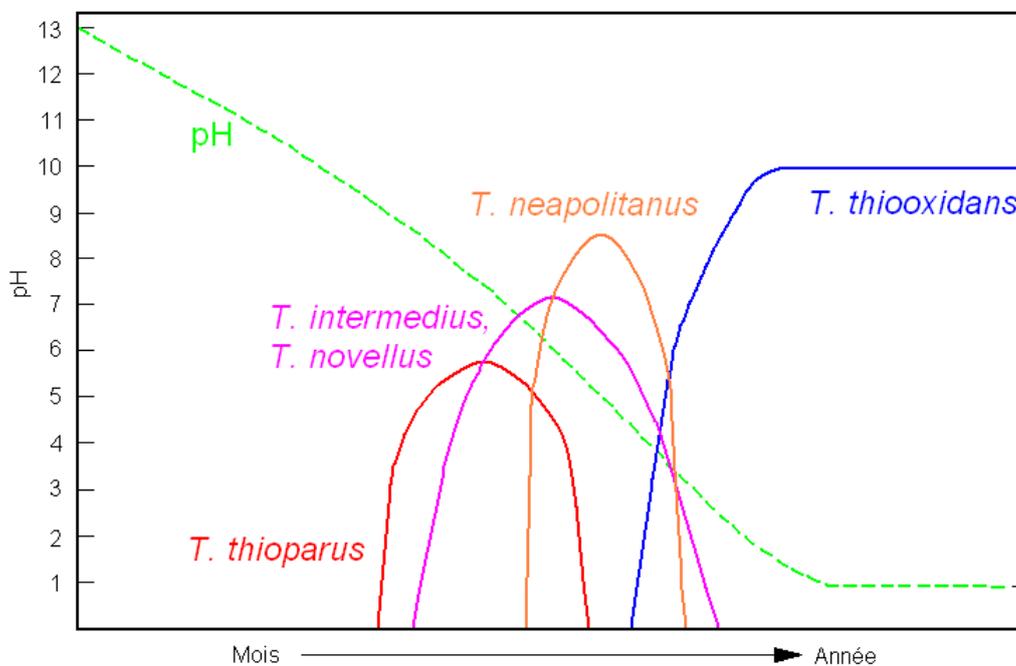


Figure I-21 : Succession bactérienne intervenant sur un béton de ciment Portland exposé à de l' H_2S [57].

La dernière étape est marquée par l'émergence d'une colonisation bactérienne acidophile oxydant les sulfures (ou le soufre élémentaire) et par une détérioration sévère du béton. Il a été constaté [38, 57] que la perte de masse importante du béton coïncide avec l'apparition d'*Acidithiobacillus thiooxidans*, qui possède une vitesse de croissance maximale à pH 2. L' H_2S (ou le S^0) est consommé par ces microorganismes suivant les réactions bilans suivantes :



L'acide sulfurique produit par *A. thiooxidans* s'accumule de plus en plus et le milieu de culture s'acidifie au fur et à mesure que le soufre est oxydé. Si du calcium est présent, alors des cristaux de sulfate de calcium (gypse) et d'ettringite (en présence d'aluminium) peuvent se former lorsque les produits de solubilité sont atteints.

Après avoir énoncé de façon générale les facteurs entrant en jeu lors de la biodétérioration, nous présentons dans le paragraphe suivant les caractéristiques des bactéries responsables de l'attaque.

I-3.2.3. Microorganismes impliqués dans le processus de biodétérioration

En 1904, la capacité de croître de certaines bactéries Gram négatives utilisant comme source d'énergie une molécule soufrée réduite a été considéré suffisamment importante d'un point de vue taxonomique pour que ces bactéries méritent d'être classées dans le genre *Thiobacillus* [74].

L'ensemble des *Thiobacilli* est caractérisée par une large gamme de conditions de croissance [74, 75]. Elles couvrent un domaine de pH important allant d'approximativement 0 à plus de 8,5, un pourcentage du contenu en guanine et cytosine de leur ADN très variable (50 à 68%), une large diversité de l'homologie de l'ADN et une variété importante d'ubiquinones et d'acides gras. Toutes ces bactéries sont petites, Gram négatives, sous forme de bacilles, et pour certaines sont mobiles grâce à un flagelle polaire. Aucune n'a la capacité de sporuler (la sporulation est l'aptitude à former une spore, qui est un organe permettant à la bactérie de résister dans des conditions très défavorables).

La source énergétique de ces bactéries est dérivée de l'oxydation de composés soufrés réduits tel que les sulfures, le soufre élémentaire, les thiosulfates, les polythionates ($S_nO_6^{2-}$) ainsi que les thiocyanates. L'oxydation complète de ces composés soufrés aboutie à la formation de sulfates ou d'acide sulfurique.

Tous ces bacilles sont autotrophes, c'est-à-dire qu'ils utilisent de la matière inorganique pour produire de la matière organique. Une partie d'entre eux sont des chimiolithotrophes obligatoires, alors que d'autres sont aussi capables de croître de manière chimioorganotrophiques. La chimiolithotrophie est l'utilisation de substances minérales, en l'absence de lumière, comme source d'énergie pour la croissance des microorganismes. Au contraire, la chimioorganotrophie est l'utilisation de substances organiques, en l'absence de lumière, comme source d'énergie pour les synthèses cellulaires.

Les techniques récentes de biologie moléculaire (analyses de l'ARNr 16S,...) ont révélé la grande diversité entre ces microorganismes et ont permis de mettre en évidence des erreurs de classification qui ont depuis été corrigées [75].

Dans cet ordre des *Thiobacillus*, on trouve entre autres *Thiobacillus thioparus*, *Starkeya novella* (anciennement *Thiobacillus novellus*), *Halothiobacillus neapolitanus* et *Acidithiobacillus thiooxidans*. Chacune de ces bactéries a des conditions de croissance différentes mais qui se recoupent. Ceci conduit pour le béton à la mise en place d'une succession bactérienne en fonction du pH (Tableau I-7).

Tableau I-7 : Genres et espèces de BSO et conditions de cultures [71].

Genres et espèces	Gamme de pH	Type trophique	Substrat soufré	Produits
<i>Thiobacillus thioparus</i>	4,5 – 10	Autotrophe	Thiosulfate, H ₂ S, thiocyanate	Soufre, acides polythioniques
<i>Starkeya novella</i>	5 – 9,2	Mixotrophe	Thiosulfate	Soufre
<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	4 – 9	Autotrophe	H ₂ S, soufre, thiosulfate	Acides polythioniques, acide sulfurique
<i>Thiobacillus intermedius</i>	1,7 – 9	Mixotrophe	Thiosulfate	Acides polythioniques, acide sulfurique
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	0,5 – 4	Autotrophe	Thiosulfate, soufre	Soufre, acide sulfurique

Acidithiobacillus thiooxidans est une bactérie acidophile, elle se développe à un pH compris entre 0,5 et 4 avec un maximum d'activité à 2. Elle a été isolée pour la première fois en 1921 par Waksman et Joffe [76]. Cette bactérie croit uniquement sur des substrats fortement sélectifs en utilisant le soufre élémentaire ou le thiosulfate de sodium comme source d'énergie. La présence de composés organiques dans le milieu n'est pas nuisible pour la croissance de cette bactérie, même à forte concentration, et peut parfois la stimuler. Cependant, sa croissance nécessite toujours la présence de soufre inorganique (H₂S, soufre élémentaire ou thiosulfate) et la présence de dioxygène.

D'après une étude réalisée par Cho et Mori [77], un micro-champignon a été identifié dans un béton sévèrement corrodé. Il vit en association avec *Acidithiobacillus thiooxidans*. Ce micro-champignon appelé OMSOfl est résistant à l'acide et peut oxyder les sulfures. Son produit métabolique est identifié comme étant le thiosulfate. L'association entre la bactérie et le micro-champignon accélère la détérioration du béton car le mycélium du champignon se développe dans les porosités et les fissures du matériau en entraînant des pressions internes importantes. Le mycélium permet au micro-champignon de se nourrir en dégradant la matière organique proche, il est composé d'un ensemble de filaments plus ou moins ramifiés, appelés hyphes. Ces filaments excrètent des métabolites qui réagissent avec le calcium endogène pour former des complexes organocalciques solubles (oxalate de calcium,...). Les nutriments disponibles pour l'ensemble des microorganismes sont alors en quantité plus importante et la surface réactive du matériau peut également être modifiée.

Ce type d'association a également été montré par Gu *et al.* [78] avec l'implication d'un micro-champignon du genre *Fusarium*. Selon ce travail, la dégradation du béton par *Fusarium* est plus rapide que par *Thiobacillus intermedius*.

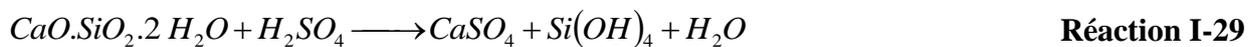
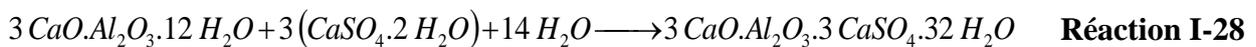
I-3.2.4. Conséquence de la biodétérioration sur les matériaux cimentaires

L'acide sulfurique produit en surface par les BSO va pénétrer dans le béton en interagissant avec les espèces chimiques constituant le matériau, et ainsi former des phases caractéristiques de la réaction de détérioration du béton par l'H₂SO₄ [70] telles que le gypse ou l'ettringite.

Le béton composé de granulats calcaires montre une profondeur de détérioration plus faible que celle obtenue avec des granulats siliceux. Les granulats calcaires en se dissolvant sous l'attaque acide créent localement un environnement tampon qui a un rôle protecteur pour la pâte de ciment. Les analyses microscopiques de la surface érodée confirment ce rôle et

permettent de faire l'hypothèse que les granulats calcaires neutralisent l'acidité alors que les granulats siliceux n'ont aucune influence lors des mécanismes de biodétérioration [79]. Un matériau cimentaire réalisé à partir de granulats calcaire va se dissoudre de manière homogène alors qu'avec des granulats siliceux, il n'y aura que la pâte de ciment qui sera dégradée. Pour ces derniers cas, les granulats siliceux se déchaussent révélant ainsi de nouvelles surfaces d'attaque.

Grâce à la microscopie électronique à balayage, il est possible d'analyser le faciès des fissures profondes dues à la formation de produits de détérioration au sein du béton. Ces fissures sont typiques des pâtes de ciments corrodés par de l'acide sulfurique [69]. Dans le cas des bétons formulés avec du ciment Portland l'acide réagit avec les hydroxydes de calcium, les aluminates de calcium et les silicates de calcium pour former des cristaux de gypse et d'ettringite.



Ces produits de corrosion ont un volume supérieur aux phases initiales et induisent une augmentation de la pression interne. Par conséquent, leur formation entraîne un élargissement de l'ouverture des fissures avec comme conséquence une augmentation de l'aire surfacique pour les processus de corrosion et la création de sites supplémentaires pour la pénétration de l'acide.

La durabilité des bétons de ciments alumineux dans les milieux de pH acide est, d'une manière générale, supérieure à celle des bétons de ciments Portland. Cela s'explique par la stabilité de l'alumine hydraté $Al(OH)_3$ jusqu'à des pH de 3 à 4 (Figure I-22).

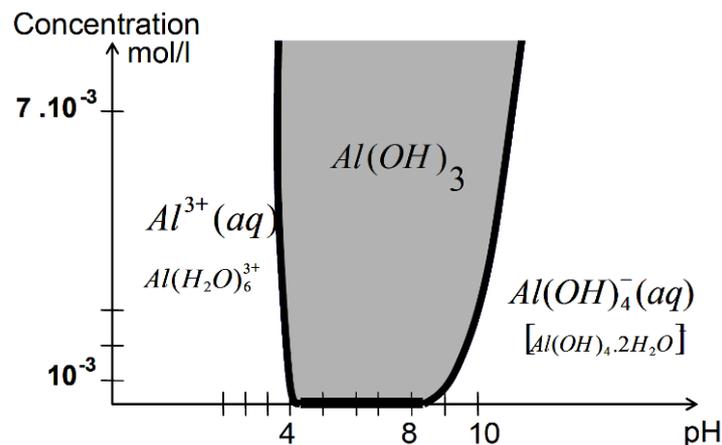
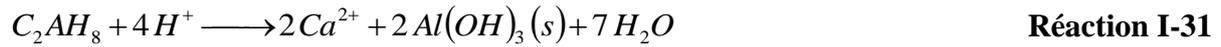


Figure I-22 : domaine de stabilité du gel d'alumine ($Al(OH)_3$) [80].

Dans le cas d'une attaque acide sur des bétons formulés avec des ciments alumineux, deux mécanismes distincts doivent être considérés avec une limite fixée à pH 4. Au dessus de cette valeur, l'acide va entraîner la précipitation d' $Al(OH)_3$ à partir de la détérioration des hydrates d'aluminates de calcium. L' $Al(OH)_3$ précipite sous forme de gel qui agit comme une barrière de diffusion et entraîne donc la réduction des vitesses de réactions suivantes :





A des pH inférieurs à 4, le gel d'alumine réagit avec l'acide et se dissout selon :



Cette réaction augmente de manière considérable la capacité de neutralisation des bétons de ciments alumineux. De plus, le temps nécessaire à la dissolution du gel d' AH_3 permet de prolonger la protection du béton sous-jacent.

Comme il vient d'être exposé, le gel d'alumine tamponne la surface du béton à un pH de 4. Les bactéries acidophiles (*Acidithiobacillus thiooxidans*) qui colonisent la surface du béton commencent à se fixer et à être actives à ce pH mais les conditions chimiques du béton à base de ciments alumineux ne sont pas suffisantes pour que la quantité d'acide produite annihile l'effet tampon du gel d'alumine.

Comme les bétons à base de ciment alumineux ont une capacité de neutralisation plus importante et une couche protectrice qui se forme très rapidement en surface, ils sont plus adaptés aux conditions acides rencontrées dans les réseaux d'assainissement comme le montre la Figure I-23.



Figure I-23 : Echantillons de béton exposés pendant 17 mois dans le cadre du projet Virginia [41].
 a- béton à base de ciment Portland et de granulats siliceux.
 b- béton à base de ciment alumineux et de granulat type ALAG³.

Une explication supplémentaire à la bonne tenue des bétons de ciments alumineux dans ces milieux pourrait être l'impact des ions aluminium sur les bactéries. A forte concentration, l'ion aluminium inhibe la croissance bactérienne empêchant toute synthèse de composés acides ou de multiplication cellulaire [81].

I-3.2.5. Lutte contre le développement bactérien

Un moyen de lutter contre la biodétérioration des matériaux cimentaires, autre que par une action sur la production d'hydrogène sulfuré, est d'influer sur la croissance ou l'activité des microorganismes impliqués dans ce processus.

³ ALAG® : granulats synthétique silico-alumineux-calciqne obtenus par fusion et contenant environ 40 % d'alumine. Ils se caractérisent par une densité élevée et une exceptionnelle dureté.

Un revêtement à base de zéolite contenant de l'argent a montré une résistance à la corrosion du béton par l'acide sulfurique d'origine biologique mais aussi une inhibition de la croissance microbienne [82]. Les aptitudes de ce revêtement à lutter contre la biodétérioration ont été mises en évidence après 32 jours d'immersion par l'absence de sous-produits tels que le gypse ou l'ettringite caractéristiques des attaques par l'acide sulfurique sur les bétons de ciment Portland.

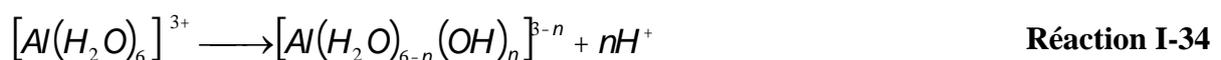
Haile *et al.* [83] ont travaillé sur l'utilisation d'un nano oxyde de cuivre pour contrôler la croissance d'*A. thiooxidans*. Cet oxyde a été déposé par des techniques électrochimiques sous forme d'un revêtement sur du béton de type CEM II. L'inhibition est estimée active à partir de 2,3 – 2,6 milligramme de cuivre par milligramme en poids secs de cellules.

La perspective d'utiliser la compétition microbienne pour contrôler la croissance des *Thiobacillus* a été envisagée par Padival *et al.* [84]. Les bactéries de type *Thiobacillus* sont caractérisées par une croissance lente et le fait d'introduire des bactéries compétitives, en contrôlant les conditions de cultures, permet de réduire le nombre et l'activité des *Thiobacillus*. Les bactéries compétitives sont des bactéries de tout type qui se développent dans les mêmes niches environnementales et utilisent les mêmes nutriments que les bactéries à combattre. Toutefois, ces nouvelles bactéries ne produisent pas de composés acides et n'altèrent donc pas le béton. La production d'acide n'est cependant pas complètement éliminée puisque les *Thiobacillus* sont toujours présentes et actives malgré une diminution significative de leur activité.

Une nouvelle technique a été développée par Zhang *et al.* [44] pour l'élimination des microorganismes impliquée dans le processus de biodétérioration. Cette technique a pour principe l'utilisation de phages spécifiques aux bactéries impliquées dans la biodétérioration. Les phages sont des organismes qui infectent les bactéries et détournent leurs métabolismes pour se répliquer. Les phages nouvellement formés lysent la paroi bactérienne pour sortir et infecter de nouveaux hôtes entraînant la mort des bactéries infectées. L'avantage de cette méthode est que les phages sont très spécifiques et que même si les bactéries développent une résistance, les phages peuvent lutter contre cette résistance en développant de nouvelles voies d'accès.

Une manière alternative de lutter contre le développement bactérien peut être l'emploi d'aluminium dans les matériaux cimentaires. Il est connu que l'aluminium a un effet nocif sur la majorité des êtres vivants d'autant plus que la plupart de ces organismes ne possèdent pas de contrôle sur cet élément. Lee *et al.* [85] ont montré en 1991 que l'aluminium avait un effet choc sur la croissance bactérienne et ce à partir d'une concentration d'un ppm, l'inhibition totale de la croissance n'intervenant qu'à partir de 20 ppm.

Il est important de noter que la solvatisation de l'aluminium implique une diminution du pH qui peut avoir une influence sur l'activité des bactéries présentes.



La forme prise par l'aluminium en solution est le paramètre qui va agir sur la toxicité de cet élément. Une forme complexée ne sera pas nocive pour la croissance bactérienne. Le pH va influencer de manière significative sur la spéciation de l'aluminium en solution et donc sur son impact sur le vivant.

L'étude menée par Wood et Cooper [86] a permis de démontrer que les bactéries en phase de croissance rapide étaient plus sensibles à l'aluminium que celles en phase stationnaire. Ceci vient confirmer les découvertes de Munns et Keyser [87] qui précisent que les cellules sont plus sensibles à l'aluminium lors de la division cellulaire.

L'aluminium est un puissant inhibiteur de nombreux processus biologiques, il va d'abord entraîner une toxicité au niveau cellulaire puis, au niveau de l'organisme dans le cas des eucaryotes pluricellulaires [88]. Mais pour qu'il devienne toxique, il faut qu'il réponde à trois critères qui sont la quantité, la durée et la fréquence de contact.

L'aluminium peut se lier à l'ADN de trois façons différentes suivant le pH [89]. A bas pH, l'aluminium, sous forme Al^{3+} , va venir s'intercaler dans la double hélice de l'ADN et va donc déstabiliser la structure même du porteur de l'information génétique. A un pH plus élevé, ce même élément, sous forme $Al(OH)^{2+}$, va stabiliser l'ADN en s'accolant à la double hélice d'ADN. Pour des pH intermédiaires, on va retrouver un mélange des deux formes formant un nouveau complexe.

Ces effets de l'aluminium restent toutefois à vérifier dans le cas de bétons formulés à partir de ciment alumineux.

I-4. Les essais accélérés de dégradation des matériaux cimentaires

L'intérêt porté à la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement est actuellement fort comme nous le montre la Figure I-24. Le fait que de nombreux chercheurs répartis sur l'ensemble de la planète travaillent sur cette problématique est vraisemblablement dû, comme nous l'avons vu, à ce que les réseaux des grandes villes sont vieillissants et nécessitent des travaux de réhabilitation ou de reconstruction avec l'emploi de matériaux durables.

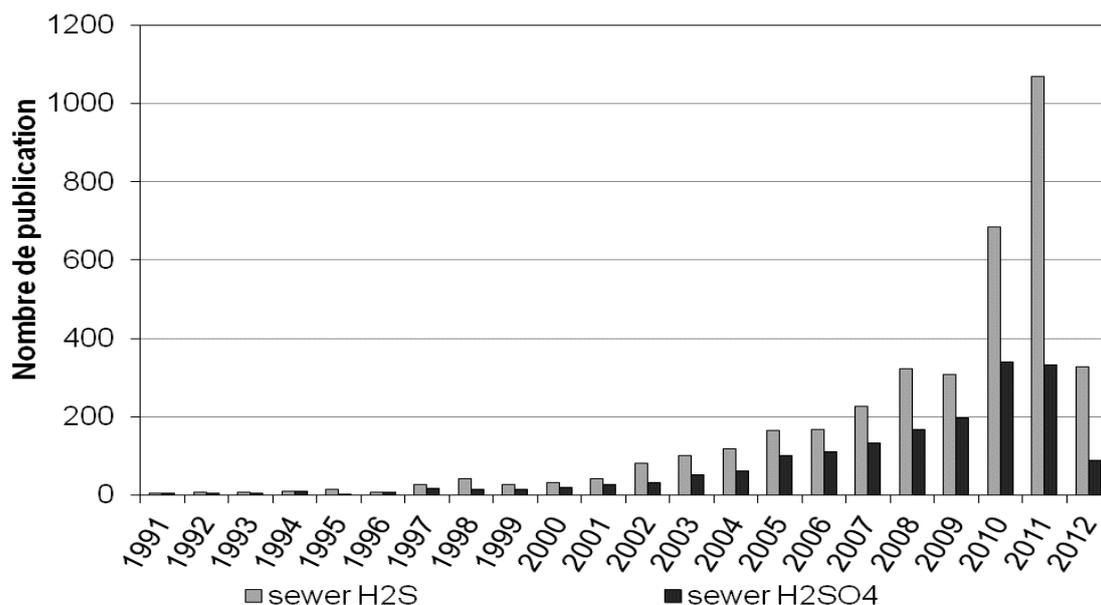


Figure I-24 : Evolution du nombre de publications portant sur « sewer - H₂S » et sur « sewer - H₂SO₄ » dans Science Direct.

De nombreuses expériences ont été réalisées à travers le monde pour comprendre l'impact de l'hydrogène sulfuré sur les canalisations en béton. Chaque équipe propose un essai qui lui semble refléter au mieux les phénomènes réels. Ces essais peuvent-être classés dans trois catégories : chimiques, biochimiques et *in situ*.

I-4.1. Les essais chimiques

Les essais chimiques sont les premiers essais qui ont été mis en place. Comme les matériaux cimentaires sont soumis à une attaque acide à la fin du processus de biodétérioration, ces expériences consistent essentiellement à mettre en contact un échantillon de mortier ou de béton avec une solution d'acide sulfurique.

Deux approches peuvent être envisagées. Les essais peuvent se faire dans des conditions réalistes ou en exacerbant certains des mécanismes pour accélérer les processus de dégradation.

Les essais réalistes ont l'avantage de coller au maximum aux conditions réelles mais il est nécessaire de mettre en place des techniques de détection de la détérioration qui soient très sensibles. Un inconvénient majeur de ce type d'essai est que l'extrapolation des résultats ne permet pas nécessairement de prédire avec certitude le devenir du matériau cimentaire. Le risque est qu'un nouveau mécanisme, qui n'était pas détectable pendant la durée de l'essai, se mette en place durant une période ultérieure de la détérioration.

Au contraire, les tests accélérés ont pour but de simuler la vie entière d'un échantillon dans des conditions particulières. Pour cela, il est possible de jouer sur différents paramètres dont la température, les cycles humidité-séchage, la concentration de l'agent agressif et enfin la taille de l'échantillon.

D'un point de vue normatif, le seul document existant s'applique aux tuyaux en fonte ductile protégée par un revêtement cimentaire. Il s'agit de la norme NF EN 598+A1 qui impose de tester la résistance des matériaux selon une méthode d'essai précise. Avant les essais, les tuyaux doivent être brossés avec une brosse dure en plastique et nettoyés avec de l'air comprimé puis être immergés dans de l'eau à température ambiante pendant environ 24 heures. Ensuite, ces tuyaux sont remplis jusqu'à mi-hauteur avec de l'acide sulfurique à pH 3 ou par de l'hydroxyde de sodium à pH 13. Les solutions sont recyclées à un débit d'environ $1 \pm 0,5 \text{ L min}^{-1}$ et l'essai se déroule à une température de $18 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 6 mois. La valeur du pH doit être contrôlée régulièrement et ajustée de sorte que sa variation soit inférieure à $\pm 0,3$ par rapport à la valeur initiale. La concentration en ions calcium doit également être surveillée et ajustée par ajout d'eau douce ou d'eau dé-ionisée de sorte qu'elle ne dépasse pas 200 mg L^{-1} . Après 6 mois d'exposition, la variation d'épaisseur du revêtement est mesurée et est comparée aux valeurs normées. Cet essai est simplifié au maximum pour obtenir rapidement des résultats reproductibles mais reste très éloigné des conditions réelles des réseaux d'assainissement.

Roy *et al.* [90] ont travaillé sur l'incorporation à du mortier de ciment CEM I de différents éléments pour comprendre leurs influences durant les attaques acides. Pour cela, différentes formulations ont été utilisées : CEM I, CEM I et fumée de silice, CEM I et métakaolin, CEM I et cendres volantes pauvres en calcium. La proportion d'ajout a été étudiée tout comme le rapport eau sur ciment (E/C). Ces différents échantillons ont été testés selon la norme ASTM C-267 (méthodes de test standardisées pour la résistance chimique des matériaux cimentaires)

c'est-à-dire qu'ils ont été immergés dans différentes solutions agressives dont de l'acide sulfurique à 1 et 5% pendant 28 jours. Après cette période d'immersion, ils ont été rincés à l'eau distillée puis pesés pour mesurer la perte de masse. Les auteurs concluent qu'à faible concentration d'acide (1%), la résistance des échantillons est bonne mais qu'elle devient faible à plus forte concentration (5%). La résistance chimique va également augmenter dans le sens de l'ajout de fumée de silice, de métakaolin et de cendres volantes. Enfin et contrairement à la logique, la résistance chimique augmente quand le rapport E/C passe de 0,36 à 0,40.

De Belie *et al.* [79] ont imaginé un essai pour tester les matériaux cimentaires dans des conditions qui se veulent proches de celles rencontrées dans les réseaux d'assainissement. Ce travail est basé sur l'étude de trois paramètres : la méthode de réalisation des échantillons, le type de ciment et le type de granulats. Les échantillons ont été réalisés par centrifugation (E/C = 0,25), par démoulage immédiat (E/C = 0,36-0,40) ou par durcissement en moule (E/C = 0,43-0,49). Ces échantillons cylindriques ont été fabriqués à partir de ciment à haute résistance aux sulfates (CEM I et CEM III) et les granulats étaient soit inertes (roches volcaniques) soit réactifs (roches calcaires). Pour cette expérience, les échantillons ont subi dix cycles de détérioration composé de trois étapes : une immersion alternée par rotation des cylindres dans une solution d'acide sulfurique à 0,5% (Figure I-25) puis un séchage à l'air et enfin un brossage de la surface. Après chaque cycle, la solution d'acide est renouvelée. Ces conditions cherchent à représenter la formation d'acide sulfurique et les fluctuations du niveau d'eau pour la première étape, le séchage causé par les situations de faible niveau d'eau pour la seconde étape et enfin, la perte de matière due à des flux importants dans la canalisation pour la dernière étape. Cet essai montre que les mortiers à base de granulats calcaires sont moins attaqués que ceux avec des granulats non réactifs. Les granulats calcaires créeraient localement, au niveau de la matrice cimentaire un microenvironnement protecteur grâce à la neutralisation de l'acide. En ce qui concerne le rapport E/C, plus il est faible et plus la résistance est importante. Contrairement aux autres études [26, 91], le CEM I à haute résistance aux sulfates serait plus résistant que le CEM III à haute résistance aux sulfates ce qui serait dû d'après les auteurs aux conditions particulières de cure utilisées pour la fabrication des éprouvettes.

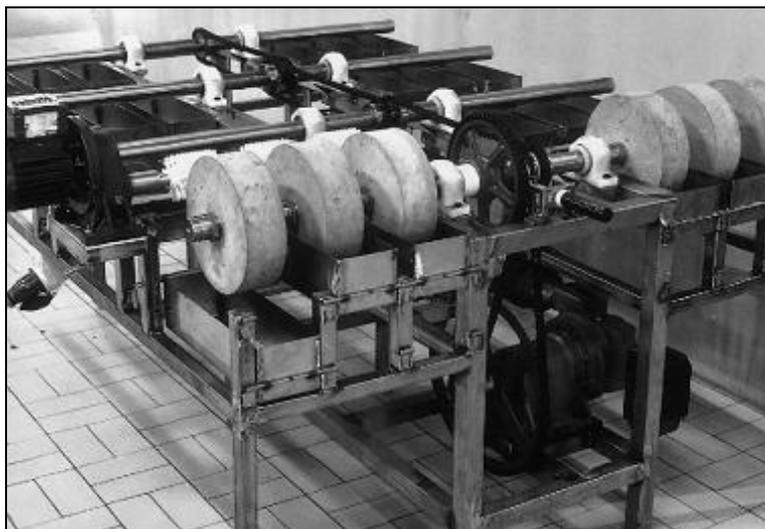


Figure I-25 : Appareil pour l'essai de détérioration accéléré développé par l'Université de Gand en 1999 [79].

Le point méthodologique le plus important dans ce type d'expérience est l'élimination ou non de la couche de gypse (ou d'autres produits de dégradation) formée au cours de l'essai. Cette couche devient en effet au bout d'un certain temps une barrière de diffusion à l'acide sulfurique pour les essais chimiques alors que pour les essais biochimiques, elle devient la zone de colonisation des microorganismes produisant l'acide sulfurique [92]. Elle devient donc une zone agressive pour le béton sous-jacent.

I-4.2. Les essais biochimiques

Les essais biochimiques font intervenir les microorganismes identifiés comme participant activement à la dégradation du béton. Les expériences sont en général réalisées avec une seule souche bactérienne, *Acidithiobacillus thiooxidans*, dans un grand volume avec l'introduction d'une quantité définie de molécules soufrées.

L'Institut National des Sciences Appliquées de Strasbourg a étudié l'impact d'une eau douce naturelle sur la biodégradation des matériaux cimentaires [93]. Pour cette étude, des échantillons de pâtes de ciment (CEM I, CEM III et CEM V) ont été inoculés avec de l'eau de la nappe phréatique rhénane (Strasbourg) additionnée de nutriments plus ou moins spécifiques pendant respectivement 3 semaines et 2,5 mois. L'ensemble des essais montre que les nuances cimentaires et les microorganismes ont une influence sur l'évolution de la surface du matériau et donc sur sa biodétérioration. Quelle que soit la nuance cimentaire considérée, l'activité métabolique des BSR induit un dépôt essentiellement composé de calcite, celle des BSO entraîne un dépôt contenant de l'hydrogénophosphate de calcium hydraté. Pour les échantillons de pâte de ciments plongés dans le milieu propice au développement des bactéries thiosulfato-réductrice, ils constatent que l'action des bactéries induit des dépôts de compositions différentes en fonction de la nuance cimentaire.

Cette équipe a également travaillé sur l'impact de la porosité sur la colonisation [94]. Elle conclut que la structure poreuse propre des pâtes de ciments interdit l'accès du réseau poreux aux microorganismes exogènes. Sans évolution du réseau poreux, les microorganismes ne peuvent donc pas pénétrer à l'intérieur du matériau ni y sécréter des substances agressives. Néanmoins, les fissures sont une voie d'accès possible pour les microorganismes au cœur du matériau.

Le groupe d'Heidelberg [95, 96] a travaillé à l'élaboration d'une chambre de simulation. Le but de ce groupe était de développer un test qui soit relativement simple. Cela a été rendu possible en réduisant le temps d'exposition et le nombre de souches bactériennes utilisées, qui est représenté uniquement par *Acidithiobacillus thiooxidans*.

La chambre d'essai de cette équipe est composée de deux parties, un incubateur et un réacteur (Figure I-26). *A. thiooxidans* est cultivée dans l'incubateur de 25 litres avec un milieu minéral à un pH de 3,5 comprenant du soufre élémentaire comme unique source de soufre (10 g L^{-1}). La température est fixée à 28-30°C et l'humidité relative est importante. Dans le réacteur, différents échantillons de mortiers, de taille 60x10x10 mm, sont exposés dans des supports en acier inoxydable. Ces échantillons sont recouverts par la suspension bactérienne provenant du fermenteur 5 minutes par heure, le milieu de culture est ensuite réinjecté dans le fermenteur par l'intermédiaire d'une pompe. La procédure d'immersion est reproduite durant 3 à 5 mois. Après quelques cycles d'immersion, un biofilm se forme en surface comprenant *A. thiooxidans* et des amas de soufre.

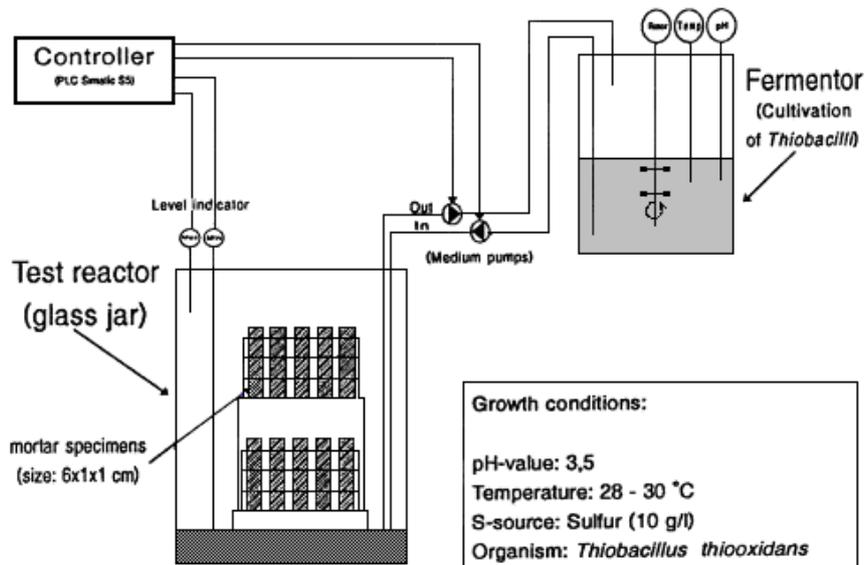


Figure I-26 : Schéma du montage de la chambre de simulation d'Heidelberg [95].

Les mortiers sont inspectés après une exposition de 3 à 5 mois. La perte de masse et la densité bactérienne sont mesurées sur l'ensemble des échantillons.

Cet essai montre que les mortiers de ciments Portland sont moins résistants à la biocorrosion que les mortiers de ciments alumineux, la résistance de ces derniers étant dix fois supérieure. Différents granulats ont été utilisés : du clinker à haute teneur en alumine, du quartz et des roches volcaniques. Pour cette étude, la nature des granulats n'a révélée aucune influence sur les processus de biodétérioration [96].

Ce type de test entraîne une exposition à deux types d'agression. La première est une attaque chimique, puisque les échantillons sont immergés dans le milieu de culture pendant 5 minutes par heure. Ce milieu a un pH de 3,5 et va dégrader le béton par attaque acide, il va aussi « laver » la surface des éprouvettes en solubilisant les produits de détériorations formés qui ne peuvent donc pas s'accumuler en surface. La seconde attaque est microbiologique, *A. thiooxidans* va se fixer à la surface des échantillons durant la phase d'immersion. Pendant 55 minutes par heure, les bactéries vont induire une diminution du pH sous des valeurs de 3,5. Une des limites majeure de ce type de test est que la croissance des bactéries s'effectue essentiellement dans le milieu le plus favorable pour elle c'est-à-dire le milieu de culture, la croissance sur les échantillons pouvant être très différente de celle rencontrée dans les réseaux d'assainissement.

Des chercheurs de la ville de Gand en Belgique [79, 97] ont également imaginé un test accéléré de biodétérioration des matériaux cimentaires. Le but principal de cette équipe était de réaliser un test simple reproduisant les pires conditions rencontrées *in situ*.

Pour cet essai, les échantillons testés sont des bétons réalisés à base de ciment Portland ou de ciment avec ajout de laitier. Pour chaque type de ciment, des ajouts ou non de polymère (ester acrylic-styrène) ont été effectués. Les échantillons sont des blocs de 2x2x5 cm.

L'H₂S est apporté une fois par cycle, c'est-à-dire tous les 17 jours à une concentration de 250 ppm. Les échantillons de béton sont fixés à des lames de verre et maintenus dans cette atmosphère durant 3 jours (Figure I-27). Ils sont ensuite plongés dans une solution enrichie en *Thiobacillus* et placés sur des agitateurs rotatifs pendant 10 jours à 90 rpm. Le pH du milieu

descend jusqu'à des valeurs de 1 à 3. Pour accélérer la corrosion des bétons, les échantillons sont lavés à l'eau Milli-Q pendant 2 jours dans des agitateurs rotatifs. Le cycle se termine par une période de séchage de 2 jours.

Après un cycle, l'épaisseur de l'échantillon est mesurée. La perte de masse et la résistance sont estimées au bout de 3 cycles de 17 jours. La baisse de pH et l'augmentation des concentrations en sulfates et en calcium sont déterminées dans les suspensions.

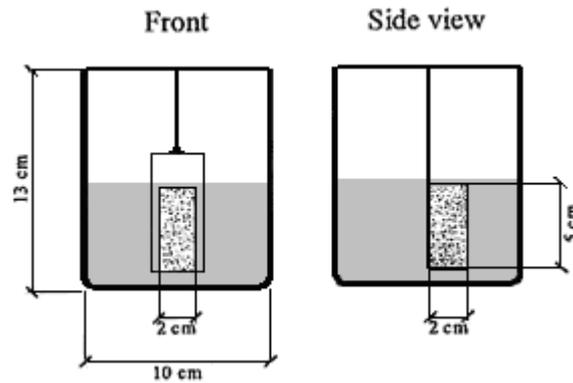


Figure I-27 : Schéma de la deuxième étape du test de l'équipe de Gand [97].

L'influence de différents paramètres a été analysée et il en ressort que le type de granulats est important. Les granulats calcaires créeraient un microenvironnement protecteur contre l'acide sulfurique [79]. Par ailleurs, ce test conclut qu'il n'y a pas de différence majeure entre les matériaux à base de ciment Portland et ceux à base de ciment au laitier de haut fourneau [97]. Néanmoins, De Belie *et al.* [79] ont montrés quelques années plus tard que les bétons à base de ciment Portland étaient plus résistants que ceux avec ajout de laitier.

La première critique qui peut être faite sur cet essai est que ce type d'expérience est très loin des conditions rencontrées *in situ*. Ensuite, les différents paramètres ne sont pas suivis comme il faudrait, par exemple, l' H_2S est oxydé chimiquement dans la chambre avec une cinétique non déterminée. De plus, les échantillons baignent dans une solution de culture des *Thiobacillus* qui est une solution acide, l'attaque est donc plus chimique que biologique. La première étape de ce test n'est pas justifiée puisque la seconde apporte du soufre grâce au milieu de culture. La dernière étape n'est également pas justifiée puisque dans les réseaux d'assainissement, les bétons sont toujours en contact avec de l'eau apportée par la forte humidité ambiante.

L'équipe de l'Université de Hambourg a travaillé sur l'élaboration d'une chambre de biodétérioration qui permet de recréer les conditions rencontrées dans les réseaux d'assainissement [98]. Pour cela, ils ont utilisé une enceinte hermétiquement close dans laquelle la température, l'humidité, la concentration d' H_2S et l'exposition aux aérosols (apport de nutriments) sont contrôlées (Figure I-28).

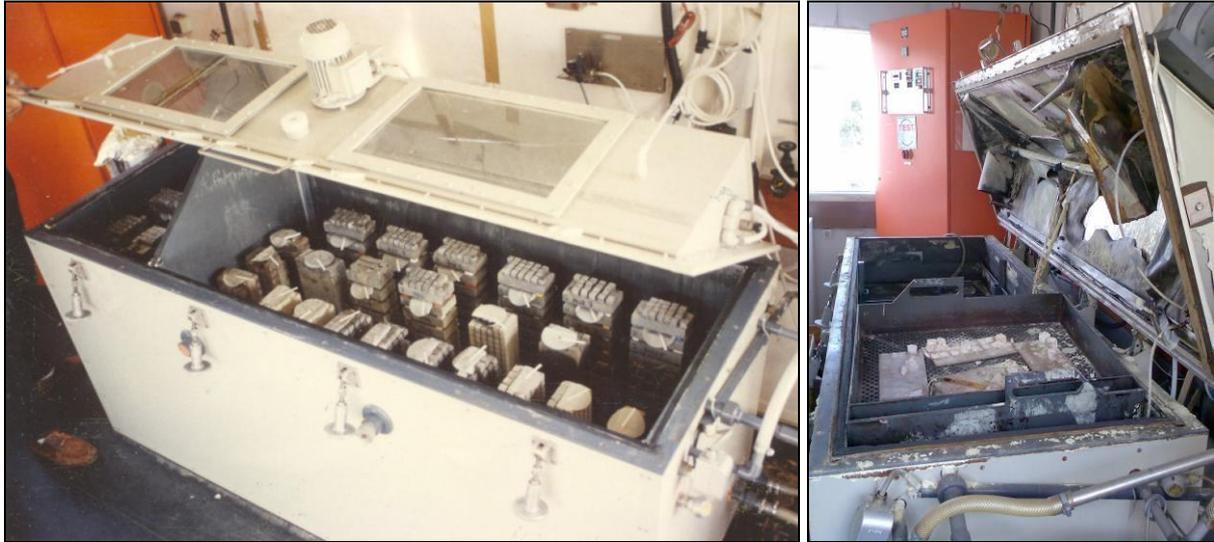


Figure I-28 : Chambre de biodétérioration de l'équipe d'Hambourg, durant son fonctionnement en 1983 et 25 ans après son installation [98].

Cette chambre a un volume d'un mètre cube et contient environ 110 litres d'eau. Les températures des parois et du fond sont contrôlées séparément. L'eau au fond de la chambre est à une température deux à trois degrés plus élevée que celle des parois pour favoriser une évaporation et donc une condensation à l'intérieur de l'enceinte. Ceci permet d'atteindre une humidité relative très importante, de l'ordre de 98%. Six diffuseurs sont installés afin de répandre sur les échantillons une solution de sels minéraux ($0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$, $0,65 \text{ g L}^{-1} \text{ MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$) indispensable à la croissance bactérienne. La température est fixée à $30 \pm 1^\circ\text{C}$. L'atmosphère dans la chambre contient entre 15 et 20 ppm d' H_2S qui est oxydé, en présence d'air, en soufre élémentaire qui se dépose dans la chambre. Cette enceinte (Figure I-29) est équipée d'un système de ventilation qui engendre des mouvements d'air importants et permet d'homogénéiser l'atmosphère de la chambre. Les échantillons exposés (cubes de 18 mm de côté) sont soumis à douze souches différentes de bactéries isolées à partir du réseau d'assainissement d'Hambourg [99]. La période d'incubation dure trois mois durant lesquels des suspensions bactériennes sont apportées à intervalles réguliers.

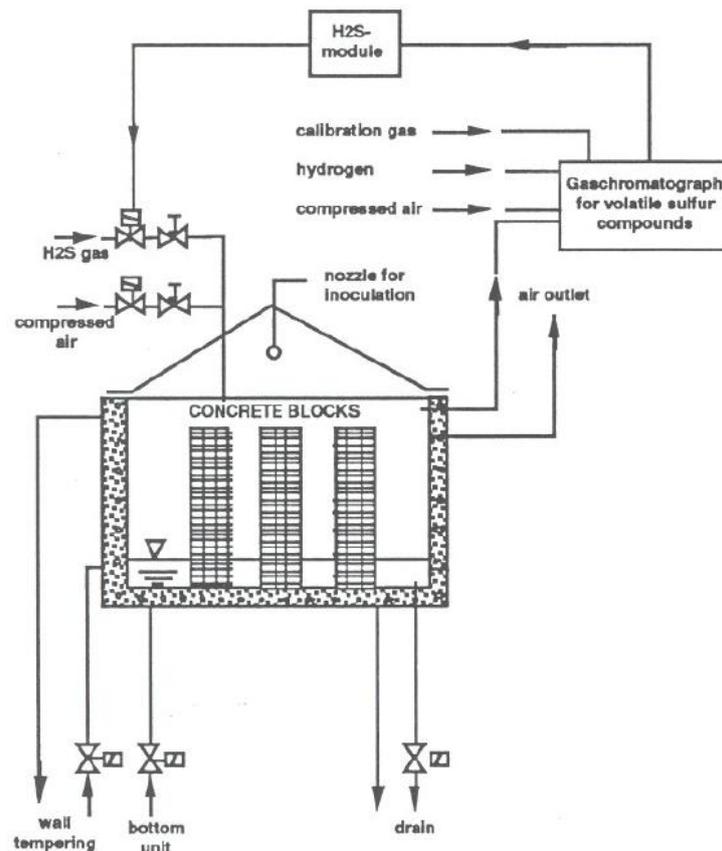


Figure I-29 : Schéma de montage de la chambre de simulation d'Hambourg [98].

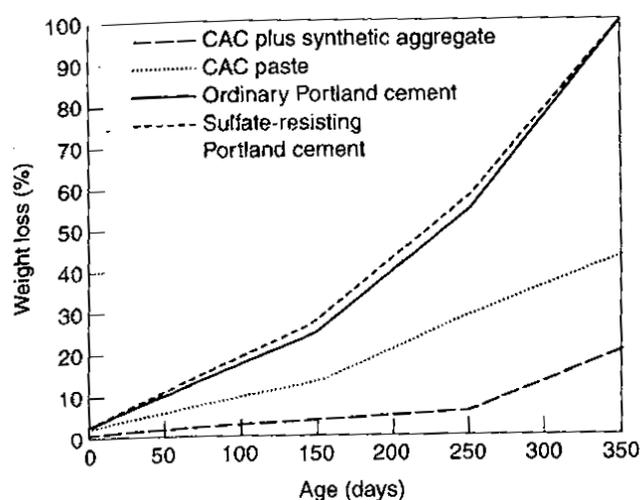
Les échantillons extraits à échéances régulières de la chambre le sont toujours par trois pour vérifier la répétabilité puis sont immergés dans une solution de sels minéraux qui est homogénéisée pendant 90 minutes grâce à un système rotatif. Ceci permet de détacher les éléments dégradés pendant l'essai et de mettre en suspension les bactéries tout en les conservant de manière stable. Cette solution est ensuite divisée en trois parties, chacune additionnée d'éléments nutritifs spécifiques pour trois types de bactéries *A. thiooxidans*, *H. neapolitanus* et *T. intermedius* – *S. novellus*). Après trois semaines d'incubation, le nombre de bactéries est évalué et permet de remonter au nombre initial de bactéries. Parallèlement à ces essais, la perte de masse et le pH de surface des échantillons de béton sont mesurés.

Cette expérience [98] permet de confirmer le fait que deux matériaux présentant des résistances comparables lors des tests par immersion dans de l'acide peuvent avoir des résistances complètement différentes en présence de bactéries. L'exemple des matériaux à base de ciment alumineux illustre très bien ce point puisque selon les essais chimiques, ces matériaux sont classés dans la catégorie des matériaux non durables alors qu'ils ont une excellente tenue dans les réseaux d'assainissement.

Cet essai a permis de conclure que les matériaux à base d'aluminate de calcium sont très résistants aux attaques d'acide sulfurique d'origine biogénique et donc qu'ils sont utilisables dans les réseaux d'assainissement (Tableau I-8 et Figure I-30). On peut noter que l'addition de granulats de type ALAG® améliore considérablement la résistance du matériau aux attaques acides de type biogénique [100].

Tableau I-8 : Détérioration des mortiers dans le test de l'université d'Hambourg [101].

Ciment	Portland	Alumineux	
Type	Portland	CALCOAT® ⁴	SewperCoat® ⁵
Granulats	siliceux		ALAG®
Capacité de neutralisation (mM g ⁻¹)	8,0	13,2	38,4
pH (84 jours)	5,8	5	5,4
pH (170 jours)	1,8	3,0	3,3
pH (320 jours)	1,0	2,1	3,0
Perte de masse (150 jours)	25,1%	13,1%	3,4%
Perte de masse (350 jours)	100%	43%	20%

**Figure I-30 : Perte de masse due à l'attaque biogénique de ciment alumineux, Portland après un an de test accéléré, équivalent environ à 24 ans dans un réseau [73].**

Il ressort des études que les matériaux cimentaires contenant des aluminates de calcium sont exposés à moins d'acide sulfurique que les matériaux à base de ciment Portland. Ceci est dû à la plus forte capacité de neutralisation des ciments alumineux et à la plus faible quantité de microorganismes présents en surface sur ce type de matériaux [91, 101].

Par comparaison avec les données recueillies dans un réseau d'assainissement, un facteur accélérateur de ce test peut être donné. La première estimation était de 8 [98] mais les essais suivants ont conduit à estimer une vitesse trois fois plus importante soit un facteur de 24 [91], c'est-à-dire qu'un échantillon passant un an dans la chambre de dégradation subit une dégradation équivalente à celle d'un échantillon exposé sur site pendant 24 ans.

Cet essai semble relativement bien adapté pour tester des échantillons de matériaux cimentaires. Le fait d'utiliser différents types de microorganismes, de l'H₂S et de ne pas remettre en place les échantillons après analyse à une échéance donnée permet de se

⁴ CALCOAT® : ciment à base d'aluminates de calcium spécialement conçu pour une utilisation dans les réseaux d'assainissement.

⁵ SEWPERCOAT® : mortier sec prêt-à-l'emploi conçu spécifiquement pour la protection des infrastructures d'assainissement exposés à la corrosion acide d'origine biogénique.

rapprocher au maximum des conditions rencontrées dans les réseaux d'assainissement. Les microorganismes ont été choisis d'après la succession de colonisation rencontrée dans les réseaux d'Hambourg. Le biotope recréé est donc le plus proche possible, quoique simplifié, de celui établi dans les réseaux d'assainissement.

I-4.3. Les essais *in situ*

Les essais *in situ* permettent de mieux comprendre les mécanismes effectifs dans les réseaux d'assainissement mais aussi de comparer les résultats obtenus en laboratoire dans des chambres d'altération avec ce qui se passe réellement sur site.

Comme la mise au point d'une chambre d'altération recréant les conditions rencontrées dans les réseaux d'assainissement est difficile, il a été décidé par un ensemble de chercheurs de l'université de Le Cap (Afrique du Sud) d'utiliser un véritable réseau dans lequel différents types et compositions de matériaux cimentaires sont exposés [41, 102]. La construction d'une ligne expérimentale a permis de mieux gérer les expériences entreprises car le débit d'eau usée peut être transféré vers une ligne de dérivation et les échantillons régulièrement inspectés (Figure I-31). Ce projet s'est déroulé suivant plusieurs phases durant lesquelles, des échantillons cylindriques de petites tailles ont été exposés mais également pour les phases plus récentes des portions de canalisation. Actuellement, ce projet en est à la phase 4, c'est-à-dire l'exposition de portions de canalisation qui ont été préalablement divisée en trois pour permettre le retrait d'échantillon au cours du temps.

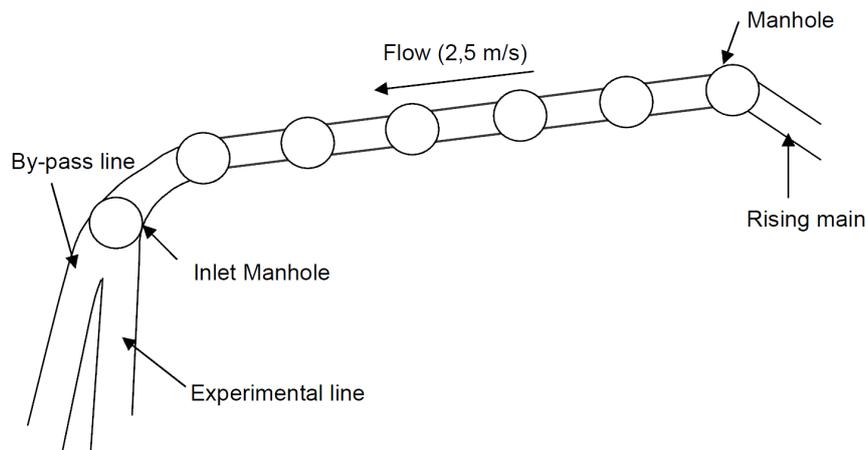


Figure I-31 : Schéma du réseau de Virginia montrant le réseau gravitationnel alimentant la section expérimentale 600 mètres plus bas que le poste de relevage [41].

Le lieu choisi est idéal pour étudier la corrosion du béton induite par les microorganismes car la concentration en H_2S est toujours supérieure à 70 ppm en hiver et à 140 ppm en été. Les éprouvettes de bétons, en forme de demi-cylindre, sont fixées directement sur la paroi de la canalisation juste au dessus de l'effluent dans une zone de turbulence. Les échantillons sont inspectés environ 5 mois après leur mise en place. Avant retrait, le pH en surface est mesuré puis les échantillons sont brossés pour retirer les parties dégradées. Après approximativement 4 mois de séchage à l'air, les échantillons sont pesés et photographiés.

Ce projet conclut que les matériaux à base de ciment alumineux sont les plus résistants, que les granulats dolomitiques sont sensiblement plus efficaces dans ce type d'environnement corrosif que les granulats siliceux et enfin, que les biocides introduits dans les matériaux cimentaires n'ont pas d'effet.

Des chercheurs de l'université d'Hokkaido (Japon) [103, 104] ont également travaillé sur les problèmes de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement. Pour cela, soixante échantillons de mortiers (40x18x8 mm) ont été exposés dans un réseau à trente centimètres au dessus du niveau de l'effluent. Les échantillons ont été récupérés de manière régulière pendant six mois puis au bout d'un an. La coupure de six mois correspond à une période de travaux durant laquelle le site d'observation n'était pas accessible.

Les produits de corrosion formés sur les échantillons collectés dans le réseau d'assainissement ont ensuite été grattés sur l'ensemble de la surface et mis en solution dans de l'eau distillée stérile. Les produits de dégradation, composés principalement de gypse, se dissolvent facilement dans l'eau et peuvent être analysés d'un point de vue chimique et bactériologique (ARNr 16S).

Il ressort des déterminations que l'exposition des échantillons à l'environnement agressif des réseaux d'assainissement a conduit à la formation d'une couche épaisse de gypse, de l'ordre du centimètre. Le pH de surface des échantillons initialement de 12 est descendu et s'est stabilisé en une centaine de jours à 1,6.

Les analyses FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) ont permis de suivre la colonisation bactérienne à la surface des échantillons au cours du temps. Ces analyses montrent que la colonisation du mortier a débuté au bout de 80 jours et qu'une succession de bactéries s'est mise en place. Au bout d'un an, il n'est retrouvé qu'*A. thiooxidans*.

L'élaboration d'un profil de la répartition de la population bactérienne dans le mortier détérioré a été effectuée sur un échantillon exposé pendant un an (Figure I-32). Ce profil montre que l'activité d'*A. thiooxidans* est principalement retrouvée en surface de la couche de détérioration du mortier, sur 1,5 mm. Les auteurs estiment que ceci est du à la faible pénétration de l'oxygène et de l'hydrogène sulfuré dans la couche de gypse. Ils proposent que l'acide sulfurique soit produit uniquement en surface puis éventuellement qu'il attaque le béton sain sous-jacent. D'autres bactéries ont été retrouvées dans les premiers 1,5 mm de la couche d'altération mais elles représentent une part mineure de la population présente sur l'échantillon (environ 10%).

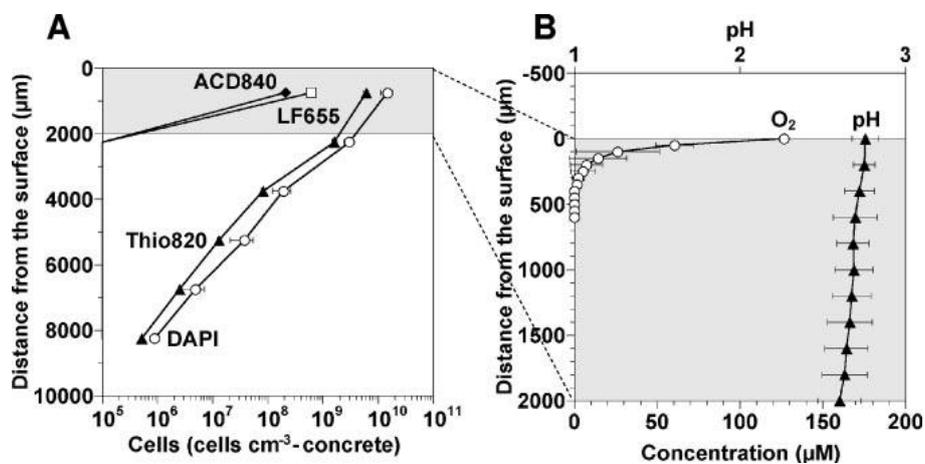


Figure I-32 : Profils en profondeur effectués sur la couche gypseuse d'un béton exposé un an. A : Dénombrement de la totalité des cellules présentes (DAPI), d'*A. thiooxidans* (Thio820), d'*Acidiphilum* (ACD840) et de *Leptospirillum* (LF655). B : Profils d'oxygène et de pH dans les 2000 premiers micromètres de la couche d'altération [103].

Les chercheurs de l'université de Sydney (Australie) s'intéressent également aux détériorations des matériaux rencontrés dans les réseaux d'assainissement [105]. Leur projet a pour but d'identifier et d'établir des relations entre les paramètres des réseaux d'assainissement qui déterminent la durabilité de différents revêtements sacrificiels. Cette étude doit également permettre d'examiner l'impact, sur la durabilité des revêtements, de produits métaboliques tels que les acides carboxyliques générés par l'activité fongique. Des échantillons ont été exposés dans les réseaux australiens et une chambre d'essai a été construite pour l'étude en laboratoire de ces mêmes paramètres.

Les connaissances scientifiques générées par ce projet vont permettre de mettre en place des recommandations pour formuler des revêtements plus durables en considérant l'agressivité des réseaux d'assainissement.

D'autres études ont été menées sur différents sites d'exposition, consistant pour la plupart en un suivi des matériaux nouvellement installés sur des périodes allant de 1 à 18 ans. Les résultats rassemblés dans le Tableau I-9 montrent que quelles que soient les conditions de température et de concentration d' H_2S , les matériaux cimentaires à base de ciment alumineux sont plus résistants que ceux à base de ciment Portland.

Tableau I-9 : Comparaison d'études de terrain sur différents matériaux cimentaires (CAC : Calcium Aluminate Cement ; OPC : Ordinary Portland Cement).

Lieu	Application	Granulats	Durée de l'expérience (an)	Taux de corrosion (mm an ⁻¹)		T (°C)	[H ₂ S] (ppm)	Référence
				CAC	OPC			
Melbourne (Australie)	Epreuve	Siliceux	18	-	1,3	-	5-40	[106]
		Calcaire			0,8			
Shiman (Japon)	Canalisation	Siliceux	12	-	4,5	10-30	5-400	[23, 107, 108]
Virginia (Afrique du Sud)	Epreuve	Siliceux	14	2,5	7,5	0-30	-	[109, 110]
		Calcaire		-	3,9			
Jubail (Arabie Saoudite)	Station de relevage	Siliceux	2	Trop lent	-	14-42	-	[111]
		ALAG®						
Virginia (USA)	Trou d'homme	ALAG®	13	0,9	10,8	-	20-100	[17]
Floride (USA)	Chambre de collecte	ALAG®	10	Trop lent	5-20	-	25-100	[17]
	Dessableur	ALAG®	5	Trop lent	2,7	-		[18]
Corpus Christi (USA)	Canalisation	ALAG®	1	Trop lent	-	-	70	[19]

I- Conclusion

Les réseaux d'assainissement sont des structures ayant pour but le transport et le traitement des eaux usées chargées en agents agressifs ou corrosifs susceptibles de détériorer les matériaux constitutifs de ces structures, en particulier les matériaux cimentaires. La biodétérioration est la cause d'environ 10% des dégradations et conduit à une perte des propriétés mécaniques du matériau pouvant aller jusqu'à l'effondrement de la structure. La nécessité de construire, réparer ou réhabiliter les réseaux d'assainissement est devenue une problématique majeure de notre siècle. Pour obtenir des structures durables, il est nécessaire de prendre en compte les paramètres bio-physico-chimiques de ces environnements particuliers et d'intervenir en amont de la construction en sélectionnant des matériaux qui répondent au mieux à ces contraintes.

Pour cela, la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de biodétérioration est primordiale. Ce processus peut être scindé en deux phases représentées, d'une part, par la production d'hydrogène sulfuré et, d'autre part, par son utilisation par les microorganismes avec formation d'acide sulfurique biogénique à la surface des matériaux cimentaires. Les travaux des différents auteurs montrent que la deuxième phase du processus peut elle-même être divisée en trois étapes avec dans un premier temps une diminution abiotique du pH de surface des matériaux cimentaires de 12-13 à des valeurs proches de 9 causée par la carbonatation et par l'impact direct de l'hydrogène sulfuré. La deuxième étape est marquée par une succession de colonisations de la surface des matériaux cimentaires par des microorganismes neutrophiles sulfo-oxydantes (*Thiobacillus thioparus*, *Starkeya novella*, *Halothiobacillus neapolitanus* et *Thiomonas intermedia*) réduisant le pH de surface jusqu'à des valeurs voisines de 4-5. Ces deux premières étapes se déroulent sans détérioration notable du matériau. La dernière étape est la colonisation par des microorganismes acidophiles (*Acidithiobacillus thiooxidans*) qui ont un impact différent suivant le type de ciment et la nature des granulats utilisés dans la formulation du matériau cimentaire. Par exemple avec les ciments Portland, le pH va continuer à baisser et atteindre des valeurs proches de 1 entraînant une destruction rapide du matériau alors que pour les matériaux formulés à partir de ciments alumineux, le pH se stabilisera aux alentours de 3-4.

Certains mécanismes complexes ont pu être mis en évidence grâce à de nombreux travaux et essais accélérés qui se veulent proches des conditions réelles. Cependant, les essais simplifiés ne rendent pas toujours réellement compte des phénomènes impliqués et ne donnent pas nécessairement d'informations détaillées pour chacune des étapes. Les essais chimiques sont certes faciles à mettre en œuvre et rapides mais ne prennent pas en compte par définition l'implication biologique rendant certains résultats erronés par rapport aux observations *in situ*. Les essais biochimiques sont plus adaptés mais plus difficiles à mettre en place car il y a une intervention du vivant. De manière générale, la plupart de ces essais ne prend en compte que la dernière étape du processus de biodétérioration en s'affranchissant de toute la succession bactérienne antérieure. Enfin, les essais sur site ont l'avantage de bien représenter les mécanismes mais, d'une part, ne sont pas accélérés donc très longs et, d'autre part, peuvent être biaisés par des conditions locales particulières. Il y a donc une nécessité de mettre au point un essai simplifié qui soit rapide et qui donne une information juste pour choisir les matériaux les plus adaptés aux environnements riches en hydrogène sulfuré. L'essai accéléré qui apparaît à ce jour le plus convenable est celui mis au point par l'université de Hambourg avec un environnement parfaitement homogène et contrôlé (H_2S , T, HR, ...) et une succession bactérienne certes limitée mais très représentative.

Malgré les imperfections que nous venons d'évoquer, la plupart de ces essais révèlent toutefois bien la différence de résistance qui existe entre les matériaux cimentaires élaborés à partir de ciment alumineux et ceux élaborés à partir de ciment Portland. Néanmoins, les causes de cette différence ne sont pas définitivement arrêtées. Les hypothèses avancées sont actuellement de trois types : le ciment alumineux possède une capacité de neutralisation plus importante que le ciment Portland, le gel d'AH₃ formé durant l'attaque acide ferait office de barrière tamponnée, et enfin l'aluminium aurait un effet bactériostatique ou bactériolytique.

Cette étude bibliographique révèle la complexité des mécanismes réactionnels conduisant à la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement. Cette complexité résulte à la fois du rôle des bactéries dans ces mécanismes et des propriétés intrinsèques à chaque matériau cimentaire. Il convient donc de définir un test de vieillissement accéléré prenant en compte ces différents aspects. Cette nécessité s'inscrit dans le cadre actuel de réhabilitation des anciens réseaux d'assainissement et de construction de nouvelles structures. La définition des conditions expérimentales de ce test de vieillissement accéléré doit toutefois être subordonnée à une amélioration des connaissances des mécanismes bio-physico-chimiques prenant place à chacune des étapes du processus de biodétérioration des matériaux cimentaires. L'étude proposée dans le cadre de ce travail vise donc dans un premier temps à appréhender de manière parfaitement maîtrisée ces différentes étapes afin de proposer un test de vieillissement accéléré optimisé. La deuxième partie de l'étude a pour objectif d'analyser les résultats de ce test de vieillissement accéléré appliqué à plusieurs formulations cimentaires et de les confronter aux observations faites *in situ*.

I- Références bibliographiques

- [1] LERM (2009) dossier technique, les égouts romains, entretien avec Alain BOUET, newsletter n°9, octobre 2009.
- [2] Clément, A., Thomas, G. (2001) Atlas du Paris souterrain : la doublure de la Ville lumière. Paris : Parigramme, 2001. 193 p. ISBN 2-84096-191-1.
- [3] Le Gauffre, P., Joannis, C., Breyse, D., Gibello, C., Desmulliez, J.J. (2005) Gestion patrimoniale des réseaux d'assainissement urbains : Guide méthodologique. Paris : TEC & Doc, 2005. 416 p. ISBN 2-7430-0748-6.
- [4] Satin, M., Selmi, B. Guide technique de l'assainissement : Moniteur référence technique. Paris : Editions du moniteur, 2010. 660 p. ISBN 2-281-11239-X.
- [5] Organisation Mondiale de la Santé en partenariat avec l'UNICEF (2008) L'assainissement menace la santé publique – communiqué de presse, 2008.
- [6] Organisation Mondiale de la Santé – service des cartes – Proportion of population using improved sanitation facilities (%), 2006 – 2009.
- [7] Fitz-Feugeas, F., Pinard Legry, G. (2006) VIII^e Forum de Biodétérioration des Matériaux. *Matériaux et Techniques*, Hors Série 94, 431.
- [8] Ranalli, G., Zanardini, E., Sorlini, C. (2009) Biodeterioration – Including Cultural Heritage – Encyclopedia of Microbiology, Editor : Moselio Schaechter, pp. 191-205, Oxford : Elsevier.
- [9] Jorand, F. (2009) Structures et fonctions de la cellule bactérienne : les enveloppes. Ecole thématique CNRS, Microbiologie et physico-chimie des biofilms.
- [10] Beloin, C. (2009) Formation des biofilms chez *E. coli* : « les dessous de la vie sur les surfaces ». Ecole thématique CNRS, Microbiologie et physico-chimie des biofilms.
- [11] Kaempfer, W., Berndt, M. (1999) Estimation of service life of concrete pipes in sewer networks. *Durability of Building Materials and Components*, 8, 36-45.

- [12] CSTB-AGHTM (1989) Réhabilitation des réseaux d'assainissement. Synthèse des résultats de l'enquête menée en 1989, Commission « Assainissement » de l'AGHTM, Groupe de travail « Réhabilitation », 7 p. octobre 1989
- [13] RERAU (2004) Restructuration des collecteurs visitables : Guide technique Tome 2. Paris : Lavoisier. 250 p. ISBN : 2-7430-0583-1
- [14] De Muynck, W., De Belie, N., Verstraete, W. (2009) Effectiveness of admixtures, surface treatments and antimicrobial compounds against biogenic sulfuric acid corrosion of concrete. *Cement & Concrete Composites*, 31, 163-170.
- [15] Milde, K., Sand, W., Wolff, W., Bock, E. (1983) *Thiobacilli* of the Corroded Concrete Walls of the Hambourg Sewer System. *Journal of General Microbiology*, 129, 1327-1333.
- [16] FD P 18-011 "Béton – Définition et classification des environnements chimiquement agressifs – Recommandations pour la formulation des béton. Décembre 2009
- [17] LCA reference Sheet
<http://www.kerneosinc.com/pdfs/HRSD%20SewperCoat%20Reference%20R%2006-03.pdf>
- [18] LCA reference sheet 02/95
<http://www.kerneosinc.com/pdfs/ormondbeach.pdf>
- [19] LCA reference sheet 04/95
<http://www.kerneosinc.com/pdfs/Trunk%20Line%20page.pdf>
- [20] Olmstead, W.M., Hamlin, H. (1900) Converting portions of the Los Angeles outfall sewer into a septic tank. *Engineering News*, 44, 317-138.
- [21] United States Environmental Protection Agency (1991) Hydrogen sulphide corrosion in wastewater collection and treatment systems. Technical Report, 430/09-91-010.
- [22] Morton, R.L., Yanko, W.A., Grahom, D.W., Arnold, R.G. (1991) Relationship between metal concentrations and crown corrosion in Los Angeles County sewers. *Research Journal of Water Pollution Control Federation*, 63, 789-798.
- [23] Mori, T., Nonaka, T., Tazaki, K., Koga, M., Hikosaka, Y., Noda, S. (1992) Interactions of nutrients, moisture, and pH on microbial corrosion of concrete sewer pipes. *Water Research*, 26, 29-37.
- [24] Ismail, N., Nonaka, T., Noda, S., Mori, T. (1993) Effect of carbonation on microbial corrosion of concrete. *Journal of Construction Management and Engineering*, 20, 133-138.
- [25] Davis, J.L. (1998) Characterization and modeling of microbially induced corrosion of concrete sewer pipes. Ph.D. Dissertation, University of Houston, Houston, TX.
- [26] Monteny, J., De Belie, N., Vincke, E., Verstraete, W., Taerwe, L. (2001) Chemical and microbiological tests to simulate sulfuric acid corrosion of polymer-modified concrete. *Cement and Concrete Research*, 31, 1359-1365.
- [27] Vincke, E., Van Wanseele, E., Monteny, J., Beeldens, A., De Belie, N., Taerwe, L., Van Gemert, D., Verstraete, W. (2002) Influence of polymer addition on biogenic sulfuric acid attack. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 49, 283-292.
- [28] Pomeroy, R.D., Boon, A.G. (1990) The problem of hydrogen sulphide in sewers. Westminster, Acer John Taylor.
- [29] CEOCOR European committee for the study of Corrosion and Protection of Pipes – Réseaux et ouvrages publics d'assainissement, Altération et corrosion, Prévention et protection – février 2007
- [30] United States Environmental Protection Agency (1974) Process Design Manual for Sulfide Control in Sanitary Sewerage systems.
- [31] United States Environmental Protection Agency (1985) Design Manual, Odor and Corrosion Control in Sanitary Sewerage Systems and Treatment Plants.
- [32] Thistlethwayte, D.K.B., Goleb, E.E. (1972) The composition of sewer air. *Advances in Water Pollution Research*, proceedings of the Sixth International Conference, Jerusalem. Pergamon press, Oxford, Great Britain, 281-288.

- [33] Matos, J.S., Aires, C.M. (1995) Mathematical modelling of sulphides and hydrogen sulphide gas build-up in the Costa do Estoril sewerage system. *Water Science Technology*, 31, 255-261.
- [34] Pomeroy, R.D., Bowlus, F.D. (1946) Progress Report on Sulfide Control Research. *Sewage Works Journal*, 18, 597-640.
- [35] Peck, H.D. Jr. (1993) Bioenergetics strategies of the sulphate-reducing bacteria, In: "The sulphate-reducing bacteria: contemporary perspectives, Brook / Springer Series in contemporary bioscience" (Odom J.M., Singleton R. Jr, eds.), Springer Verlag, New York, pp. 41-76.
- [36] Le Gall, J., Fauque, G. (1988) Dissimilatory reduction of sulfur compounds. In: "Biology of anaerobic microorganisms" (Zehnder A.J.B., eds.), John Wiley, New York, pp. 587-639.
- [37] Cypionka, H. (1995) Solute transport and cell energetics. In: "Biotechnology Handbooks, Volume 8, Sulfate-reducing bacteria" (Barton L.L., eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 151-184.
- [38] Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H., Watanabe, Y. (1999) Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 5107-5116.
- [39] Thistlethwayte, D.K.B. (1972) The control of sulphides in sewerage systems. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
- [40] Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2003) Microbiologie. Livre edition De Boek. ISBN-10 : 2804142566, ISBN-13 : 978-2804142568, 1137 pages.
- [41] Alexander, M.G., Goyns, A., Fourie, C. (2008) Experiences with a full-scale experimental sewer made with CAC and other cementitious binders in Virginia, South Africa – Calcium Aluminate Cement : Proceedings of the Centenary Conference, Avignon, 30 June – 2 July 2008. Fentiman CH, Mangabhai RJ and Scrivener KL. (editors). IHS BRE Press, 2008, EP94. ISBN 978-1-84806-045-6.
- [42] Boon, A.G., Lister, A.R. (1975) Formation of sulphide in rising main sewers and its prevention by injection of oxygen. *Progress in Water Technology*, 7, 289-300.
- [43] Pomeroy, R.D., Parkhurst, J.D. (1977) The forecasting of sulfide buildup rates in sewers. *Progress Water Technology*, 9, 621–628.
- [44] Zhang, L., De Stryver, P., De Gussemé, B., De Muynck, W., Boon, N., Verstraete, W. (2008) Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review. *Water Research*, 42, 1-12.
- [45] Raj Sharma, K., Yuan, Z., De Haas, D., Hamilton, G., Corrie, S., Keller, J. (2008) Dynamics and dynamic modelling of H₂S production in sewer systems. *Water Research*, 42, 2527-2538.
- [46] Sadowski, A.G. (2005) Synthèse sur l'hydrogène sulfuré et son traitement – rapport interne du laboratoire ENGEES.
- [47] Heukelelelian, H. (1943) Effect of the addition of sodium nitrate to sewage on hydrogen sulphide production and BOD reduction. *Sewage Works*, 15, 255-261.
- [48] Poduska, R.A., Anderson, B.D. (1981) Successful storage lagoon odor control. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 53, 299-310.
- [49] Firer, D., Friedler, E., Lahav, O. (2008) Control of sulphide in sewer systems by dosage of iron salts: Comparison between theoretical and experimental results, and practical implications. *Science of the Total Environment*, 392, 145-156.
- [50] United States Environmental Protection Agency (1992) Detection, control, and correction of hydrogen sulfide corrosion in existing wastewater system. Office of wastewater enforcement and compliance, Washington, DC, 20460.
- [51] Nielson, A.H., Vollertsen, J., Hvitved-Jacobson, T. (2005) Kinetics and stoichiometry of sulfide oxidation by sewer biofilms. *Environmental Water Research*, 39, 4119-4125.

- [52] Vollertsen, J., Nielsen, A.H., Jensen, H.S., Wium- Andersen, T, Hvitved-Jacobsen, T (2008) Corrosion of concrete sewers - The kinetics of hydrogen sulfide oxidation. *Science of Total Environment*, 394, 162-170.
- [53] Yasyerli, S., Dogu, G., Ar, I., Dogu, T. (2004) Dynamic analysis of removal and selective oxidation of H₂S to elemental sulfur over Cu-V and Cu-V-Mo mixed oxides in a fixed bed reactor. *Chemical Engineering Science*, 59, 4001-4009.
- [54] Steudel, R. (1996) Mechanism for the Formation of Elemental Sulfur from Aqueous Sulfide in Chemical and Microbiological Desulfurization Process. *Industrial Engineering Chemical Research*, 35, 1417-1423.
- [55] Parker, C.D. (1947) Species of sulphur bacteria associated with the corrosion of concrete. *Nature*, 159, 439-440.
- [56] Starkey, R.L. (1935) Products of the oxidation of thiosulfate by bacteria in mineral media. *Journal of General Physiology*, 18, 325-349.
- [57] Islander, R.L., Devanny, J.S., Mansfeld, F., Postyn, A., Shih, H. (1991) Microbial ecology of crown corrosion in sewers. *Journal of Environmental Engineering*, 117, 751-770.
- [58] Suzuki, I. (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 97-105.
- [59] Rohwerder, T., Sand, W. (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium spp.*. *Microbiology*, 149, 1699-1709.
- [60] Chahal, B.S. (1986) A further study on the purification of the sulfur-oxidising enzyme from *Thiobacillus thiooxidans* – M.Sc. Thesis, University of Manitoba, Winnipeg.
- [61] Suzuki, I. (1965) Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 110, 97-101.
- [62] Rohwerder, T., Sand, W. (2007) Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering Life Science*, 7, 301-309.
- [63] Oprime, M.E.A.G., Garcia, O., Cardoso, A.A. (2001) Oxidation of H₂S in acid solution by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Process Biochemistry*, 37, 111-114.
- [64] Prieur, D. (2008) Les endosymbioses trophiques et leur rôle dans l'évolution passée et contemporaine des Eucaryotes – Ecole thématique du CNRS organisée à la station biologique de Roscoff du 20 au 23 octobre 2008
<http://www.sb-roscoff.fr/ETSymbioses2008/pdf/Presentations/6.1.Prieur-FS.ppt.pdf>
- [65] Process Design Manual for Sulfide Control in Sanitary Sewerage Systems (1974) United States Environmental Protection Agency, Technology Transfer Office: Washington, DC, 1974: EPA-625/1-74-005.
- [66] Wilmot, P.D., Cadee, K. Katinic, J.J., Kavanagh, B.V.J. (1988) Kinetics of sulfide oxidation by dissolved oxygen. *Water Pollution Control Federation*, 60, 1264-1270.
- [67] Kotronarou, A., Hoffmann, M.R. (1991) Catalytic autoxidation of hydrogen sulfide in wastewater. *Environmental Science & Technology*, 25, 1153-1160.
- [68] Jolley, R.A., Forster, C.F. (1985) The kinetics of sulphide oxidation. *Environmental Technology Letters*, 6, 1-10.
- [69] Aviam, O., Bar-Nes, G., Zeiri, Y., Sivan, A. (2004) Accelerated biodegradation of cement by sulfur-oxidizing bacteria as a bioassay for evaluating immobilisation of low level radioactive waste. *Applied and Environmental Microbiology*, 6031-6036.
- [70] Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H (2007) Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 971-980.

- [71] Roberts, D.J., Nica, D., Zuo, G., Davis, J.L. (2002) Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, 227-234.
- [72] Chaussadent, T. (1999) Etat des lieux et réflexions sur la carbonatation du béton armé – Etude et Recherche du LCPC, OA29, Edité par le LCPC, p. 80.
- [73] Scrivener, K.L., Capmas, A. (1999) Calcium Aluminate Cements. In: Lea's chemistry of cement and concrete, Fourth Edition. Editor: Peter C. Hewlett, Copublished in North, Central and South America by John Wiley & Sons Inc., New York, Toronto.
- [74] Robertson, L., Kuenen, G. (2006) The Genus *Thiobacillus*. *Prokaryotes*, 5, 812-827.
- [75] Kelly, D., Wood, A. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 511-516.
- [76] Waksman, S.A., Joffe, J.S. (1921) Acid production by a new sulfur-oxidizing bacterium. *Science*, 53, 216.
- [77] Cho, K.S., Mori, T. (1995) A newly isolated fungus participates in the corrosion of concrete sewer pipes. *Water Science Technology*, 31, 263-271.
- [78] Gu, J.D., Ford, T.E., Berke, N.S., Mitchell, R. (1998) Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 101-109.
- [79] De Belie, N., Monteny, J., Beeldens, A., Vincke, E., Van Gemert, D., Verstraete, W. (2004) Experimental research and prediction of the effect of chemical and biogenic sulfuric acid on different types of commercially produced concrete sewer pipes. *Cement and Concrete Research*, 34, 2223-2236.
- [80] Lamberet, S., Guinot, D., Lempereur, E., Talley, J., Alt, C. (2008) Field investigations of high performance calcium aluminate mortar for wastewater applications – Calcium aluminate Cements, proceedings of the centenary Conference, Avignon, 30 June – 2 July 2008. Fentiman CH, Mangabhai RJ and Scrivener KL. (editors). IHS BRE Press, 2008, EP94. ISBN 978-1-84806-045-6.
- [81] SewperCoat®, Brochure publicitaire (2009) Kerneos.
- [82] Haile, T., Nakhla, G. (2008) A novel coating for protection of concrete sewers from biological sulfuric acid attack. *Geomicrobiology Journal*, 25, 322-331.
- [83] Haile, T., Nakhla, G., Allouche, E., Vaidya, S. (2010) Evaluation of the bactericidal characteristics of nano-copper oxide or functionalized zeolite coating for bio-corrosion control in concrete sewer pipes. *Corrosion Science*, 52, 45-53.
- [84] Padival, N.A., Weiss, J.S., Arnold, R.G. (1995) Control of *Thiobacillus* by means of microbial competition: Implications for corrosion of concrete sewers. *Water Environment Research*, 67, 201-205.
- [85] Lee, L.H., Lustigman, B., Chu, I.Y., Jou, H.L. (1991) Effect of aluminium and pH on the growth of *Anacystis nidulans*. *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology*, 46, 720-726.
- [86] Wood, M., Coope, J.E. (1988) Acidity, aluminium and multiplication of *Rhizobium trifolii*: effects of initial inoculum density and growth phase. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 20, 83-87.
- [87] Munns, D.N., Keyser, H.N. (1981) Response of *Rhizobium* strains to acid and aluminium stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 13, 115-118.
- [88] Exley, C., Birchall, J.D. (1992) The cellular toxicity of aluminium. *Journal of Theoretical Biology*, 159, 83-98.
- [89] Karlik, S.J., Eichhorn, G.L., Lewis, P.N., Crapper, D.R. (1980) Interaction of aluminum species with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 19, 5991-5998.

- [90] Roy, D.M., Arjunan, P., Silsbee, M.R. (2001) Effect of silica fume, metakaolin, and low-calcium fly ash on chemical resistance of concrete. *Cement and Concrete Research*, 31, 1809-1813.
- [91] Ehrich, S., Helard, L., Letourneaux, R., Willocq, J., Bock, E. (1999) Biogenic and Chemical Sulfuric Acid Corrosion of mortars. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 11, 340-344.
- [92] Monteny, J., Vincke, E., Beeldens, A., De Belie, N., Taerwe, L., Van Gemert, D., Verstraete, W. (2000) Chemical, microbiological, and in situ test methods for biogenic sulphuric acid corrosion of concrete. *Cement and Concrete Research*, 30, 623-634.
- [93] Roux, S., Feugeas, F., Cornet, A. (2005) Biodégradation des bétons : analyse des bétons et mortiers en contact avec une eau douce naturelle. *Matériaux & Techniques*, 93, 123-135, Hors Série.
- [94] Roux, S. (2008) Evaluation des risques de biodégradation des bétons en contact avec une eau douce naturelle. Thèse, Docteur de l'Université Louis Pasteur – Starsbourg I Discipline : Sciences pour l'ingénieur soutenue le 21 mai 2008.
- [95] Hormann, K., Hofmann, F., Schmidt, M. (1997) Stability of concrete against biogenic sulfuric acid corrosion, a new method for determination – Proceedings of the 10th International Congress on the Chemistry of Cement, Gothenberg, 4vi038.
- [96] Schmidt, M., Hormann, K., Hofmann, F.J., Wagner, E. (1997) Concrete with greater resistance to acid and to corrosion by biogenous sulfuric acid. *Concrete Precasting Plant and Technology*, 4, 64-70.
- [97] Vincke, E., Verstichel, S., Monteny, J., Verstraete, W. (1999) A new test procedure for biogenic sulfuric acid corrosion of concrete. *Biodegradation*, 10, 421-428.
- [98] Sand, W., Dumas, T., Marcdargent, S. (1992) Tests for biogenic sulfuric acid corrosion in a simulation chamber confirm the on site performance of calcium aluminate based concretes in sewage applications. International Symposium on Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) Testing – USA, Miami, Florida.
- [99] Milde, K., Sand, W., Wolff, W., Bock, E. (1983) *Thiobacilli* of the corroded concrete walls of the Hambourg sewer system. *Journal of General Microbiology*, 129, 1327-1333.
- [100] Sand, W., Dumas, T., Marcdargent, S. (1994) Accelerated biogenic sulfuric-acid corrosion test for evaluating the performance of calcium-aluminate based concrete in sewage applications – Microbiologically influenced corrosion testing, ASTM STP 1232, Jeffrey R. Kearns and Brenda J. Little, Eds., American Society for Testing and materials, Philadelphia, 234-249.
- [101] Ehrich, S. (1998) *Untersuchungen zur biogenen Schwefelsäurekorrosion von zementgebundenen Baustoffen*, PhD dissertation.
- [102] Fourie, C.W. (2002) Biologically induced sulphuric acid attack on concrete samples in the experimental sewer section at Virginia. Department of Civil Engineering, University of Cape Town 18 novembre 2002.
- [103] Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H. (2007) Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 971-980.
- [104] Satoh, H., Odagiri, M., Ito, T., Okabe, S. (2009) Microbial community structures and in situ sulfate-reducing and sulfur-oxidizing activities in biofilms developed on mortar specimens in a corroded sewer system. *Water Research*, 43, 4729-4739.
- [105] <http://www.awmc.uq.edu.au/index.html?page=84398&pid=0>
- [106] CSR Humes (1997) Pipeline Materials in H₂S, 1977 Werribee Pipeline – Information Series of CSR Humes, NPD0101.

- [107] Mori, T., Koga, M., Nonaka, T., Mishina, F., Sakai, Y., Koizumi, J. (1991) Microbial corrosion of concrete sewer pipes, H₂S production from sediments and determination of corrosion rate. *Water Science and Technology*, 23, 1275-1282.
- [108] Tazaki, K., Mori, T., Nonaka, T. (1992) Microbial jarosite and gypsum from corrosion of Portland cement concrete. *Canadian Mineralogist*, 30, 431-444.
- [109] Goyns, A. (2001) Calcium aluminate cement linings for cost-effective sewers. International Conference on CAC, Edinburgh, 617-631.
- [110] Goyns, A. (2003) Virginia sewer rehabilitation, Progress report n° 1 – PIPES, 21.
- [111] Saricimen, H., Shameem, M., Barry, M.S., Ibrahim, M., Abbasi, T.A. (2003) Durability of proprietary cementitious materials for use in wastewater transport systems. *Cement and Concrete Composites*, 25, 7.

Chapitre II

MATERIAUX, MATERIELS ET METHODES

II- Introduction

L'étude bibliographique a permis de mettre en évidence que certains matériaux cimentaires pouvaient être fortement détériorés dans les réseaux d'assainissement à cause de l'intervention de microorganismes. Les mécanismes conduisant à ce type de détérioration sont assez bien connus dans le cas de matériaux cimentaires à base de ciment Portland mais restent mal compris pour ceux à base de ciment d'aluminate de calcium qui se comportent généralement mieux.

Ce chapitre se propose de présenter les matériaux cimentaires choisis dans le cadre de ce travail de recherche ainsi que les souches bactériennes sélectionnées pour recréer les conditions de biodétérioration rencontrées dans les ouvrages d'eaux usées. La méthodologie expérimentale est ensuite expliquée succinctement. Enfin, les méthodes analytiques utilisées pour le suivi des mortiers et de la biomasse sont présentées dans la dernière section de ce chapitre.

II-1. Choix des matériaux cimentaires

D'après l'étude bibliographique, les matériaux cimentaires représentent la grande majorité des matériaux employés dans les ouvrages d'assainissement puisqu'on dénombre 45% de béton. A ce pourcentage, il faut ajouter toutes les parties qui sont recouvertes d'un revêtement cimentaire pour protéger le matériau sous-jacent (cas des canalisations en fonte) et les revêtements cimentaires employés lors de la réhabilitation ou de la rénovation de structures plus anciennes (pierre, brique,...).

Les matériaux cimentaires sont représentés par trois groupes : les pâtes de ciment (ciment et eau), les mortiers (ciment, sable et eau) et les bétons (ciment, sable, granulats et eau). Les pâtes de ciment ne sont pas employées dans les réseaux d'assainissement au contraire des deux autres systèmes cimentaires. Le béton, à cause des granulats de grande taille, présente de trop grandes disparités pour permettre une véritable comparaison entre les échantillons. Le choix de cette étude s'est donc porté sur les mortiers qui ont l'avantage de permettre l'étude du comportement lié à la fois à la matrice de ciment et aux granulats de petite taille.

Le ciment d'aluminate de calcium est utilisé dans cette étude compte tenu de sa bonne tenue dans les réseaux d'assainissement. Les retours terrain indiquent qu'il est moins impacté par les phénomènes de biodétérioration que les matériaux à base de ciment Portland [1-6]. Le fait qu'il soit conseillé par la norme FD P18-011 de décembre 2009 de l'employer dans les travaux en milieu fortement et très fortement agressif ($\text{pH} < 4$) est une raison supplémentaire. Le ciment Portland de type CEM I est le ciment le plus utilisé et à ce titre, le mieux connu. Il semble donc indispensable de l'utiliser comme référence pour les comparaisons avec les autres types de ciment.

Le ciment Portland de type CEM III est un mélange de ciment CEM I et de laitier de haut fourneau (36 à 95% suivant la catégorie). Il est conseillé dans le cas de travaux souterrains en milieux agressifs, comme les eaux usées. Sa résistance aux milieux acides tiendrait du fait qu'il possède moins de chaux et serait donc moins réactif qu'un ciment CEM I face à une attaque acide. Son étude permettra de savoir s'il est bien résistant dans les réseaux d'assainissement.

En ce qui concerne les granulats, il a été décidé d'utiliser du sable normalisé AFNOR pour une partie des échantillons de mortier. Ce sable étant normalisé, il possède une variabilité granulométrique faible ce qui assure une comparaison facilitée des résultats entre les échantillons pour des ciments différents.

Un granulats de synthèse alumino-calcique (ALAG®) a également été utilisé. Ce type de granulats a la même composition minéralogique que le ciment d'aluminate de calcium et permet ainsi d'obtenir une matrice homogène, répondant de manière uniforme aux phénomènes de biodétérioration.

Les rapports eau sur ciment (E/C) et sable sur ciment (S/C) utilisés pour fabriquer les mortiers sont respectivement de 0,37 et de 1,44. Ces rapports sont les mêmes que ceux employés par Saint-Gobain, un fabricant de canalisation adaptée aux réseaux d'assainissement. Le choix de tels rapports permet ainsi de rester proche de la réalité industrielle.

A partir de ces différents choix, cinq formulations de mortier ont été définies (Tableau II-1). Les compositions des ciments et du laitier sont données dans le Tableau II-2.

Tableau II-1 : Descriptif des formulations cimentaires utilisées pour cette étude.

	Type de ciment	Ajout	Type de granulats	Appellation
Echantillon 1	Portland	-	Sable AFNOR	CEM I
Echantillon 2		Laitier de haut fourneau (75%)		CEM III
Echantillon 3	Ciment d'aluminate de calcium*	-		CAC + S
Echantillon 4		Laitier de haut fourneau (75%)		CAC + L
Echantillon 5		-	ALAG®	CAC + A

* CALCOAT® RG

Tableau II-2 : Composition des ciments et du laitier. Valeurs en pourcentage massique (ND : Non Défini).

	Portland	CAC	Laitier
Al ₂ O ₃	5,07	51,87	12,2
CaO	63,93	37,06	41,5
SiO ₂	20,87	5,31	34,5
Fe ₂ O ₃	3,31	2,25	0,4
MgO	0,83	0,54	8,2
MnO	ND	ND	0,4
TiO ₂	0,24	2,19	0,9
SO ₃	3,39	0,15	0,1
K ₂ O	1,01	0,31	0,5
Na ₂ O	0,20	0,05	0,4
P ₂ O ₅	0,94	0,19	ND
Sulfures	ND	ND	1,1
Perte au feu	0,94	ND	ND
Résidu insoluble	0,26	ND	ND

Pour cette étude, deux types d'échantillon ont été préparés. Les premiers sont des cubes de mortier de deux centimètres de côté utilisés pour les études de laboratoire. Les seconds sont des cylindres de mortier avec un manche en plastique (PVC) utilisés pour les essais sur site.

Les cubes sont obtenus à partir de parallélépipèdes de mortier de 2x2x16 cm qui sont coupés en sept morceaux de deux centimètres environ (Figure II-1). Les extrémités des parallélépipèdes sont éliminées pour avoir des échantillons qui soient tous identiques. Tous les échantillons présentent donc trois faces moulées, deux faces sciées et une face gâchée. Après durcissement de 48 h, ils sont stockés en atmosphère ambiante pour permettre la carbonatation naturelle qui facilitera la colonisation des bactéries.

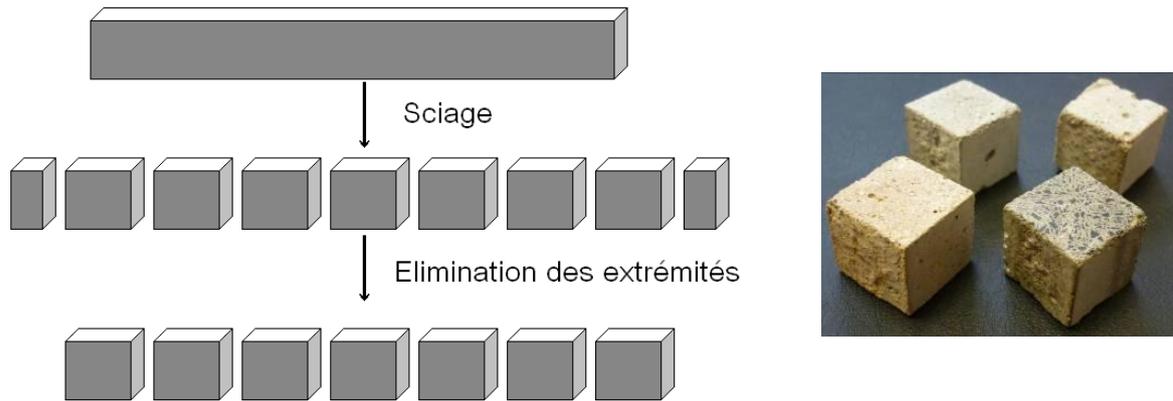


Figure II-1: Schéma de l'obtention des échantillons cubique à partir d'une barre 2x2x16 cm.

Les cylindres sont réalisés en deux temps. Tout d'abord, le manche en plastique d'une longueur de 16 cm et de 1,5 cm de diamètre est coupé à une de ses extrémités sous forme de croix sur 1,5 cm. Cette partie est ensuite recourbée afin d'éviter un retrait du manche lors des études (Figure II-2). La partie cimentaire est un cylindre de 6 cm de diamètre et de 14 cm de haut. La tige de plastique est introduite dans le mortier encore frais. Une fois le mortier durci, le manche est gravé pour permettre son identification même après vieillissement et un trou de petite taille est pratiqué dans le manche pour permettre de suspendre l'échantillon lors des expositions dans les réseaux d'assainissement.

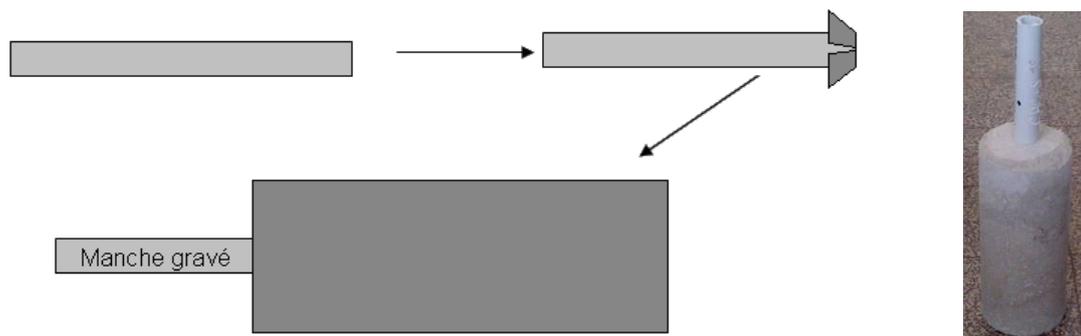


Figure II-2 : Schéma de la réalisation d'un échantillon cylindrique.

Les échantillons initiaux ont été caractérisés en laboratoire par différentes techniques pour connaître leur état avant détérioration (voir annexe c).

II-2. Souches bactériennes

En 1945, Parker [7] a identifié pour la première fois l'implication de bactéries dans les processus de détérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement. Il isole *Acidithiobacillus thiooxidans* qu'il nomme alors *Thiobacillus concretivorus* à cause de sa capacité à entraîner la détérioration du béton. Il met également en évidence l'implication d'autres bactéries qu'il classe en deux groupes : celui se rapprochant de *Thiobacillus thioparus* et un groupe « divers ».

Plus tard, d'autres bactéries du genre *Thiobacillus* ont également été identifiés pour leur implication dans le processus de biodétérioration, il s'agit de *Thiobacillus thioparus* [8],

Starkeya novella (anciennement *Thiobacillus novellus*) [9], *Halothiobacillus neapolitanus* (anciennement *Thiobacillus neapolitanus*) [9] et *Thiomonas intermedia* (anciennement *Thiobacillus intermedius*) [9, 10].

Okabe *et al.* [11] ont mis en évidence par des techniques de biologie moléculaire basées sur le séquençage de l'ARNr 16S, la succession de colonisation, impliquant six phylotypes qui sont : *Thiothrix*, *Thiomonas*, *Thiobacillus*, *Halothiobacillus*, *Acidiphilium* et *Acidithiobacillus*.

Les moisissures, ou microchampignons, ont parfois un rôle dans le processus de biodétérioration des matériaux cimentaires [12, 13] mais ils ont été moins étudiés dans la littérature et ne sont donc pas clairement identifiés. Dans l'optique de mettre au point un essai accéléré qui se veut proche des conditions réelles, il a été décidé de s'affranchir de l'impact des microchampignons puisqu'ils ne sont pas retrouvés sur l'ensemble des sites touchés par le processus de biodétérioration [13].

Comme la succession de microorganismes cultivables impliqués dans le processus de biodétérioration est connue et qu'elle suit l'ordre suivant : *Thiobacillus thioparus*, *Starkeya novella*, *Thiomonas intermedia*, *Halothiobacillus neapolitanus* et *Acidithiobacillus thiooxidans*, il a été choisi de prendre l'ensemble de ces bactéries sans *Thiobacillus thioparus* car sa gamme de croissance est très similaire à celle de *Starkeya novella* (Figure II-3).

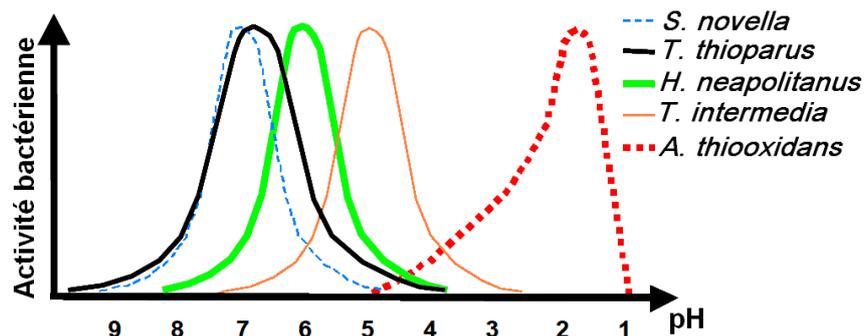


Figure II-3 : Succesion de colonisation retrouvée sur du béton biodétérioré d'après [14].

II-2.1. Choix des bactéries

Les bactéries ont été fournies par la société allemande DSMZ GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Collection allemande de microorganismes et cultures cellulaires) qui est le centre de ressources biologiques européen le plus complet. Cette entreprise propose un large choix d'espèces bactériennes et de souches bactériennes pour une même espèce. Ainsi, différents critères ont été utilisés pour sélectionner les bactéries utilisées pour cette étude.

Il n'y a pas eu de choix à faire dans le cas de *Starkeya novella* et de *Thiomonas intermedia* car DSMZ ne proposait qu'une souche de ces bactéries (Tableau II-3 et Tableau II-4).

Tableau II-3 : Informations fournies par DSMZ sur *Starkeya novella*.

Nom	<i>Starkeya novella</i>
Synonymes	<i>Thiobacillus novellus</i>
Numéro DSMZ	506
Isolée depuis	Sol
Température optimale de croissance	26–30°C

Tableau II-4 : Informations fournies par DSMZ sur *Thiomonas intermedia*.

Nom	<i>Thiomonas intermedia</i>
Synonymes	<i>Thiobacillus intermedius</i>
Numéro DSMZ	18155
Isolée depuis	Eau douce
Température optimale de croissance	30°C

Au contraire, trois variétés d'*Halothiobacillus neapolitanus* sont proposées (Tableau II-5). Le choix de la souche 15147, isolée à partir d'un béton biodétérioré dans un réseau d'assainissement, a été fait car le support de croissance de départ est identique à ceux de notre étude. Les bactéries sont donc adaptées pour croître sur du béton.

Tableau II-5 : Informations fournies par DSMZ sur *Halothiobacillus neapolitanus*.

Nom	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>		
Synonymes	<i>Thiobacillus neapolitanus</i>		
Numéro DSMZ	581	15147	16832
Isolée depuis	Canal	Béton biodégradé en réseau d'assainissement	Puits de soufre
Température optimale de croissance	30°C	25°C	30°C

Le choix de la souche d'*Acidithiobacillus thiooxidans* a été plus difficile. En effet, DSMZ propose cinq souches différentes qui ont des conditions de croissance très variées (Tableau II-6). Pour cette étude, le choix s'est porté sur la souche 14887 car ces bactéries ont été isolées à partir d'un milieu minéral.

Tableau II-6 : Informations fournies par DSMZ sur *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Nom	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>				
Synonymes	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>				
Numéro DSMZ	504	622	9463	11478	14887
Isolée depuis	-	Etang	Réacteur de biolixiviation	Eau de drainage de minier	Argile Kimmeridge
Température optimale de croissance	26°C	28-30°C	28°C	30°C	25°C

II-2.2. Milieux de culture

Chaque bactérie a un milieu de culture qui lui est propre. Ce milieu liquide contient l'ensemble des éléments indispensables à la croissance et au développement des bactéries. Il a été mis au point pour assurer une croissance optimale de celles-ci et est proposé par DSMZ.

De nouveaux milieux de culture sont ajoutés tous les 15 jours dans les incubateurs pour permettre aux bactéries de conserver suffisamment de nutriments pour pouvoir se développer.

Pour éviter toute contamination et préalablement à leur emploi, une stérilisation des milieux de culture est réalisée au moyen d'un autoclave à 125°C pendant 15 min.

Starkeya novella :

Pour ce milieu de culture, les différentes solutions sont stérilisées séparément (Tableau II-7). Une fois l'ensemble des solutions revenu à température ambiante, elles sont mélangées pour atteindre un volume final d'un litre. Le pH doit être ajusté à 8,5 avec une solution à 0,5 N de NaOH stérile. La composition de la solution C correspondant à la solution d'éléments traces est indiquée à la fin de cette partie (Tableau II-11).

Tableau II-7 : Milieu de culture de *Starkeya novella*.

Solution A :	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	10,60 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
NH ₄ Cl	0,30 g
Extrait de levure	0,30 g
Rouge phénol	2,00 g
Eau distillée	900,00 mL
Solution B :	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,10 g
Eau distillée	50,00 mL
Solution C :	
Solution éléments traces	5,00 mL
Solution D :	
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	5,00 g
Eau distillée	50,00 mL
pH du milieu : 8,5	

Thiomonas intermedia :

Ce milieu de culture (Tableau II-8) est ajusté à un pH compris entre 5,5 et 6,0 puis il est autoclavé. Le thiosulfate de sodium est stérilisé séparément et ajouté à la solution une fois à température ambiante.

Tableau II-8 : Milieu de culture de *Thiomonas intermedia*.

NH ₄ Cl	0,1 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	5,0 g
Extrait de levure	1,0 g
Eau distillée	1000,0 mL
pH du milieu : 5,5 – 6,0	

Halothiobacillus neapolitanus :

Ce milieu de culture (Tableau II-9) est ajusté à un pH compris entre 6,6 et 7,0 puis il est autoclavé. Le thiosulfate de sodium est stérilisé séparément dans 100 mL d'eau distillée et ajouté à la solution une fois à température ambiante.

Tableau II-9 : Milieu de culture d'*Halothiobacillus neapolitanus*.

KH ₂ PO ₄	4,0 g
K ₂ HPO ₄	4,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 g
NH ₄ Cl	0,4 g
Solution d'éléments traces	5,0 mL
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	10,0 g
Pourpre de bromocrésol	0,5 mL
Eau distillée	1000,0 mL
pH du milieu : 6,6 – 7,0	

Acidithiobacillus thiooxidans :

Ce milieu de culture (Tableau II-10) est préparé sans thiosulfate. Le pH est ajusté entre 4,4 et 4,7 puis autoclavé. Le thiosulfate stérile est ajouté froid au milieu de culture.

Tableau II-10 : Milieu de culture d'*Acidithiobacillus thiooxidans*.

KH ₂ PO ₄	3,00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,25 g
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	5,00 g
Eau distillée	1000,00 mL
pH du milieu : 4,4 – 4,7	

Solution éléments traces :

Cette solution (Tableau II-11) entre dans la composition de deux des milieux de culture et permet d'apporter aux bactéries les éléments traces nécessaires à leur croissance. Elle est réalisée en mélangeant différents sels puis en ajustant le pH à 6,0.

Tableau II-11 : Solution d'éléments traces.

Na ₂ -EDTA	50,00	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,00	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5,54	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,06	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,00	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,10	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57	g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61	g
Eau distillée	1000,00	mL
pH du milieu : 6,0		

II-2.3. Matériel

Les bactéries sont cultivées dans des incubateurs d'une capacité de 7 litres (Figure II-4) équipés d'un système à double paroi permettant la régulation en température par une circulation d'eau thermostatée par un bain-marie à 30°C. Ces incubateurs sont entreposés sous une hotte à flux laminaire pour conserver un environnement stérile et donc s'affranchir de toute contamination. Les milieux de cultures contenus dans les incubateurs sont homogénéisés au moyen d'agitateurs magnétiques.



Figure II-4 : Développement des différentes souches bactériennes dans leur milieu de culture.

Une mesure du pH est réalisée tous les 15 jours pour contrôler la croissance des différentes souches bactériennes.

II-3. Méthodologie expérimentale

II-3.1. Essais *in situ*

Pour étudier la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement, il est nécessaire de garder un lien étroit avec les phénomènes réels en passant par des expositions sur site. Deux campagnes d'exposition ont été menées, la première en France et la seconde aux Emirats Arabe Unis.

La campagne d'exposition française se porte sur deux sites d'études présentant des potentiels de détérioration différents. Sur ces sites, un suivi des paramètres environnementaux (température, humidité relative, concentration en hydrogène sulfuré) est assuré par des analyseurs en continu. A chaque échéance, soit tous les quatre mois, un suivi des échantillons est effectué en termes d'aspect visuel, de masse et de pH de surface. La colonisation microbienne est également surveillée et estimée par des techniques de biologie moléculaire.

La deuxième campagne d'exposition, mise en place aux Emirats Arabe Unis, représente un site avec une très forte concentration d'hydrogène sulfuré, soit un fort potentiel de biodétérioration. Pour cette campagne, le suivi des échantillons se limite à l'étude des mortiers (aspects visuels, évolution de la masse et du pH de surface).

Les caractéristiques plus complètes de ces trois sites sont présentées dans le chapitre III : Essais sur site.

II-3.2. Réacteurs

D'après la littérature, le processus de biodétérioration des matériaux peut être expliqué par une succession de quatre étapes : l'oxydation abiotique de l' H_2S en soufre élémentaire à la surface du matériau, l'implication de microorganismes qui vont utiliser les molécules soufrées présentes en surface du matériau et les oxyder en acide sulfurique, la diffusion de cet acide à travers une couche de produits de détérioration et enfin l'attaque acide du matériau sain.

L'étude des mécanismes de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement doit donc passer par des expériences en atmosphère contrôlée pour étudier chaque étape individuellement. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des réacteurs spécifiques de petite taille permettant de travailler sous H_2S dans des conditions de sécurité suffisantes.

Les essais de laboratoire sont présentés dans le chapitre IV : Etude des mécanismes de biodétérioration.

II-3.3. Enceinte de biodétérioration

L'étude de chaque étape du processus permet de mettre en évidence les éléments déterminants et discriminant vis-à-vis des matériaux cimentaires pour pouvoir développer et mettre au point un essai accéléré en laboratoire recréant les conditions rencontrées dans les réseaux d'assainissement. L'utilisation d'une enceinte de grand volume est donc importante pour mettre à l'épreuve différents matériaux cimentaires et pour pouvoir comparer leur durabilité dans des conditions identiques de biodétérioration.

Cette enceinte se doit d'être la plus simple possible et apporter des résultats répétables pour pouvoir envisager, dans un avenir plus ou moins lointain, une normalisation de cet essai. A terme, cet essai devrait pouvoir permettre de tester n'importe quel type de matériau en vue d'une utilisation dans les réseaux d'assainissement. Le développement de cet essai doit donc répondre à un certain nombre de questions, tel que la source de soufre employée, le type de bactéries apportées, la manière d'ensemencer les échantillons avec ces bactéries, les paramètres bio-physico-chimiques à suivre,... qui sont traitées dans le chapitre V : Mise au point d'un essai accéléré.

II-4. Méthodes analytiques

II-4.1. Etude des mortiers

L'ensemble des techniques analytiques utilisées pour cette étude sont couramment employées pour l'étude de la durabilité des matériaux cimentaires.

II-4.1.1. Diffraction des rayons X

La diffractométrie de rayons X (DRX) est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X par la matière. Cette technique d'analyse permet d'identifier, par comparaison avec des spectres de références, les phases cristallines d'une poudre ou d'un solide.

Les analyses diffractométriques sont effectuées sur le diffractomètre PHILIPS PW 1830 avec le rayonnement K_{α} du cobalt et au moyen d'un compteur proportionnel. Elles sont enregistrées entre 4 et 70 ° / 2 θ sur les échantillons séchés et broyés à 80 microns.

Chaque diagramme obtenu est traité par informatique sur une station de travail SUN à l'aide d'un ensemble de logiciels réalisés sous GKS à l'Ifsttar à partir des programmes de GOEHNER et GARBAUSKAS et en utilisant la base de données JCPDS :

- Lissage sur 11 points,
- Calcul et suppression du fond continu,
- Indexation des raies et normalisation des intensités,
- Recherche des phases possibles,
- Interprétation du diagramme par comparaison avec les phases possibles.

II-4.1.2. Analyses thermiques

Le terme analyses thermiques désigne un ensemble de techniques permettant la mesure de caractéristiques d'un matériau en fonction de la montée en température.

Deux types d'analyses thermiques sont utilisés pour ce travail. La première est l'analyse thermogravimétrique (ATD) qui consiste en la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. L'interprétation des résultats est facilitée par la courbe dérivée (DTG) qui permet de distinguer les différentes étapes des pertes enregistrées par la courbe ATG.

La seconde est l'analyse thermique différentielle (ATD) qui consiste à suivre l'évolution de la différence de température entre l'échantillon étudié et un corps témoin inerte, c'est-à-dire dépourvu d'effets thermiques dans le domaine de température étudié. Elle permet la mesure des enthalpies des diverses réactions tout au long du chauffage dans le milieu réactionnel.

Les analyses thermiques ont été effectuées avec un analyseur thermique simultané NETZSCH STA 409E avec les conditions opératoires suivantes :

- prise d'essai de l'ordre de 160 mg placée dans un creuset en platine taré et calciné
- chauffage de 25 à 1130°C à 10°C min⁻¹ sous balayage d'air (80 mL min⁻¹)

La prise d'essai est placée dans un creuset en platine préalablement calciné et taré. La thermobalance est étalonnée sur tout le domaine de température compris entre 25 et 1250°C par analyse d'étalons certifiés afin de déterminer le coefficient de sensibilité qui permet de calculer les enthalpies directement en J g⁻¹.

II-4.1.3. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière sous faible vide. Cette technique d'observation a été développée pour observer des échantillons non conducteur et/ou contenant des phases plus ou moins hydratées.

Un microscope électronique à balayage se base sur deux modes d'observation. Le premier repose sur l'emploi d'un détecteur d'électrons secondaires qui permet d'obtenir une information sur la topographie de l'échantillon alors que le second dépend d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés qui apportent une information sur le contraste chimique du matériau.

Les clichés de microscopie électronique sont réalisés à partir d'un microscope électronique à balayage environnemental de type Quanta 400 de chez FEI. Les échantillons sont observés sous une pression de 47 Pascal, une tension de 25 kV et une distance de travail (WD) de 10 millimètres.

Les analyses chimiques élémentaires ont été effectuées grâce au système d'analyse EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) EDAX DX 4i par Oxford.

Les examens microscopiques ont été effectués d'une part à partir de fragments de béton imprégnés de résine et polis jusqu'au micromètre et d'autre part de cassure fraîche au marteau, afin de préserver l'apparence et l'agencement des minéraux constitutifs du matériau. Les échantillons de mortiers issus de la chambre de biodétérioration subissent un traitement complémentaire en vue d'observer le biofilm. Dans un premier temps, ils sont déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol successifs de 10 min (éthanol à 25%, 50%, 75% et 100%). Les échantillons sont ensuite séchés à l'air avant d'être métallisés à l'or puis observés en microscopie électronique à balayage.

II-4.1.4. Plasma à couplage inductif

Le plasma à couplage inductif ou ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*), est une technique de spectroscopie d'émission atomique permettant de doser dans une solution de nombreux éléments de la classification périodique. Les résultats sont généralement exprimés pour les matériaux cimentaires sous forme d'oxydes.

Un atome possède un grand nombre de niveaux d'énergie possibles. Une raie spectrale résulte de la transition électronique entre certains de ces niveaux. Lorsqu'un atome est excité, il quitte l'état fondamental pour passer à un niveau électronique supérieur mais cet état instable le pousse à rejoindre le niveau fondamental en réémettant un rayonnement sous forme d'énergie. Chaque atome émet un ensemble de raies spectrales à des longueurs d'ondes caractéristiques qui sont parfaitement connues et répertoriées dans des banques de données. De plus, l'intensité des rayonnements émis est proportionnelle à la quantité d'éléments à doser. Cette méthode permet donc de caractériser chaque élément qualitativement et quantitativement.

La torche à plasma est un spectromètre d'émission atomique basé sur l'excitation d'un plasma d'argon par une haute fréquence. Le plasma est un gaz partiellement ionisé, électriquement

neutre. A l'intérieur de celui-ci, les températures atteintes, de l'ordre de 5000 à 6000°C, permettent d'analyser une grande partie des éléments du tableau périodique.

L'appareil du laboratoire, modèle ULTIMA 2000 de la marque Jobin-Yvon est composé d'une pompe péristaltique, d'une chambre de nébulisation, d'une torche à plasma, d'un monochromateur Czemy-Tumer, d'un photomultiplicateur et d'un ordinateur. Ces principales caractéristiques optiques sont les suivantes :

- monochromateur Czemy-Tumer de 0,64 m de focale,
- réseau holographique haute luminosité de 4320 traits mm^{-1} ,
- surface du réseau : 80 x 100 mm,
- résolution pratique pour le réseau 4320 tr mm^{-1} : < 11 pm de 120 à 440 nm,
- 2 détecteurs "Haute dynamique" (HDD) sont utilisés pour optimiser la sensibilité dans l'UV et le visible,
- l'analyse de chaque élément est optimisée par le choix informatique de différentes largeurs de fentes d'entrée et de sortie (résolution variable).

L'échantillon préalablement mis en solution après attaque acide (HNO_3 au 1/50^{ème}) est introduit par un gaz d'argon dans le plasma sous forme d'aérosol. Il subit successivement une désolvatation, une atomisation, une ionisation et une excitation. Les particules excitées se dés excitent spontanément, en émettant un rayonnement électromagnétique qui sera analysé par le dispositif optique appelé réseau holographique puis traité par le système informatique. Pour obtenir des résultats fiables, il est nécessaire de préchauffer l'appareil, de réaliser une courbe d'étalonnage et de détecter la meilleure sensibilité possible.

II-4.1.5. Porosité accessible à l'eau

La porosité accessible à l'eau permet d'obtenir la porosité globale du matériau, c'est-à-dire le rapport entre le volume total des vides et le volume de l'échantillon testé. La porosité accessible à l'eau est un indicateur de durabilité du matériau (accès aux éléments délétères). Les mesures ont été effectuées selon la norme NF P18-459 de mars 2010 « Essai pour béton durci. Essais de porosité et de masse volumique » [15]. Cet essai repose sur des pesées de l'échantillon saturé d'eau ou sec dans l'air et dans l'eau. Elle est exprimée en pourcentage volumétrique selon l'équation suivante :

$$\varepsilon = \frac{M_{\text{air}} - M_{\text{sec}}}{M_{\text{air}} - M_{\text{eau}}} \times 100$$

Avec :

ε	La porosité accessible à l'eau	
M_{air}	La masse de l'échantillon imbibé d'eau dans l'air libre	g
M_{sec}	La masse de l'échantillon à l'état sec	g
M_{eau}	La masse apparente dans l'eau après immersion dans l'eau de l'échantillon imprégné à l'eau sous vide	g

La porosité des échantillons sains est indiquée dans le Tableau II-12.

Tableau II-12 : Valeurs de porosité (en %) des échantillons de mortier sains.

	CEM I	CEM III	CAC+S	CAC+L	CAC+A
Porosité (en %)	9,8	16,8	8,9	14,5	18,8

II-4.1.6. Surface spécifique BET et porosité BJH

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un analyseur de surface Micromeritics modèle ASAP 2010. La méthode repose sur le principe d'adsorption/désorption de gaz (azote) à la surface d'un échantillon. Elle permet de déterminer l'aire spécifique du solide (surface totale du produit accessible aux atomes ou aux molécules d'un adsorbat) et le volume poreux dans le domaine nanométrique à partir respectivement des modèles BET [16] et BJH [17].

Préalablement aux essais, les produits ont subi un dégazage lent pendant 3 jours à une température de 40°C jusqu'au vide (5 mbar), afin de désorber les substances étrangères physiquement adsorbées (H₂O, CO₂, ...)

La méthode BET permet d'obtenir la surface spécifique d'un matériau, c'est-à-dire la surface totale du mortier accessible à l'azote y compris celle correspondant aux pores de petits diamètres (quelques nm). Elle est issue du traitement théorique de l'hypothèse des multicouches établie par Brunauer, Emmett et Teller (BET).

Le résultat de ce traitement sur la courbe d'adsorption d'azote montre que le volume de gaz sorbé V sous une pression P est donné par la relation suivante :

$$\frac{P}{V(P^0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C - 1}{V_m C} \frac{P}{P^0}$$

Avec :

P	La pression	Pa
P°	La pression de vapeur saturante à la température T	Pa
V	Le volume réduit aux conditions standards	cm ³ g ⁻¹
V _m	La quantité, toujours dans les conditions standards de pression et de température, de gaz nécessaire pour recouvrir la totalité du solide d'une monocouche de gaz	cm ³ g ⁻¹
C	Une constante	

La valeur de l'aire surfacique est alors reliée au volume de gaz adsorbé sous forme d'une monocouche (V_m) et à l'aire d'encombrement d'une molécule d'adsorbat A_i. La surface spécifique est donnée par la formule :

$$S = \frac{V_m}{VM} \times N_A \times A_i$$

Avec :

N _A	6,02.10 ²³ (nombre d'Avogadro)	mol ⁻¹
S	Surface spécifique	m ² g ⁻¹
V _m	Volume de gaz adsorbé sous forme de monocouche	cm ³ g ⁻¹
VM	Volume molaire	cm ³ mol ⁻¹
A _i	0,162	nm ²

La méthode de Barrett, Joyner et Halenda ou BJH permet de calculer la distribution des tailles de mésopores d'un matériau. Ce calcul est basé sur l'analyse itérative de la courbe de désorption d'azote.

Les matériaux sains ont été caractérisés par ces techniques et les différentes valeurs de ces paramètres sont rassemblées dans le Tableau II-13.

Tableau II-13 : Valeurs des aires BET (en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) et du volume total adsorbé cumulé (en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) pour les différents échantillons sains.

	CEM I	CEM III	CAC+S	CAC+L	CAC+A
Aire BET (en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	3,9	4,2	2,2	2,6	2,2
Volume BJH (en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	0,017	0,019	0,010	0,012	0,009

II-4.2. Etude des biofilms

Dans le but de mieux comprendre l'intervention du vivant dans la biodétérioration des matériaux cimentaires, il est nécessaire de suivre différents paramètres : le nombre de bactéries qui se sont développées en surface des échantillons a été étudié grâce à un microscope à épifluorescence couplé à une coloration au DAPI, l'état physiologique des biofilm a été caractérisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence associé à un marquage au Dead/Live® ainsi que par des observations par microscopie électronique à balayage, l'activité de ces microorganismes a été estimée à partir de mesures d'ATP et de dosages des protéines issues des biofilms. Enfin, la biodiversité des échantillons exposés *in situ* a été étudiée au moyen du polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP).

II-4.2.1. Microscopie à épifluorescence

La microscopie à épifluorescence est une technique de microscopie qui consiste à observer des éléments fluorescents. Certains objets microscopiques présentent la propriété d'être naturellement fluorescents, c'est-à-dire de réémettre sur une bande de longueurs d'onde spécifiques l'énergie lumineuse reçue sur une certaine plage de longueurs d'onde plus courtes. D'autres objets ne sont pas fluorescents mais peuvent le devenir par ajout d'un composé chimique, appelé fluorochrome ou fluorophore. Dans ce cas, le fluorochrome doit être choisi de telle manière qu'il soit spécifique de l'objet à marquer.

Pour pouvoir observer un échantillon en épifluorescence, il est nécessaire de mettre en place un système de filtres séparés par un miroir. Cet ensemble appelé « cube » est schématisé par la Figure II-5. On peut voir que la lumière émise par la source passe dans un premier temps à travers un filtre d'excitation qui va sélectionner une longueur d'onde précise. La lumière sélectionnée va ensuite se réfléchir sur un miroir dichroïque pour atteindre l'échantillon par l'intermédiaire de l'objectif. L'échantillon va donc être excité et renvoyer de la fluorescence. Cette dernière va être captée par l'objectif, traversera le cube car le miroir dichroïque va la laisser passer. Le filtre d'arrêt ou filtre d'émission va sélectionner les longueurs d'onde recherchées provenant de l'échantillon. La fluorescence va donc atteindre les oculaires et être observée.

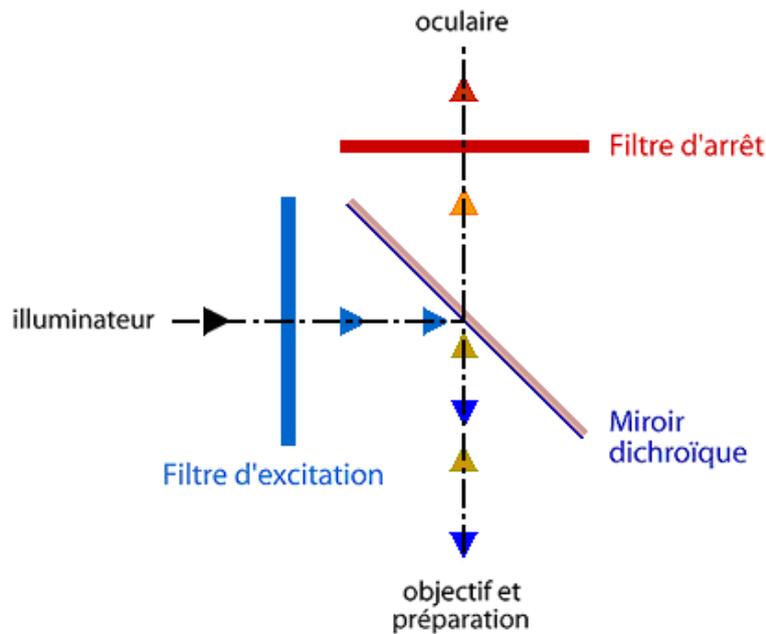


Figure II-5 : Schéma d'un « cube » pour illumination en épifluorescence.

Quand on cherche à observer du matériel vivant, différents fluorochromes peuvent être envisagés tels que le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), la GFP (*Green Fluorescent Protein*, protéine verte fluorescente) ou encore l'acridine orange. Nous avons choisi de travailler avec le DAPI (Figure II-6) car ce fluorochrome est très largement utilisé pour observer du matériel génétique dans des structures vivantes et préservées [18-20].

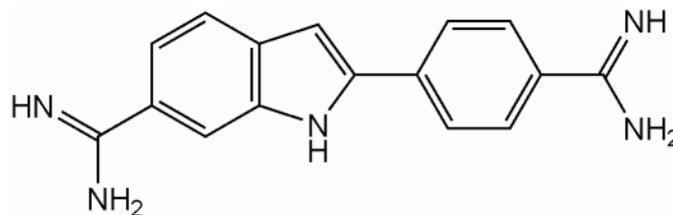


Figure II-6 : Molécule de DAPI.

Ce fluorochrome se lie fortement à l'ADN au niveau des bases adénosine – thymine, il absorbe la lumière ultra-violette et réémet une fluorescence bleue brillante (Figure II-7).

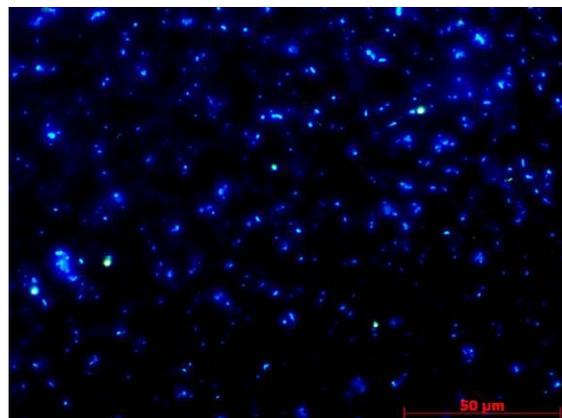


Figure II-7 : Exemple d'une suspension bactérienne colorée au DAPI.

Le marquage au DAPI est utilisé pour dénombrer les bactéries présentes en surface des échantillons de mortier après décrochage du biofilm. Pour cela, le biofilm est passé en solution au moyen d'ultrasons, fixé, coloré au DAPI, filtré sur une membrane en polycarbonate noire puis observé sous un microscope à épifluorescence. Un protocole détaillé est disponible en annexe d.

Pour mettre en évidence ces bactéries, nous utilisons un microscope à épifluorescence de marque Carl ZEISS Axio Scope A.1 avec un objectif x500, un filtre d'émission pour une longueur de 358 nm et un filtre d'excitation pour une longueur d'onde de 463 nm.

Nous avons également travaillé à partir d'un kit de coloration : le « Live/Dead BacLight® viability kit » qui permet de distinguer les cellules viables des cellules mortes en se basant sur l'intégrité membranaire, qui est selon Joux et Lebaron [21] et Grégori *et al.* [22] l'un des principaux critères de viabilité. Le kit est composé du SYTO-9 (vert) qui va colorer toutes les bactéries indépendamment de l'état de leur membrane et de l'iodure de propidium (rouge) qui va pénétrer uniquement dans les cellules dont les membranes sont abimées. Le SYTO-9 est excité à 480 nm et émet à 500 nm, l'iodure de propidium est excité à 490 nm et émet à 635 nm. Ce kit de coloration nous permet d'observer directement le biofilm formé à la surface des échantillons de mortier. Le protocole de coloration est détaillé en annexe e.

II-4.2.2. ATPmétrie

L'ATPmétrie est une technique de biologie moléculaire permettant de mesurer la quantité d'Adénosine TriPhosphate (ATP) présente dans un échantillon contenant des cellules vivantes.

Toutes les cellules vivantes produisent et consomment de l'ATP (Figure II-8). L'hydrolyse de cette molécule en Adénosine DiPhosphate (ADP) ou en Adénosine MonoPhosphate (AMP) fournit l'énergie nécessaire à l'ensemble des réactions chimiques au sein des cellules vivantes. L'ATP est considérée comme la molécule de stockage et de transport de l'énergie.

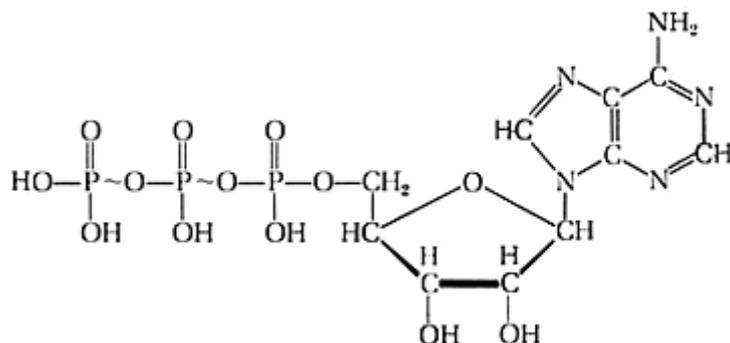


Figure II-8 : Molécule d'Adénosine TriPhosphate (ATP).

Le dosage de l'ATP permet d'estimer l'activité bactérienne si une estimation de la quantité de bactéries est faite en parallèle.

Une des méthodes de dosage de l'ATP repose sur les réactions de luminescence impliquant la luciférine. La luciférine est tout d'abord modifiée en présence d'ATP, puis oxydée sous le contrôle d'une enzyme, la luciférase, en oxyluciférine et émet une certaine quantité de photons. Les réactions sont présentées dans la Figure II-9.

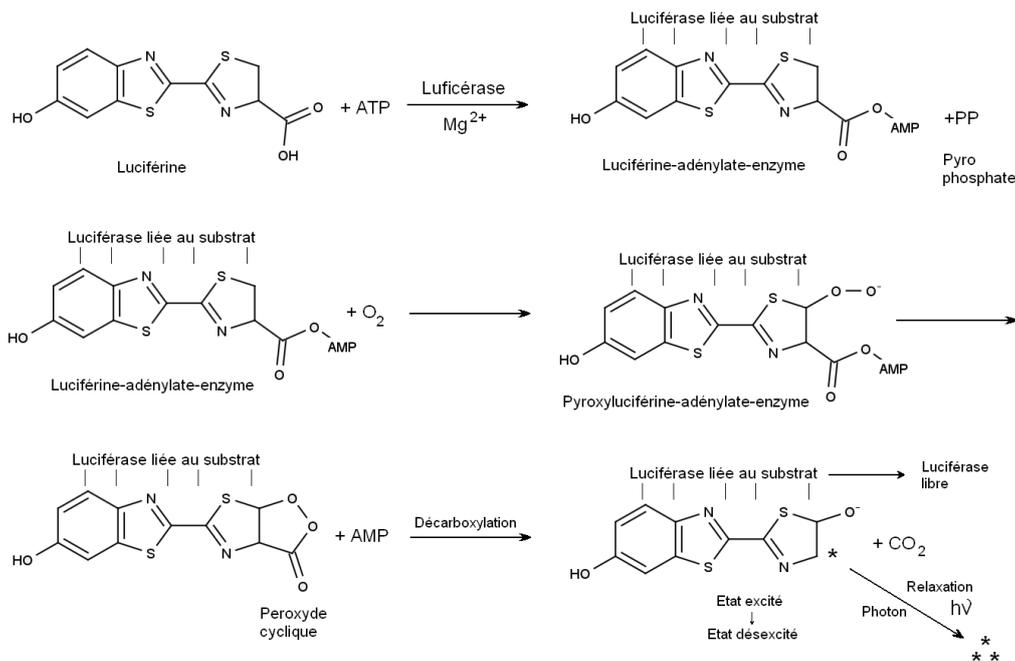


Figure II-9 : Réaction d'ATPmétrie.

Ces réactions conduisent en un complexe luminescent dont la quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans l'échantillon. Ainsi, plus il y aura d'ATP et plus la quantité de lumière émise sera importante. La valeur obtenue est exprimée en RLU (Relative Light Unit ou Unité relative de lumière).

Les mesures d'ATP ont été réalisées à l'aide d'un ATPmètre de marque Novalum[®] de chez Charm Sciences associé à des écouvillons WaterGiene[®].

Un protocole détaillé est disponible en annexe f.

II-4.2.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines permet d'estimer la quantité de protéines produite par une biomasse et donc d'en évaluer son importance à un instant précis. En effet, une biomasse qui se trouvera dans de bonnes conditions produira une grande quantité de protéines pour interagir avec son environnement alors que si cette même biomasse est en état de stress, elle sera moins productive.

Pour réaliser ce dosage, il est nécessaire dans un premier temps d'extraire les cellules du biofilm puis de les lyser et de doser les protéines extraites selon le protocole de Bradford utilisant de bleu de Coomassie G250 [23].

L'extraction des protéines est réalisée par sonication à 0°C du biofilm préalablement mis en solution au moyen d'un bain à ultrasons. La sonication est une technique basée sur l'émission d'ultrasons dans un liquide à partir d'une sonde en titane qui provoque une alternance de compressions / décompressions dans le liquide qui créent des microbulles. Elles disparaissent rapidement en engendrant des variations locales et importantes de pression allant jusqu'à 300 atmosphères. Ce phénomène est accompagné d'un échauffement localisé et très intense

pouvant atteindre 3 000 K. Ainsi, les ultrasons entraînent une lyse des cellules en solution. Cette technique emploie des ultrasons 300 fois plus puissants que ceux d'un bain à ultrasons.

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance du bleu de Coomassie après complexation avec des acides aminés aromatiques et des résidus hydrophobes d'acides aminés présents dans la ou les protéines étudiées. La forme liée du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes libres du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance, observé en spectroscopie UV étant proportionnel à la quantité de colorant lié, il est possible de remonter à la concentration en protéines dans l'échantillon en utilisant une gamme étalon.

Les spectres UV ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceau JASCO V-630 à une longueur d'onde de 594 nm et dont le trajet optique est fixé à 1 cm. Un protocole détaillé est disponible en annexe g.

II-4.2.4. Polymorphisme de conformation des simples brins

Le polymorphisme de conformation des simples brins ou SSCP (acronyme anglais de Single Strand Conformation Polymorphism) est une technique de biologie moléculaire permettant d'obtenir rapidement le panorama d'une communauté microbienne complexe sans identification préalable de chaque type de microorganismes (Figure II-10). Cette technique se base sur la migration différentielle par électrophorèse capillaire de fragments d'ADN générant une « empreinte » de la communauté microbienne. Il est ainsi possible d'obtenir une dynamique du biofilm ou de la communauté microbienne en comparant plusieurs échéances.

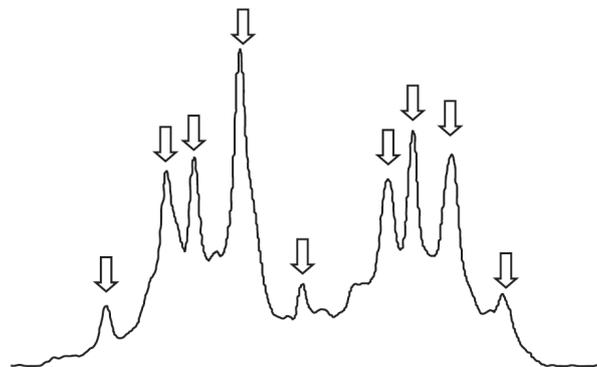


Figure II-10 : Profil de SSCP. Chaque flèche correspond à une espèce microbienne différente.

L'ADN a été extrait en utilisant un kit MP Biomedical de type « Fast DNA® SPIN Kit for Soil » qui permet d'extraire et de purifier le matériel génétique en provenance d'un échantillon issu d'un milieu environnemental (sol, matière fécale, eaux usées, boues). Ce kit présente l'avantage d'isoler en moins de trente minutes de l'ADN génomique pour une amplification par PCR (Réaction de polymérisation en chaîne).

Les échantillons de biomasse sont placés dans des tubes contenant une matrice de lyse, un mélange de particules de céramique et de silice conçu pour lyser efficacement toutes les cellules. L'homogénéisation a lieu en présence d'un tampon MT et d'un tampon de phosphate de sodium. Ces réactifs permettent l'extraction de l'ADN génomique avec un minimum de contamination par de l'ARN. A la fin de cette extraction, l'ADN peut directement être amplifié par PCR.

La réaction quantitative de polymérase en chaîne ou qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) est un type particulier de PCR. Une PCR étant une technique d'amplification d'ADN (ou d'ARN) *in vitro* qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence génétique choisie. Une PCR quantitative permet de mesurer la quantité initiale de matériel génétique utilisé pour l'amplification.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

- Une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent,
- Une hybridation ou fixation d'amorces aux extrémités de la séquence recherchée,
- Une élongation du brin d'ADN à partir de l'amorce par action de l'ADN polymérase.

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN désirée (Figure II-11). Les fragments d'intérêts comprennent uniquement les séquences d'ADN comprises entre les deux amorces.

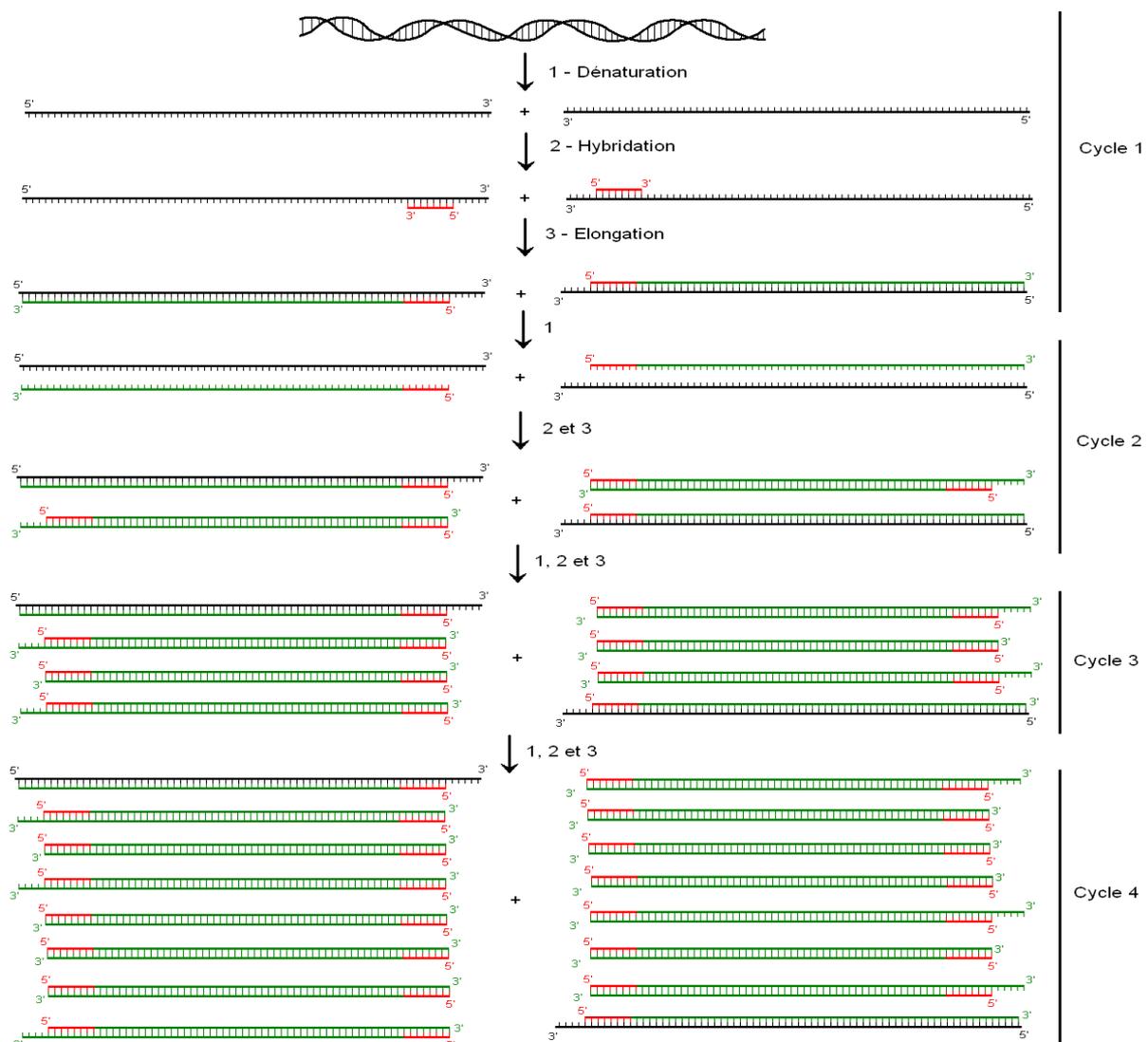


Figure II-11 : Schéma des quatre premiers cycles d'une PCR.

La SSCP est une technique d'électrophorèse basée sur la conformation secondaire repliée qu'adopte un fragment d'ADN simple brin en conditions non-dénaturantes (Figure II-12) et qui est dépendante de sa séquence. Pour cela, les fragments d'ADN amplifiés par PCR au moyen de sondes marquées par des fluorochromes sont dénaturés à 95°C, c'est-à-dire que les deux brins d'ADN vont se séparer. Le mélange obtenu est rapidement refroidi à 0°C, chaque brin d'ADN adopte alors une conformation tridimensionnelle unique et répétable qui dépend de la taille du brin d'ADN, de sa composition en bases azotées et de la succession de ces bases. Les simples brins d'ADN sont ensuite déposés à l'entrée d'un capillaire rempli d'un gel de migration puis un potentiel électrique est appliqué à chaque extrémité de celui-ci ce qui provoque la migration électrophorétique des simples brins. La forme et la taille de la conformation de chaque brin vont donc être à l'origine d'une migration différentielle à travers le maillage du gel. Un scanner associé à un laser va alors capter l'intensité de fluorescence sur toute la tête de lecture et produire un chromatogramme.

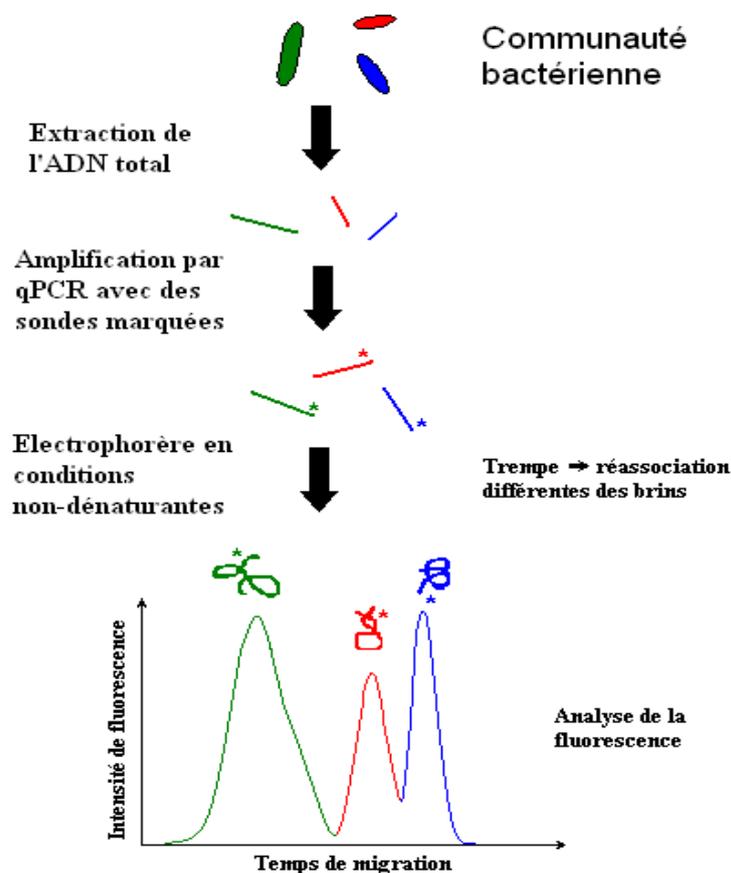


Figure II-12 : Principe de l'analyse SSCP.

Un protocole détaillé de cette technique analytique est disponible en annexe h.

II- Références bibliographiques

[1] LCA reference Sheet

<http://www.kerneosinc.com/pdfs/HRSD%20SewperCoat%20Reference%20R%202006-03.pdf>

[2] LCA reference sheet 02/95

<http://www.kerneosinc.com/pdfs/ormondbeach.pdf>

- [3] Alexander, M.G., Goyns, A., Fourie, C. (2008) Experiences with a full-scale experimental sewer made with CAC and other cementitious binders in Virginia, South Africa – Calcium Aluminate Cement : Proceedings of the Centenary Conference, Avignon, 30 June – 2 July 2008. Fentiman CH, Mangabhai RJ and Scrivener KL. (editors). IHS BRE Press, 2008, EP94. ISBN 978-1-84806-045-6.
- [4] Fourie, C.W. (2002) Biologically induced sulphuric acid attack on concrete samples in the experimental sewer section at Virginia. Department of Civil Engineering, University of Cape Town, 18 novembre 2002.
- [5] Goyns, A. (2001) Calcium aluminate cement linings for cost-effective sewers. International Conference on CAC, Edinburgh, 617-631.
- [6] Goyns, A. (2003) Virginia sewer rehabilitation, Progress report n° 1 – PIPES, 21.
- [7] Parker, C.D. (1947) Species of sulphur bacteria associated with the corrosion of concrete. *Nature*, 159, 439-440.
- [8] Gilchrist, F.M.C. (1953) Microbiological studies of the corrosion of concrete sewers by sulphuric acid producing bacteria. *The South African Industrial Chemist*, 11, 214-215.
- [9] Milde, K., Sand, W., Wolff, W., Bock, E. (1983) *Thiobacilli* of the corroded concrete walls of the Hambourg sewer system. *Journal of General Microbiology*, 129, 1327-1333.
- [10] Yoshida, N., Morinaga, T., Murooka, Y. (1993) Characterization and identification of bacterial strains isolated from corroded concrete in the accumulation stratum and their resistance levels to heavy metals. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76, 400-402.
- [11] Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H. (2007) Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (3), 971-980.
- [12] Cho, K.S., Mori, T. (1995) A newly isolated fungus participates in the corrosion of concrete sewer pipes. *Water Science Technology*, 31 (7), 263-271.
- [13] Gu, J.D., Ford, T.E., Berke, N.S., Mitchell, R. (1998) Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 101-109.
- [14] Lamberet, S., Guinot, D., Lempereur, E., Talley, J., Alt, C. (2008) Field investigations of high performance calcium aluminate mortar for wastewater applications – Calcium aluminate Cements, proceedings of the centenary Conference, Avignon, 30 June – 2 July 2008. Fentiman C.H., Mangabhai R.J. and Scrivener K.L. (editors). IHS BRE Press, 2008, EP94. ISBN 978-1-84806-045-6.
- [15] NF P18-459 de mars 2010 « Essai pour béton durci. Essais de porosité et de masse volumique ».
- [16] Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 309-319.
- [17] Barrett, E.P., Joyner, L.G., Halenda, P.P. (1951) The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, 73, 373-380.
- [18] Schallenberg, M., Kalf, J., Rasmussen, J.B. (1985) Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1214-1219.
- [19] Xu, Z., Pilch, D.S., Srinivasan, A.R., Olson, W.K., Geacintov, N.E., Breslauer, K.J. (1997) Modulation of nucleic acid structure by ligand binding: induction of a DNA-RNA-DNA hybrid triplex by DAPI intercalation. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 5, 1137-1147.
- [20] Wei, S., Sanchez, M., Trejo, D., Gillis, C. (2010) Microbial mediated deterioration of reinforced concrete structures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 748-754.
- [21] Joux, F., Lebaron, P. (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, 2, 1523-1535.

- [22] Grégori, G., Denis, M., Lefèvre, D., Romano, J.C. (2003) Viabilité des bactéries hétérotrophes dans la braie de Marseille. *C.R. Biologies*, 326, 739-750.
- [23] Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Chapitre III
ESSAIS SUR SITE

III- Introduction

Les essais sur site sont un moyen permettant de classer d'un point de vue durabilité différents types d'échantillons dans les mêmes conditions. De manière générale, ces essais sont utilisés par les chercheurs comme point de départ de recherches pour identifier les paramètres déterminants dans les phénomènes de biodétérioration ou par des industriels pour tester leurs produits.

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre I, différents groupes de recherches ont travaillé sur les problèmes générés par l'hydrogène sulfuré à travers des essais sur sites [1-16]. Les résultats de ces essais font ressortir des différences de comportement entre les différents matériaux cimentaires testés. Ainsi, il a été montré que les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium sont plus durables que ceux à base de ciment Portland (de trois à douze fois), que les granulats siliceux sont plus défavorables que les granulats réactifs à l'acide comme les granulats calcaires ou dolomitiques. L'impact des paramètres environnementaux tels que la concentration en H₂S, la température, l'humidité relative et l'activité bactérienne n'est toutefois pas toujours détaillé dans ces études alors que ce sont des points importants dans l'optique de définir les mécanismes de biodétérioration mis en jeu et de mettre au point un essai accéléré de biodétérioration qui soit en accord avec la réalité.

Dans le cadre de cette étude, il nous a donc semblé indispensable de réaliser des expositions d'échantillons *in situ* compte tenu que les mécanismes relatifs à la biodétérioration des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium sont encore mal connus. Cette étude doit permettre d'apporter des réponses complémentaires pour expliquer les différences de tenue décrites dans la littérature. Par ailleurs, certaines solutions, comme l'utilisation de matériaux cimentaires à base de laitier de hauts fourneaux susceptibles d'être moins réactifs vis-à-vis de l'acide sulfurique, seront aussi évaluées compte tenu des résultats contradictoires rencontrés dans la littérature [17-20].

Cette étude a pour but d'observer et de quantifier le comportement de cinq types de matériaux cimentaires en relation avec leur environnement et de faire ressortir les paramètres majeurs de la biodétérioration pour définir les essais à réaliser en laboratoire et mettre au point *in fine* un essai accéléré. Pour cela, les paramètres environnementaux sont suivis en continu et les échantillons sont caractérisés à différentes échéances d'un point de vue physique, chimique et biologique.

La campagne d'exposition porte sur trois sites dans lesquels ont été exposés les mêmes types d'échantillons, le but étant de comparer des sites ayant des potentiels d'émission d'H₂S très variables donc *a priori* des vitesses de biodétérioration des matériaux différentes.

III-1. Matériels et méthodes

III-1.1. Présentation des sites d'exposition

Trois réseaux d'assainissement ont été choisis pour cette étude, les deux premiers sont situés en France et le troisième aux Emirats Arabes Unis.

Le premier site est un poste de pompage référencé S1 (Figure III-1-A). Ce site est touché par des phénomènes de dégradation puisque le revêtement polymère qui avait été appliqué à la

surface du béton est détérioré (Figure III-1-B) et révèle un matériau cimentaire sous-jacent légèrement dégradé. Cependant le potentiel de production d' H_2S est faible car l'eau qui y transite est uniquement d'origine domestique. De plus, ce site recueille l'eau d'un faible nombre d'habitations.



Figure III-1 : Visuel de l'environnement direct (A) et de l'intérieur de S1 (B).

Le deuxième site est situé dans une zone industrielle en aval d'une station d'épuration et plus particulièrement dans une station de refoulement, il est référencé S2 (Figure III-2-A). Il a un potentiel de production d' H_2S plus important puisqu'il fait transiter des eaux provenant d'une zone industrielle ainsi que des eaux d'origines domestiques. Ce site présente une forte dégradation au niveau des parois de béton (Figure III-2-B). La matrice cimentaire n'a plus de propriétés cohésives et les granulats deviennent apparents. Dans certaines zones, une couche de gypse importante s'est formée.

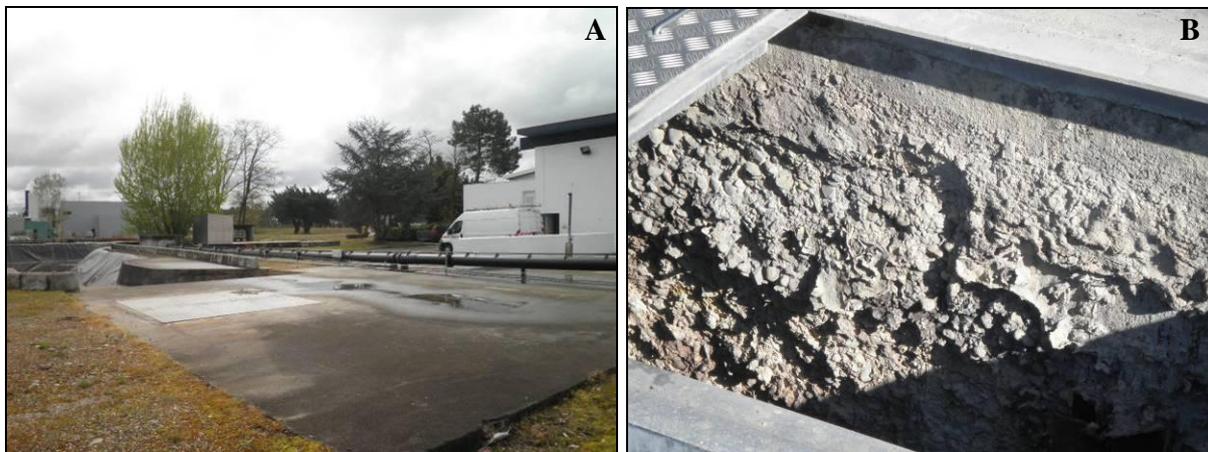


Figure III-2 : Visuel de l'environnement direct (A) et de l'intérieur de S2 (B).

Le troisième site localisé aux Emirats Arabes Unis est situé en centre ville, en amont d'une station d'épuration. Il est référencé S3 (Figure III-3). Il a un très fort potentiel d'émission d' H_2S puisque la température dans les réseaux y est toujours élevée et de l'ordre de $40^{\circ}C$. Des pics de production d' H_2S à 1000 ppm ont pu être mesurés avec une valeur de fond située aux alentours de 500 ppm. Les matériaux cimentaires utilisés pour la conception de ce site sont fortement détériorés.



Figure III-3 : Visuels de l'environnement direct de S3.

La campagne d'exposition réalisée sur ce dernier site a débuté un an après la campagne française et n'est donc pas exploitée dans le présent manuscrit.

III-1.2. Matériels d'exposition

Après avoir pris contact avec les gestionnaires des réseaux d'assainissement, un cahier des charges a été mis au point pour définir les moyens à mettre en œuvre. Les échantillons devaient être enfermés dans une caisse pour éviter qu'ils ne soient emportés lors d'une éventuelle montée des eaux. Cette caisse devait également être transportable par un homme ce qui a impliqué de travailler avec un poids limité.

Le système retenu pour les expositions est présenté sur la Figure III-4.

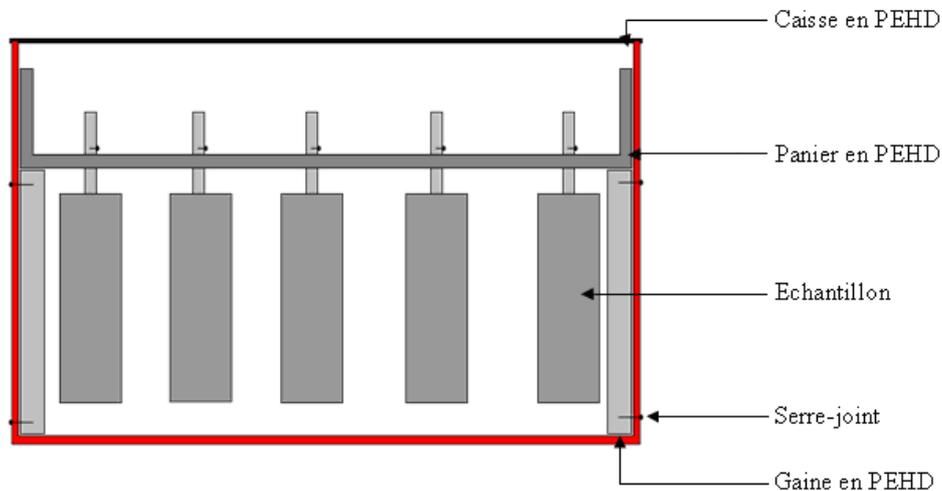


Figure III-4 : Schéma de montage d'une caisse d'exposition.

Les matériaux constitutifs de la caisse d'exposition ont été choisis pour résister à l'ambiance corrosive des réseaux d'assainissement. Le plastique a été privilégié car il est réputé pour être inerte en présence d' H_2S .

Trois échantillons de chacun des cinq types de mortier (voir Chapitre II-1) sont introduits par caisse. Chaque caisse comporte donc quinze échantillons qui sont suspendus sans contact direct avec les parois de la caisse d'exposition.

Tous les sites ont été équipés d'analyseurs en continu de la température et de la concentration en H₂S avec une liaison GSM permettant de récupérer directement sur un serveur l'ensemble des données enregistrées. Par ailleurs, des capteurs d'humidité et de température de petite taille ont été également introduits dans les caisses d'exposition pour faire un suivi de ces paramètres au cours du temps. Ils sont programmés pour faire une mesure toutes les 6 h.

III-1.3. Méthodologie

A chaque échéance, les échantillons sont pesés pour estimer les variations de poids puis le pH de surface est mesuré sur quatre zones (Figure III-5) au moyen de papier pH : une mesure sur la face supérieure, deux sur les côtés et une sur la face inférieure. Ceci permet d'avoir une représentativité de ce paramètre sur l'ensemble des échantillons et de vérifier l'homogénéité des phénomènes.

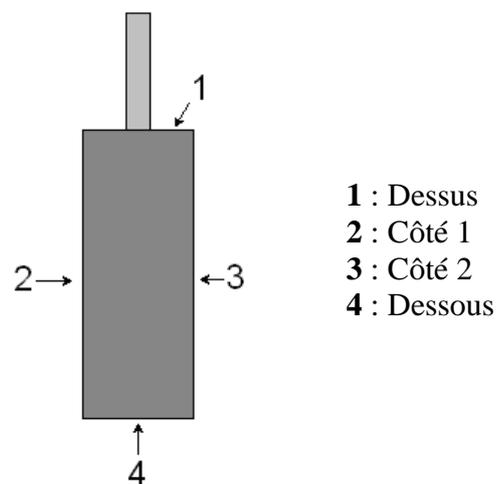


Figure III-5: Zones de mesure du pH.

Chacun des trois échantillons d'une formulation exposés (Figure III-6) est l'objet d'une étude particulière :

- Les échantillons de la première série sont destinés à l'étude des phénomènes de biodétérioration en partie haute des réseaux. Ils sont très peu manipulés et la couche de détérioration qui se forme est conservée.
- Les échantillons de la deuxième série sont destinés à étudier l'impact des zones de marnage et la mise en solution de la couche de détérioration. A chaque échéance, les échantillons sont brossés avec une brosse souple puis rincés à l'eau du robinet.
- La troisième série d'échantillons est destinée à l'étude de la diversité microbienne. A chaque échéance, le biofilm qui se forme en surface de ces échantillons est récupéré sur un quart de la surface totale de l'éprouvette pour être analysé par SSCP (polymorphisme de conformation des simples brins ou « *Single Strand Conformation Polymorphism* »). Ces analyses visent à définir si la composition du mortier et les conditions d'exposition relatives à chaque site influent sur la biodiversité.

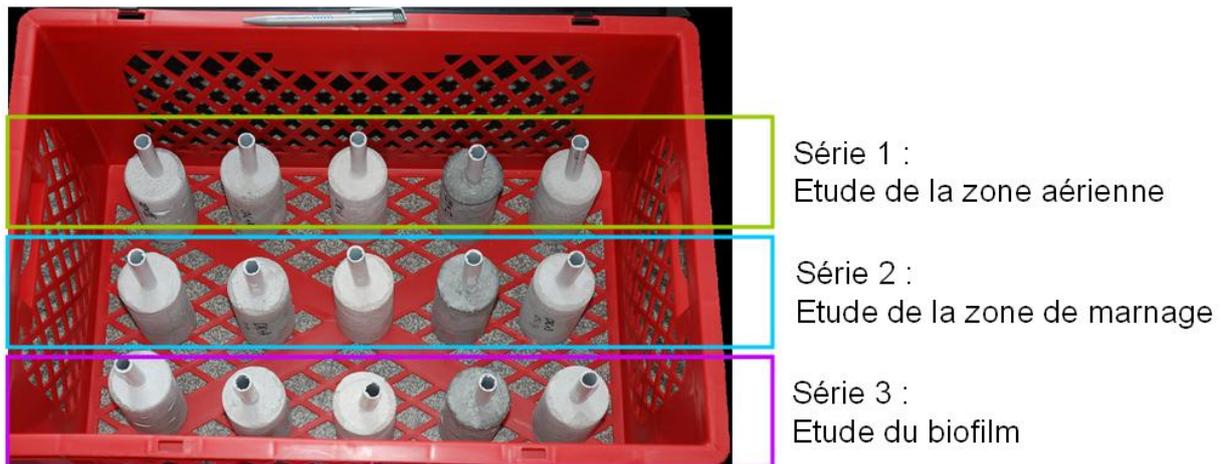


Figure III-6 : Répartition en série de chaque échantillon par caisse d'exposition.

Les échéances de suivi de l'évolution des échantillons sont de quatre mois.

III-2. Résultats

Comme nous l'avons déjà précisé, cette étude vise à observer et quantifier le comportement de cinq types de matériaux cimentaires en liaison avec leur environnement. Dans cet objectif, nous présenterons tout d'abord le suivi des caractéristiques environnementales (température, humidité relative, concentration en H_2S) puis nous décrirons l'évolution des caractéristiques propres aux matériaux (observations visuelles, évolution de la masse et du pH de surface). Enfin les deux dernières parties seront consacrées à l'étude de la biodiversité en interaction avec les différents matériaux cimentaires.

III-2.1. Suivi des caractéristiques environnementales

D'après les capteurs positionnés dans les caisses exposées sur les sites français, ces sites ont toujours été soumis à une humidité relative proche de 100% qui permet la condensation sur les échantillons étudiés. En ce qui concerne la température (Figure III-7), les deux sites présentent une différence de l'ordre de $5^{\circ}C$ mais l'évolution est similaire pour toute la durée d'exposition. On peut en particulier observer le cycle annuel de température avec un maximum en été et un minimum en fin d'hiver.

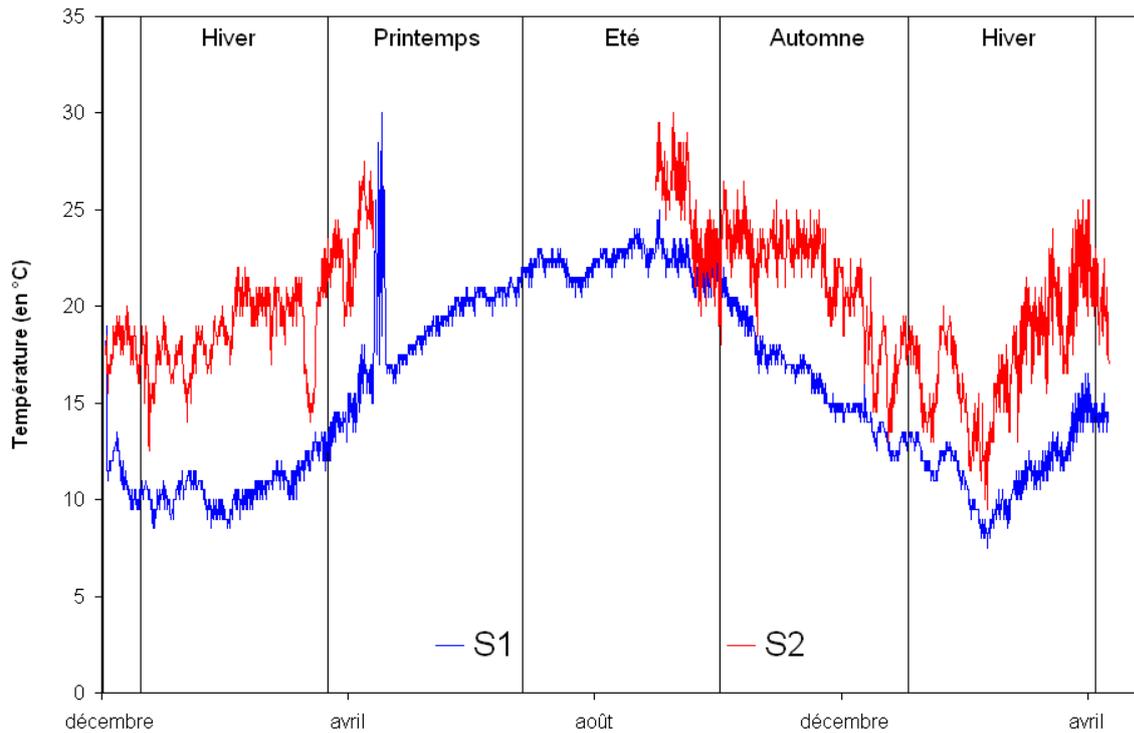


Figure III-7 : Evolutions des températures sur les sites d'exposition S1 et S2.

Les mesures en continu de la concentration en H_2S et de la température dans les sites d'exposition sont rassemblées dans le Tableau III-1 et la Figure 8.

Tableau III-1 : Concentration en H_2S et température des sites S1 et S2 mesurées par les analyseurs sur une période d'un an.

		S1	S2
[H_2S] (en ppm)	Minimum	0	0
	Moyenne	5	96
	Maximum	104	308
Température (en °C)	Minimum	7,5	9,5
	Moyenne	16	20
	Maximum	30	30

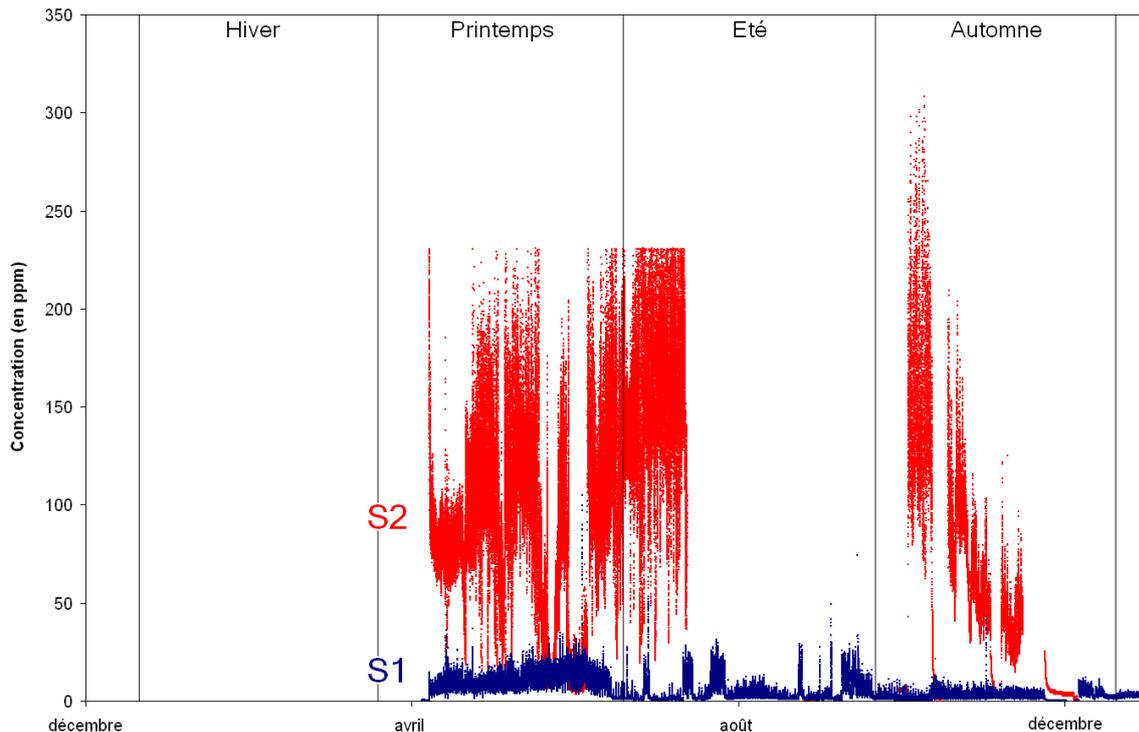


Figure III-8 : Evolutions des concentrations en H₂S sur les sites S1 et S2 (Nota Bene : l'analyseur H₂S du site S2 a eu des problèmes de fonctionnement).

D'après Alexander *et al.* [1], la concentration d'H₂S évolue dans le même sens que la température extérieure. D'après la Figure III-9, on retrouve cette tendance avec une augmentation de la concentration en H₂S de 30 à 40 ppm pour une augmentation d'environ 5°C à l'échelle de la journée pour le site S2.

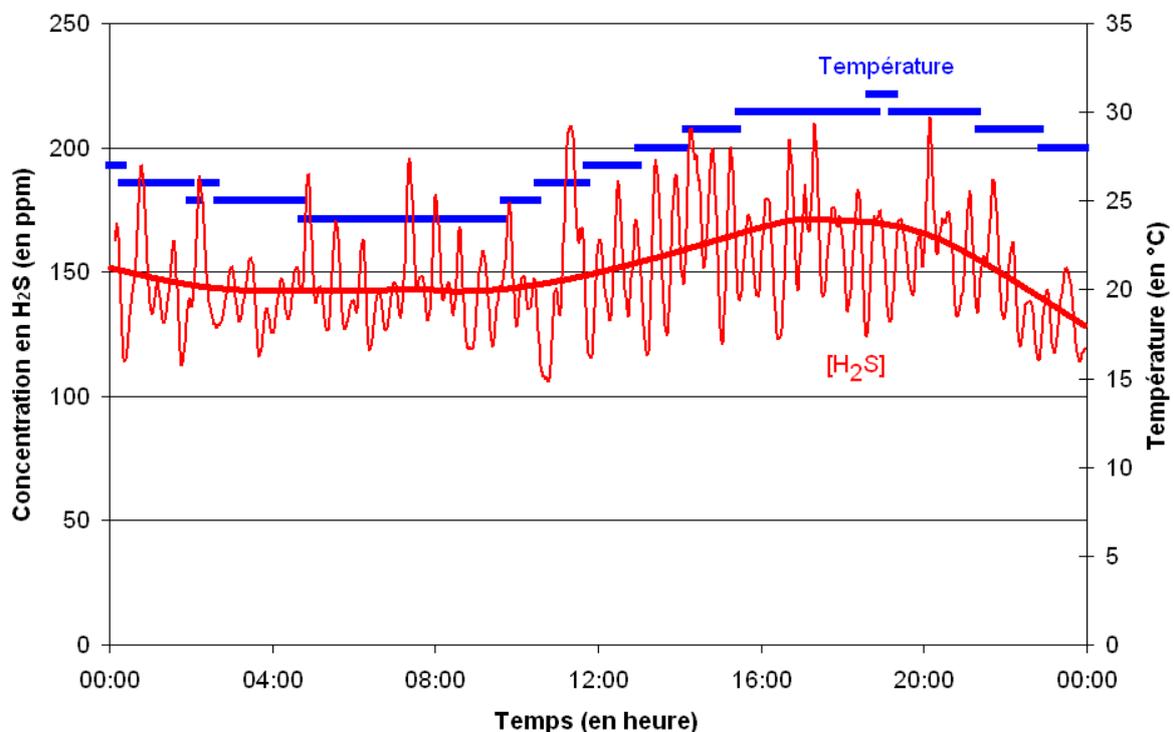


Figure III-9 : Evolutions de la concentration d'H₂S et de la température du site S2 pour une journée type.

III-2.2. Observations visuelles des échantillons de mortier

Pour observer l'évolution de la surface des mortiers, des photographies des différents échantillons ont été faites. Celles de la série 1 (échantillons destinés à l'étude de la partie haute des canalisations) ont été choisies pour représenter l'évolution de la surface car ces échantillons ne sont pas manipulés. Des détails pourront cependant être apportés avec des photographies des deux autres séries.

III-2.2.1. Echantillons de mortier CEM I

Les échantillons de mortier CEM I du site S1 (Figure III-10) subissent une détérioration progressive. Lors de la première échéance, les échantillons ont légèrement noirci et une fine couche blanchâtre est apparue. Cette patine a ensuite évolué avec l'apparition d'un dépôt non homogène de particules jaunâtres assimilées à du soufre sans détérioration de l'échantillon. A un stade plus avancé, la dégradation débute avec l'apparition d'une couche ocre et la présence d'éclatement à la base du manche de plastique associée à une pâte visqueuse blanche identifiée par DRX comme du gypse (Figure III-11).

Pour le site S2, les échantillons de mortier CEM I subissent une détérioration beaucoup moins linéaire (Figure III-10). Les échantillons se sont d'abord couverts d'une patine noire et les zones de rétention (partie supérieure et macroporosité) ont été le siège de la formation de produits de dégradation plus ou moins importants (Figure III-12). La partie supérieure a éclaté au niveau du manche de l'échantillon. Par la suite, les phénomènes de détérioration se sont arrêtés (période estivale), la patine noire a été lessivée puis un dépôt ocré est apparu, associé à une reprise de la détérioration de l'échantillon.

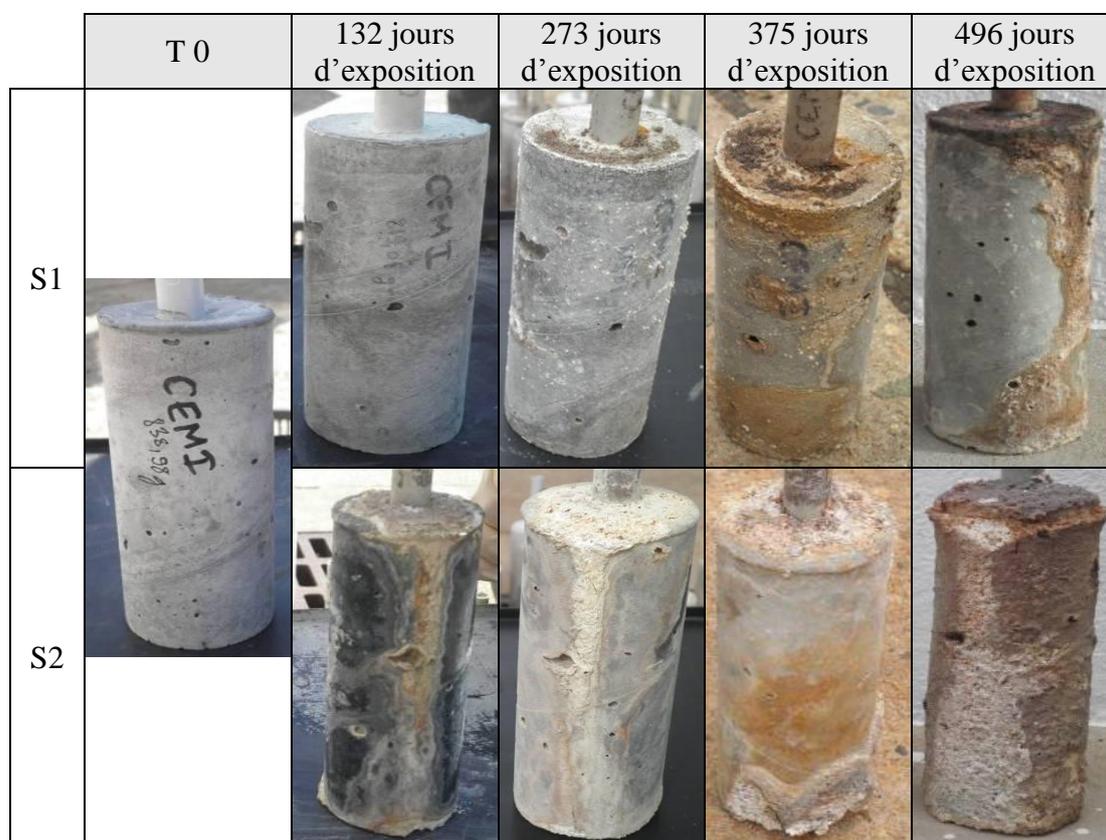


Figure III-10 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CEM I sur les deux sites d'exposition français.



Figure III-11 : Détail de la face supérieure d'un échantillon de mortier CEM I exposé 375 jours sur le site S1.

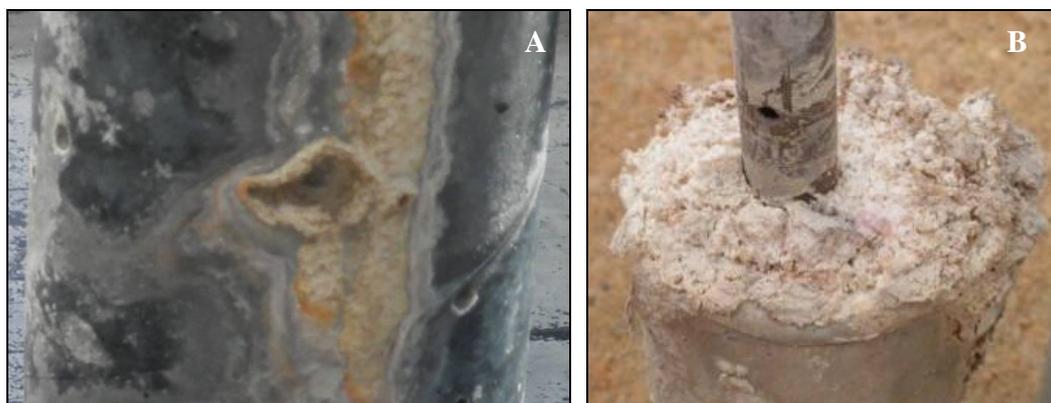


Figure III-12: Détails des dégradations observées sur des échantillons de mortier CEM I sur le site S2. A – exposé 132 jours, B – exposé 375 jours.

Le site d'étude a donc une grande influence sur la cinétique de dégradation des échantillons de mortier CEM I.

III-2.2.2. Echantillons de mortier CEM III

Les échantillons de mortier CEM III exposés sur le site S1 (Figure III-13) se comportent bien. Ils évoluent très peu sur la première année d'exposition mais se couvrent au bout d'un an d'une couche brune foncée potentiellement associée à une immersion de l'échantillon. En effet, la présence de débris semble indiquer que les échantillons ont été immergés à plusieurs reprises sans pour autant que cela influe sur leur détérioration.

Les échantillons de mortier CEM III exposés sur le site S2 se comportent moins bien (Figure III-13). Ils se détériorent rapidement et la formation de produits expansifs entraîne des éclatements situés au niveau des zones de rétention (Figure III-14). La surface des échantillons a également évolué, de couleur blanche elle est passée à jaunâtre pour finir avec des teintes ocrées. Les échantillons au bout d'un an sont fortement dégradés. Ils présentent des zones d'éclatements importantes et les prémices d'une desquamation à partir des zones de rétention où il est possible d'observer des décollements de la surface.

Pour les échantillons de mortier CEM III, le site d'étude semble jouer un rôle certain en entraînant ou non des détériorations importantes.

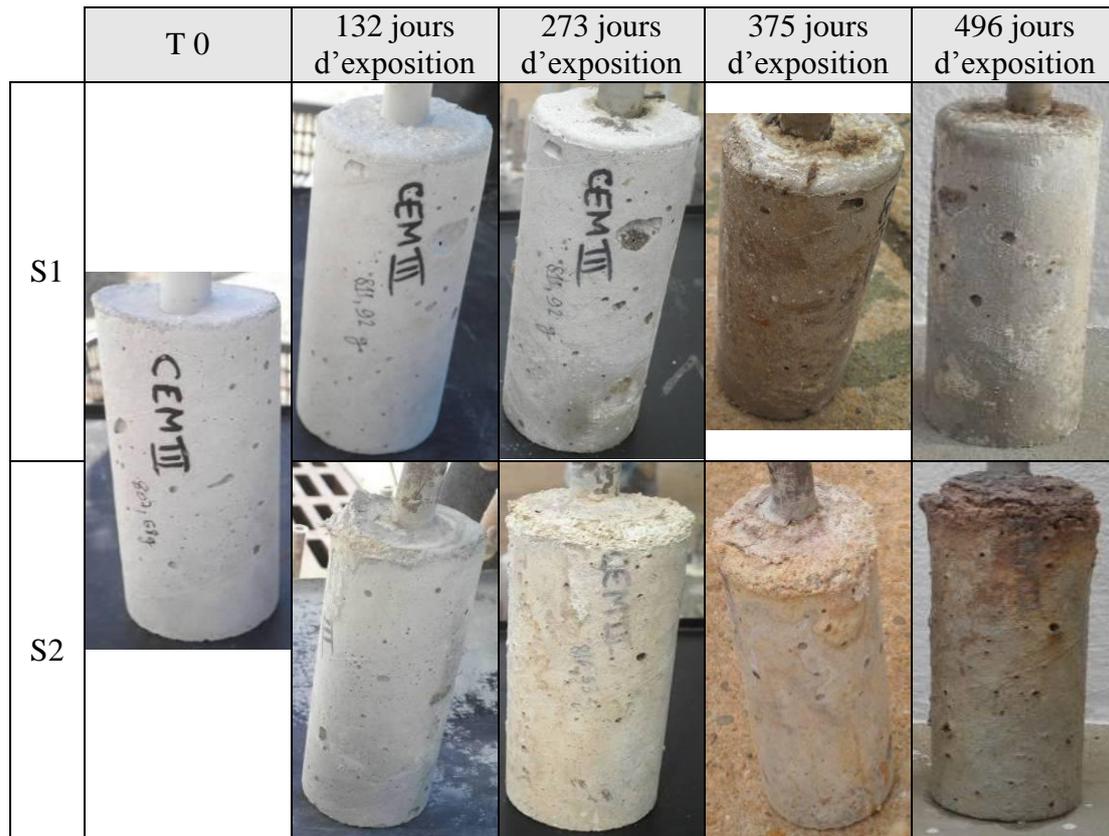


Figure III-13 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CEM III sur les deux sites d'exposition français.



Figure III-14 : Détails des dégradations observées sur des échantillons de mortier CEM III sur le site S2.

III-2.2.3. Echantillons de mortier CAC+S

Les échantillons de mortier CAC+S sur le site S1 (Figure III-15) ont globalement peu évolué. Ils se sont couverts d'une patine blanche à bleutée dans les premiers temps qu'ils ont rapidement perdu au profit de coulures blanches. Au bout d'un an, ces échantillons ont repris une apparence proche de celle d'origine sans montrer de dégradation majeure.

Les échantillons de mortier CAC+S sur le site S2 (Figure III-15) ont subi des transformations de surface importantes. Ils ont d'abord noirci et se sont recouverts d'une couche blanche plus ou moins homogène. Au bout d'un an, les échantillons ont repris une teinte proche de leur couleur d'origine mais des coulures orangées provenant des zones de rétention (partie supérieure de l'éprouvette essentiellement) restent présentes.

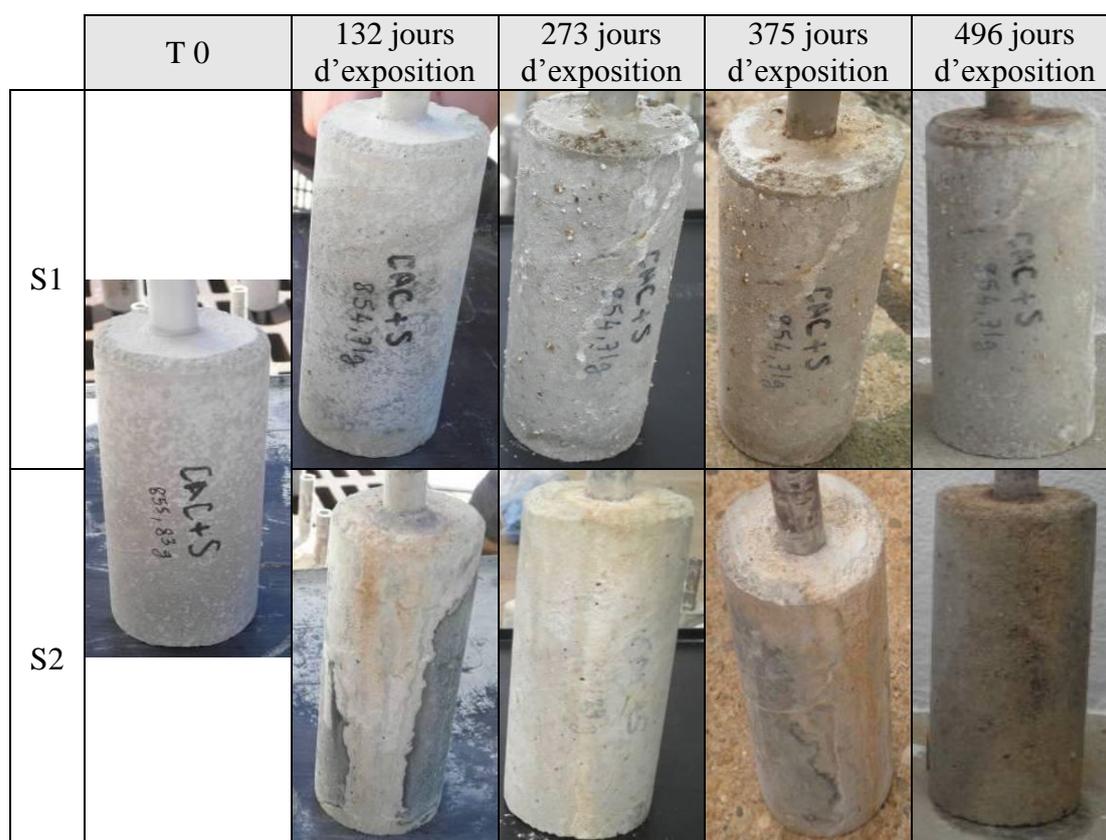


Figure III-15: Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CAC+S sur les deux sites d'exposition français.

Les échantillons de mortier CAC+S sont bien conservés quel que soit le site d'étude.

III-2.2.4. Echantillons de mortier CAC+L

Les échantillons de mortier CAC+L exposés sur le site S1 (Figure III-16) ont très peu évolué sur la première année d'exposition. Ils se sont couverts d'une couche orangée. Les échantillons n'ont subi aucune dégradation au cours de cette exposition.

Les échantillons de mortier CAC+L exposés sur le site S2 (Figure III-16) sont très bien conservés pour l'ensemble de la durée d'exposition. Ils ont subi des transformations de

surface caractérisées par la formation d'une patine blanche ocrée mais la durabilité du mortier n'a pas été atteinte.

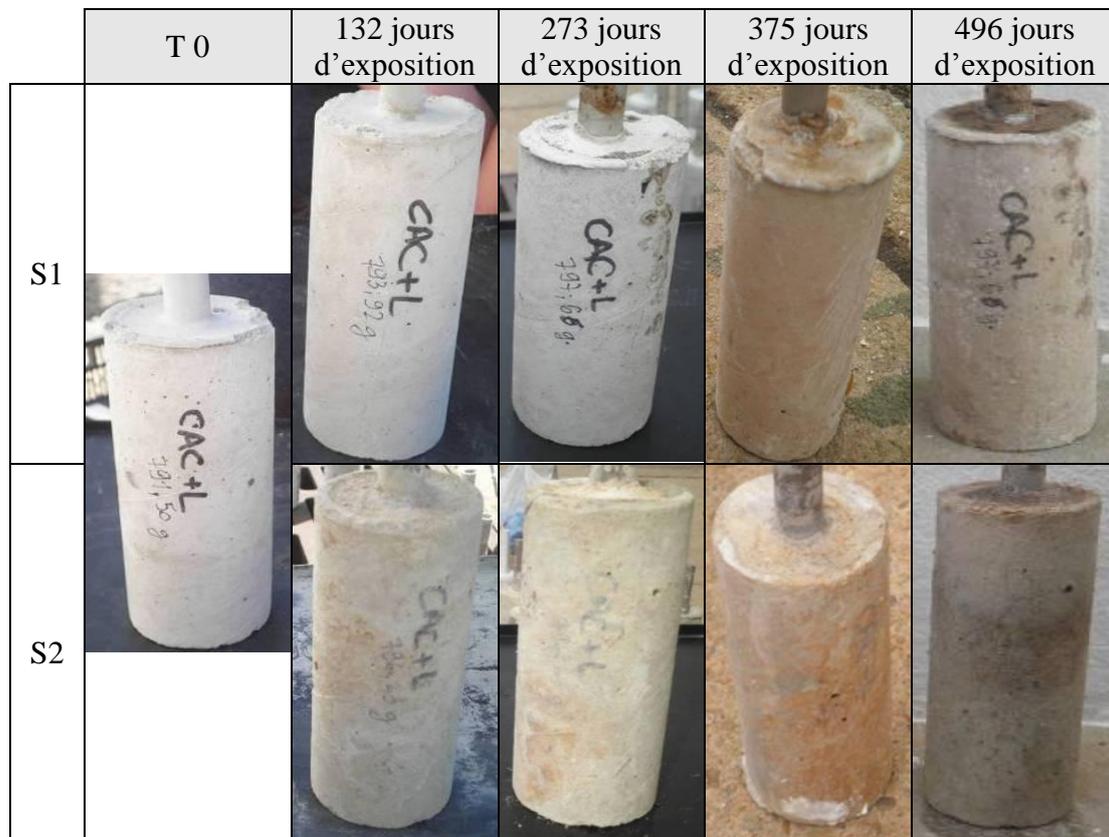


Figure III-16 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CAC+L sur les deux sites d'exposition français.

III-2.2.5. Echantillons de mortier CAC+A

Les échantillons de mortier CAC+A exposés sur le site S1 (Figure III-17) ont subi des phénomènes de surface. Ils se sont partiellement recouverts d'une couche noire non homogène. Au bout d'un an, des produits blancs sont visibles sur la partie supérieure des échantillons. Les divers débris retrouvés en surface des échantillons ne semblent pas impacter la détérioration de la matrice cimentaire.

Les échantillons de mortier CAC+A exposés sur le site S2 (Figure III-17) ont noirci de manière plus ou moins homogène et une couche blanchâtre a recouvert les échantillons depuis la face supérieure. La disparition de cette couche au profit d'une couche plus orangée ne semble pas avoir impactée la durabilité de cet échantillon.

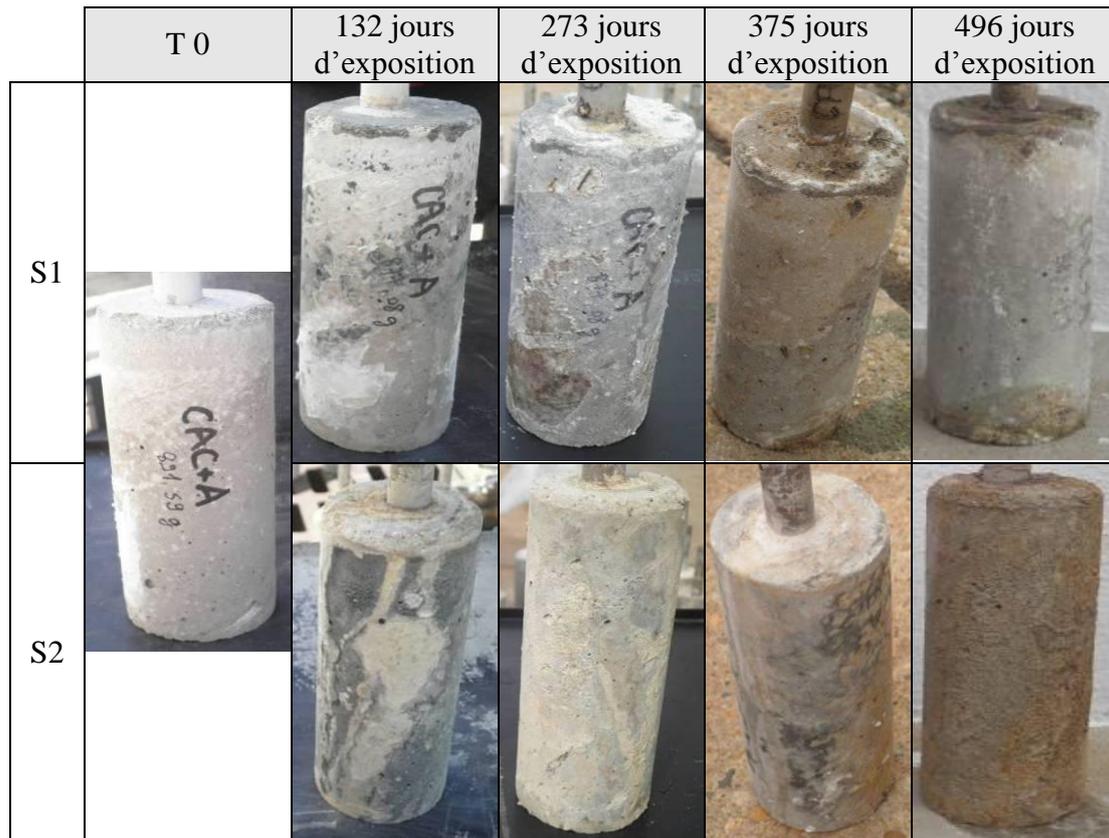


Figure III-17 : Photographies de l'évolution des échantillons de mortier CAC+A sur les deux sites d'exposition français.

III-2.3. Suivi de la masse des échantillons

A chaque échéance, les échantillons sont pesés avant toute manipulation pour estimer les variations de masse. La Figure III-18, basée sur les pesées des échantillons des séries 1 et 3, nous indique que l'ensemble des masses des échantillons augmentent au cours du temps. Vraisemblablement, ces variations sont dues à une saturation partielle en eau du réseau poreux mais elles ne peuvent pas être directement reliées aux valeurs de porosité des échantillons (voir chapitre II-4.1.5).

La prise de masse des échantillons suit les mêmes tendances de stabilisation sur les deux sites d'étude mais avec des valeurs légèrement supérieures pour le site S2. Ces prises de masse sont très variables suivant les échantillons puisque par exemple les mortiers CAC+L n'ont pris que très peu de poids alors que les mortiers CAC+A ont pris jusqu'à 6% de leur poids de départ. Le mortier CEM I est le seul à avoir perdu du poids au bout de 496 jours d'exposition.

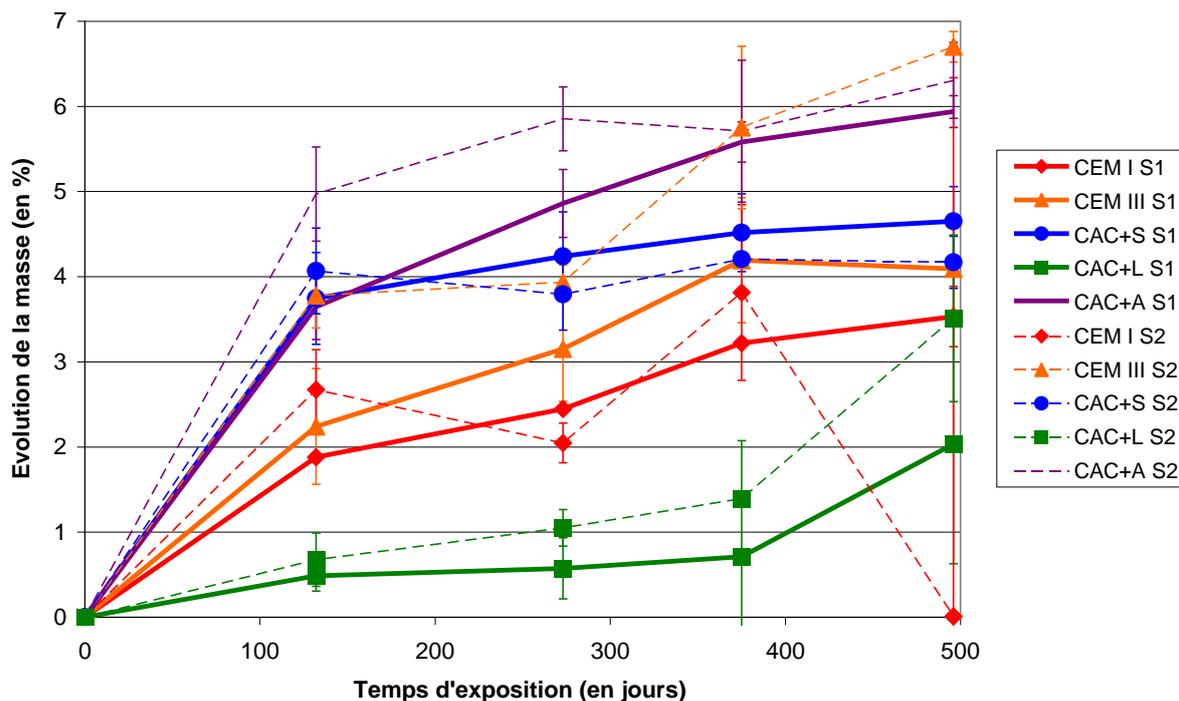


Figure III-18 : Evolution de la masse des échantillons au cours du temps (moyenne sur 2 mesures, barres d'erreur : écart du minimum et du maximum par rapport à la moyenne).

Comme nous l'avons précisé au début de ce chapitre, un des trois échantillons de chaque formulation est brossé à chaque échéance pour retirer les produits de dégradation qui se sont formés. Ces pertes sont bien caractéristiques de la détérioration car elles sont calculées à partir de la différence entre les poids avant et après brossage. Cet essai a pour objet de suivre le comportement des matériaux situés dans la zone de marnage d'un réseau d'assainissement.

Comme nous avons pu l'observer précédemment (Figures III-10 à III-17), les pertes de matière sont surtout localisées sur les zones de rétention des échantillons et ne sont donc pas homogènes sur toute la surface. Ces pertes ont été ramenées à la masse initiale des échantillons compte tenu de la difficulté à bien définir la surface réellement dégradée.

Les échantillons exposés sur le site S1 sont de manière générale peu touchés par les phénomènes de biodétérioration. Des produits de dégradation commencent toutefois à se former à partir d'un an pour les mortiers CEM I et CEM III (Figure III-19). Les échantillons du site S2 présentent une perte de poids dès la première échéance pour les mortiers CEM I et CEM III et dans une moindre mesure pour les mortiers CAC+S.

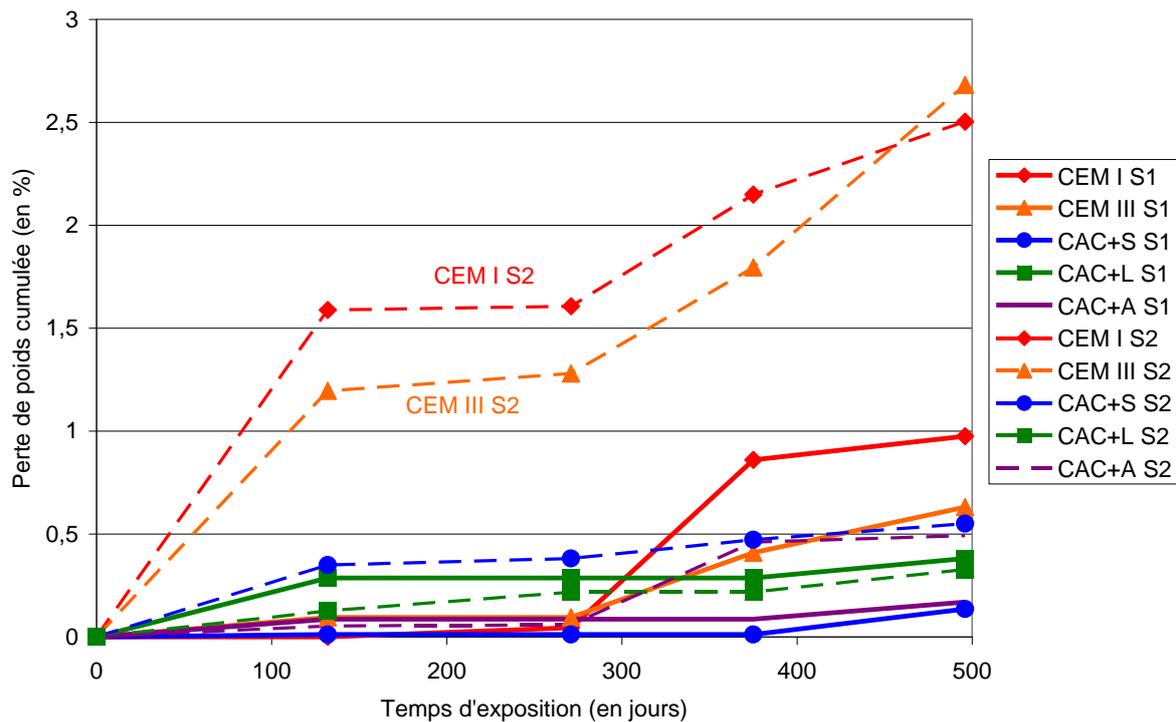


Figure III-19 : Pourcentage massique des produits de dégradation après brossage suivant le type d'échantillon et le site d'exposition au cours du temps.

III-2.4. Suivi du pH des échantillons

Le pH des échantillons a également été mesuré et les résultats obtenus sont rassemblés dans les Figures III-20 à III-22. Nous pouvons ainsi analyser les évolutions du pH suivant le type d'échantillon, le site considéré et l'emplacement de la mesure sur l'échantillon.

La face supérieure des échantillons est une zone fortement soumise aux variations de pH puisqu'il s'agit d'une zone de rétention. L'acide formé par les microorganismes peut stagner sur cette face et attaquer le matériau sous-jacent.

Les profils de pH des différents échantillons sont très similaires pour le site S1 alors que ceux du site S2 montrent des différences de comportement plus marquées. Pour ce dernier site, l'ensemble des mortiers atteignent des pH correspondant au domaine de prédominance d'*Acidithiobacillus thiooxidans* (0 à 4) ce qui implique une production importante d'acide et donc une forte dégradation, si toutefois cette espèce bactérienne est bien active à la surface des matériaux.

Les zones latérales et la face inférieure des échantillons sont moins touchées par les évolutions de pH. L'acide produit par le biofilm ruisselle sur les échantillons et a un impact modéré sur les matériaux aux échéances considérées. Malgré cela, le pH atteint des valeurs de l'ordre de 4 lors de la dernière échéance. Ce pH commence donc à devenir favorable à la croissance d'*Acidithiobacillus thiooxidans*.

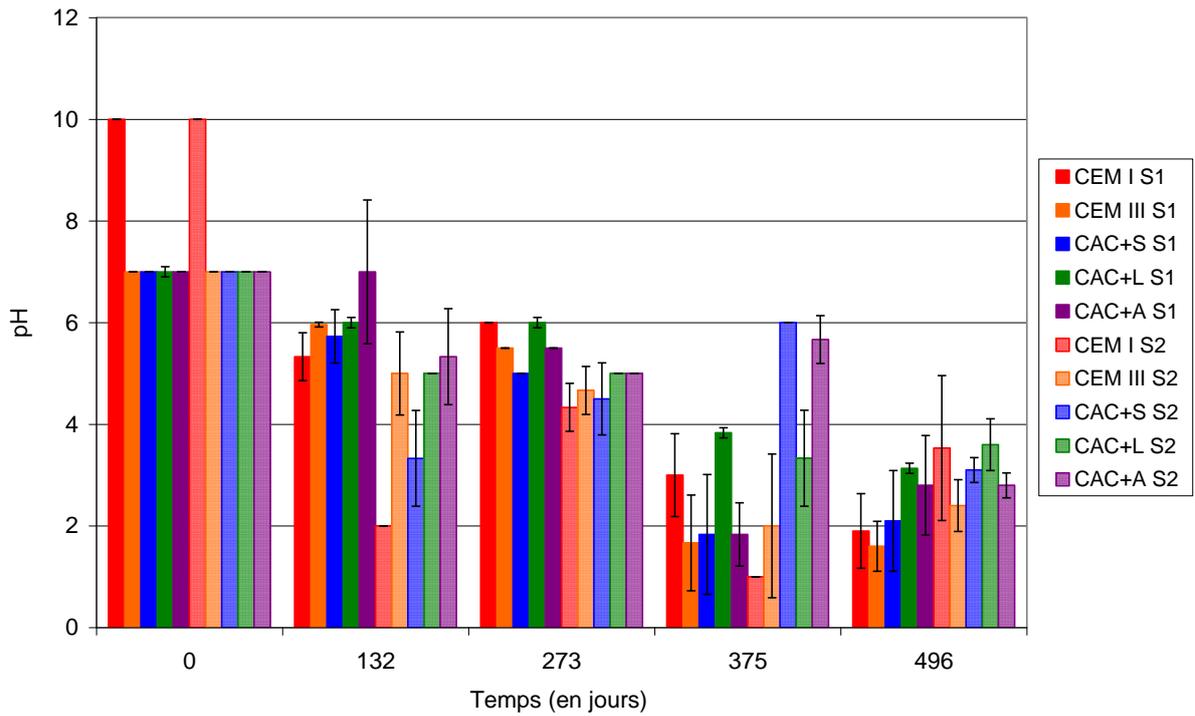


Figure III-20 : Evolution du pH moyen de surface de la face supérieure des échantillons (moyenne sur 3 échantillons, barres d'erreur : écart-type).

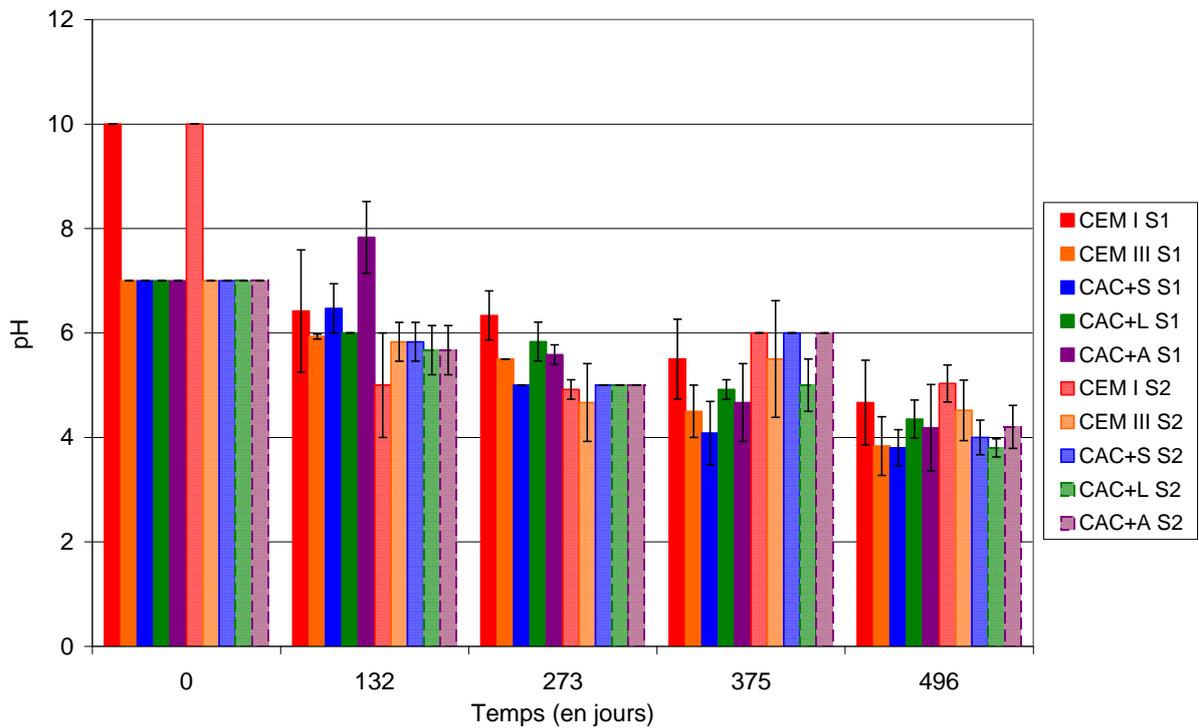


Figure III-21 : Evolution du pH moyen de surface de la partie latérale des échantillons (moyenne sur 3 échantillons avec 2 mesures par échantillon, barres d'erreur : écart-type).

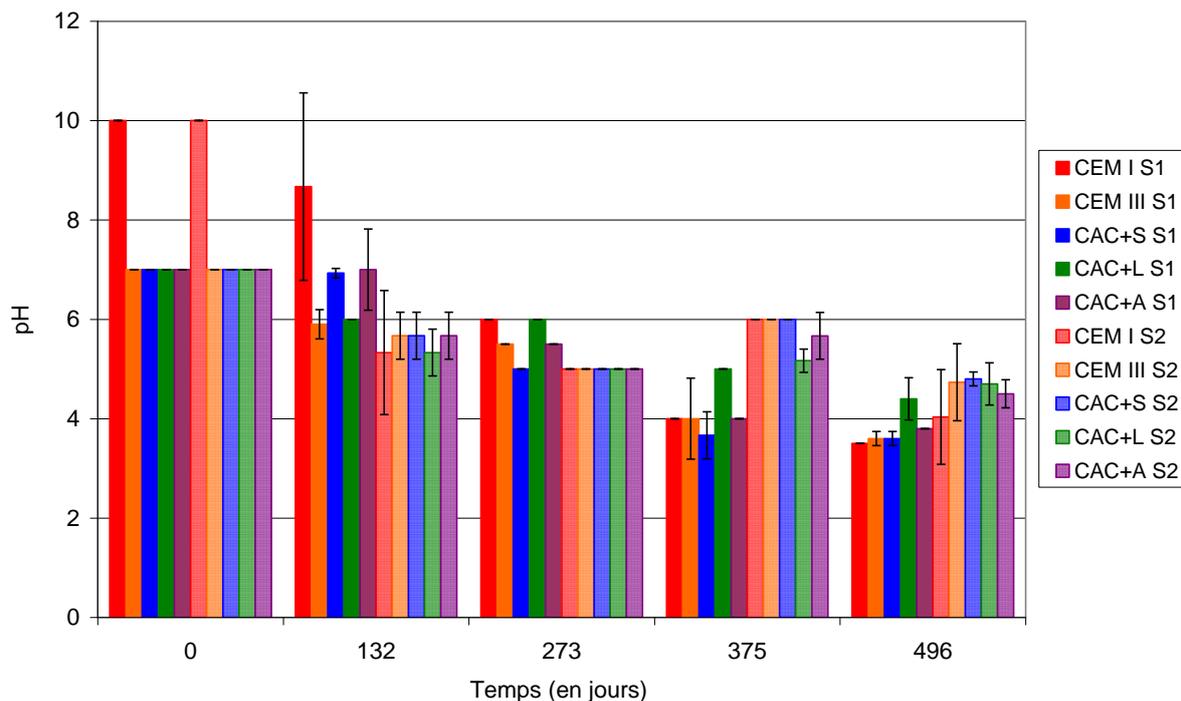


Figure III-22 : Evolution du pH moyen de surface de la partie inférieure des échantillons (moyenne sur 3 échantillons, barres d'erreur : écart-type).

III-2.5. Etude de l'eau de condensation

Les échantillons ont été fabriqués avec un manche en PVC creux permettant de recueillir l'eau de condensation ($\approx 13 \text{ cm}^3$). Ces eaux, prélevées à différentes échéances ont été analysées en laboratoire par ICP pour déterminer la nature et la concentration des ions en solution et leur impact sur les microorganismes suivant la formulation cimentaire (les analyses complètes sont regroupées en annexe i).

Les eaux prélevées pour les échantillons exposés sur le site S1 sont acides et le niveau d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) varie avec le type d'échantillon (Tableau III-2). Les échantillons de mortier CEM I, CEM III et CAC+A présentent des quantités d'ATP importantes par rapport aux échantillons de mortier de CAC+S et CAC+L. Ces valeurs sont cependant critiquables car les échantillons ont été immergés pendant une durée indéterminée et l'eau contenue dans les manches a donc pu être polluée.

Les analyses effectuées sur les eaux récupérées pour les échantillons du site S2 sont également acides et présentent une quantité d'ATP plus faible. Nous pouvons remarquer que seuls les mortiers à base de ciment Portland (CEM I et CEM III) présentent une quantité d'ATP indiquant la présence de microorganismes actifs. Les échantillons à base de ciment d'aluminat de calcium ont tous une quantité d'ATP nulle laissant penser que ce ciment inhibe la croissance microbienne.

Tableau III-2 : Mesures de pH et d'ATP réalisées sur l'eau condensée dans les manches en PVC des échantillons exposés 375 jours.

	S1			S2		
	pH	ATP (en RLU)	[Al] total (en mg L ⁻¹)	pH	ATP (en RLU)	[Al] total (en mg L ⁻¹)
CEM I	2	709 239 917	46	1	2 221 456	475
CEM III	2	1 102 288	350	1	42 191	380
CAC+S	2	109 576	2243	1	0	3363
CAC+L	1	108 553	675	1	0	874
CAC+A	3	133 745 197	100	1	0	1376

La comparaison entre la concentration en aluminium total dissous et le niveau d'ATP (Figure III-23) montre que cet élément a un rôle inhibiteur de l'activité des microorganismes à partir d'environ 350 mg L⁻¹.

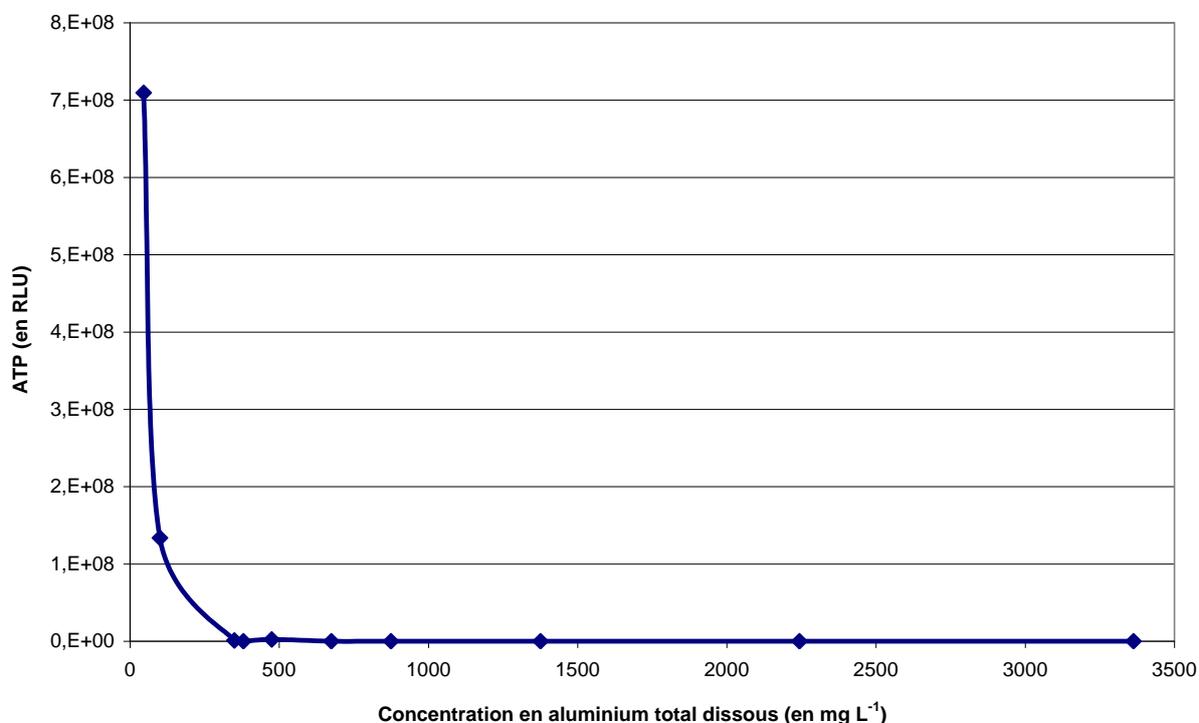


Figure III-23 : Mesure d'ATP dans l'eau des manches des échantillons en fonction de la concentration en aluminium total.

III-2.6. Analyse de la diversité microbienne

La troisième série d'échantillons est utilisée pour l'étude de la colonisation microbienne et permet d'estimer la quantité d'ADN total présent dans le biofilm.

Les résultats rassemblés dans le Tableau III-3 nous indiquent que les matériaux cimentaires à base de ciment Portland, et plus particulièrement le CEM I, sont généralement plus bio-réceptifs que ceux à base de ciment d'aluminate de calcium. La quantité d'ADN total extrait à la surface des échantillons varie également d'un site et d'une échéance à l'autre, le site S2 étant plus favorable au développement de microorganismes.

Tableau III-3 : Quantité d'ADN total (en ng cm⁻² de matériau) extrait à la surface des échantillons.

		CEM I	CEM III	CAC+S	CAC+L	CAC+A
T0	Témoin	0,8	3,2	0,5	13,2	14,9
132 jours	S1	10,3	4,3	3,5	0	5,3
	S2	154,5	106,8	47,8	46,7	34,2
273 jours	S2	1,3	-	3,1	-	-
375 jours	S2	70,6	-	8,1	-	3,6
496 jours	S2	16,9	-	3,8	-	2,4

L'ADN bactérien a ensuite été amplifié à partir de l'ADN total extrait du biofilm en utilisant des sondes spécifiques aux bactéries (archées et eubactéries) et aux eucaryotes. L'étude de ces fragments d'ADN bactérien amplifiés (ou amplicons) par SSCP a permis d'obtenir une empreinte à un instant donné de la population bactérienne établie sur les échantillons (Figures III-24 à III-27). Plus ces spectres possèdent de pics et plus la population bactérienne est diversifiée. Le dénombrement de ces pics permet donc de discriminer les échantillons suivant leur réceptivité biologique.

La comparaison des spectres SSCP pour une même formulation montre que les échantillons les plus diversifiés en termes d'espèces bactériennes sont ceux du site S2 à l'exception du mortier CAC+L. Les échantillons exposés sur le site S1 présentent une diversité faible et dominée par certaines espèces. Malgré tout, les espèces dominantes sont plus nombreuses (hauteur de pic) sur le site S1 que sur le site S2.

Si nous nous intéressons au site S1 (Figures III-24 et III-28), nous pouvons constater que la diversité bactérienne augmente sensiblement à la première échéance sur les matériaux cimentaires à base de ciment portland (CEM I et CEM III) par rapport au témoin (T0). Le mortier CAC+L présente une évolution du nombre d'espèces bactériennes comparable aux mortiers Portland. Cependant, la diversité bactérienne est différente suivant le type de ciment considéré puisque les pics, qui représentent chacun une espèce bactérienne, n'ont pas les mêmes temps de rétention. Nous pouvons aussi noter que les quantités de bactéries (hauteur de pic) ne sont pas identiques suivant les matrices cimentaires considérés.

Les profils SSCP déterminés pour les échantillons du site S2 (Figures III-25 et III-28) sont très différents de ceux obtenus pour le site S1. La diversité bactérienne reste cependant toujours plus importante pour les matériaux cimentaires à base de ciment Portland mais également pour le mortier CAC+A. Encore une fois, nous pouvons noter que les espèces majoritaires sont différentes et que la quantité de bactéries associée à ces espèces varie suivant le matériau cimentaire.

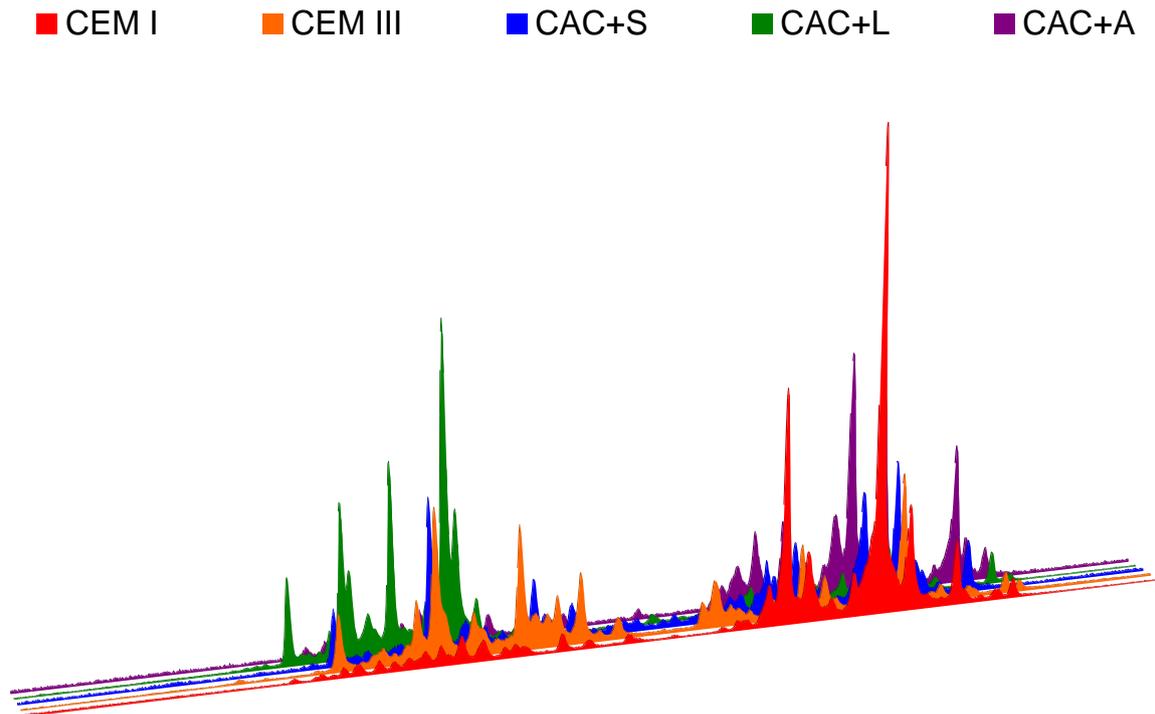


Figure III-24 : Profil SSCP procaryotiques des échantillons du site S1 exposés 132 jours.

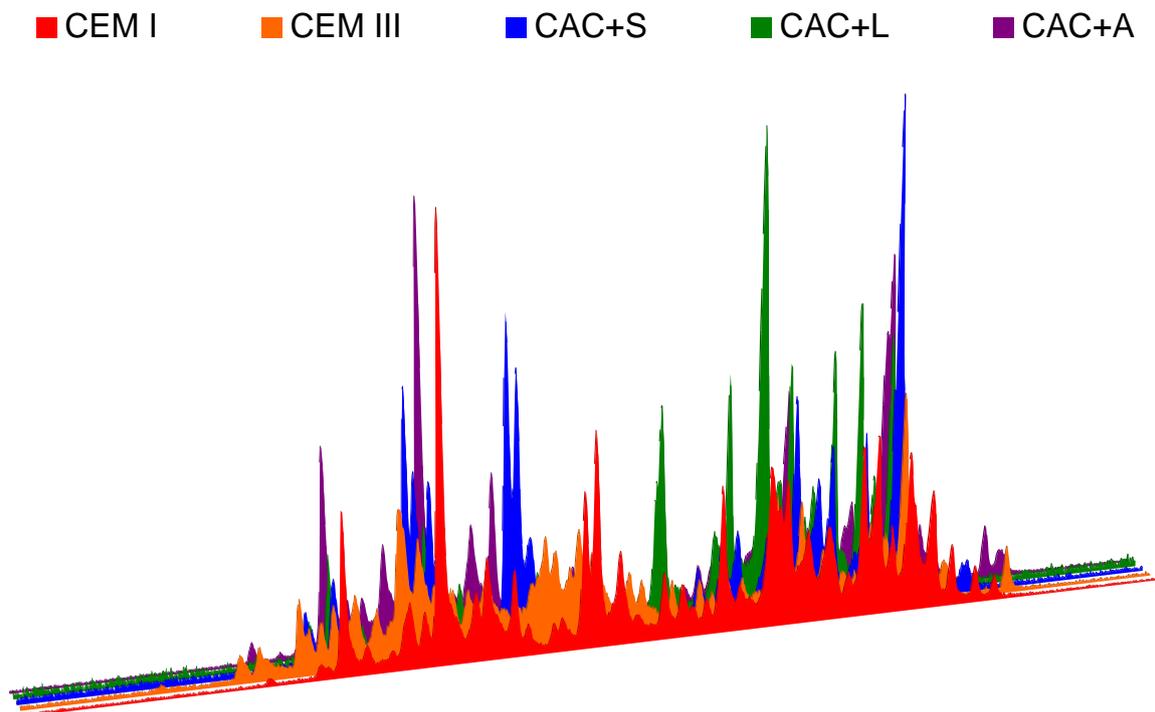


Figure III-25 : Profil SSCP procaryotiques des échantillons du site S2 exposés 132 jours.

Le suivi de la colonisation bactérienne sur le site S2 (Figures III-26 et III-27) montre une évolution importante de la biodiversité au cours du temps. L'espèce bactérienne majoritaire présente à la surface du mortier au ciment CEM I (Figure III-26) disparaît peu à peu au profit d'une partie des autres souches bactériennes déjà présentes mais surtout de nouvelles souches qui s'implantent à la surface de l'échantillon. Il en va de même pour les eucaryotes (Figure III-27). De manière générale, la biodiversité augmente au cours du temps sans qu'aucune

souche microbienne ne devienne apparemment dominante. L'ensemble des résultats des analyses SSCP sont rassemblés dans l'annexe j.

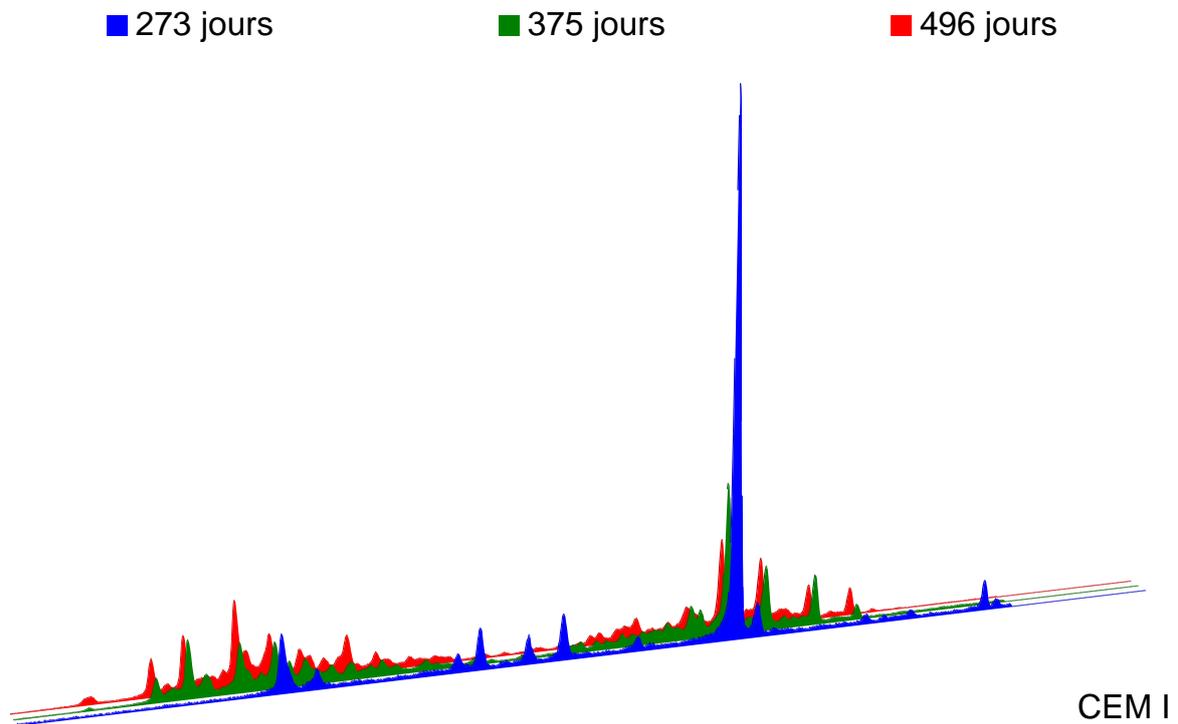


Figure III-26 : Profil SSCP procaryotiques du mortier CEM I au cours du temps sur le site S2.

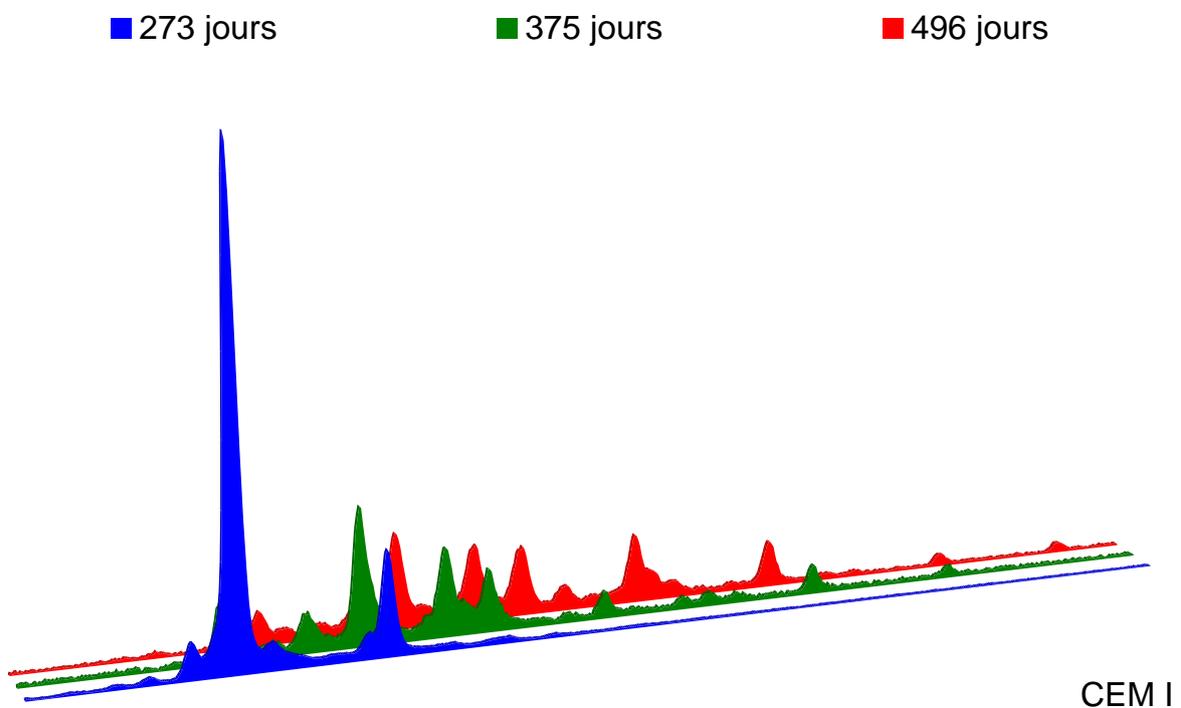


Figure III-27 : Profil SSCP eucaryotiques du mortier CEM I au cours du temps sur le site S2.

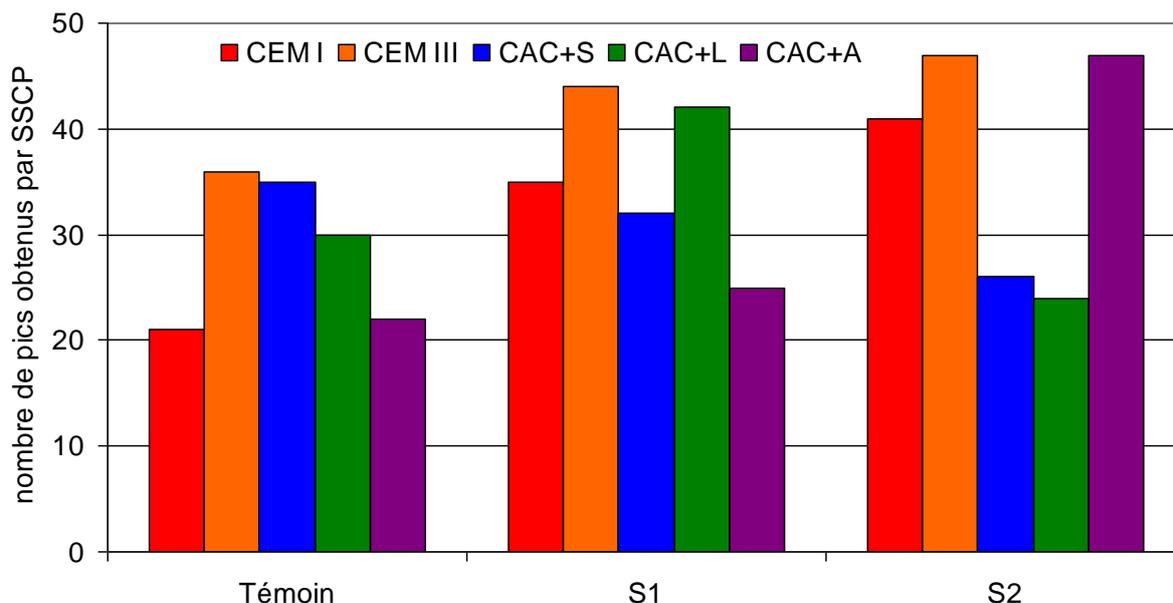


Figure III-28 : Richesse (nombre de pics) des échantillons de mortiers obtenue par SSCP des fragments d'ADN procaryotiques après 132 jours d'exposition dans les réseaux d'assainissement.

III-3. Discussion

Les résultats de cette étude confirment ceux retrouvés dans la littérature [1-2, 14-16]. Les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium ont une meilleure tenue sur sites que ceux à base de ciment Portland. Nous pouvons remarquer que l'ajout de laitier de haut fourneau (à hauteur de 70%) n'améliore que très peu les propriétés du ciment Portland au contraire de ce que laissait penser certains auteurs [17, 19-20]. Cependant, l'ajout de laitier de haut-fourneau à du ciment d'aluminate de calcium (CAC+L) améliore la durabilité de ce matériau dans les réseaux d'assainissement par rapport à un matériau sans laitier (CAC+S). De même, l'utilisation de granulats synthétiques silico-alumineux-calcique (CAC+A) à la place de granulats siliceux (CAC+S) augmente la durabilité du matériau.

Les observations que nous avons faites à partir des expositions sur site vont dans le même sens que celle d'Okabe *et al.* en 2007 [3]. Cette équipe a réalisé une exposition d'échantillons de mortier *in situ* avec une échéance toutes les deux semaines à partir du premier mois d'exposition pendant six mois puis une dernière échéance à un an. Selon ces auteurs, les mortiers ont été colonisés rapidement entraînant une chute progressive du pH mais des pertes de masses importantes n'ont été mesurées qu'à partir d'un an d'exposition (Figure III-29). Il en va de même pour nos travaux avec certains des échantillons exposés sur le site S2 qui commencent à montrer des pertes significatives à partir d'un an et quatre mois.

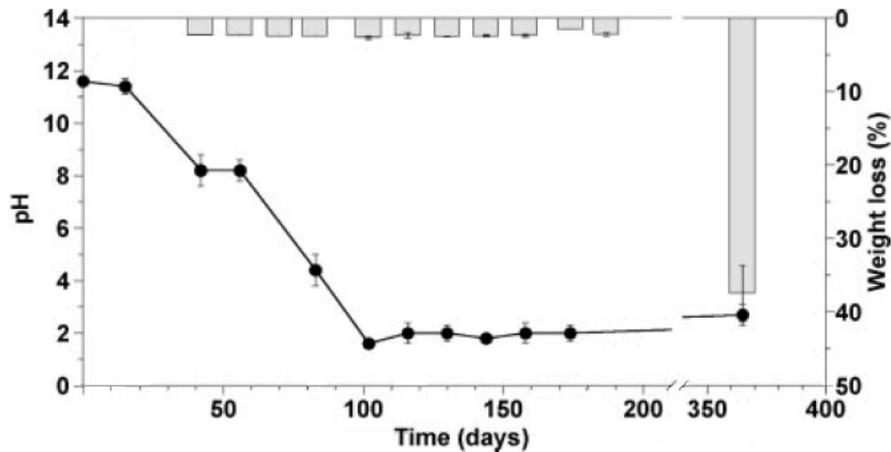


Figure III-29: Evolution du pH et des pertes de masses des échantillons de mortier exposés *in situ* par Okabe *et al.* [3].

La biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement est donc un processus non linéaire qui a un temps de latence important et une phase de détérioration rapide et exponentielle. La phase de latence correspond au temps nécessaire pour que le matériau épuise sa réserve alcaline. Ceci est rendu possible grâce aux conditions environnementales (CO_2 , H_2S) puis aux premiers microorganismes neutrophiles qui en se développant produisent des métabolites acides qui vont influencer sur le pH et consommer la réserve de base des mortiers. Le pH doit ensuite rester bas pour permettre aux souches acidophiles de s'implanter et de se développer dans le biofilm (Figures III-29 et III-30). Ces souches vont produire de grandes quantités d'acide sulfurique qui va attaquer la matrice cimentaire.

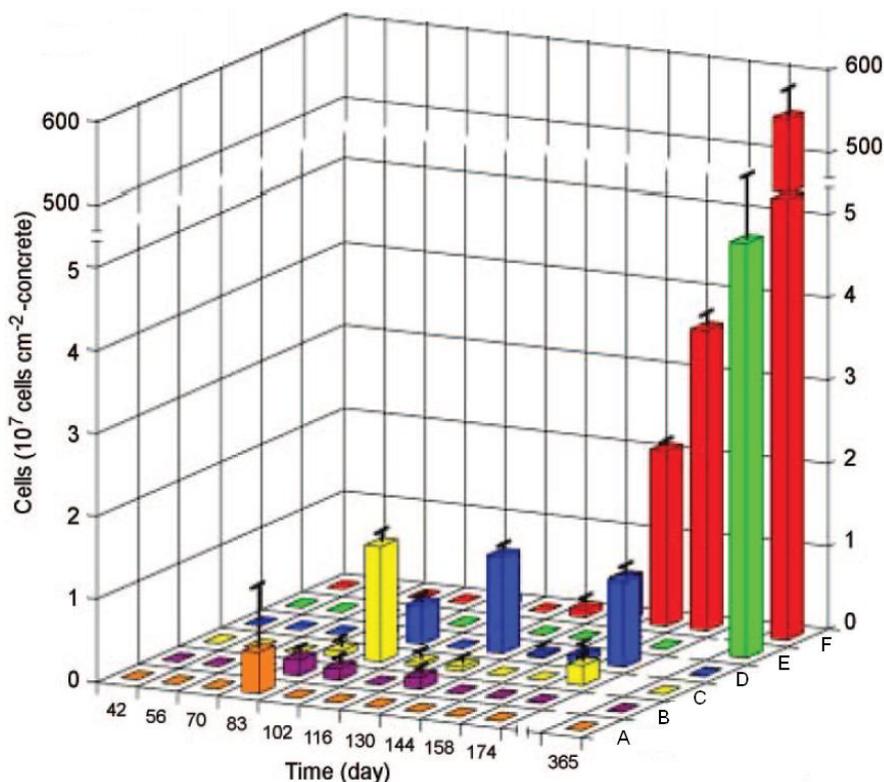


Figure III-30 : Evolution des souches bactériennes au cours du temps, d'après Okabe *et al.* [3]. A : *Thiothrix spp.*, B : *Thiobacillus plumbophilus*, C : *Thiomonas intermedia*, D : *Halothiobacillus neapolitanus*, E : *Acidiphilium spp.*, F : *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Les paramètres environnementaux ont une influence importante sur les phénomènes de biodétérioration puisque nous observons des différences de comportement des échantillons suivant les sites d'études. Ces différences ne sont pas inattendues puisque nous savons d'après la littérature que les microorganismes sont affectés par la température de leur environnement [21]. Les réactions catalysées par des enzymes sont nombreuses au sein d'une cellule et la température a un effet important sur les vitesses de ces réactions (Figure III-31). En effet, à chaque augmentation de 10°C la vitesse de réaction catalysée par une enzyme double comme celle de n'importe quelle réaction chimique. Puisque ces réactions sont plus rapides, le métabolisme est plus actif et la vitesse de croissance du microorganisme est augmentée. Au-delà de la température optimale de croissance, une nouvelle augmentation de température diminue la croissance et une température suffisamment élevée entraîne la dénaturation des enzymes.

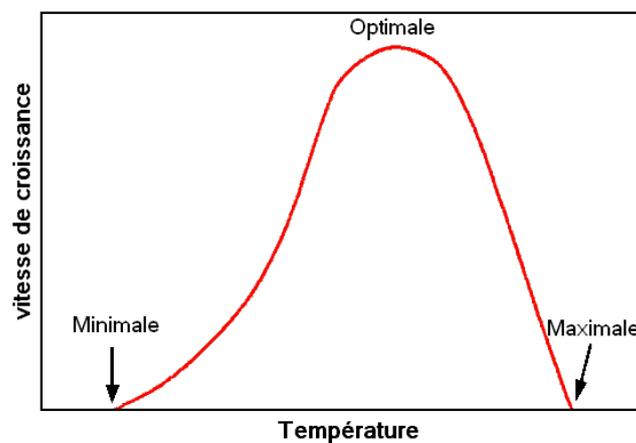


Figure III-31 : Effet de la température sur la vitesse de croissance [21].

Le site S2 est en moyenne plus chaud de 4°C que le site S1 et il est plus proche de l'optimum de croissance des microorganismes identifiés dans la littérature comme participant aux phénomènes de biodétérioration (30°C), les microorganismes s'y développent plus rapidement et peuvent donc générer plus d'acide sulfurique.

La concentration d'H₂S est également un paramètre clef dans ce processus puisque comme nous pouvons le constater plus elle est importante plus la dégradation est avancée. L'hydrogène sulfuré est une des sources d'électrons, et donc d'énergie, utilisées par les microorganismes sulfo-oxydants dans les réseaux d'assainissement pour croître et se développer. Il est donc normal que la production d'acide sulfurique soit plus importante sur le site S2 que sur le site S1. Comme la production d'acide est favorisée sur le second site, les dégradations sont plus importantes.

Roberts *et al.* [22] ont montré que la dégradation d'une matrice cimentaire était linéaire entre 0 et 250 ppm d'H₂S et Valix *et al.* [5, 6] ont pu observer que cette relation perdait sa linéarité pour de fortes concentrations. En présence de 500 ppm d'H₂S, la dégradation des matrices cimentaires serait moins importante car l'H₂S deviendrait nocif et entraînerait donc l'inhibition des microorganismes. Cependant, il a été montré par Nishimura et Yoda [23] qu'une population de *Thiobacillus sp.* provenant d'une station d'épuration pouvait traiter un biogaz contenant de 300 à 2 000 ppm d'H₂S avec un rendement supérieur à 99% et Schieder *et al.* [24] ont montré que des *Thiobacillus sp.* pouvaient traiter, avec une efficacité de plus de 90%, un biogaz similaire contenant 5 000 ppm d'H₂S. Selon Hirayama et Vetter [25],

l'inhibition engendrée par l' H_2S intervient en solution (eaux hydrothermales) pour une concentration allant de 9 000 à 60 000 ppm. D'autres phénomènes doivent donc intervenir pour expliquer cette baisse d'activité rencontrée à 500 ppm. Les résultats attendus sur le site S3 permettront d'évaluer l'impact de l' H_2S à haute concentration.

Lors de la mise en place des essais, il a été décidé de traiter les deux premiers échantillons de chaque formulation de manière différente pour représenter les différentes zones d'une canalisation. Les échantillons de la première série, représentant la partie supérieure de la canalisation ont été très peu manipulés alors que la seconde série a été brossée à chaque échéance pour représenter la zone de marnage. On se serait attendu à ce que les échantillons de la seconde série soient, comme dans une canalisation en fonctionnement, plus dégradés mais les résultats nous indiquent le contraire. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- Tout d'abord, dans une canalisation la zone de marnage est également la zone où la plus grande quantité d'acide peut se trouver compte tenue des coulures le long des parois. Cette accumulation doit donc attaquer plus intensément le matériau et les produits de dégradation sont évacués rapidement. Ce n'est pas le cas dans le cadre de notre étude car nous avons de petits échantillons.
- Il est également possible que l'intérieur de la caisse d'exposition ne soit pas suffisamment ventilé. L' H_2S et les nutriments présents dans la canalisation vont dans un premier temps interagir avec la caisse puis avec les échantillons de la première ou de la troisième série. Les échantillons de la deuxième série, situés au centre de la caisse seraient donc entourés d'une atmosphère moins nocive pour les matériaux ou moins favorable à la croissance des microorganismes car moins riche en nutriments.
- Une autre hypothèse est que le brossage des échantillons entraîne le retrait de tout le biofilm formé en surface des échantillons. Les matériaux brossés seraient donc mieux protégés puisque tous les quatre mois, un nouveau biofilm se mettrait en place sans qu'il parvienne réellement à mûrir. Les bactéries les plus dégradantes pour les matériaux cimentaires tel qu'*Acidithiobacillus thiooxidans* ne parviendraient pas à s'implanter dans ce biofilm trop jeune.

Les échantillons de mortier à base de ciment Portland (CEM I et CEM III) de la troisième série, utilisés pour l'étude de la colonisation bactérienne, présentent des dégradations plus importantes que celles de la première série (Figure III-32). Cette observation n'a pas été constatée pour les échantillons de mortier à base de ciment d'aluminat de calcium.

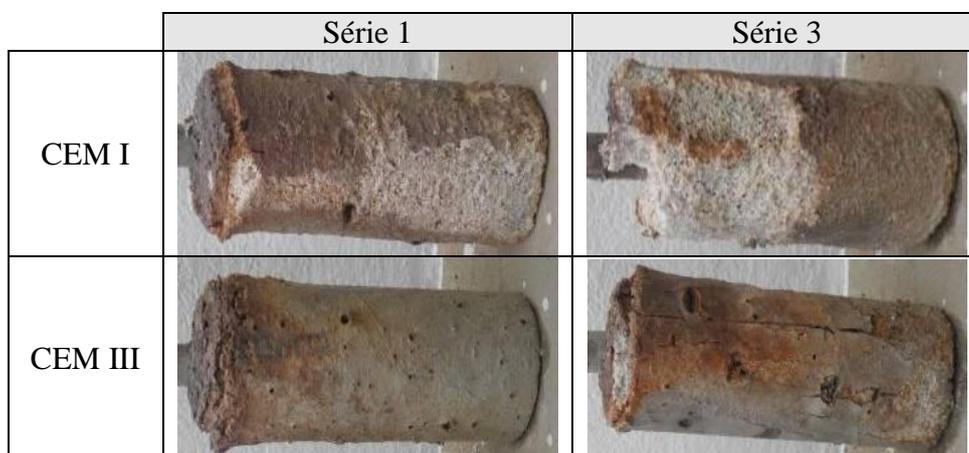


Figure III-32 : Visuels des échantillons de mortier CEM I et CEM III des séries 1 et 3 exposés 496 jours sur le site S2.

La seule différence de traitement entre ces deux séries est le grattage de la surface des échantillons de la troisième série avec une brosse fine imprégnée de guanidine thiocyanate. Deux facteurs peuvent donc expliquer cette différence de comportement, le grattage et/ou le réactif. Il est à noter qu'à chaque échéance, il est possible de retrouver visuellement la zone de prélèvement précédente car une couche formée de dépôts jaunâtre est clairement visible, ce serait donc très certainement l'impact de la guanidine thiocyanate qui interviendrait. Cette molécule est un agent chaotropique utilisé très généralement comme dénaturant protéique ou pour l'extraction de l'ARN et de l'ADN car il lyse les cellules et entraîne la dénaturation des ARNases et des ADNases, qui autrement endommageraient la fraction de matériel génétique extraite. Une possibilité serait donc que le prélèvement réalisé sur le biofilm entraînerait une lyse cellulaire plus ou moins importante et le déversement du contenu protéique et enzymatique à la surface des matériaux. Ainsi, la surface des mortiers deviendrait plus bioréceptive et un nouveau biofilm pourrait se mettre plus facilement en place avec des nutriments plus simples à assimiler qui lui permettraient de croître et de mûrir rapidement.

L'étude réalisée sur l'eau de condensation piégée dans les manches des échantillons permet de mettre en évidence l'impact de l'aluminium sur la croissance microbienne. Cet élément inhibe le développement microbien à partir d'une concentration de 350 mg L^{-1} . Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'impact de l'aluminium sur les microorganismes impliqués dans le processus de biodétérioration. Néanmoins, Ehrich [26] a montré que l'ion Al^{3+} diminue l'activité des bactéries du genre *Thiobacillus* avec une concentration seuil différente suivant les espèces. Pour *Halothiobacillus neapolitanus*, ce seuil est de 250 mg L^{-1} , pour *Starkella novella* de 75 mg L^{-1} , pour *Thiomonas intermedia* de 50 mg L^{-1} et pour *Acidithiobacillus thiooxidans* de 750 mg L^{-1} . Ces chiffres sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus dans notre étude. Une autre étude réalisée par Fischer *et al.* [27] indique qu'*Acidithiobacillus thiooxidans* a un temps de génération (temps nécessaire pour doubler la population bactérienne) qui augmente et une activité qui diminue en présence d'une concentration de sulfate d'aluminium allant de 70 mg L^{-1} à 140 mg L^{-1} . Cette concentration influe sur la croissance d'*A. thiooxidans* sans pour autant l'inhiber totalement.

La spéciation de l'aluminium est un paramètre essentiel pour comprendre les différences de concentration engendrant une inhibition. En effet, cet élément a une chimie qui évolue fortement avec le pH (Figure III-33).

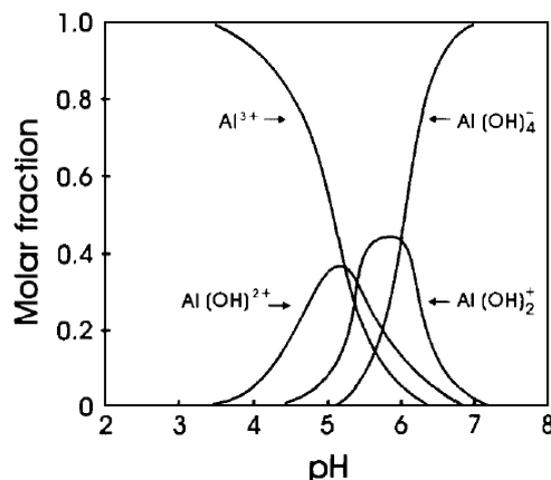


Figure III-33 : Evolution des différentes espèces de l'aluminium en fonction du pH [28].

Bruce et al. [29] ont montré qu'un échantillon de sol à pH 5,8 présentait une concentration initiale en Al^{3+} de 6,3 μM . Un abaissement de son pH à 4,77 la fait augmenter à 700 μM et une augmentation de son pH à 6,22 la diminue à 5 μM . Connaître la concentration exacte des différentes formes ioniques de l'aluminium et identifier celles qui vont influencer sur la croissance bactérienne est donc difficile et doit prendre en compte de nombreux paramètres. De plus, l'aluminium peut précipiter sous forme d' $Al(OH)_3$ ou encore se lier à d'autres ions pour former des complexes, modifiant le milieu initial.

Différents modes d'actions de l'aluminium ont été identifiés (Tableau III-4). L'aluminium est une espèce sans fonction biologique connue et intrinsèquement toxique [30], qui interfère avec de nombreux processus indispensables au bon fonctionnement de la cellule, tant à l'intérieur (influence sur la réplication, sur la production d'ATP) qu'à l'extérieur (influence sur le pH, sur le transport membranaire, sur les enzymes et/ou le substrat). Il peut donc impacter de façon différente de nombreuses souches de microorganismes.

Tableau III-4 : Mécanismes de la toxicité de l'aluminium chez les microorganismes [28].

Mécanisme	Processus affecté
Acidification du milieu	Homéostasie ionique, structure ou fonction des macromolécules
Fixation aux composants de la membrane	Transport membranaire
Fixation aux enzymes ou aux substrats	Processus enzymatique
Substitution au magnésium	Processus métabolique
Inhibition du transport des ions	Homéostasie ionique
Fixation à l'ADN	Réplication ou transcription de l'ADN
Fixation à l'ATP	Processus nécessitant de l'énergie
Inhibition de la synthèse d'ATP	Processus métabolique

III- Conclusion

L'exposition de cinq types d'échantillons de mortier dans des réseaux d'assainissement durant un an et quatre mois a permis de valider les travaux antérieurs concernant la bonne tenue des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium par rapport à ceux à base de ciment Portland. Nous pouvons établir une hiérarchie des matériaux cimentaires étudiés du moins au plus résistant : CEM I < CEM III < CAC+S < CAC+A/CAC+L. Ces essais *in situ* ont également permis d'améliorer les connaissances sur les mécanismes de biodétérioration en mettant en évidence une différence de colonisation des différentes formulations cimentaires ainsi qu'une inhibition de l'activité microbienne à partir de 350 mg L^{-1} d'aluminium en solution.

Ces essais font également ressortir des éléments intéressants qu'il est nécessaire d'étudier en laboratoire pour mieux les comprendre. Dans ce cadre, nous pouvons citer la présence d'une couche colorée dans les tons de jaune, se formant sur la majorité des échantillons, qui pourrait être attribuée à la présence de soufre issu de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré. Par ailleurs, le développement microbien diffère d'une matrice cimentaire à l'autre et il serait donc pertinent de rechercher les éléments qui peuvent influencer sur la population du biofilm en étudiant par exemple l'influence de la source d'électron utilisée préférentiellement par ces microorganismes. Enfin, si on s'intéresse plus particulièrement aux matériaux, nous pouvons également nous demander quel est l'impact réel de l'acide sulfurique produit par les microorganismes sur les différentes matrices cimentaires.

Cette étude *in situ* va se poursuivre pour mieux étudier sur le long terme la biodétérioration des matériaux cimentaires et la colonisation microbienne. Pour ce dernier point, des techniques de biologie moléculaire (pyroséquençage) seront utilisées pour identifier les espèces microbiennes dominantes présentes à la surface des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminat de calcium.

Des améliorations peuvent être proposées pour d'éventuelles futures expositions de matériaux dans les réseaux d'assainissement. Par exemple, l'emploi de microélectrodes de pH de surface qui permettrait d'avoir une valeur chiffrée du pH de l'extrême surface. Le principe même de l'exposition pourrait être amélioré en utilisant une caisse plus ajourée ou mieux ventilée pour favoriser la circulation d'air.

L'un des buts de ce travail est *in fine* la mise au point d'un essai accéléré en laboratoire. Pour que celui-ci soit caractéristique des conditions délétères rencontrées dans les réseaux d'assainissement, il apparaît qu'une concentration d'H₂S proche de celle du site S2 (100 ppm) est suffisante.

III- Références bibliographiques

- [1] Alexander M.G., Goyns A., Fourie C. (2008) Experiences with a full-scale experimental sewer made with CAC and other cementitious binders in Virginia, South Africa – Calcium Aluminate Cement: Proceedings of the Centenary Conference, Avignon, 30 June – 2 July 2008. Fentiman C.H., Mangabhai R.J. and Scrivener K.L. (editors). HIS BRE Press, 2008, EP94. ISBN 978-1-84806-045-6.
- [2] Fourie C.W. (2002) Biologically induced sulphuric acid attack on concrete samples in the experimental sewer section at Virginia. Department of Civil Engineering, University of Cape Town, 18 novembre 2002.
- [3] Okabe S., Odagiri M., Ito T., Satoh H. (2007) Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 971-980.
- [4] Satoh H., Odagiri M., Ito T., Okabe S. (2009) Microbial community structures and *in situ* sulfate-reducing and sulfur-oxidizing activities in biofilms developed on mortar specimens in a corroded sewer system. *Water Research*, 43, 4729-4739.
- [5] <http://www.awmc.uq.edu.au/index.html?page=84398&pid=0>
- [6] Travaux de M. Valix (communication personnelle)
- [7] CSR Humes (1997) Pipeline Materials in H₂S, 1977 Werribee Pipeline – Information Series of CSR Humes, NPD0101.
- [8] Mori T., Nonaka T., Tazaki K., Koga M., Hikosaka Y., Noda S. (1992) Interactions of nutrients, moisture, and pH on microbial corrosion of concrete sewer pipes. *Water Research*, 26, 29-37.
- [9] Mori T., Koga M., Nonaka T., Mishina F., Sakai Y., Koizumi J. (1991) Microbial corrosion of concrete sewer pipes, H₂S production from sediments and determination of corrosion rate. *Water Science and Technology*, 23, 1275-1282.
- [10] Tazaki K., Mori T., Nonaka T. (1992) Microbial jarosite and gypsum from corrosion of Portland cement concrete. *Canadian Mineralogist*, 30, 431-444.
- [11] Goyns A. (2001) Calcium aluminate cement linings for cost-effective sewers. International Conference on CAC, Edinburgh 16-19 July 2001, 617-631, ISBN: 1-86125-142-4.

- [12] Goyns A. (2003) Virginia sewer rehabilitation, Progress report n° 1 – PIPES, 21.
- [13] Saricimen H., Shameem M., Barry M.S., Ibrahim M., Abbasi T.A. (2003) Durability of proprietary cementitious materials for use in wastewater transport systems. *Cement and Concrete Composites*, 25, 421-427.
- [14] LCA reference Sheet.
<http://www.kerneosinc.com/pdfs/HRSD%20SewperCoat%20Reference%20R%2006-03.pdf>
- [15] LCA reference sheet 02/95.
<http://www.kerneosinc.com/pdfs/ormondbeach.pdf>
- [16] LCA reference sheet 04/95.
<http://www.kerneosinc.com/pdfs/Trunk%20Line%20page.pdf>
- [17] Les pathologies des réseaux d'assainissement, dossier technique, LERM Lettre d'information n°9, octobre 2008.
http://www.lerm.fr/lerm/Newsletter/Newsletter9/lerm_Newsletter9_pathologie.shtml
- [18] De Belie N., Monteny J., Beeldens A., Vincke E., Van Gemert D., Verstraete W. (2004) Experimental research and prediction of the effect of chemical and biogenic sulfuric acid on different types of commercially produced concrete sewer pipes. *Cement and Concrete Research*, 34, 2223-2236.
- [19] Chang Z.T., Song X.J., Munn R., Marosszeky M. (2005) Using limestone aggregates and different cements for enhancing resistance of concrete to sulphuric acid attack. *Cement and Concrete Research*, 35, 1486-1494.
- [20] Girardi F., Vaona W., Di Maggio R. (2010) Resistance of different types of concretes to cyclic sulfuric acid and sodium sulfate attack, *Cement and Concrete Composites*, 32, 595-602.
- [21] Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003) Microbiologie. Livre édition De Boek. ISBN-10 : 2804142566, ISBN-13 : 978-2804142568, 1137 pages.
- [22] Roberts D.J., Nica D., Zuo G., Davis J.L. (2002) Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, 227-234.
- [23] Nishimura, S., Yoda, M. (1997) Removal of hydrogen sulfide from an anaerobic biogas using a bio-scrubber. *Water Science and Technology*, 36, 349-356.
- [24] Schieder, D., Quicker, P., Scheinder, R., Winter, H., Prechtel, S., Faulstich, M. (2003) Microbiological removal of hydrogen sulfide from biogas by means of a separate biofilter system: Experience with technical operation. *Water Science and Technology*, 48, 209-212.
- [25] Hirayama, A., Vetter, R.D. (1989) Kinetics of sulfide and thiosulfate oxidation by the hydrothermal vent Bacterium *Thiomicrospira crunogina* and comparison with *Thiobacillus neapolitanus*. Abstract I43. Proceedings of the annual meeting - 1989 American Society of Microbiology, Washington, DC.
- [26] Ehrlich, S. (1998) *Untersuchungen zur biogenen Schwefelsäurekorrosion von zementgebundenen Baustoffen*, PhD dissertation.
- [27] Fischer J., Quentmeier A., Gansel S., Sabados V., Friedrich C.G. (2002) Inducible aluminum resistance of *Acidiphilium cryptum* and aluminum tolerance of other acidophilic bacteria, *Archive of Microbiology*, 178, 554-558.
- [28] Guarcidueñas Piña R., Cervantes C. (1996) Microbial interactions with aluminium, *BioMetals*, 9, 311-316.
- [29] Bruce R.C., Warrell L.A., Edward D.G., Bell L.C. (1988) Effects of aluminum and calcium in the soil solution of acid soils on root elongation of *Glycine max* cv. Forrest, *Agricultural Research*, 38, 319-338.
- [30] Silver S. (1983) Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad. In: Westbroek P., DeJong E.W., eds. *Biomining and Biological Metal Accumulation*. Dordrecht: Reidel, 439-457.

Chapitre IV

ETUDE DES MECANISMES DE BIODETERIORATION

IV- Introduction

D'après la littérature, les mécanismes de biodétérioration qui conduisent à la ruine des structures en béton dans les réseaux d'assainissement peuvent être analysés comme un enchainement de trois phases avec tout d'abord la réduction abiotique du pH, causée par l'action du dioxyde de carbone et de l'hydrogène sulfuré, jusqu'à des pH de l'ordre de 9 puis la mise en place d'une succession de microorganismes neutrophiles qui abaissent le pH des matériaux cimentaires jusqu'à un pH de 4. Enfin, des microorganismes acidophiles colonisent la surface des matériaux cimentaires et produisent de grandes quantités d'acide sulfurique qui entraîne la dissolution de la matrice cimentaire ainsi que la formation de produits non cohésifs et/ou expansifs tels que le gypse et/ou l'ettringite. Du point de vue du matériau, la biodétérioration peut être considérée comme un enchainement de quatre étapes (Figure IV-1). La première est l'oxydation, à la surface du béton de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire. Cette oxydation serait réalisée par voie chimique et biologique [1-4] mais la voie abiotique serait prépondérante dans la première phase du phénomène de biodétérioration. La deuxième est l'utilisation, comme source d'énergie par les bactéries sulfo-oxydantes, des molécules soufrées présentes à la surface du béton qui vont être oxydées en acide sulfurique. Cet acide va diffuser, dans une troisième étape, à travers une couche de détérioration (si elle est présente) et attaquer dans une dernière étape le matériau sain sous jacent.

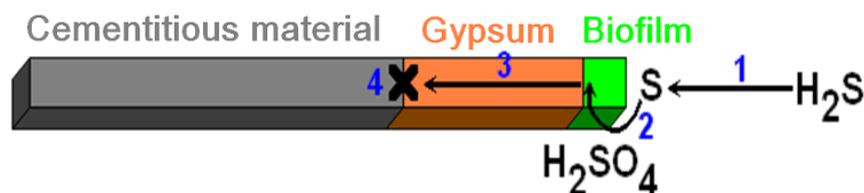


Figure IV-1 : Représentation schématique des quatre étapes de la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement.

Les essais réalisés sur site (voir Chapitre III) montrent que les matériaux cimentaires n'ont pas tous le même comportement face à la biodétérioration. Des essais complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre notamment l'impact direct de l'hydrogène sulfuré sur les différentes formulations cimentaires, l'influence de la source de soufre utilisée par les microorganismes ainsi que les mécanismes mis en jeu lors des attaques acides.

Ce chapitre a pour but de mieux comprendre le processus de biodétérioration en étudiant en laboratoire chaque étape du processus, de manière indépendante et contrôlée, afin de faire ressortir les différences entre les matériaux et d'identifier les meilleures conditions de détérioration à employer pour la réalisation d'un essai accéléré.

IV-1. Oxydation abiotique de l' H_2S

D'après Roberts *et al.* [5] et Islander *et al.* [6], le processus de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement débute par une réduction abiotique du pH de surface engendrée par l'impact du CO_2 (carbonatation) et de l' H_2S qui permet aux microorganismes de coloniser la surface. Selon les travaux de Joseph *et al.* [7], cette première réduction abiotique du pH serait essentiellement due à l' H_2S présent dans l'atmosphère. Ce sulfure d'hydrogène au contact des matériaux cimentaires va s'oxyder en différentes molécules qui pourront être utilisées, lors de la colonisation de la surface, comme source d'électrons par les microorganismes (source d'énergie). Très peu de données sont publiées sur

le devenir de l' H_2S à la surface des matériaux cimentaires et plus particulièrement ceux à base de ciment d'aluminat de calcium. Il nous a donc semblé indispensable d'étudier cet aspect.

Le but de cette étude est triple puisqu'elle vise tout d'abord à évaluer si la transformation abiotique de l' H_2S en une autre espèce soufrée est possible à pression atmosphérique avec une humidité relative et une température données. Le deuxième objectif est de mettre en évidence l'influence de certains des constituants des matériaux cimentaires sur cette transformation. Enfin, le dernier objectif est d'étudier l'influence de la concentration d' H_2S sur différents types de matrices cimentaires.

IV-1.1. Matériaux, matériels et méthodes

IV-1.1.1. Matériaux

Dans le cadre de cette étude, différents types de matériaux ont été testés. Tout d'abord, les cinq formulations cimentaires étudiées dans ce travail (CEM I, CEM III, CAC+S, CAC+L et CAC+A) et décrites dans le chapitre II. Ensuite, d'autres matériaux ont été utilisés de manière plus ponctuelle : du fer, de l'aluminium, du verre, des granulats siliceux (Palvadeau) et des granulats calcaires (Boulonnais). Ces matériaux ont été choisis car ce sont des composés que l'on retrouve tels quels ou sous forme ionique en plus ou moins grande quantité dans les matériaux cimentaires.

Les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminat de calcium peuvent subir un phénomène de conversion (voir annexe b). Les hydrates métastables initiaux évoluent vers des hydrates thermodynamiquement plus stables modifiant ainsi la conformation et donc les propriétés du matériau cimentaire. Des matériaux à base de ciment d'aluminat de calcium convertis et non convertis ont donc été exposés pour connaître l'influence de ce paramètre sur la transformation abiotique de l' H_2S .

IV-1.1.2. Matériels et méthodes

Les échantillons sont répartis dans un réacteur à double paroi hermétiquement fermé de 7 L (Figure IV-2). La température est maintenue à 30 ± 1 °C par une circulation d'eau à partir d'un bain thermostaté. L'humidité relative est contrôlée par des solutions salines et l' H_2S est apporté dans le réacteur en flux continu à une concentration de 20 ou 50 ppm. Un flacon laveur contenant de l'acétate de zinc est ajouté en sortie de réacteur pour précipiter l' H_2S en ZnS .

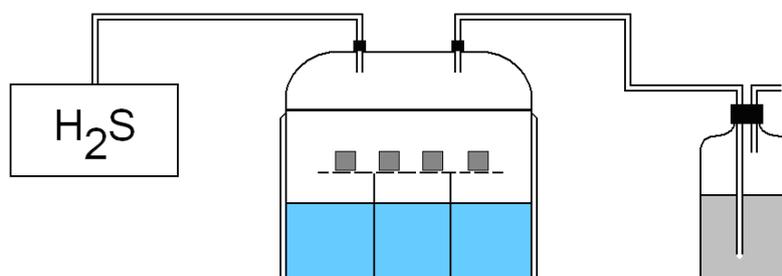


Figure IV-2 : Schéma du montage pour étudier l'oxydation abiotique de l' H_2S .

L'étude de l'influence de l'humidité relative a été réalisée grâce à l'emploi de trois humidités relatives sous un flux constant de 20 ppm d' H_2S . La première humidité relative n'est pas

contrôlée et représente une humidité relative faible (< 30%). La deuxième est obtenue en utilisant une solution saline saturée de chlorure de sodium qui impose une humidité relative de 75%. La dernière a été choisie à saturation et, pour cela, les échantillons sont imprégnés d'eau sous vide puis exposés au-dessus d'eau distillée. Ces essais ont été réalisés avec un nombre limité d'échantillons (CEM I, CAC+S et CAC+A) pour évaluer la possibilité de l'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré. Chaque matériau cimentaire à base de ciment d'aluminate de calcium a été utilisé sous deux états de conversion.

L'étude de l'influence des différents matériaux constitutifs des mortiers a été réalisée uniquement à 100% d'humidité relative et sous un flux continu de 20 ppm d'H₂S.

Enfin, l'influence de la concentration d'H₂S (20 et 50 ppm) a également été étudiée à 100% d'humidité relative avec l'ensemble des matériaux cimentaires étudiés dans le cadre de ce travail de recherche (CEM I, CEM III, CAC+S, CAC+L et CAC+A).

Le réacteur est ouvert une fois par mois pour récupérer un échantillon de chaque matériau. L'étude de l'influence de l'humidité relative a duré un mois alors que l'étude de l'influence de la concentration d'H₂S a duré trois mois pour estimer la cinétique de la réaction.

Après exposition, chaque échantillon est observé par microscopie électronique à balayage sous faible vide à 25 kV et sans aucune préparation pour s'affranchir d'une éventuelle pollution due à la métallisation. Des mesures de la teneur en soufre ont été réalisées par EDS (*Energy-Dispersive X-ray Spectrometry*) à un grandissement de quarante (surface étudiée ≈ 10,6 mm²) sur trois zones de chaque échantillon pour estimer la quantité de soufre déposée à chaque échéance. Par ailleurs, des cartographies du soufre ont également été réalisées par EDS pour connaître la répartition de cet élément à la surface des échantillons.

IV-1.2. Résultats

IV-1.2.1. Influence de l'humidité relative

Cette première étude vise à étudier l'impact de l'humidité relative sur l'oxydation abiotique de l'H₂S. Deux états de conversion des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium ont été utilisés afin d'en étudier l'influence sur l'oxydation abiotique de l'H₂S.

Les observations réalisées à une humidité relative faible sont comparables à celles pour des surfaces sans exposition à l'H₂S (Tableau IV-1). Ce premier point montre l'importance de la présence d'eau à la surface des échantillons pour l'oxydation abiotique de l'H₂S.

Les échantillons de mortier de type CEM I exposés à 20 ppm d'H₂S présentent des quantités de soufre différentes suivant l'humidité relative considérée (Tableau IV-1). Les teneurs en soufre sont similaires pour un échantillon de mortier exposé à 75% d'humidité relative et 100% d'humidité relative.

Les échantillons de mortier au ciment d'aluminate de calcium (CAC+S et CAC+A) non convertis exposés à 20 ppm d'H₂S et à des humidités relatives variables ne présentent pas d'évolution majeure dans la quantité de soufre déposée (Tableau IV-1). Il semble que la transformation de l'H₂S en soufre élémentaire soit tout de même légèrement plus importante à 75% d'humidité relative. Au contraire, ces mêmes échantillons convertis présentent une variation de la quantité de soufre déposé suivant l'humidité relative. La formation de cristaux

de soufre est deux fois plus importante à 75% d'humidité relative qu'à 100% d'humidité relative. De plus, moins de soufre se dépose sur les matériaux convertis par rapport aux matériaux non converti quelle que soit l'humidité relative considérée.

Tableau IV-1 : Pourcentage de soufre mesuré à la surface des échantillons exposés à une humidité relative variable à 20 ppm d'H₂S pendant un mois (moyenne de 6 mesures).

	CEM I	CAC+S		CAC+A	
		non converti	converti	non converti	converti
Sans exposition	0,19 ± 0,09	0,11 ± 0,08	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,06	0,14 ± 0,05
HR = 75%	1,74 ± 0,08	1,36 ± 0,11	0,82 ± 0,24	1,48 ± 0,07	1,85 ± 0,12
HR = 100%	1,41 ± 0,17	1,18 ± 0,17	0,48 ± 0,07	1,18 ± 0,08	0,89 ± 0,07

Le soufre se forme de manière hétérogène à la surface des matériaux (Figure IV-3) et préférentiellement sur la pâte de ciment sauf dans le cas du mortier CAC+A qui a une matrice totalement alumineuse et où le soufre se dépose de façon plus homogène.

En conclusion, nous noterons que l'hydrogène sulfuré s'oxyde bien de manière abiotique en soufre élémentaire à la surface des matériaux cimentaires étudiés. Cette transformation s'effectue en présence d'un film d'eau créé par une humidité relative importante. Nous pouvons constater qu'une humidité relative inférieure à 100% favorise cette transformation comme c'est aussi le cas avec la carbonatation du béton qui est accélérée dans un domaine d'humidité relative comprise entre 60 et 80%. Cette transformation semble être plus difficile à la surface des granulats siliceux que sur la pâte de ciment. Enfin, la conversion des mortiers au ciment d'aluminate de calcium joue un rôle dans la transformation de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire.

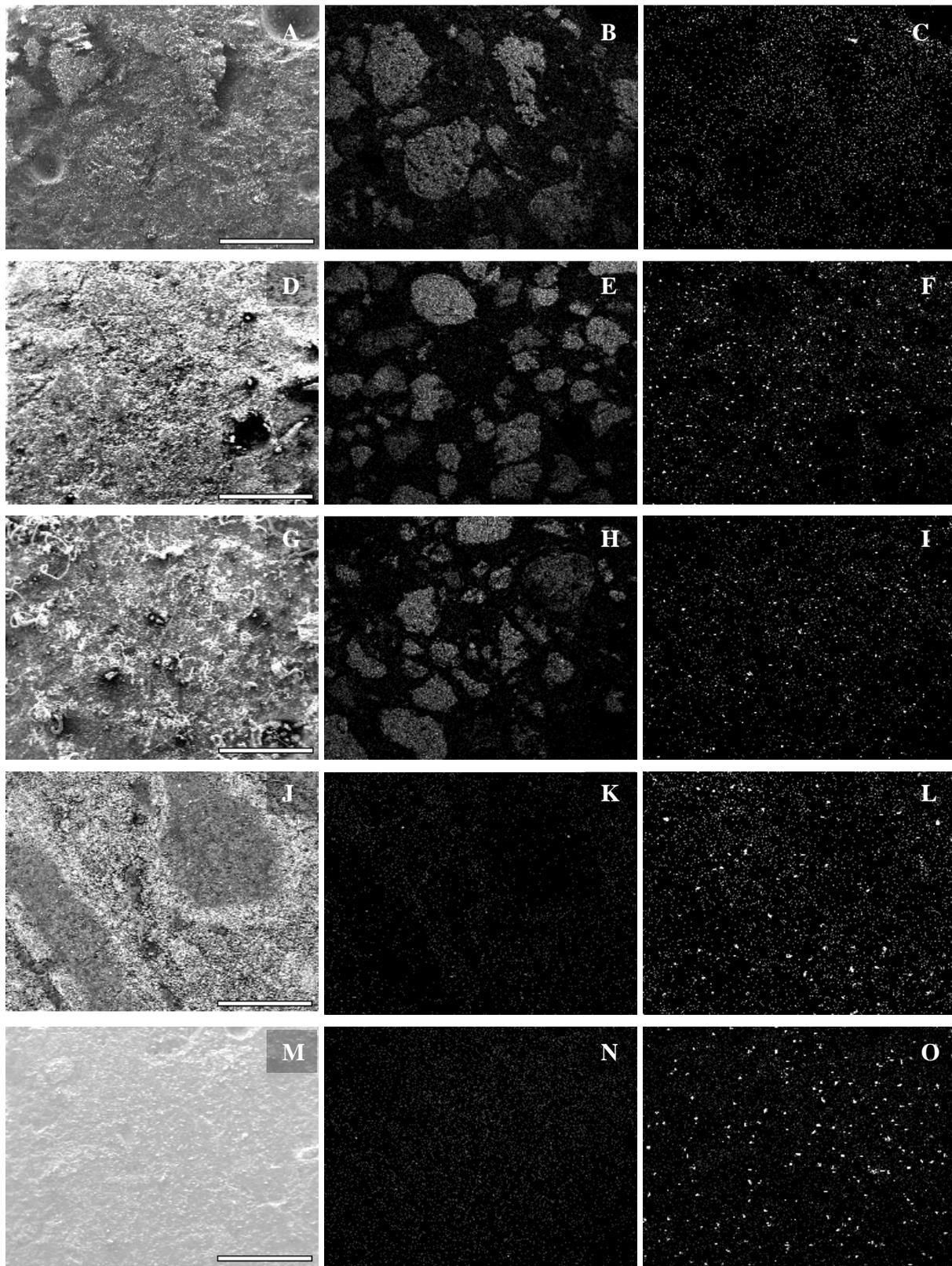


Figure IV-3 : Observations MEB des échantillon de mortier CEM I (A à C), CAC+S non converti (D à F), CAC+S converti (G à I), CAC+A non converti (J à L) et CAC+A converti (M à O) exposé à 20 ppm d' H_2S et 75% d'humidité relative pendant un mois, (A, D, G, J et M) en électron secondaire, (B, E, H, K et N) cartographies du silicium, (C, F, I, L et O) cartographies du soufre. La barre blanche représente 1 mm.

IV-1.2.2. Influence des éléments constitutifs des mortiers

Un matériau cimentaire peut être assimilé à une matrice complexe composée d'éléments simples. L'étude de l'oxydation abiotique de l' H_2S sur des matériaux cimentaires doit donc passer par des expositions de matériaux ou d'éléments à la base des mortiers étudiés. Ainsi nous avons soumis pendant trois mois et dans les mêmes conditions cinq matériaux de base (fer, aluminium, verre, granulats Palvadeau et Boulonnais) à 20 ppm d' H_2S .

Le fer exposé à de l' H_2S se dégrade, les produits de corrosion se développent en surface et croissent avec le temps. Les cartographies réalisées sur les zones corrodées (Figure IV-4) révèlent la présence d'une quantité importante de soufre (Tableau IV-2) mais les surfaces encore saines en sont exemptes. Il existe donc une corrélation entre la présence d' H_2S et les dépôts de produits de corrosion présents en surface du matériau.

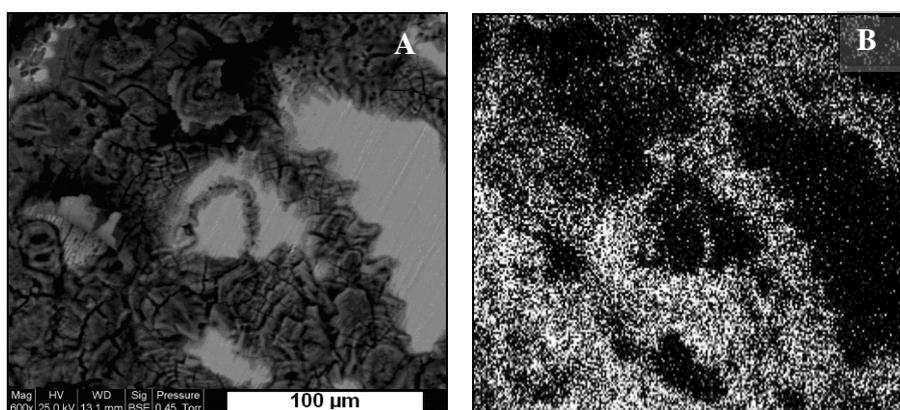


Figure IV-4 : (A) Observation au MEB de l'échantillon de fer exposé trois mois à 20 ppm d' H_2S et (B) cartographie du soufre associée.

L'aluminium n'a pas été altéré, il a gardé son apparence initiale tout au long de l'essai. L'aluminium semble donc très peu favorable à la formation de complexes soufrés ou au dépôt de soufre (Tableau IV-2).

L'analyse des échantillons de verre n'a pas révélé d'évolution de la quantité de soufre formé au cours du temps (Tableau IV-2). En effet, quand il est présent, le soufre est associé à des particules exogènes de fer, de cuivre ou de zinc. Le verre en lui-même ne semble pas fixer ou favoriser le dépôt de soufre résultant d'une oxydation de l' H_2S .

Les granulats Palvadeau sont totalement siliceux. Au bout d'un mois, du soufre apparaît sur leur surface (Tableau IV-2) associé à des particules exogènes de fer, de zinc ou de cuivre (résidus de sciage).

Les granulats Boulonnais sont totalement calcaires. L'exposition à de l' H_2S conduit à une très faible quantité de soufre (Tableau IV-2) qui s'est déposé de manière hétérogène et ponctuelle. Encore une fois, ce soufre est associé à des particules de fer exogènes.

Tableau IV-2 : Pourcentage de soufre mesuré à la surface des échantillons exposés pendant trois mois à 20 ppm d'H₂S (moyenne de 6 mesures).

	Sans exposition	1 mois	2 mois	3 mois
Fer	0,24 ± 0,08	0,19 ± 0,07	1,75 ± 1,04	1,96 ± 0,16
Aluminium	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,10	0,12 ± 0,04	0,04 ± 0,04
Verre	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04
Granulats Palvadeau	0,07 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,07
Granulats Boulonnais	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,82 ± 0,89

IV-1.2.3. Influence de la concentration d'H₂S

Avec 20 ppm d'H₂S, seul le mortier à base de ciment CEM I présente une légère augmentation de la concentration en soufre (Figure IV-5) qui est corrélée avec l'observation de cristaux de soufre en surface du mortier. Les autres matériaux ont une valeur de fond plus élevée mais qui n'évolue pas. Pour 50 ppm, on retrouve du soufre sur tous les matériaux mais en concentration plus importante sur les matériaux cimentaires à base de ciment Portland (CEM I et CEM III).

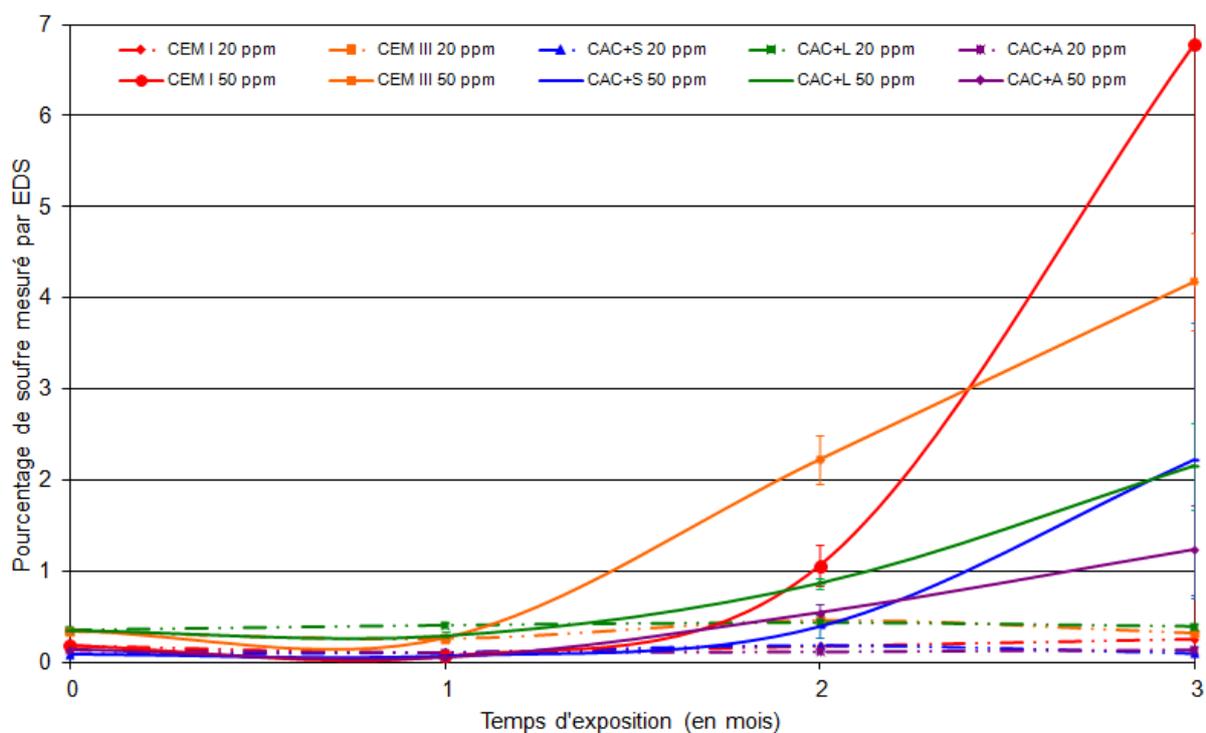


Figure IV-5 : Evolution du pourcentage de la proportion de soufre à la surface des échantillons de mortiers au cours du temps pour 20 et 50 ppm d'H₂S.

Les analyses des échantillons de mortier CEM I révèlent une répartition particulière du soufre. Au bout de deux mois d'exposition à 20 ppm d' H_2S , des cristaux de soufre se forment à l'interface entre la pâte de ciment et les granulats (Figure IV-6).

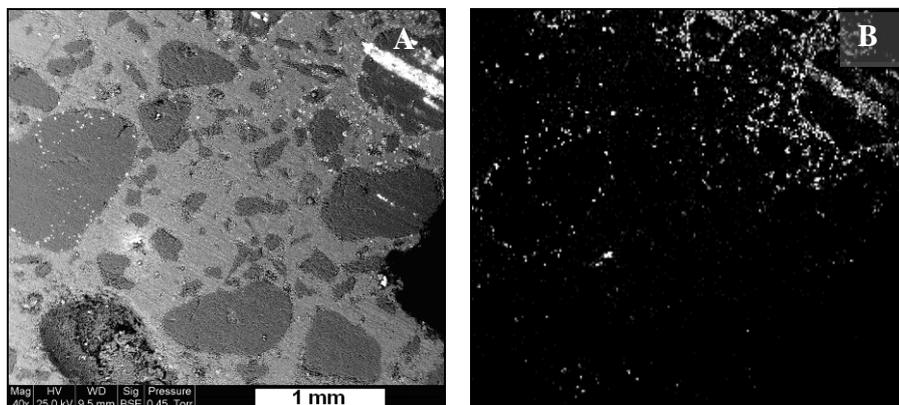


Figure IV-6 : (A) Observation au MEB de l'échantillon de mortier CEM I exposé deux mois à 20 ppm d' H_2S en électron rétrodiffusé et (B) cartographie du soufre associée.

Ces cristaux sont également retrouvés sur des particules exogènes de cuivre et de zinc. Lors d'une exposition à 50 ppm d'hydrogène sulfuré, le soufre est retrouvé en plus grande quantité qu'à 20 ppm (x20 ; Figure IV-5) et sa répartition devient plus homogène. La Figure IV-7 présente un cristal de soufre typique formé sur un échantillon de mortier à base de ciment CEM I en trois mois sous 50 ppm d' H_2S . Ces cristaux de soufre font en moyenne $34 \pm 9 \mu\text{m}$ de long.

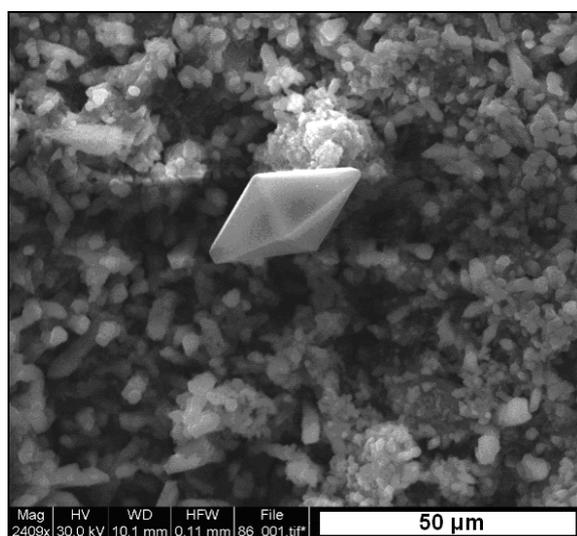


Figure IV-7 : Cristal de soufre observé au MEB sur un échantillon de mortier CEM I après trois mois d'exposition à 50 ppm d' H_2S .

Les échantillons de mortier CEM III présentent initialement une faible proportion de soufre dans la pâte de ciment. A 20 ppm d' H_2S , le soufre se dépose essentiellement sur les dépôts exogènes de cuivre et de zinc. Lorsque ces mortiers sont exposés à 50 ppm d' H_2S , le soufre va se déposer en grande quantité sur toute la surface du matériau (Figure IV-5) mais préférentiellement sur la pâte de ciment. La Figure IV-8 présente des cristaux de soufre formés sur de la pâte de ciment. Ces cristaux de $23 \pm 5 \mu\text{m}$ de long sont nombreux mais mal formés.

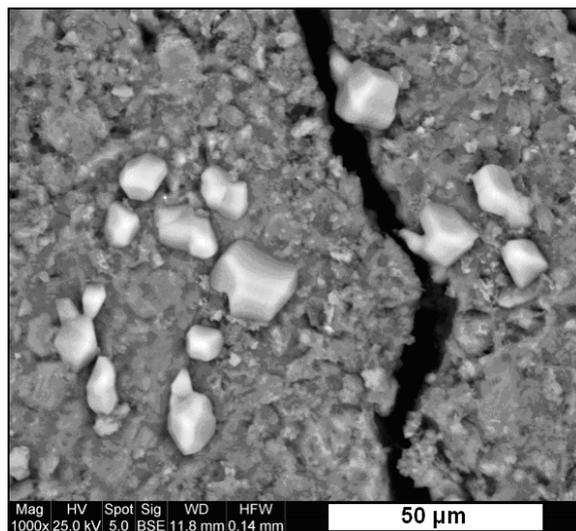


Figure IV-8 : Cristaux de soufre observé au MEB sur un échantillon de mortier CEM III après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H₂S.

Les échantillons de mortiers CAC+S présentent initialement très peu de soufre dans la pâte de ciment. Au bout de trois mois d'exposition à 20 ppm d'H₂S, le soufre est retrouvé de manière ponctuelle et en faible quantité (<1%). Ce type de mortier n'est donc pas favorable au dépôt de soufre ou à la formation de complexes soufrés. Après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H₂S, vingt fois plus de soufre est retrouvé en surface des échantillons (Figure IV-5). Il est principalement mis en évidence sur la pâte de ciment. Les cristaux observés (Figure IV-9) présentent une forme bipyramidale de $27 \pm 5 \mu\text{m}$ de long mais avec la présence de trous plus ou moins importants sur les faces des cristaux.

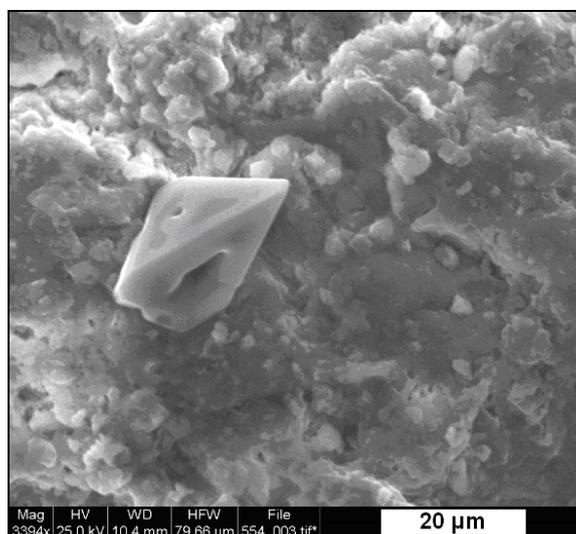


Figure IV-9 : Cristal de soufre observé au MEB sur un échantillon de mortier CAC+S après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H₂S.

Les mortiers CAC+L possèdent initialement une faible proportion de soufre dans la pâte de ciment ($\approx 0,5\%$). L'exposition à 20 ppm d'H₂S pendant 3 mois n'a pas modifié cette quantité. Les mortiers CAC+L ne sont donc pas favorables au dépôt de soufre ou à la formation de complexes soufrés. Lorsqu'ils sont exposés à 50 ppm d'H₂S, ces matériaux se couvrent de six fois plus de soufre qu'à 20 ppm (Figure IV-5) qui se dépose de manière préférentielle sur la pâte de ciment en formant des cristaux imparfaits de $30 \mu\text{m}$ de long (Figure IV-10) avec la présence de trous comme pour l'échantillon CAC + S.

Les cristaux formés sur les granulats siliceux (Figure IV-10-A) s'éloignent de la forme caractéristique des cristaux de soufre par rapport à ceux formés sur un gel d'alumine (Figure IV-10-B) mais ces derniers arborent des trous dans leur structure. Les cristaux rencontrés à la surface de ces échantillons ont une longueur de $29 \pm 7 \mu\text{m}$.

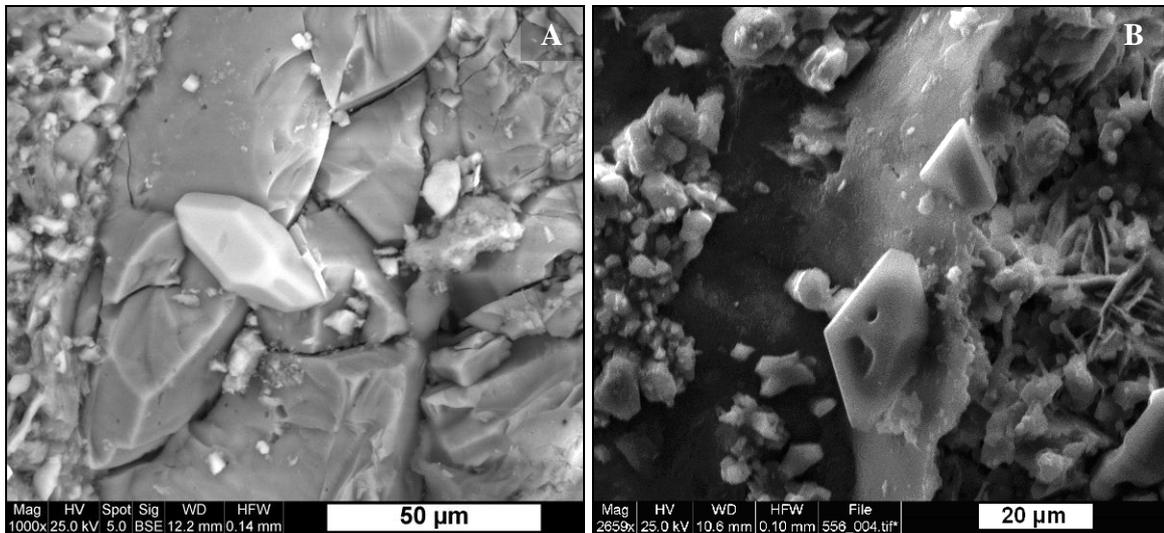


Figure IV-10 : Cristaux de soufre observés au MEB sur un échantillon de mortier CAC+L après trois mois d'exposition à 50 ppm d' H_2S , sur un granulat (A) et sur un gel d'alumine (B).

Les échantillons de mortier CAC+A sont des matériaux possédant peu de soufre initialement (0,14%). L'apport d' H_2S à 20 ppm pendant 3 mois n'a que très peu modifié la proportion de soufre présent en surface du matériau (<1%). Les échantillons de mortier CAC+A ne sont donc pas favorables au dépôt de soufre ou à la formation de complexes soufrés. Il en va de même pour une exposition à 50 ppm d'hydrogène sulfuré (Figure IV-5). Les granulats ayant la même composition chimique que la matrice cimentaire n'ont pas d'impact sur l'oxydation de l'hydrogène sulfuré.

Les cristaux de soufre de $31 \pm 5 \mu\text{m}$ de long et de forme plus ou moins bipyramidale (Figure IV-11) ont une répartition hétérogène à la surface des échantillons. On peut remarquer que les cristaux formés sur le gel d'alumine présentent un faciès particulier. Ils gardent la forme bipyramidale mais leur surface semble être transparente, laissant penser qu'elle présente une composition chimique différente. Les analyses EDS ne sont toutefois pas assez fines pour dégager des différences de composition entre le cœur et la périphérie de ces cristaux.

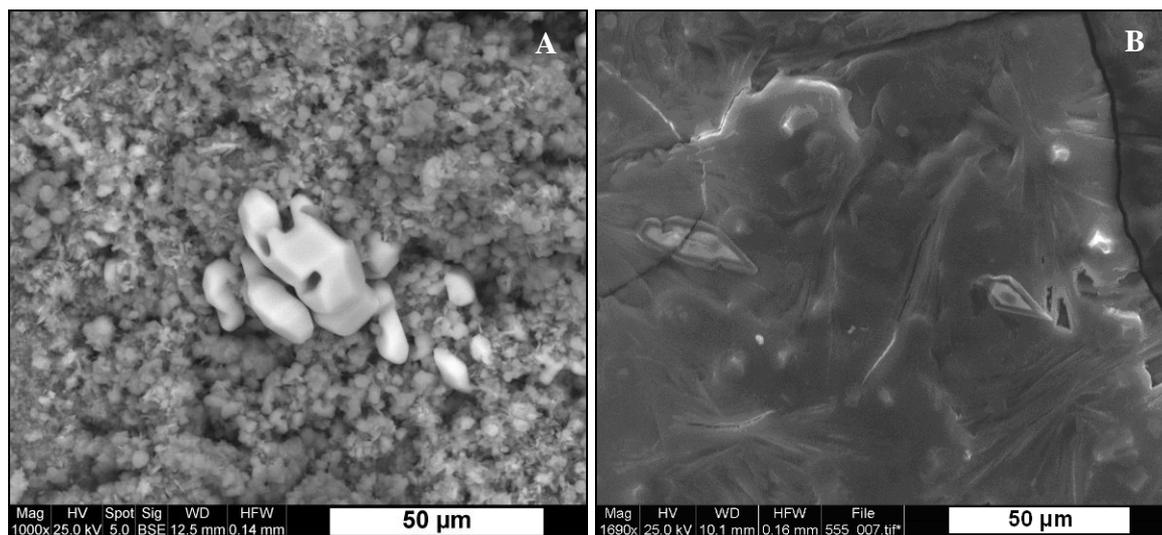


Figure IV-11 : Cristaux de soufre observés au MEB sur un échantillon de mortier CAC+A après trois mois d'exposition à 50 ppm d'H₂S, sur un granulat (A) et sur un gel d'alumine (B).

Ces études montrent de manière générale que le soufre se répartit de manière ponctuelle et hétérogène à la surface des matériaux et en périphérie des granulats dans le cas du CEM I à 20 ppm d'H₂S. Il semble que la présence de cations métalliques (fer, cuivre ou zinc) ou de calcium soit indispensable à l'oxydation abiotique de l'H₂S.

Au bout de trois mois d'exposition, des cristaux de soufre sont retrouvés à la surface de tous les échantillons exposés à 50 ppm d'H₂S. Ces cristaux font en moyenne 24 ± 7 µm de long mais sont mieux formés sur le CEM I que sur les échantillons contenant du ciment d'aluminat de calcium ou du laitier. La présence de gel d'alumine semble influencer sur la formation des cristaux de soufre en surface des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminat de calcium. Des interactions particulières entre l'hydrogène sulfuré et les ions aluminium issu de la couche d'alumine pourraient venir perturber l'oxydation de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire.

IV-1.3. Discussion

L'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire est possible à pression atmosphérique et sous une température de 30°C mais elle varie en fonction de certains paramètres comme l'humidité relative et les paramètres physicochimiques des matériaux étudiés (composition, humidité relative, conversion).

L'humidité relative a une influence importante sur la faisabilité de cette réaction, la formation de soufre ne se faisant qu'à haute humidité. D'après une étude récente réalisée par Joseph *et al.* [7], la quantité de soufre élémentaire retrouvée à la surface d'un échantillon de béton exposé à une concentration d'H₂S de 20 à 50 ppm pendant un an est plus importante à 100% d'humidité relative qu'à 85-90% d'humidité relative. Nos travaux semblent indiquer un comportement différent puisqu'en un mois, nous obtenons une quantité de soufre élémentaire comparable pour deux humidités relatives mais la durée d'exposition a sans doute une influence notable sur la quantité de soufre déposée. Ainsi, l'oxydation se déroule dans un milieu liquide puisqu'une forte humidité relative implique l'établissement d'une fine couche d'eau en surface des matériaux qui va permettre la mise en solution de l'H₂S. Comme les réseaux d'assainissement présentent la plupart du temps une humidité relative élevée

permettant la condensation, l'oxydation abiotique de l' H_2S est donc possible à la surface de ces ouvrages en béton.

L'oxydation de l'hydrogène sulfuré en présence de matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium convertis est fortement dépendante de l'humidité relative. La quantité de soufre retrouvée à 75% d'humidité relative est deux fois plus importante qu'à 100% d'humidité relative tandis que les matériaux non convertis ont des quantités de soufre formé plus proches. La conversion est un phénomène par lequel les hydrates métastables (CAH_{10} et C_2AH_8) se convertissent en hydrates thermodynamiquement stables (C_3AH_6). Les hydrates passent d'une structure hexagonale à une structure cubique ce qui entraîne une augmentation de la porosité. Cette variation est potentiellement la cause de la différence de comportement des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium.

Des études menées sur l'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré directement en solution [8-11] ont montré qu'il existe un temps d'induction (ou de latence) pour l'oxydation des sulfures (Figure IV-12) attribuable à un mécanisme en chaîne. Ce temps d'induction se traduit par un délai entre le moment où les conditions de sursaturation sont créées et celui où l'oxydation est effectivement observée.

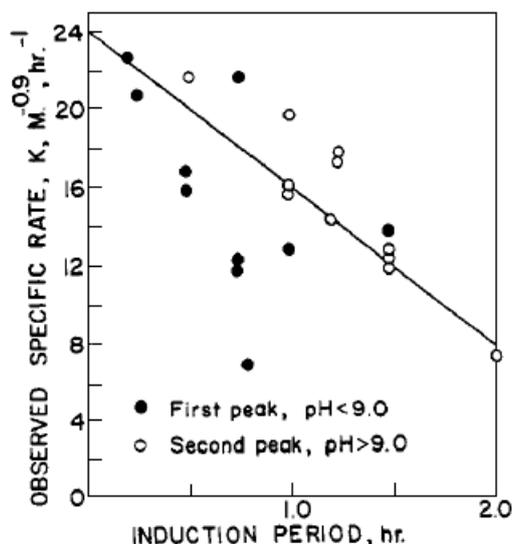


Figure IV-12 : Vitesse d'oxydation d' H_2S en fonction du temps de latence [8].

En solution, cette période de latence varie de quelques heures à plusieurs jours. Elle est de l'ordre de l'heure pour Chen et Morris [8], de 8 heures à 4 jours pour Chiu et Meehan [9], de 8 à 24 heures pour O'Brien et Birkner [10] et de 8 heures pour Steudel [11]. Dans le cas de notre étude, elle semble beaucoup plus importante puisqu'il est parfois nécessaire d'attendre plusieurs mois pour obtenir une évolution de la teneur en soufre sur les matériaux. Ceci peut s'expliquer par le fait que pour arriver à oxyder l' H_2S de façon abiotique, il est nécessaire de passer par un état de saturation en H_2S de la couche d'eau retrouvée en surface des matériaux.

Le soufre est toujours présent de manière ponctuelle et hétérogène à la surface des matériaux et le plus généralement associé à des particules métalliques (fer, cuivre, zinc) ou à des zones plus fortement concentrées en calcium. Il semble donc nécessaire qu'un site de sorption soit présent pour activer le phénomène et permette aux cristaux de soufre de se constituer et de croître. Cependant, tous les métaux ne participent pas à l'oxydation de l' H_2S car l'aluminium

n'a pas favorisé cette oxydation. L'ensemble des couples oxydant/réducteur ne peuvent donc pas intervenir dans l'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré.

Cette hypothèse est validée par Steudel [12] qui fournit également un mécanisme réactionnel pour des oxydants mettant en jeu un électron. Selon ses travaux, l'oxydation de l' H_2S en soufre élémentaire se déroule dans un milieu aqueux dans lequel l' H_2S , sous forme d' HS^- , s'oxyde en soufre élémentaire par l'intervention d'oxydants métalliques échangeant un électron selon les réactions 1 et 2. Les matériaux cimentaires ayant un pH basique, cette transformation est possible.

Les ions hydrosulfure (HS^-) réagissent en présence d'ions métalliques (M^{n+}) pour former du soufre élémentaire (Réaction IV-1). Les ions métalliques vont ensuite être régénérés en présence d'oxygène et de protons (Réaction IV-2).



Le soufre élémentaire formé suivant la réaction 1 est noté S^0 pour représenter son état d'oxydation mais consiste principalement en du soufre cyclique S_8 qui se construit étape par étape à partir de précurseurs ou d'ions.

En soumettant de l' HS^- à un oxydant impliquant l'échange d'un seul électron, des radicaux vont se créer selon la Réaction IV-3.



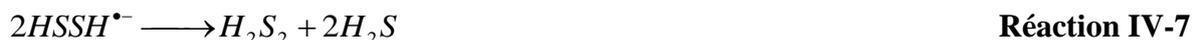
Le pKa de HS^\bullet étant inférieur à 7, on va essentiellement trouver du $S^{\bullet-}$, formé selon la Réaction IV-4.



Ce radical va ensuite réagir selon deux voies réactionnelles, par dimérisation (Réaction IV-5) ou par réaction avec HS^- (Réaction IV-6).



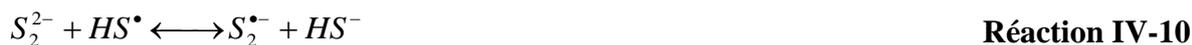
Le radical $HSS^{\bullet 2-}$ va rapidement disparaître pour former plus de S_2^{2-} selon les réactions IV-7 et IV-8.



Comme H_2S_2 est un diacide, il va se décomposer à des pH élevés en disulfure dianion selon la Réaction IV-9.



S_2^{2-} va ensuite réagir avec les radicaux libres HS^\bullet et $S^{\bullet-}$ selon les réactions IV-10 et IV-11.



En solution, le radical ionique $S_2^{\bullet-}$ va se dimériser (Réaction IV-12) ou réagir avec $S^{\bullet-}$ suivant la Réaction IV-13.



Par des réactions similaires, des polysulfures de plus en plus gros vont se former (réactions IV-14 à IV-19).



Ces différents polysulfures vont ensuite s'équilibrer avec des formes plus stables (réactions IV-20 à IV-22) et aboutir à la formation du S_8 cyclique.



La transformation de l' H_2S en soufre élémentaire est aussi possible à des pH acides en passant par un radical $H_2S^{\bullet+}$ qui réagit avec l'eau pour former des ions H_3O^+ et des radicaux HS^\bullet qui interviennent ensuite dans le même mécanisme réactionnel à partir de la réaction 4.

L'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré est fortement dépendante du pH. Selon Chen et Morris [8], elle suit un schéma complexe (Figure IV-13). Pour des solutions de pH inférieurs à 6, le taux d'oxydation est très faible car H_2S (aq) domine en solution. La vitesse de réaction augmente avec le pH pour atteindre un maximum à pH 8. Cette vitesse va ensuite diminuer jusqu'à pH 9 pour augmenter à nouveau jusqu'à un second maximum équivalent au premier à un pH voisin de 11. Enfin la vitesse de réaction va à nouveau diminuer pour les pH les plus alcalins.

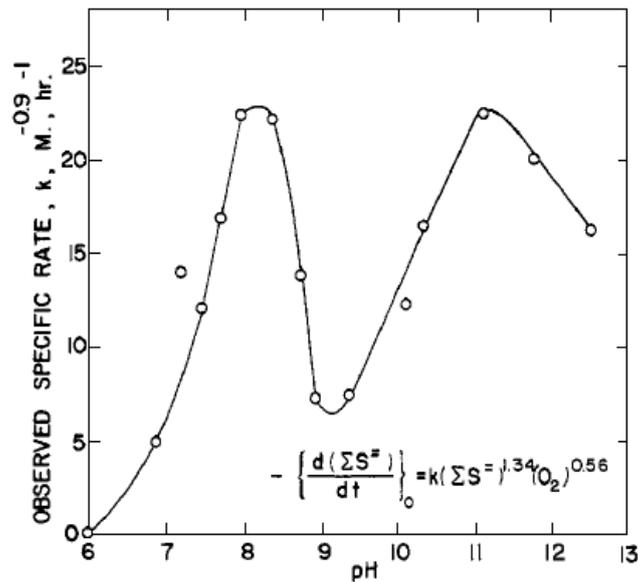


Figure IV-13 : Taux d'oxydation spécifique des sulfures en fonction du pH à 25°C [8].

Ce schéma réactionnel indique que l'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré passe par l'intervention de l'ion HS^- comme proposé pour le modèle de Steudel [12] énoncé ci-dessus. Cependant, Steudel indique également dans un article plus récent [11] qu'une solution saturée en H_2S possède un pH de 4,1 et qu'elle s'oxyde rapidement en présence d'une atmosphère d'oxygène pur. Le pH influencerait donc sur la nature de l'espèce soufrée formée. Pour des pH supérieurs à 8, aucune présence de soufre élémentaire n'est mise en évidence, entre 7 et 8, il y a formation de polysulfides alors que pour des pH inférieurs à 7, du soufre élémentaire est formé. Le pH de surface des mortiers est donc un paramètre important car il va déterminer la vitesse d'oxydation du sulfure d'hydrogène par voie abiotique et le type de molécules soufrées formées potentiellement utilisables par les microorganismes. Le pH de surface des mortiers étudiés pour cette étude est basique, de l'ordre de 10 à 12, mais ces mesures sont réalisées à l'aide de papier pH humide qui indique donc une valeur moyenne sur une certaine profondeur. Ainsi, le pH en extrême surface peut avoir une valeur inférieure résultant de phénomène de carbonatation ou de réactions acide avec l'hydrogène sulfuré.

Les cristaux de soufre ne se forment pas uniquement à partir d'empilements de soufre S_8 mais également à partir de soufre S_6 et S_7 et d'autres composés hydrophobes présents dans le système comme les hydrocarbures, qui viennent polluer les cristaux [12]. Cela entraîne la présence d'imperfections dans la forme finale des cristaux. La forme la plus stable thermodynamiquement est la forme orthorhombique (Figure IV-14-A) mais dans certains cas, la formation de cristaux monoclinique est possible (Figure IV-14-B) [13].

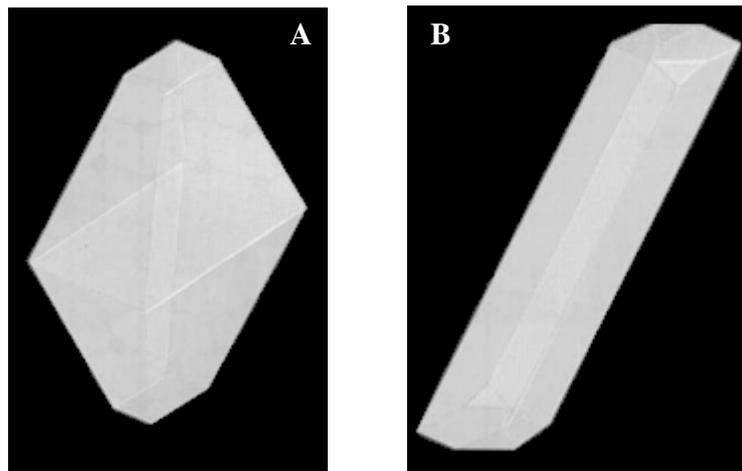


Figure IV-14 : A- Cristal de soufre orthorhombique. B- Cristal de soufre monoclinique [13].

Les cristaux observés à la surface des différents matériaux exposés à de l' H_2S sont la plupart du temps plus proches des cristaux orthorhombiques. Néanmoins des imperfections sont observées sur nos échantillons (Figures IV-8 à IV-11). Trois hypothèses sont envisagées pour expliquer la présence d'anfractuosités :

- La formation de ces cristaux pourrait passer par l'incorporation d'hexamères (S_6) ou d'heptamères (S_7) de soufre à la place du S_8 , ce qui modifierait la structure cristalline thermodynamiquement stable du soufre élémentaire.

- Il est également possible d'expliquer ces imperfections par le fait que les cristaux observés puissent être en cours de formation. Dans ce cas, la croissance de ces cristaux se ferait tout d'abord par les arrêtes puis par les faces.

- Une autre explication envisageable est que les cristaux de soufre élémentaire s'oxydent plus rapidement sur ces matrices en un autre composé soufré soluble tel que les sulfates, les thiosulfates ou en des ions au degré d'oxydation intermédiaire ($\text{S}_5\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$) qui ne seraient donc pas visible lors des observations au microscope électronique à balayage. Toutefois, cette possibilité ne semble pas correspondre au modèle proposé par Islander *et al.* [6] qui indiquent que le soufre élémentaire ne peut s'oxyder que de façon biotique.

Si on s'intéresse à la répartition du soufre à la surface des matériaux cimentaires, nous remarquons qu'il est observé essentiellement en périphérie des granulats. Cette zone appelée auréole de transition (ou ITZ pour *Internal Transition Zone*) a été caractérisée comme possédant des surfaces spécifiques, des porosités et des concentrations en calcium croissantes de la pâte de ciment vers le granulat (Figure IV-15) [14]. La porosité à cette interface est environ 30% supérieure à celle de la matrice cimentaire. Cette zone, typiquement de trente microns de largeur [15] doit donc favoriser les échanges grâce à sa plus grande surface spécifique, à la rétention d'eau causée par sa porosité et à l'apport d'ions calcium participant à l'échange d'électron à l'origine de la formation des cristaux de soufre.

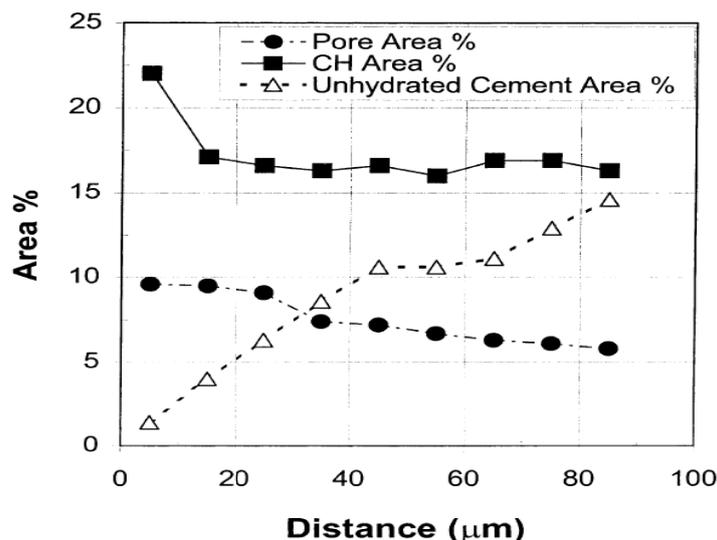


Figure IV-15 : Evolution des valeurs moyennes du pourcentage de l'aire des pores, de la portlandite (CH) et du ciment anhydre en fonction de la distance du granulat d'un béton [14].

Les granulats siliceux ou calcaires, seuls ou inclus dans une pâte de ciment, ne semblent pas participer à la transformation abiotique de l' H_2S .

Pour cette étude, différents types de ciment ont été utilisés (CEM I, CEM III et plusieurs matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium). Les différences apparaissant entre ces matériaux à 50 ppm d' H_2S indiquent que les mortiers CEM I et CEM III sont plus favorables au dépôt de soufre élémentaire que les mortiers à base de ciment d'aluminate de calcium. Le type de ciment a donc un rôle important dans l'oxydation abiotique de l' H_2S . Le fait que l'on puisse retrouver plus de soufre élémentaire en surface des matériaux réalisés à partir de ciment Portland pourrait en partie expliquer la différence de durabilité de ces deux matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement.

Les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium présentent une concentration élevée en aluminium qui d'après les essais réalisés sur de l'aluminium ne participe pas à l'oxydation abiotique de l' H_2S . Cependant d'après Chiu et Meehan [9] l'ajout d' Al_2Cl_3 dans une solution où est diffusée de l'hydrogène sulfuré entraîne une diminution du temps d'induction de l'oxydation abiotique. La spéciation de l'aluminium semble donc importante pour expliquer ces différences de comportement. Il est possible que, dans le cas de notre étude, la couche d'oxyde recouvrant naturellement l'aluminium l'ait isolé de l' H_2S en inhibant ainsi son hypothétique effet catalyseur. On peut également noter que les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium se couvrent, sur une gamme de pH allant de 4 à 10 (voir Figure 22 du chapitre I), d'une couche de gel d'alumine en surface. Celle-ci limiterait la transformation de l' H_2S en soufre élémentaire. Il est donc normal que cette transformation soit moins favorisée sur ces supports. Les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium possèdent une autre particularité, la conversion, qui implique la modification des hydrates présents au sein de la matrice cimentaire. Les essais réalisés ne semblent pas montrer d'impact de cette transformation sur la faisabilité ou l'importance de l'oxydation abiotique de l' H_2S .

IV-1.4. Conclusion

L'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire à la surface des matériaux cimentaires est possible dans les conditions de température, d'humidité relative et de pression

rencontrées dans les réseaux d'assainissement. Elle conduit à la formation de cristaux de soufre de forme majoritairement orthorhombique et de taille similaire quel que soit le matériau cimentaire considéré. Elle nécessite l'intervention d'un catalyseur qui peut être une particule chargée issue de certains métaux (fer, cuivre, zinc,...) ou une forte concentration de calcium comme c'est le cas au niveau de l'auréole de transition qui présente également une porosité plus importante. Les composés peu solubles comme la silice ou les carbonates ne permettent pas cette catalyse.

La formulation cimentaire et plus particulièrement le type de ciment va jouer un rôle dans la cinétique et le rendement de cette réaction. Les échantillons à base de ciment Portland (CEM I et CEM III) sont plus favorables à cette transformation que ceux réalisés à partir de ciment d'aluminate de calcium (CAC+S, CAC+L, CAC+A), tant par la quantité de soufre formé que par la qualité des cristaux produits (présence de défauts dans le cas des CAC).

Les différents matériaux n'ayant pas le même comportement face à l'hydrogène sulfuré, il apparaît indispensable d'utiliser l' H_2S dans un essai accéléré. En effet, ce gaz s'oxyde en surface des matériaux cimentaires en soufre élémentaire mais également en d'autres composés oxydés potentiellement utilisables par les bactéries sulfo-oxydantes comme source énergétique.

IV-2. Influence de la source de soufre sur la croissance des bactéries sulfo-oxydantes

L'oxydation abiotique de l' H_2S conduit au dépôt de soufre élémentaire en surface des matériaux cimentaires et éventuellement à la formation de produits plus oxydés du soufre tels que les sulfates, les thiosulfates ou des ions au degré d'oxydation intermédiaire ($S_5O_6^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$, $S_2O_6^{2-}$). Par définition, toutes les espèces bactériennes sulfo-oxydantes (BSO), appartenant anciennement au groupe des *Thiobacillus*, vont, pour se développer, utiliser l'énergie issue de l'oxydation de composés soufrés réduits [18]. Ainsi, l'ensemble des molécules soufrées ci-dessus présentées est potentiellement utilisable par les bactéries sulfo-oxydantes comme source d'électron.

Toutes les bactéries sulfo-oxydantes sont des organismes chimiolithotrophes, c'est-à-dire qu'elles puisent leur énergie dans l'oxydation de molécules minérales et plus particulièrement de composés réduits du soufre. Cependant, des différences existent concernant la source de carbone utilisée par ces bactéries qui vont définir deux grands groupes : les autotrophes et les hétérotrophes. Les autotrophes sont capables de se développer en milieu inorganique contenant du CO_2 comme seule source de carbone. Les hétérotrophes exigent au contraire des composés organiques pour croître. Il est également possible de rencontrer des bactéries capables de se développer dans l'une ou l'autre de ces conditions, ce sont des mixotrophes. Si nous nous intéressons plus particulièrement aux BSO impliquées dans la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement, nous retrouvons cette distinction sur la source de carbone. En effet, *Starkeya novella* et *Thiomonas intermedia* sont mixotrophes alors que *Thiobacillus thioparus*, *Halothiobacillus neapolitanus* et *Acidithiobacillus thiooxidans* sont autotrophes.

Les besoins nutritionnels des différentes bactéries sulfo-oxydantes sont donc variables et la modification de la source d'électron ou de la source de carbone va avoir une influence sur leur croissance, qui comprend quatre phases (Figure IV-16). La première est la phase de latence,

période au cours de laquelle les microorganismes synthétisent les enzymes dont ils vont avoir besoin pour utiliser les substrats disponibles dans le milieu de culture. La deuxième étape est la période durant laquelle les microorganismes entrent en division cellulaire de manière exponentielle. On définit pour cette étape deux paramètres qui sont le taux de croissance (μ) et le temps de génération (g). Le taux de croissance correspond à l'accroissement de la population par unité de temps et le temps de génération se définit comme le temps nécessaire pour que la population double. Vient ensuite la phase stationnaire où la population atteint un maximum et pour laquelle la croissance apparaît nulle car autant de microorganismes apparaissent et disparaissent par lyse cellulaire. On définit à cette étape la capacité de charge maximale (K) ou quantité maximale de microorganismes présents. La dernière étape est la phase de déclin qui se caractérise par une augmentation du nombre de morts engendrés par l'épuisement des nutriments et l'accumulation des déchets dans le milieu de culture.

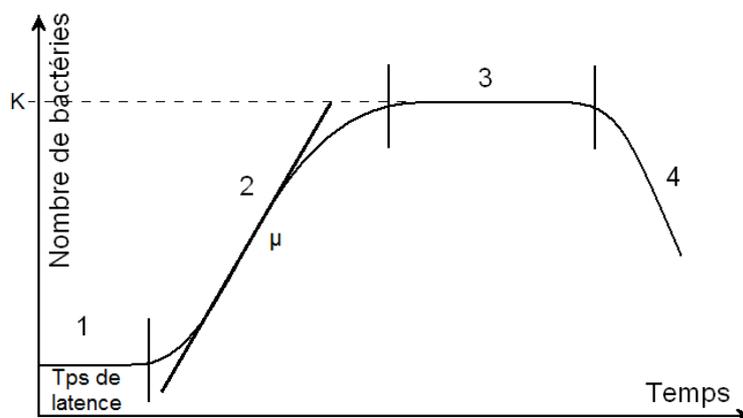


Figure IV-16 : Schéma d'une croissance bactérienne type en quatre phases. 1- Phase de latence, 2- Phase de croissance exponentielle, 3- Phase stationnaire, 4- Phase de déclin [19].

La littérature n'est pas claire concernant la source de soufre utilisée préférentiellement par les bactéries sulfo-oxydantes. Pour certains auteurs comme Oprime *et al.* [16], les bactéries semblent oxyder directement de l'hydrogène sulfuré et pour d'autres tels que Rohwerder et Sand [20], il est nécessaire que cet hydrogène sulfuré soit d'abord oxydé en soufre élémentaire ou en un autre produit plus facilement assimilable par les microorganismes. Ainsi, il apparaît nécessaire de réaliser des essais pour mieux connaître le type de source de soufre permettant une croissance optimale des bactéries impliquées dans le processus de biodétérioration des matériaux cimentaires.

IV-2.1. Matériels et méthodes

IV-2.1.1. Cultures bactériennes

Dans le cadre de cette étude nous allons étudier les bactéries dont les caractéristiques sont retrouvées dans le chapitre II-2 et qui seront impliquées dans l'essai accéléré présenté dans le chapitre V. Pour étudier l'impact de la source de soufre, *S. novella* (DSMZ 506), *T. intermedia* (DSMZ 18155), *H. neapolitanus* (DSMZ 15147) et *A. thiooxidans* (DSMZ 14887) sont repiquées à 1% dans 50 mL de milieu de culture privé de toute source de soufre. L'inoculation des milieux de culture est réalisée en utilisant le culot obtenu par centrifugation à 3 000 g pendant 10 minutes à 20°C d'une suspension de 30 mL de culture en phase exponentielle depuis 24 h. Ce culot est ensuite rincé deux fois dans le milieu de culture sans soufre pour être certain de s'affranchir du milieu de culture initial.

Le suivi de la croissance est réalisé en batch, c'est-à-dire en système clos dans lequel aucun nutriment n'est ajouté et aucun déchet n'est retiré lors de la culture. Ce travail est exécuté avec des milieux de culture incubés à $30\pm 1^\circ\text{C}$ sous agitation à 150 rpm avec une variante sur la source de soufre. Ces milieux de culture sont réalisés selon les recommandations de DSMZ mais en ôtant tous les apports de soufre (Tableaux IV-3-IV-5, IV-7).

La source d'électron est différente dans quatre milieux de cultures. Le premier est un témoin ne contenant pas de soufre, le deuxième contient 5 g L^{-1} de thiosulfate (10 g L^{-1} pour *H. neapolitanus*), le troisième 1 g L^{-1} de soufre élémentaire (2 g L^{-1} pour *H. neapolitanus*). Le dernier utilisé uniquement pour l'étude de *S. novella* et *T. intermedia* contient environ 4 g L^{-1} d'hydrogène sulfuré. Il est apporté par bullage pendant une minute dans les milieux de culture ensemencés à partir d'une bouteille de 50 ppm d' H_2S . Les concentrations des différentes molécules soufrées apportées à chaque milieu de culture représentent la même quantité d'électrons échangeables.

La solution d'éléments traces modifiée (Tableau IV-6) n'a été utilisée que pour l'étude de la croissance de *H. neapolitanus*.

Tableau IV-3 : Milieux de culture de *Starkeya novella*.

	Hétérotrophie	Autotrophie
Solution A :		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10,60 g	10,60 g
KH_2PO_4	1,50 g	1,50 g
NH_4Cl	0,30 g	0,30 g
Extraits de levures	0,30 g	-
Eau distillée	895,00 mL	895,00 mL
Solution B :		
$\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 g	0,10 g
Eau distillée	100,00 mL	100,00 mL
Solution C :		
Solution éléments traces	5,00 mL	5,00 mL

Tableau IV-4 : Milieux de culture de *Thiomonas intermedia*.

	Hétérotrophie	Autotrophie
NH_4Cl	0,1 g	0,1 g
KH_2PO_4	3,0 g	3,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 g	0,1 g
CaCl_2	0,1 g	0,1 g
Extrait de levures	1,0 g	-
Eau distillée	1000,0 mL	1000,0 mL

Tableau IV-5 : Milieu de culture d'*Halothiobacillus neapolitanus* sans source de soufre.

KH ₂ PO ₄	4,0 g
K ₂ HPO ₄	4,0 g
MgCl ₂ ·7H ₂ O	0,8 g
NH ₄ Cl	0,4 g
Solution d'éléments traces	5,0 mL
Eau distillée	995,0 mL

Tableau IV-6 : Solution d'éléments traces sans source de soufre.

Na ₂ -EDTA	50,00 g
ZnBr ₂	17,24 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5,54 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,06 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4,92 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,10 g
Cuivre pur	0,40 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61 g
Eau distillée	1000,00 mL

Tableau IV-7 : Milieu de culture d'*Acidithiobacillus thiooxidans* sans source de soufre.

KH ₂ PO ₄	3,00 g
MgCl ₂ ·7H ₂ O	0,50 g
NH ₄ Cl	1,50 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,25 g
Eau distillée	1000,00 mL

L'influence de l'extrait de levures couplé à la variation de la source de soufre est également étudiée sur les souches mixotrophes : *S. novella* et *T. intermedia*. Ces souches bactériennes sont cultivées dans les mêmes conditions que précédemment mais en retirant l'extrait de levures (Tableaux IV-3 et IV-4). Nous avons ainsi pu observer l'influence de la source de carbone sur leur croissance.

IV-2.1.2. Suivi de la croissance

La croissance de *S. novella* et *T. intermedia* est suivie par densité optique en utilisant un spectrophotomètre UV en mode transmission à 289 nm pour *S. novella* et 300 nm pour *T. intermedia*. Ces longueurs d'onde ont été choisies en fonction d'une première étude (Figure IV-17) réalisée sur les suspensions bactériennes, la ligne de base ayant été obtenue avec les milieux de culture stériles.

Le suivi de la croissance de *Starkeya novella* et *Thiomonas intermedia* a été réalisé par densité optique à respectivement 289 et 300 nm. Il est à noter que ces valeurs de longueur d'onde sont loin de celles retrouvées dans la littérature puisque Beffa *et al.* [21] proposent une longueur d'onde de 436 nm pour étudier la croissance de *S. novella* et London et Matin *et al.* [22, 23] proposent 540 nm pour *T. intermedia*.

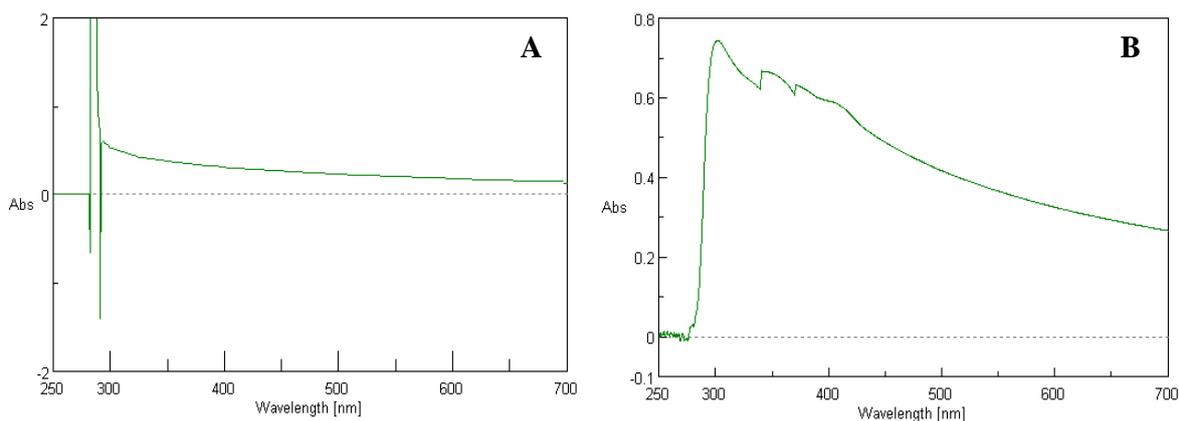


Figure IV-17 : Spectre UV des milieux de culture de *Starkeya novella* (A) et de *Thiomonas intermedia* (B).

Le dénombrement de *H. neapolitanus* et *A. thiooxidans* est réalisé par dilution successive à 10% puis étalement de 100 μ L de chaque dilution sur gélose contenant les milieux de culture conseillés par DSMZ. Les boîtes ensemencées sont placées en étuve à $30\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 heures pour *H. neapolitanus* et 5 jours pour *A. thiooxidans* avant comptage.

Les croissances d'*H. neapolitanus* et d'*A. thiooxidans* ont été suivies pour cette étude par dénombrement sur gélose puisque ces souches n'ont pas montré de variation de leur densité optique en spectrométrie UV. Néanmoins, certains auteurs ont mis en évidence une croissance pour ces bactéries à 660 nm pour *H. neapolitanus* [24], et à 605 nm pour *A. thiooxidans* [25].

IV-2.2. Résultats

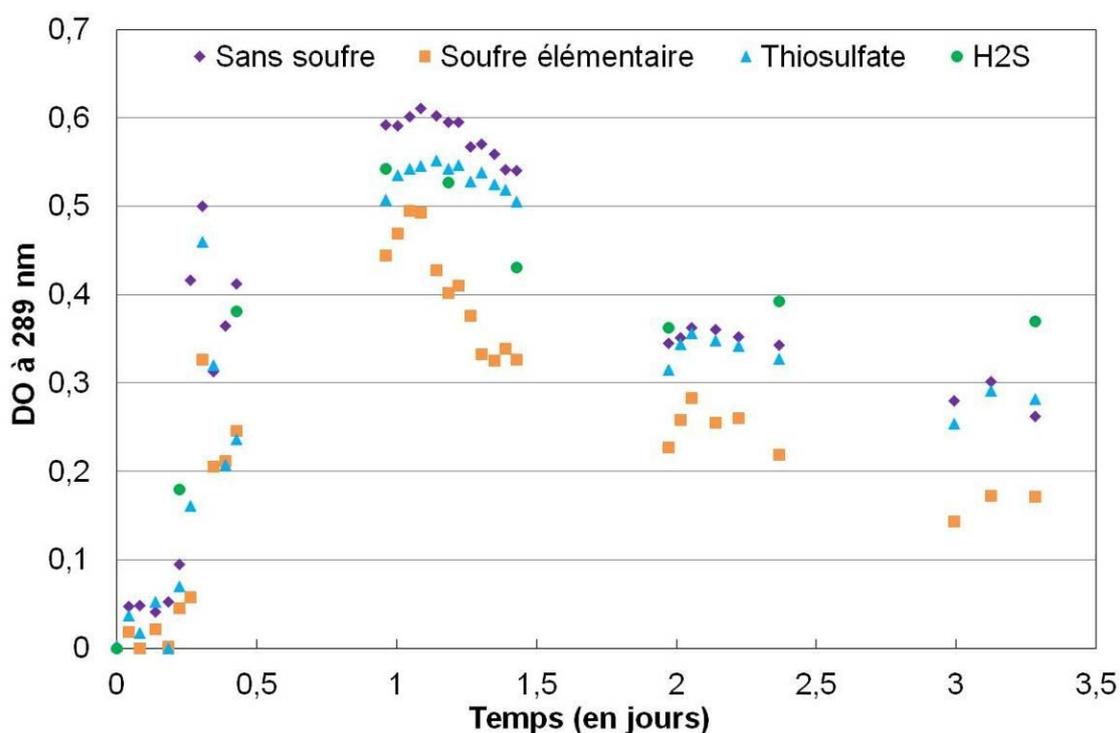
Des différences significatives de croissance ont été observées pour *Starkeya novella* suivant le mode de culture appliqué (Tableaux IV-8 et IV-9, Figures IV-18 et IV-19). Les temps de génération (g) sont de l'ordre de l'heure en présence d'extrait de levures et s'allongent considérablement pour les milieux de culture sans extrait de levures pour atteindre des temps de génération de l'ordre du jour. Le taux de croissance (μ) est plus faible car le métabolisme est moins efficace.

L'allongement des temps de latence dans le milieu sans extrait de levure est dû à l'adaptation des bactéries aux nouvelles conditions de culture. Elles doivent faire face à un milieu plus pauvre en nutriments les obligeant à synthétiser de nouvelles enzymes pour s'adapter.

S. novella croît avec toutes les sources de soufre, excepté l'hydrogène sulfuré quand elle est cultivée en absence d'extrait de levures. Le taux de croissance (μ) de cette souche bactérienne en présence d'extrait de levures est aussi important pour les milieux ne contenant pas de soufre que pour ceux contenant du thiosulfate. Elle semble utiliser préférentiellement le soufre élémentaire pour croître. De plus, la capacité de charge (K) du milieu est maximale en présence de soufre élémentaire sans extrait de levures. Quel que soit le mode de culture choisi, ses caractéristiques de croissance avec le soufre élémentaire sont supérieures aux autres sources de soufre.

Tableau IV-8 : Caractéristiques associées à la croissance de *Starkeya novella* en présence d'extrait de levures à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 6,8.

	Sans soufre	Soufre élémentaire	Thiosulfate	H ₂ S
Temps de latence (en h)	3,32	3,87	3,87	3,87
Taux de croissance μ (en h ⁻¹)	0,11	0,24	0,11	0,04
Temps de demi-vie g (en h)	8,4	4,2	9,1	24
Capacité de charge K (en DO)	0,6	0,5	0,55	0,55

**Figure IV-18 : Suivi de la croissance de *Starkeya novella* en présence d'extrait de levures.****Tableau IV-9 : Caractéristiques associées à la croissance de *Starkeya novella* sans extrait de levures à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 6,8.**

	Sans soufre	Soufre élémentaire	Thiosulfate	H ₂ S
Temps de latence (en h)	235	184	235	-
Taux de croissance μ (en h ⁻¹)	0,011	0,032	0,008	-
Temps de demi-vie g (en h)	91	31	120	-
Capacité de charge K (en DO)	-	2,25	-	-

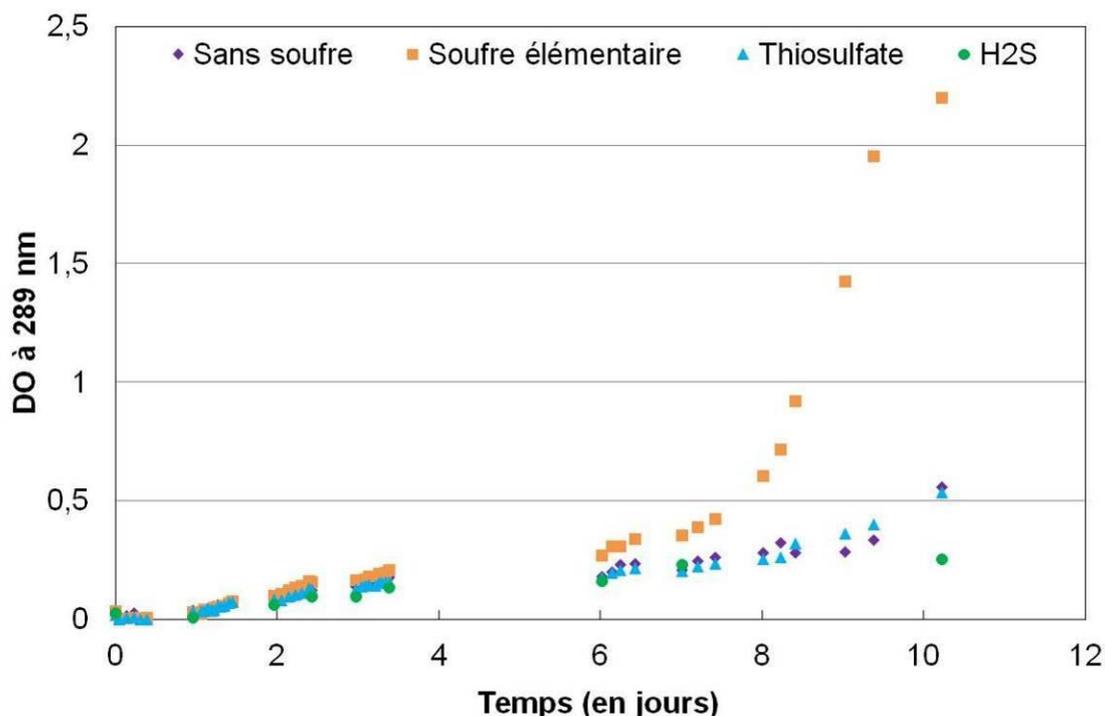


Figure IV-19 : Suivi de la croissance de *Starkeya novella* sans extraits de levures.

Thiomonas intermedia a été cultivée en présence ou non d'extrait de levures mais la croissance n'a pu être mise en évidence qu'en leur présence (Tableau IV-10 et Figure IV-20). Pendant trois semaines, cette souche bactérienne cultivée en absence d'extrait de levures n'a pas présentée de croissance.

La source de soufre a un impact faible sur la croissance de cette souche bactérienne. Elle semble capable d'assimiler le soufre indépendamment de sa provenance avec le même temps de latence. Le temps de génération (g) est minimal pour le milieu privé de soufre.

Le milieu de culture à base de thiosulfate conduit à un taux de croissance (μ) minimal mais sa capacité de charge (K) est maximale ce qui indique que cette souche bactérienne, dans ces conditions, croît plus lentement mais atteint une biomasse plus importante.

Tableau IV-10 : Caractéristiques associées à la croissance de *Thiomonas intermedia* en présence d'extraits de levures à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 5,5.

	Sans soufre	Soufre élémentaire	Thiosulfate	H ₂ S
Temps de latence (en h)	2,15	2,15	2,15	2,15
Taux de croissance μ (en h ⁻¹)	0,40	0,28	0,20	0,27
Temps de demi-vie g (en h)	2,53	3,56	4,95	3,66
Capacité de charge K (en DO)	1,7	1,6	2	1,7

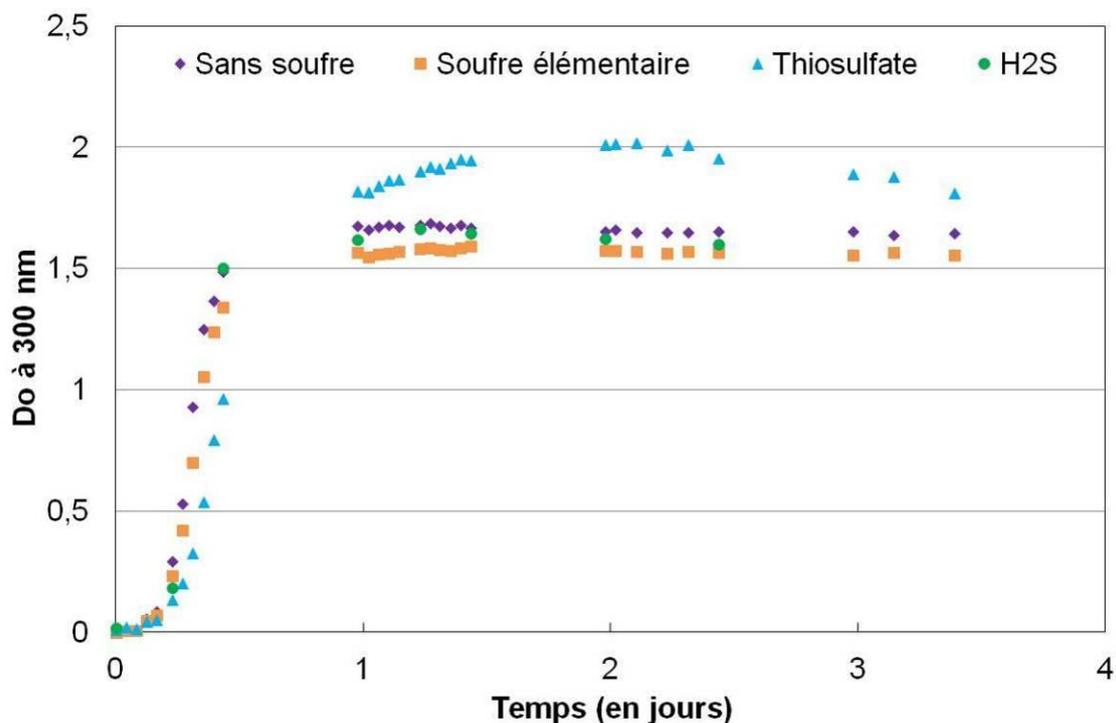


Figure IV-20 : Suivi de la croissance de *Thiomonas intermedia* en présence d'extrait de levures.

H. neapolitanus s'est développée quelle que soit la source de soufre (soufre élémentaire, thiosulfate ou sans soufre ; Tableau IV-11 et Figure IV-21). Sa croissance est cependant plus importante sur le thiosulfate que sur les autres milieux ; son taux de croissance est deux fois plus important et sa capacité de charge supérieure d'un demi logarithme.

Tableau IV-11 : Caractéristiques associées à la croissance d'*Halothiobacillus neapolitanus* à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 6,8.

	Sans soufre	Soufre élémentaire	Thiosulfate
Temps de latence (en h)	4,5	4,5	4,5
Taux de croissance μ (en h^{-1})	0,27	0,31	0,57
Temps de demi-vie g (en h)	3,68	3,19	1,76
Capacité de charge K (ufc mL^{-1})	$1,3 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$

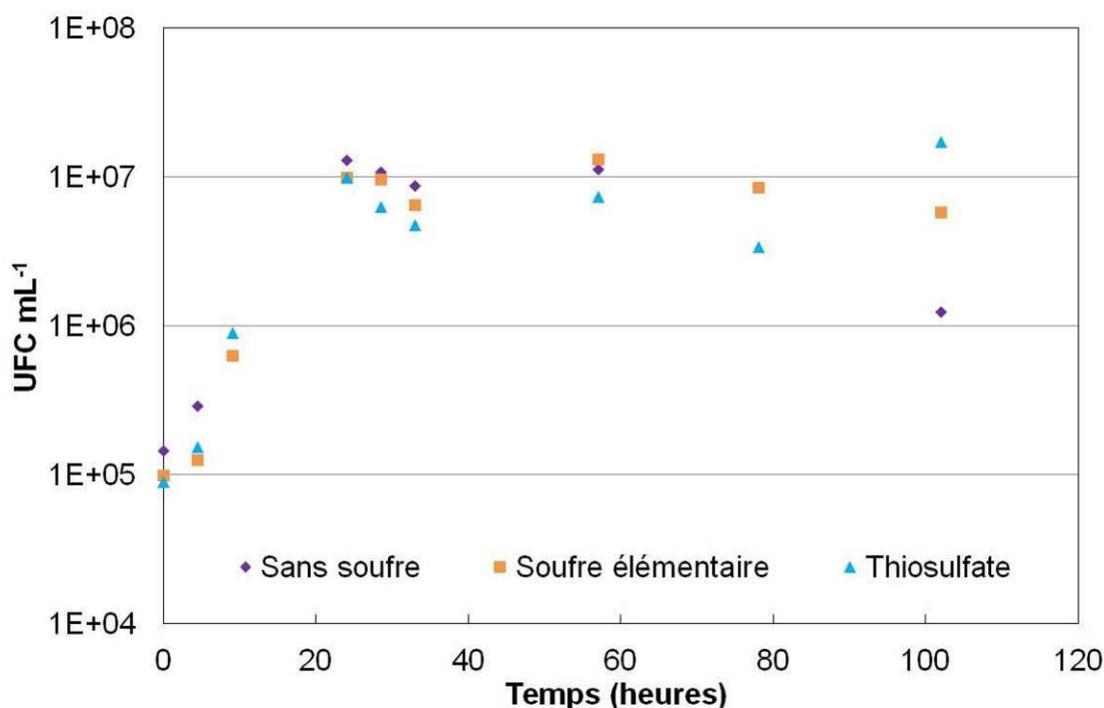


Figure IV-21 : Suivi de la croissance d'*Halothiobacillus neapolitanus*.

A. thiooxidans s'est développée dans tous les milieux de culture avec des taux de croissance très proches quelle que soit la source de soufre considérée (Tableau IV-12 et Figure IV-22).

Les différences entre ces milieux sont observées essentiellement sur la capacité de charge maximale. Cette souche bactérienne a une quantité de biomasse trois fois plus importante si elle est cultivée en présence de soufre élémentaire que de thiosulfate et une fois et demie plus importante que sur un milieu sans apport de soufre.

Tableau IV-12 : Caractéristiques associées à la croissance d'*Acidithiobacillus thiooxidans* à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un pH de 4,7.

	Sans soufre	Soufre élémentaire	Thiosulfate
Temps de latence (en h)	4,5	4,5	4,5
Taux de croissance μ (en h ⁻¹)	0,15	0,16	0,17
Temps de demi-vie g (en h)	6,65	6,25	5,75
Capacité de charge K (ufc mL ⁻¹)	$4,2 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$

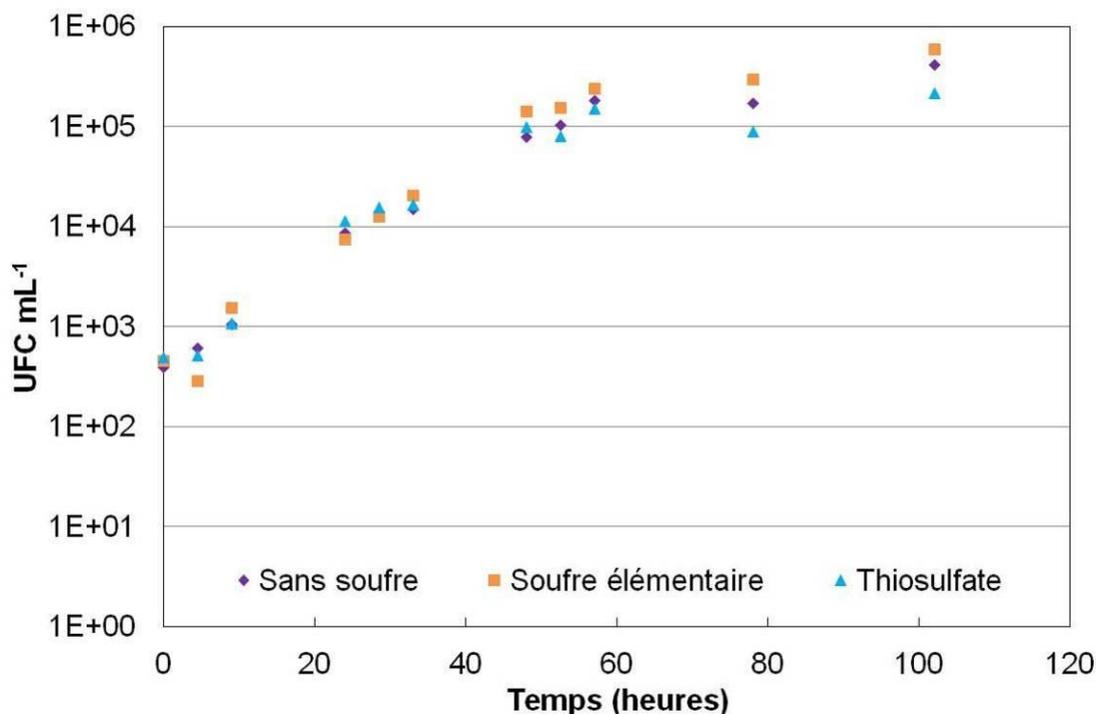


Figure IV-22 : Suivi de la croissance d'*Acidithiobacillus thiooxidans*.

IV-2.3. Discussion

La quasi-totalité des souches bactériennes a un temps de latence similaire, de l'ordre de 2 à 5 heures quel que soit la source de soufre. La seule exception est *S. novella* cultivée en autotrophie dont le temps de latence est de 8-10 jours. Les taux de croissances varient en moyenne de 0,13 à 0,38 h⁻¹ et permettent d'ordonner ces souches de la plus rapide à la plus lente à se multiplier : *H. neapolitanus*, *T. intermedia*, *A. thiooxidans* et enfin *S. novella*.

Les caractéristiques de croissance des souches bactériennes étudiées dans cette étude et dans la littérature sont rassemblées dans le Tableau IV-13.

D'après la littérature, *S. novella* est capable de croître à des taux de croissance plus élevés que ceux que nous avons calculé. Pour Klein et Charles [26], le taux de croissance de *S. novella* cultivée sur du thiosulfate et en présence d'une solution d'éléments traces est de 0,24 h⁻¹, pour Beffa *et al.* [21], elle est de 0,05 - 0,06 h⁻¹ pour une culture en autotrophie en présence de thiosulfate. Enfin les études menés par Hondjuila Miokono *et al.* [27] ont montré que *S. novella* pouvait croître en autotrophie sur du thiosulfate à un taux de 0,03 h⁻¹ ce qui représente quatre fois la vitesse de croissance de notre souche bactérienne.

Dans le cas de *S. novella* cultivée en absence d'extrait de levures, des temps de latence très variables sont observés indiquant que le métabolisme de cette souche bactérienne s'adapte plus facilement au soufre élémentaire qu'aux autres sources de soufre. Elle n'a d'ailleurs montré aucune croissance durant les dix jours de suivi avec de l'hydrogène sulfuré. Cette espèce est l'une des premières à s'implanter sur les matériaux cimentaires [5, 28, 29] puisque sa gamme de pH de croissance est la plus haute. La présence de soufre élémentaire à la surface des matériaux cimentaires va donc favoriser sa croissance et assurer la mise en place rapide de la succession de microorganismes.

Concernant la croissance de *T. intermedia*, Smith et Rittenberg [30] ont estimé le temps de doublement de leur souche bactérienne en autotrophie et en présence de thiosulfate à 20 h,

soit un taux de croissance de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Nos propres résultats nous indiquent que notre souche n'est pas capable de croître dans ces conditions en trois semaines.

La croissance de *H. neapolitanus* est plus rapide dans le cadre de notre étude qu'elle n'est dans celle de Wood *et al.* [31] ou de Hondjuila Miokono *et al.* [27] qui trouvent respectivement un taux de croissance de $0,22 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ et $0,10 \text{ h}^{-1}$ sur du thiosulfate.

Enfin la croissance d'*A. thiooxidans* est deux fois plus rapide dans le cadre de notre étude que dans celle de Hondjuila Miokono *et al.* [27] ($0,09 \text{ h}^{-1}$) mais avec un temps de latence similaire.

Tableau IV-13 : Synthèse des données relatives à la croissance des souches bactériennes retrouvées dans la littérature. Toutes les souches bactériennes sont cultivées sur du thiosulfate.

	Souche	Auteurs	Température (en °C)	pH	Taux de croissance (en h^{-1})
<i>S. novella</i>	DSM 506	Beffa <i>et al.</i> [21]	28	7,6	0,05-0,06
	ATCC 8093	Klein <i>et al.</i> [26]	29	6	0,24
	DSM 506	Hondjuila Miokono <i>et al.</i> [27]	30 ± 2	6,5	0,03
	DSM 506	Notre étude	30 ± 1	6,8	0,008
<i>T. intermedia</i>	Souche extraite par London [22]	Smith <i>et al.</i> [30]	30	6,8	0,05
	DSM 18155	Notre étude	30 ± 1	5,5	0,20
<i>H. neapolitanus</i>	OSWA	Wood <i>et al.</i> [31]	30	7,3	$0,22 \pm 0,04$
	DSM 581	Hondjuila Miokono <i>et al.</i> [27]	30 ± 2	6,5	0,10
	DSM 15147	Notre étude	30 ± 1	6,8	0,57
<i>A. thiooxidans</i>	DSM 504	Hondjuila Miokono <i>et al.</i> [27]	30 ± 2	4,5	0,09
	DSM 14887	Notre étude	30 ± 1	4,7	0,17

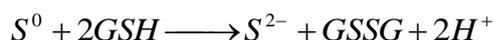
La façon d'introduire l' H_2S dans les suspensions bactériennes est critiquable. Nous avons fait barboter de l' H_2S à 50 ppm dans les erlenmeyers de culture pendant 1 minute puis nous avons refermé ces récipients de façon hermétique à l'aide de bouchons en plastique. La quantité de gaz apportée n'est certainement pas suffisante pour atteindre la concentration désirée en solution. L' H_2S étant très réactif, il a pu réagir avec le récipient. Ceci pourrait expliquer l'absence de croissance de *S. novella* et de *T. intermedia* en présence d' H_2S . Une solution serait de travailler dans un bioréacteur avec un apport contrôlé d' H_2S .

Nous avons vu précédemment que l'oxydation abiotique de l' H_2S conduit à la formation de cristaux de soufre cristallisés à la surface des matériaux cimentaires. Ce soufre n'est pas soluble dans l'eau [32]. Cependant, l'oxydation de l' H_2S sur site serait également réalisée par voie biotique [1-4] conduisant à la formation de soufre aux propriétés différentes du soufre élémentaire formé chimiquement. D'après Prange *et al.* [33], il serait composé de longues chaînes de soufre terminées par des groupements organiques. Steudel [34] propose une composition légèrement différente puisque, pour lui, il s'agirait d'un noyau soufré, principalement de S_8 mais contenant quelques inclusions d'autres soufres cycliques, qui serait entouré par de longues chaînes de polythionates. Dans tous les cas, les auteurs s'accordent à dire que la surface du soufre ainsi formé est beaucoup plus hydrophile. Le test de solubilité réalisé par Janssen *et al.* [35] valide ce résultat. Ainsi, le soufre biogénique se disperse dans l'eau et non dans l'hexadécane. Le soufre cristallisé orthorhombique a le comportement

inverse puisqu'il se disperse dans l'hexadécane et non dans l'eau. Cette différence de comportement rend le soufre issu de l'oxydation chimique de l' H_2S moins disponible pour les microorganismes. Nos suivis de croissance ayant été réalisés à partir de ce type de soufre, il a été plus difficile à assimiler par les souches bactériennes que ne pourrait l'être le soufre rencontré dans les réseaux d'assainissement. Les bactéries ont du produire des tensioactifs leur permettant de mouiller ces surfaces hydrophobes avant de les utiliser. La production de ces substances organiques a été montrée pour *Acidithiobacillus thiooxidans* [36, 37].

L'étude de l'ensemble des souches bactériennes indique qu'elles sont capables d'utiliser le soufre ou le thiosulfate avec des temps de latence similaires (de 2 à 5 heures), sauf dans le cas de *S. novella* en absence d'extrait de levures. Ainsi, les différents substrats semblent être utilisés par la même voie métabolique, les bactéries n'ont donc pas la nécessité de produire de nouvelles enzymes.

Selon Vishniac et Santer [38] l'oxydation de la source de soufre par les bactéries sulfoxydantes suit un schéma complexe (Figure IV-23). Tout d'abord, le soufre pénètre dans la bactérie grâce au groupement sulfhydrile (-SH) du glutathion (tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, noté GSH sous sa forme réduite et GSSG sous sa forme oxydée) ou par un autre composé sulfhydrile de celle-ci (Réaction IV-23).

**Réaction IV-23**

Une fois le soufre sous forme de sulfure dans la cellule, il est oxydé en soufre élémentaire (Figure IV-23 réaction a) qui subit une condensation enzymatique avec un sulfite (Figure IV-23 réaction b) pour former du thiosulfate, par la suite oxydé en tétrathionate (Figure IV-23 réaction c). L'oxydation du tétrathionate mène à la formation de trithionate (réaction d) et éventuellement à celle de sulfites (Figure IV-23 réaction e). Ces sulfites sont ensuite oxydés en sulfate (Figure IV-23 réaction f) mais une partie peut être réintégrée dans la réaction b. Les *Thiobacillii* sont également capables d'oxyder les thiosulfates à la place des sulfures. Pour cela, il est nécessaire que du thiosulfate et du tétrathionate soient présents simultanément. Dans ces conditions, le tétrathionate se dismuterait en trithionate et pentathionate (Figure IV-23 réaction g). Ce dernier par une autre réaction catalysée par le thiosulfate produirait du tétrathionate et du soufre (Figure IV-23 réaction h) qui serait assimilé par la bactérie.

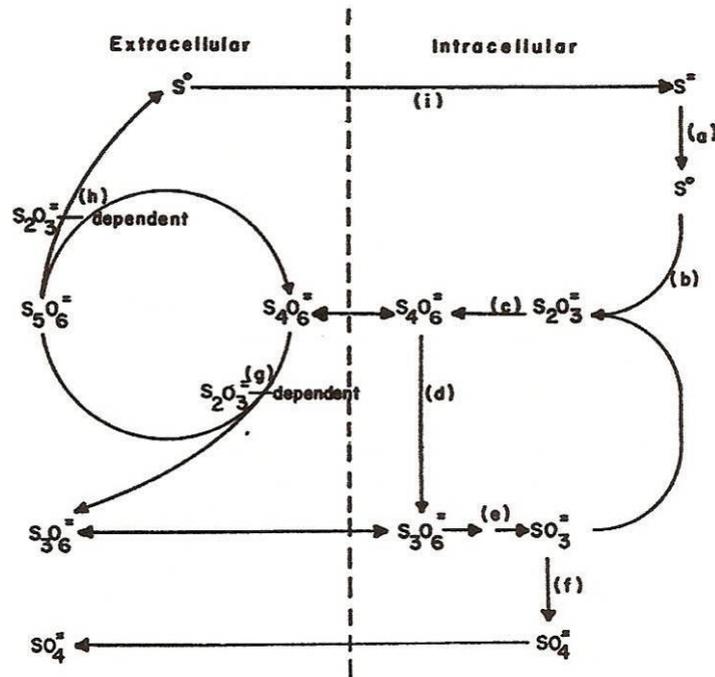


Figure IV-23 : Schéma supposé de l'oxydation du soufre par une bactérie [38].

Suzuki [39] propose une suite de réactions catalysées ou non par des enzymes pour expliquer l'oxydation de l'hydrogène sulfuré, du soufre et du thiosulfate. Son travail est basé sur l'action de deux inhibiteurs des réactions d'oxydation. Le *N*-ethylmaleimide (NEM) est un agent fixant les thiols qui bloque l'oxydation des sulfures au stade du soufre élémentaire puisqu'il impose la formation de l'octet de soufre (S_8). Le 2-heptyl-4-hydroxy-quinole *N*-oxyde (HQNO) est un inhibiteur du transport des électrons.

Selon cet auteur, l'hydrogène sulfuré et le soufre élémentaire sont oxydés selon le même chemin réactionnel grâce à l'intervention de la sulfure oxydase (Réaction IV-24), d'une enzyme oxydant le soufre (Réaction IV-27) et de la sulfite oxydase (Réaction IV-29). Durant ce mécanisme, des électrons sont produits (Réaction IV-25) qui intègrent la chaîne de transfert des électrons ou chaîne respiratoire.

Sulfure oxydase :



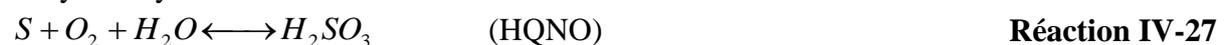
Chaîne respiratoire :



Réaction IV-24 + Réaction IV-25 :



Enzyme oxydant le soufre :



Réaction IV-26 + Réaction IV-27 :



Sulfite oxydase + chaîne respiratoire :



Réaction IV-28 + Réaction IV-29 :



Réaction IV-27 + Réaction IV-30 :



Pour expliquer l'oxydation du thiosulfate, il faut intervenir deux voies métaboliques. La première (Réactions IV-27, IV-29, IV-32 à IV-35) débute par le clivage de la liaison S-S par la rhodanèse suivie par l'action d'une enzyme oxydant le soufre. La sulfite oxydase va ensuite oxyder les sulfite en sulfate en libérant des électrons qui vont intégrer la chaîne respiratoire. Sans l'action d'inhibiteurs, les deux atomes de soufre du thiosulfate vont être oxydés en sulfate sous l'action de deux moles d'oxygène.

Rhodanèse (enzyme de clivage du thiosulfate) :



Enzyme oxydant le soufre :



Réaction IV-27 + Réaction IV-32 :



Sulfite oxydase + chaîne respiratoire :



Réaction IV-29 + Réaction IV-32 :



Réaction IV-27 + 2 (Réaction IV-29) + Réaction IV-32 :



La seconde voie métabolique (Réaction IV-27, IV-29, IV-36 à 40) commence avec la condensation de deux thiosulfates en un tétrathionate qui est hydrolysé en thiosulfate, soufre élémentaire et sulfate. On retrouve ensuite la chaîne de réaction du soufre élémentaire et du thiosulfate de la voie 1.

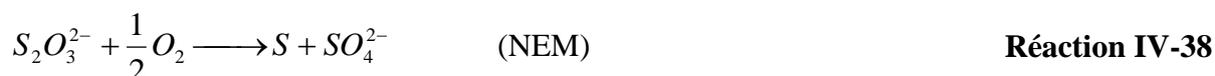
Enzyme oxydant le thiosulfate + chaîne respiratoire :



Hydrolase du tétrathionate :



Réaction IV-36 + Réaction IV-37 :



Enzyme oxydant le soufre :



Réaction IV-27 + Réaction IV-36 + Réaction IV-37 :



Sulfite oxydase + chaîne respiratoire :



Réaction IV-27 + Réaction IV-29 + Réaction IV-36 + Réaction IV-37 :



Ces mécanismes d'oxydation ne correspondent pas exactement au mécanisme plus global proposé par Vishniac et Santer [38]. Ces auteurs n'ont cependant pas précisé quelle était la bactérie sulfo-oxydante étudiée, se limitant à décrire le genre plus général qu'est *Thiobacilli*. Il est donc possible que les voies d'oxydation soient légèrement différentes d'une souche bactérienne à l'autre.

Un élément important se dégage de ces suivis de croissances bactériennes. Il semblerait que les bactéries sulfo-oxydantes soient capables de se développer sans qu'aucune source de soufre ne soit apportée dans leur milieu de culture. Or ces souches bactériennes sont réputées pour oxyder une source de soufre afin de se développer. Elles puisent de cette oxydation des électrons qui intègrent la chaîne respiratoire et qui font fonctionner leur métabolisme. La croissance observée montre que les bactéries ont obtenu de l'énergie pour leur croissance, il est donc possible qu'elles puissent oxyder d'autres molécules. Afin de vérifier cette hypothèse, un essai supplémentaire serait nécessaire qui consisterait à repiquer en cascade les cultures bactériennes en phase stationnaire. Si le milieu de culture possède bien une hypothétique source d'électron alors une croissance sera mise en évidence sur tous les milieux, dont celui sans soufre. Dans le cas contraire, la croissance s'arrêtera sur le milieu sans soufre.

Une possibilité pour expliquer cette croissance sans apport de soufre réside aussi dans la capacité de stockage du soufre dans des vésicules extracellulaires par les bactéries du genre *Thiobacillus* [35, 40, 41] (Figure IV-24).

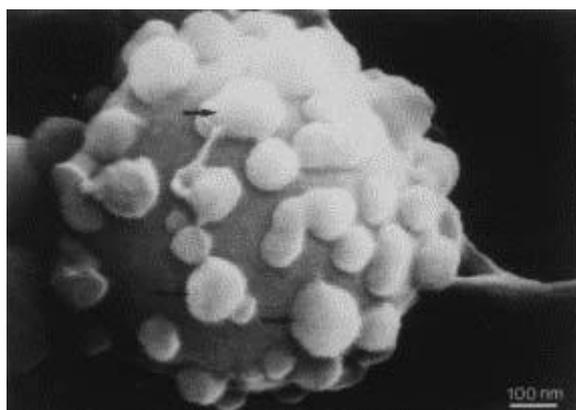


Figure IV-24 : Micrographie électronique de soufre excrété par *Thiobacillus* [35].

La croissance de *Starkeya novella* et *Thiomonas intermedia* en présence d'extraits de levures peut aussi également expliquer cette croissance sans apport de soufre. L'extrait de levures est un concentré de composés solubles issus de suspensions de levures déshydratés et lysées [42] qui contiennent de nombreux éléments potentiellement sources de soufre comme les protéines, les acides nucléiques, les peptides, les acides aminés, les nucléotides, les acides

aminés dérivés [42-44]. Citons par exemple les deux acides aminés soufrés indispensables à la vie que sont la méthionine et la cystéine. Il semblerait donc que *S. novella* et *T. intermedia* utilisent préférentiellement le soufre contenu dans cet extrait de levures plutôt que celui apporté sous forme de thiosulfate, de soufre élémentaire ou d' H_2S .

London [22] a étudié la croissance de *T. intermedia* en autotrophie et en hétérotrophie en présence ou non d'extrait de levures. Selon lui, cette espèce bactérienne est capable de croître sans composés soufrés mais nécessite des extraits de levures et une source de carbone organique de type glucose ou glutamate. Il suggère que la croissance de *T. intermedia* est équivalente pour 0,05% d'extraits de levures et 0,5% de thiosulfate (Figure IV-25) mais avec un temps de latence beaucoup plus long. Ce temps de latence de 11 jours, n'est pas interprété avec certitude. Il suggère l'existence d'une inhibition initiale qui s'annule d'elle-même. London propose également, en liaison avec les travaux de Mechalis et Rittenberg [45], que ces extraits de levures soient utilisés comme des éléments préfabriqués pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques réduisant du même coup les demandes énergétiques.

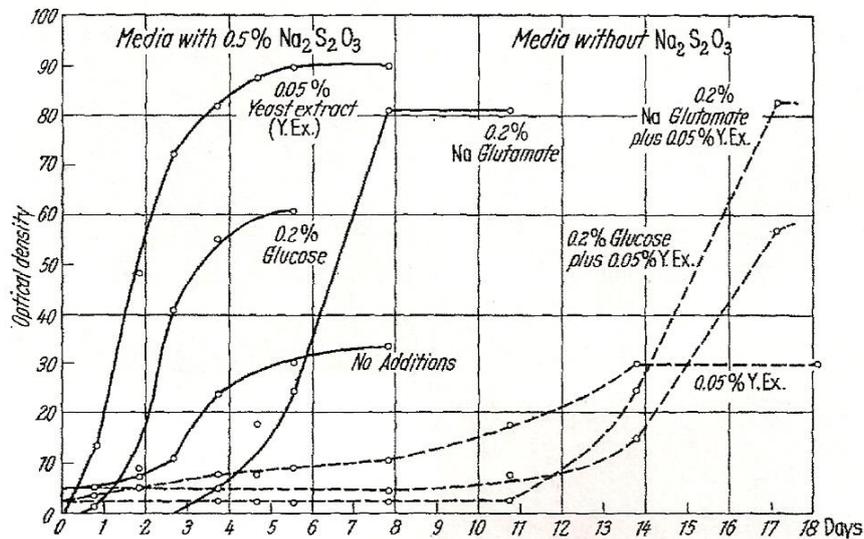


Figure IV-25 : Croissance de *T. intermedia* sous différentes conditions de culture [22].

La croissance des bactéries varie en fonction du type trophique imposé (autotrophie ou hétérotrophie) et de la source de soufre. Celle-ci ne présente pas les mêmes impacts d'une souche bactérienne à l'autre. On peut donc se demander quel est le type d'environnement rencontré dans les réseaux d'assainissement. L'effluent d'eau usée apporte de nombreux composés au biofilm avec lequel il est en contact [46] : des fibres, des protéines, des sucres, des sources de carbone organique ou encore des molécules oxydables. La composition d'un effluent est très variable d'un site à l'autre et dépend fortement de l'origine des apports en eaux usées (Tableau IV-14).

Tableau IV-14 : Paramètres chimiques d'eaux usées selon [46, 47].

	Eau usée domestique (en mg L ⁻¹)	Eau usée industrielle (en mg L ⁻¹)
Demande Chimique en Oxygène	204-440	39 000- 60 000
Carbone Organique Total	50,3-139	-
Azote total	50-70	1 000-1 575
pH	-	7-8

Le biofilm en contact avec l'effluent pourra très certainement se développer en hétérotrophie car il trouvera dans l'effluent suffisamment d'éléments. Les conditions d'humidités retrouvées dans les réseaux d'assainissement font que l'ensemble de la canalisation est généralement humide. Les courants de convections charrient jusqu'à la voute des microgouttelettes d'eau ainsi que les composés volatils issus de l'effluent [48] (Figure IV-26). La composition en éléments minéraux et organiques de la voute est donc le reflet de la composition de l'effluent.

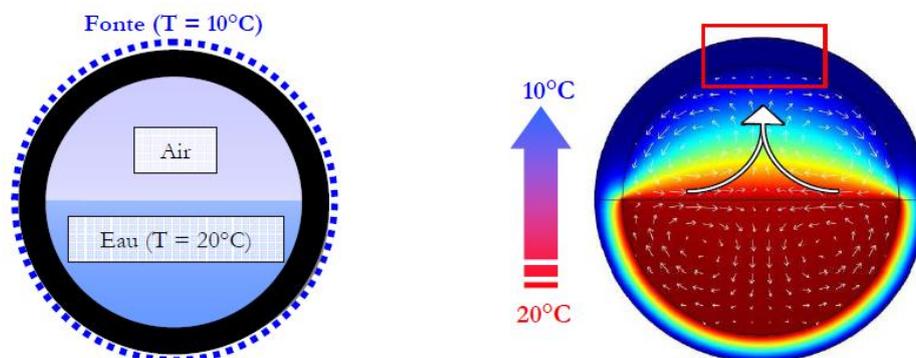


Figure IV-26 : Modélisation des températures sous COMSOL d'une canalisation d'eau usée [48].

Ainsi nous pouvons imaginer que la voute présente des conditions de croissance variable dues à un apport non homogène des différentes molécules nécessaire à la croissance de toutes les souches bactériennes. Le biofilm, en fonction des zones considérées et du temps doit passer de l'hétérotrophie à l'autotrophie et consommer de façon différente l'ensemble des sources de soufre oxydé disponibles à la surface du matériau.

Cette variation des conditions trophiques va avoir une influence majeure sur la dynamique des populations en favorisant ou inhibant certaines espèces. On pourrait penser que les bactéries mixotrophes soient favorisées dans ces environnements changeant par rapport à des organismes autotrophes stricts mais Gottschal *et al.* [49, 50] ont montré que la fréquence des changements est déterminante. Dans des environnements passant rapidement et de manière cyclique de conditions d'autotrophies à hétérotrophies, les bactéries autotrophes strictes sont favorisées. Leur métabolisme reste prêt à oxyder une source de soufre réduite contrairement aux bactéries mixotrophes qui vont voir leur métabolisme s'adapter à chaque changement et n'auront pas la réactivité nécessaire pour se développer rapidement. Gottschal *et al.* [49, 50] l'ont montré à l'aide de trois souches bactériennes (*Halothiobacillus neapolitanus* : autotrophe, *Paracoccus versutus* (anciennement *Thiobacillus A2*) : mixotrophe [51] et *Spirillum G7* : hétérotrophe) cultivées dans des conditions différentes (soit les proportions d'acétate et de thiosulfate varient (Figure IV-27-A) soit des cycles d'autotrophie/hétérotrophie sont réalisés en alternant le thiosulfate et l'acétate toutes les 4h (Figure IV-27-B)).

La Figure IV-27-A montre que *Paracoccus versutus* est capable de se maintenir quel que soit le milieu de culture étudié. Quand le quotient [acétate]/[thiosulfate] augmente de 0/40 à 5/30, le nombre relatif de *P. versutus* augmente alors que celui de *H. neapolitanus* diminue et que *S. G7* ne peut pas croître dans le milieu. Quand le quotient [acétate]/[thiosulfate] diminue de 20/0 à 15/10, le nombre de *P. versutus* augmente en même temps que celui de *S. G7* diminue et que *H. neapolitanus* ne parvient pas à se développer. La partie centrale de ce graphique indique qu'une coexistence des trois souches bactériennes est possible si les nutriments sont apportés dans les bonnes proportions.

La Figure IV-27-B démontre que *P. versutus* initialement présente comme l'espèce dominante est progressivement dépassée par *S. G7* et par *H. neapolitanus* à mesure que le milieu est

soumis aux cycles alternants 20 mM d'acétate durant 4 h puis 40 mM de thiosulfate durant 4 h.

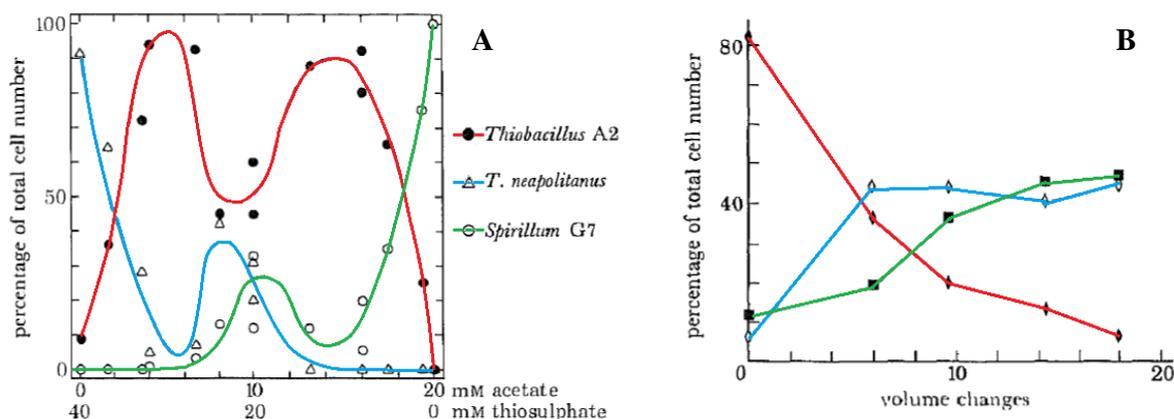


Figure IV-27 : A – Résultat de l'essai de compétition entre *P. versutus*, *H. neapolitanus* et *S. G7* [49]. B – Compétition en culture continue entre *P. versutus*, *H. neapolitanus* et *S. G7* pour la culture sur thiosulfate et acétate en condition limitante en fonction du nombre de changement. Les deux milieux ont été apportés successivement durant 4 h [50].

Kuenen et Beudeker [52] ont mis au point un modèle simplifié (Figure IV-28) permettant de prévoir le type de population de bactéries sulfo-oxydantes présentes dans des eaux douces soumises à des taux variables de renouvellement des composés soufrés inorganiques par rapport aux composés organiques. Ces auteurs prévoient le développement de bactéries sulfo-oxydantes autotrophes dans des environnements aux conditions très changeantes. Ce modèle coïncide bien avec la dynamique de colonisation des réseaux d'assainissement puisque les bactéries impliquées dans la biodétérioration des matériaux cimentaires sont soit autotrophes soit mixotrophes et la dernière bactérie de la succession, *A. thiooxidans* est une bactérie autotrophe qui devient majoritaire vis-à-vis de toutes les autres bactéries.

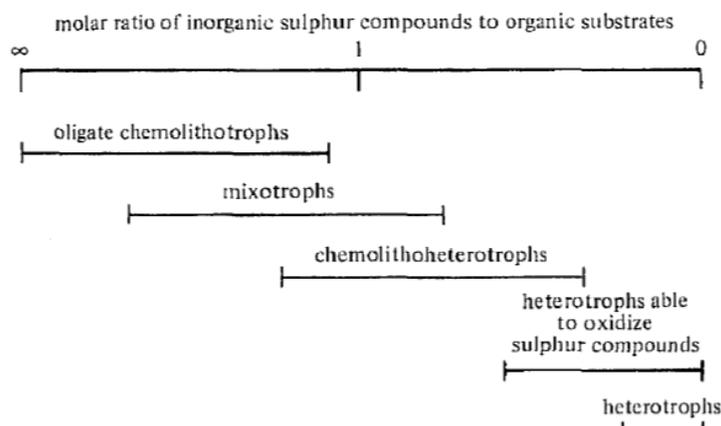


Figure IV-28 : Modèle prédisant l'apparition de bactéries sulfo-oxydantes en fonction du taux de renouvellement relatif des composés soufré inorganique réduit et des substrats organique durant des conditions de croissance limitées en énergie dans des eaux douces [52].

IV-2.4. Conclusion

L'étude de la croissance des différentes bactéries en présence d'une source de soufre variable montre de réelles différences pour *Starkeya novella* cultivée en autotrophie qui se développe majoritairement sur du soufre élémentaire. Les autres souches bactériennes ne semblent pas

aussi sélectives quant au type de soufre à privilégier et utilisent l'ensemble des molécules soufrées de manière aussi rapide.

Les conditions qui favorisent le développement d'une biomasse importante sont à prendre en considération pour la mise en place d'un essai accéléré. Or, d'après cette étude, les conditions les plus favorables varient d'une espèce bactérienne à l'autre et il semble difficile de satisfaire l'ensemble des souches bactériennes simultanément. Apporter du soufre sous forme d'hydrogène sulfuré paraît être la meilleure solution car il a la possibilité de s'oxyder en soufre élémentaire ou en une autre molécule plus oxydée à la surface des matériaux cimentaires. Les bactéries vont ainsi retrouver toutes les sources de sulfures indispensables à leur croissance respective.

En se développant les bactéries sulfo-oxydantes oxydent les sources de soufre présentes dans leur milieu jusqu'au composé le plus oxydé, l'acide sulfurique. Par conséquent, il est indispensable d'étudier l'impact de cet acide sur les différents matériaux cimentaires.

IV-3. Attaque acide

D'après la littérature, la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement est un phénomène correspondant, dans sa phase finale, à une production d'acide sulfurique par des bactéries sulfo-oxydantes acidophiles, il en résulte donc une attaque acide sur les matériaux cimentaires qui conduit à la dissolution de la matrice cimentaire et à la formation de produits non cohésifs et/ou expansifs tel que le gypse et/ou l'ettringite. Ainsi une manière simple d'étudier cette étape du processus est de recréer l'attaque acide directement sur les matériaux en les soumettant à une concentration connue d'acide tout en réalisant un suivi de l'évolution des échantillons et des solutions.

Deux types d'attaques acides ont été réalisés en laboratoire sur deux matériaux cimentaires à base de ciment Portland ou de ciment d'aluminate de calcium. Les essais sont effectués, d'un côté en soumettant les échantillons à une solution acide à différents pH et de l'autre, à ces mêmes solutions acides mais en renouvelant toutes les 8 et 16 h la solution agressive. Le but est de mettre en évidence des comportements différents des matériaux suivant le type d'attaque mis en place.

IV-3.1. Matériels et méthodes

Deux types d'essais, basés sur des immersions d'échantillons de mortier dans des solutions d'acide sulfurique à différents pH, ont été réalisés. Ces essais ont une durée de cinq jours.

Le premier essai consiste à immerger un cube de mortier de 2 cm de côté dans 500 mL d'une solution d'acide sulfurique à un pH déterminé, variant de 1 à 5,5 (1 ; 2 ; 3 ; 4,5 ; 5,5). Toutes les 24 heures, un prélèvement de 20 mL de la solution est effectué pour réaliser un suivi du passage des ions en solution par analyses ICP. Les pH de la solution et de la surface du mortier sont également mesurés à chaque échéance.

Le second essai est une immersion d'un cube de mortier de 2 cm de côté dans 500 mL d'une solution d'acide sulfurique avec renouvellement de cette solution toutes les 8 et 16 heures. Pour cet essai, le pH varie également de 1 à 5,5. A chaque renouvellement, les mêmes déterminations que pour le premier essai sont réalisées.

Les échantillons utilisés pour ces essais sont des mortiers gâchés avec du sable siliceux normalisé et avec des rapports E/C de 0,37 et S/C de 1,44. Deux types de ciment ont été employés, un ciment Portland de type CEM I et un ciment d'aluminate de calcium (CAC+S). Les solutions d'acide sulfurique ont été obtenues par dilution en cascade à partir d'une solution à 10 N. Cinq pH ont été étudiés : 1 ; 2 ; 3 ; 4,5 et 5,5.

IV-3.2. Résultats

IV-3.2.1. Observation des mortiers

Après une semaine d'immersion dans des solutions acides, les échantillons ont changé d'aspect (Figure IV-29). Les plus détériorés sont ceux qui ont été exposés à une solution à bas pH et plus particulièrement ceux exposés à pH 1 (CEM I et CAC) et à pH 2 pour le CEM I.

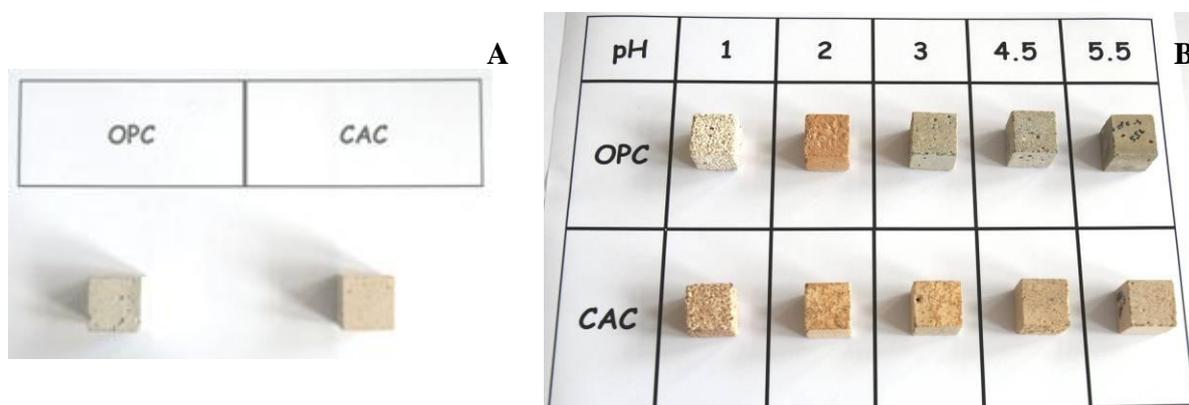


Figure IV-29 : Mortiers à base de ciment Portland (OPC) et de ciment d'aluminate de calcium (CAC) avant immersion (A) et après 5 jours d'immersion dans l'acide sulfurique sans renouvellement (B).

A la fin des essais, les échantillons de mortier ont été coupés en deux pour observer le profil de la couche de détérioration. Deux indicateurs colorés, ayant des zones de virage distinctes, ont été pulvérisés sur les échantillons. Les indicateurs colorés utilisés, sont d'une part, la phénolphthaléine qui a une zone de virage comprise entre 8,2 et 10 avec une forme acide incolore et une forme basique rose et, d'autre part, le pourpre de bromocresol qui a une zone de virage comprise entre 5,2 et 6,8 avec une forme acide jaune et une forme basique pourpre.

Ces pulvérisations ont permis de mettre en évidence une zone ayant un pH plus faible en surface des matériaux (Figures IV-30 et IV-32). La profondeur maximale de la zone altérée est de 1 mm pour le pH 1.

Les deux indicateurs colorés donnent des résultats quasiment identiques pour les solutions de pH 1 et 2 et permettent de voir pour les autres solutions que le pH de surface n'est pas descendu au-dessous de 7 (Figures IV-30 et IV-31) lorsque l'essai est réalisé sans renouvellement de la solution.

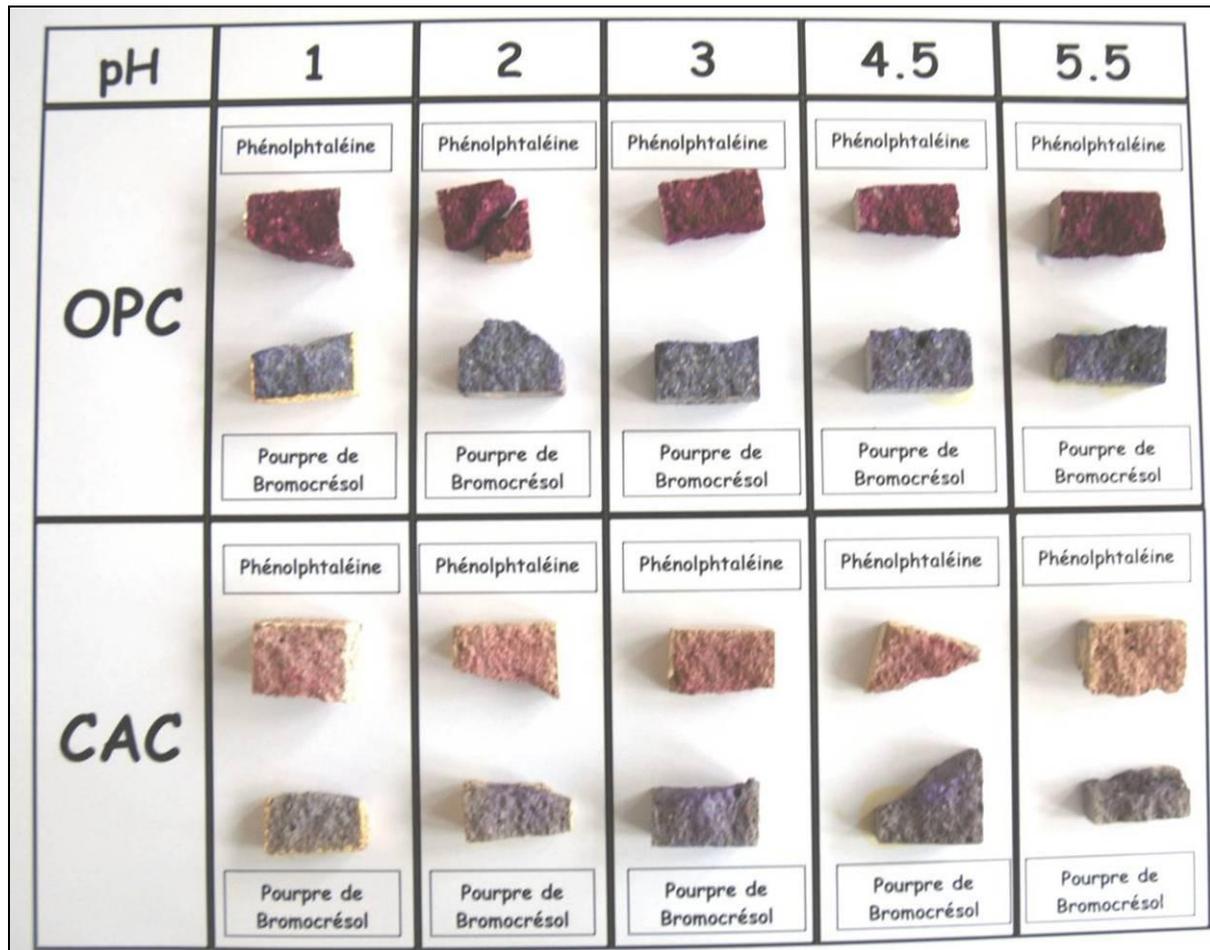


Figure IV-30 : Photographies des échantillons immergés 5 jours dans de l'acide sulfurique sans renouvellement, vue de dessus.

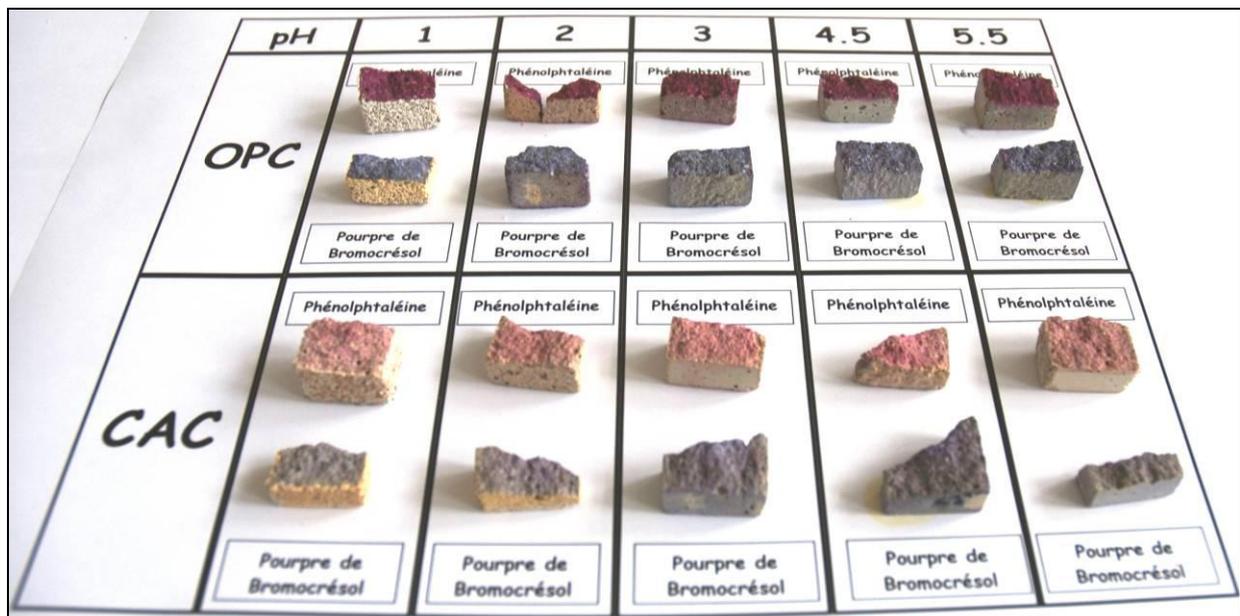


Figure IV-31 : Photographies des échantillons immergés 5 jours dans de l'acide sulfurique sans renouvellement, vue oblique.

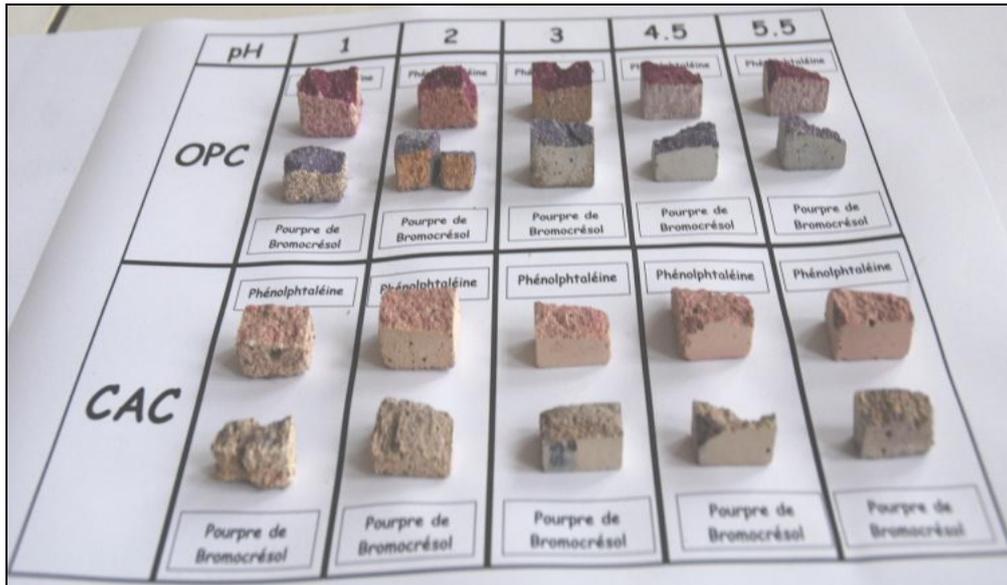


Figure IV-32 : Photographies des échantillons immergés 5 jours dans de l'acide sulfurique avec renouvellement.

IV-3.2.2. Evolution des pH

Pour les essais sans renouvellement, les mortiers à base de ciment Portland réagissent avec la solution d'acide sulfurique pour atteindre un équilibre (Figures IV-33 et IV-34). Pour les pH 3 à 5,5, les solutions sont assez rapidement neutralisées par la dissolution des mortiers jusqu'à une valeur d'équilibre. Au contraire, pour le pH 1, la solution acide impose son pH au système et induit une chute importante et rapide du pH à la surface du mortier. Le pH 2 représente une situation intermédiaire puisque les pH sont conservés à leur valeur initiale pendant 48h avant qu'une évolution puisse être observée.

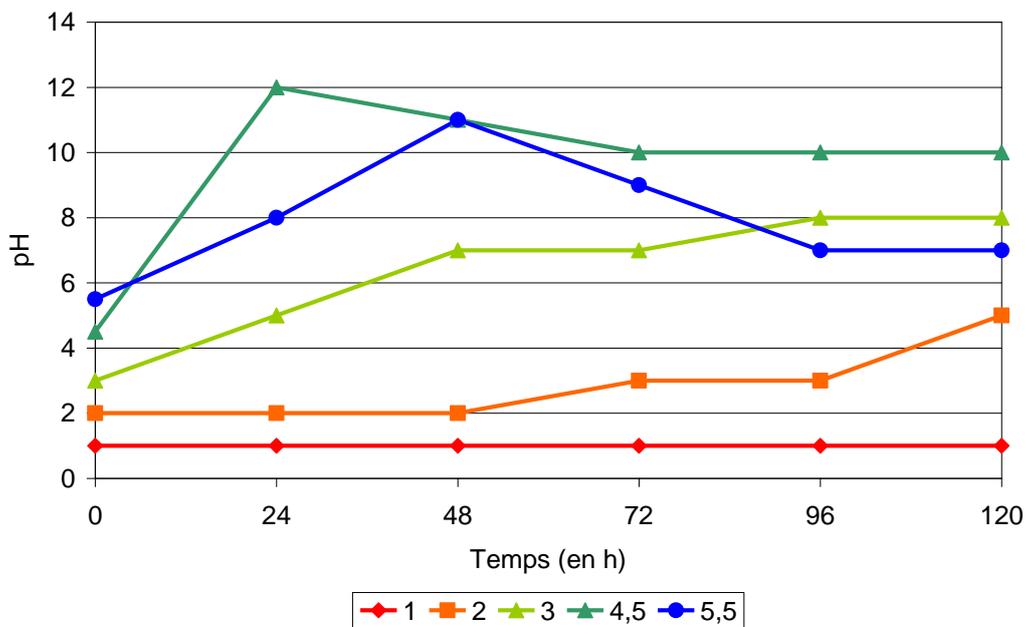


Figure IV-33 : Evolution du pH de la solution pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.

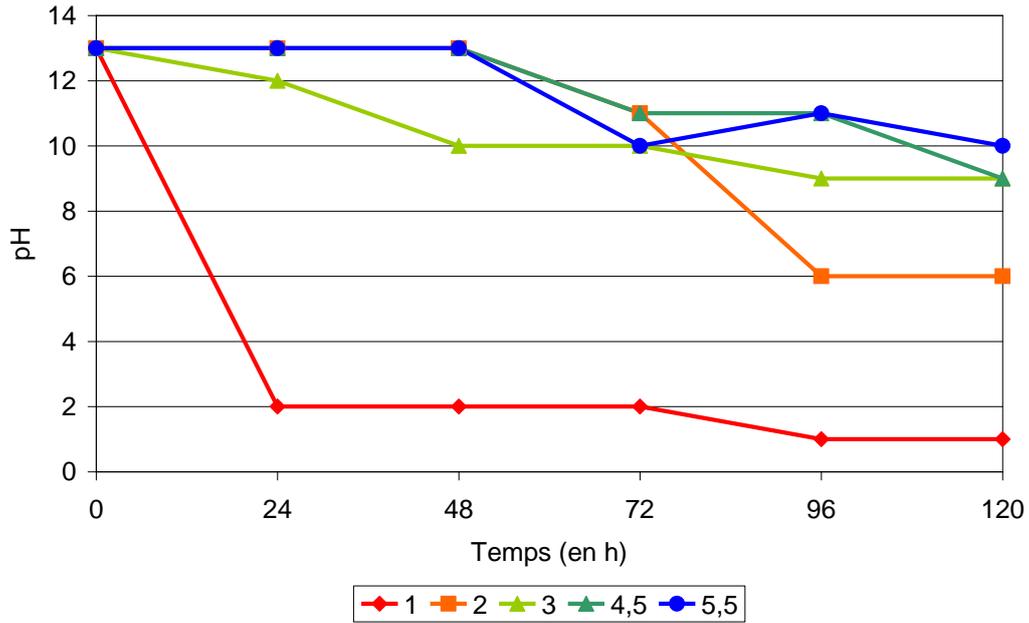


Figure IV-34 : Evolution du pH de la surface du mortier pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.

En ce qui concerne le mortier au ciment d'aluminate de calcium, le pH augmente progressivement dans la solution non renouvelée et diminue à la surface du mortier pour les pH de 2 à 5,5 (Figures IV-35 et IV-36). Seule la solution à pH 1 reste à ce pH après cinq jours. Un équilibre est atteint au bout de 4 à 5 jours et le mortier semble se stabiliser à un pH de surface de 7.

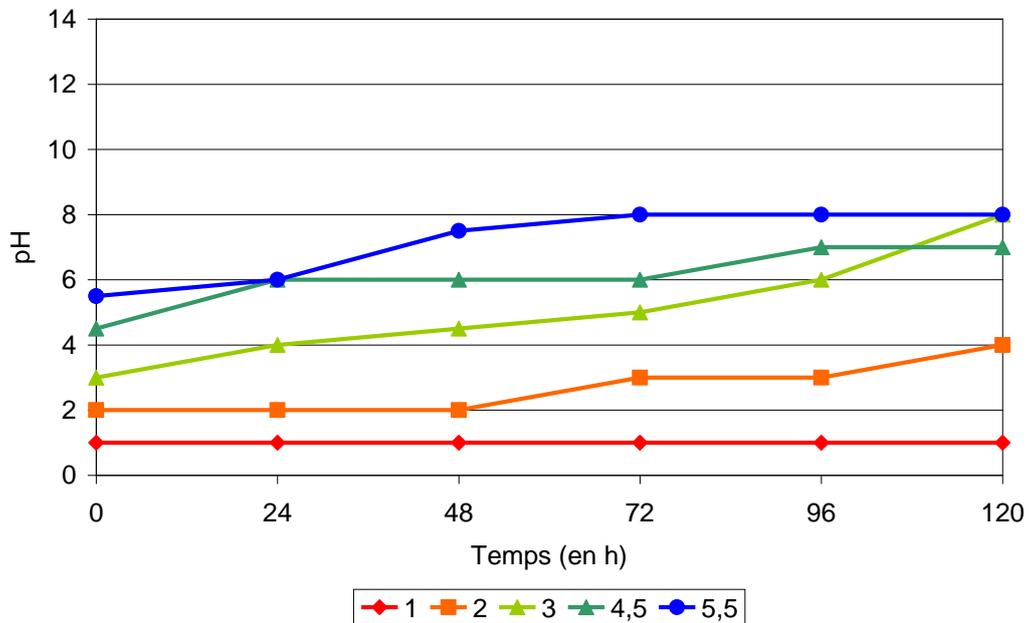


Figure IV-35 : Evolution du pH de la solution pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminate de calcium.

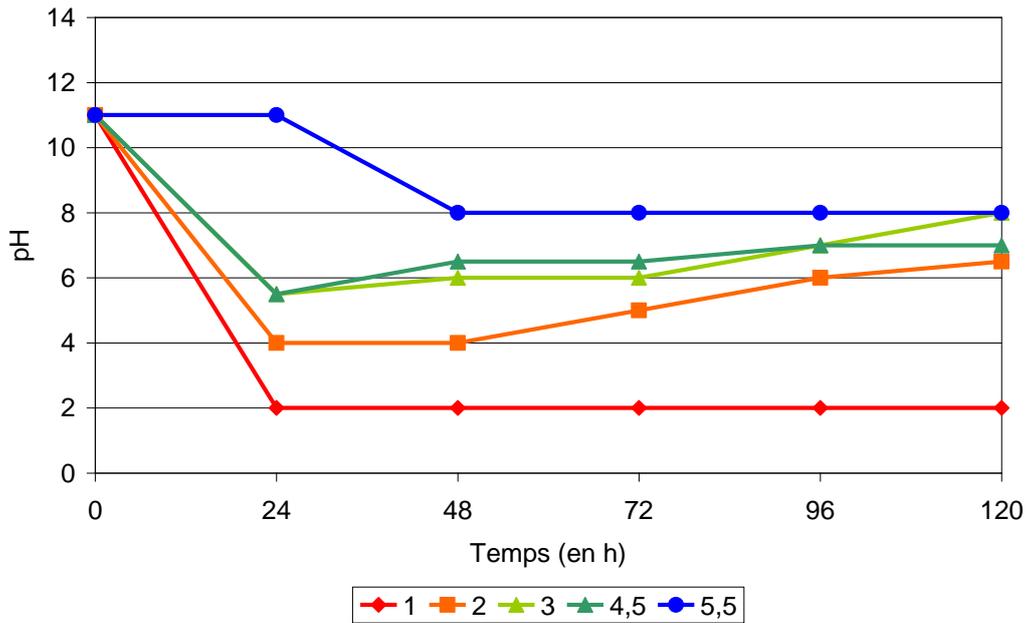


Figure IV-36 : Evolution du pH de la surface du mortier (B) pour les essais sans renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminat de calcium.

Avec un renouvellement de la solution acide, nous remarquons pour les mortiers à base de ciment Portland un phénomène en deux étapes (Figures IV-37 et IV-38). Dans un premier temps (24 à 32 h) le mortier réagit avec la solution acide. Il en résulte une chute rapide du pH de surface du mortier et une hausse du pH de la solution. A la fin de cette étape, les équilibres acide/base sont atteints et les phénomènes de diffusion du cœur vers l'extérieur sont totalement mis en place. Dans la seconde étape, le système reste à l'équilibre, la solution acide attaque le mortier sain mais doit au préalable diffuser à travers une zone déjà détériorée.

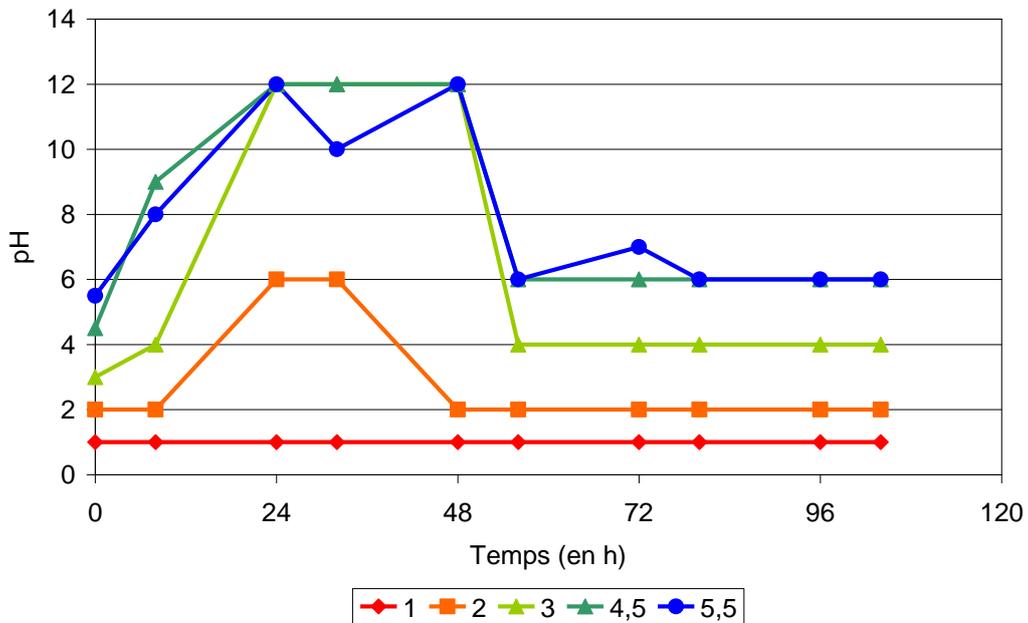


Figure IV-37 : Evolution du pH de la solution pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.

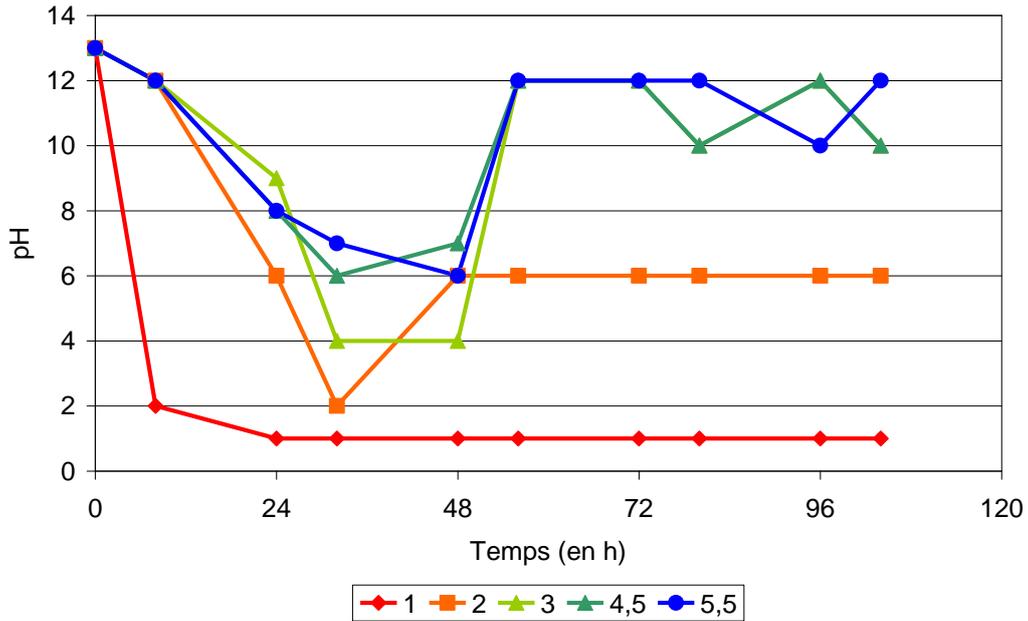


Figure IV-38 : Evolution du pH de la surface du mortier pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment Portland.

Avec les mortiers à base de ciment d'aluminate de calcium le même type de comportement est observé (Figures IV-39 et IV-40). L'évolution du pH en surface des échantillons est néanmoins plus complexe et provient vraisemblablement de la formation de gel d'alumine en surface qui crée localement une zone tampon.

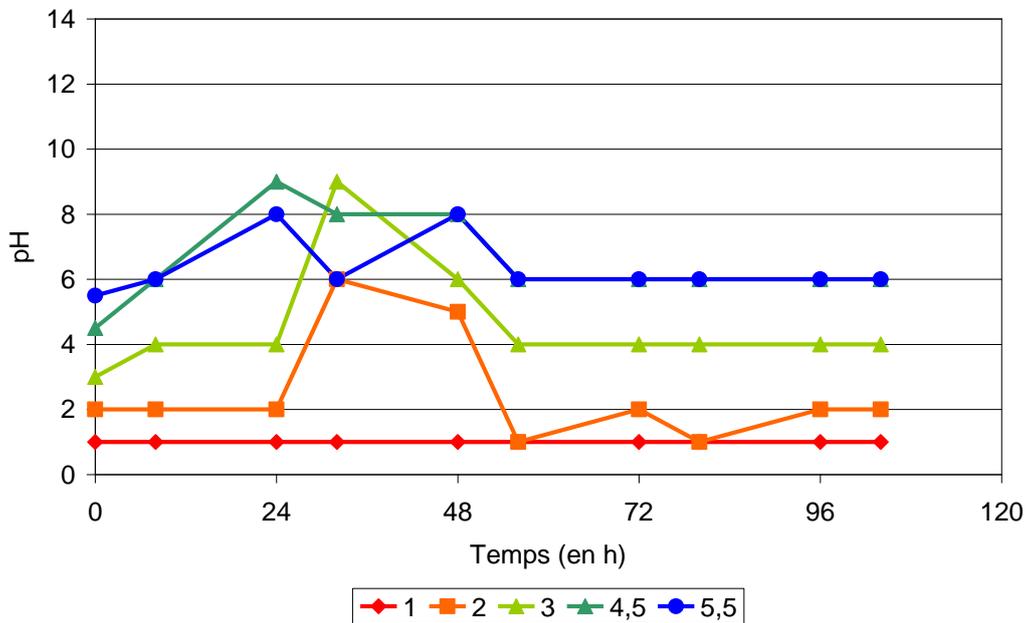


Figure IV-39 : Evolution du pH de la solution pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminate de calcium.

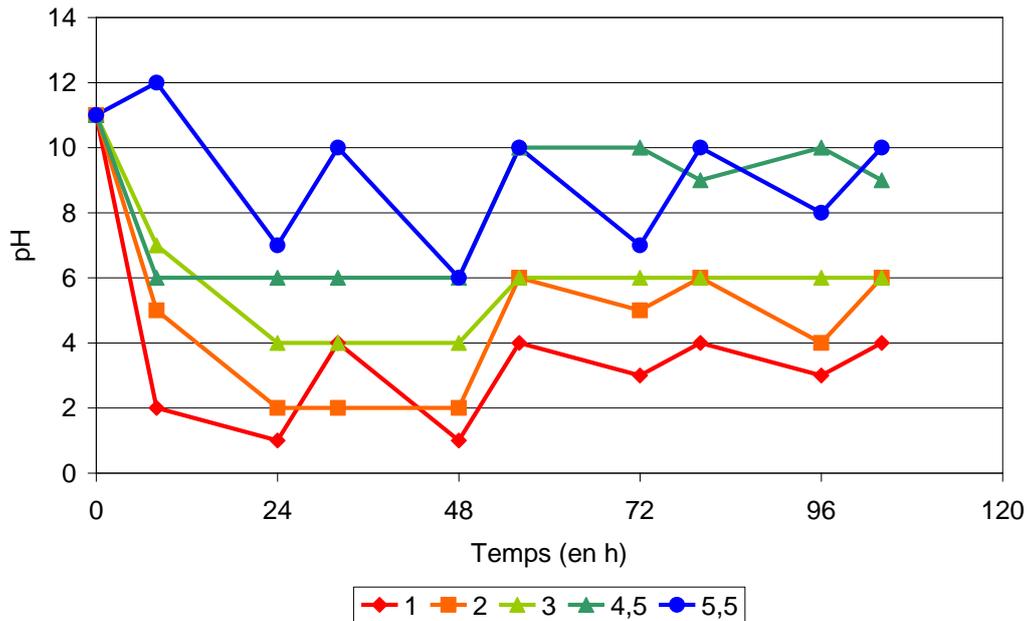


Figure IV-40 : Evolution du pH de la surface du mortier pour les essais avec renouvellement de la solution acide, du mortier à base de ciment d'aluminate de calcium.

Les résultats obtenus pour les essais sans renouvellement de la solution d'acide sulfuré diffèrent de ceux obtenus avec renouvellement. L'essai le plus agressif pour le matériau est l'essai avec renouvellement. La solution d'acide sulfurique la plus agressive est la solution à pH 1 qui engendre une chute importante du pH du mortier.

IV-3.2.3. Suivi des pertes de masses

Au cours de l'essai, les échantillons ont été pesés à chaque échéance. La quantité de matière perdue au cours du temps pour les pH 1 et 2 est présentée sur la Figure IV-41 ainsi que les résultats d'une étude similaire, réalisée par Espinosa *et al.* [53].

L'étude réalisée par Espinosa *et al.* [53] porte sur des échantillons parallélépipédiques de mortier (2x2x10 cm) réalisés à base de ciment Portland ou de ciment d'aluminate de calcium et avec du sable siliceux. Les mortiers sont formulés selon un rapport E/C de 0,4 et un rapport S/C de 2.

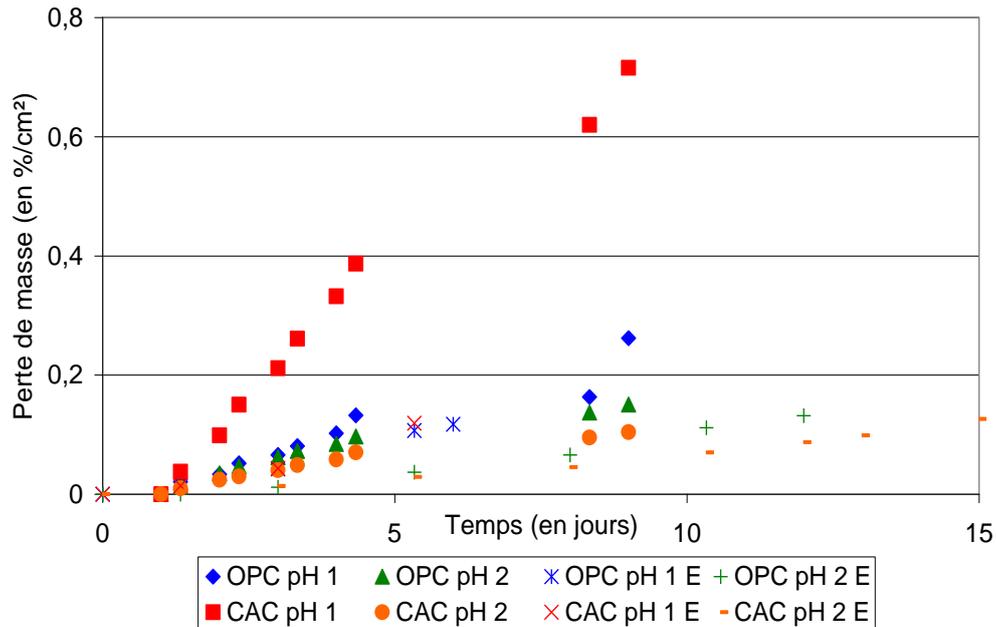


Figure IV-41 : Evolution de la perte de masse au cours du temps et comparaison avec les résultats d'Espinosa *et al.* [53].

Le suivi de la perte de masse réalisé sur les échantillons immergés dans une solution acide avec renouvellement montre que les mortiers ne réagissent pas de la même façon suivant le pH de la solution. Dans le cas d'un pH 1, le mortier au ciment d'aluminat de calcium perd jusqu'à trois fois plus en masse que le mortier au ciment Portland alors qu'à pH 2, les deux mortiers perdent une masse comparable.

La comparaison avec l'étude d'Espinosa *et al.* [53] montre que les allures de courbes sont similaires mais que les échantillons de notre étude perdent, de manière générale, plus de masse. La différence de perte de masse peut-être due à la différence dans la géométrie des échantillons ou à l'état de surface des échantillons avant immersion. En effet, d'après Zivica *et al.* [54], la porosité et donc, dans une certaine mesure, l'état de surface des échantillons joue un rôle important dans la durabilité des matériaux cimentaires face à une attaque acide. Or les échantillons utilisés pour la présente étude ont été sciés sur deux de leurs faces présentant donc une surface fragilisée et plus accessible à un agent agressif tel que l'acide sulfurique alors que les échantillons de l'étude d'Espinosa ont été totalement moulés et présentent donc une surface moins poreuse.

IV-3.2.4. Suivi du passage des ions en solution

Les Figures IV-42 à IV-45 présentent l'évolution des concentrations ioniques (exprimées par rapport à la surface exposée) en fonction du temps pour les deux types de matériaux et pour les deux types d'essais. Les évolutions des concentrations en ions lixiviés au cours du temps pour les échantillons immergés dans les solutions acides de pH 2 à 5,5 sont rassemblées dans l'annexe k.

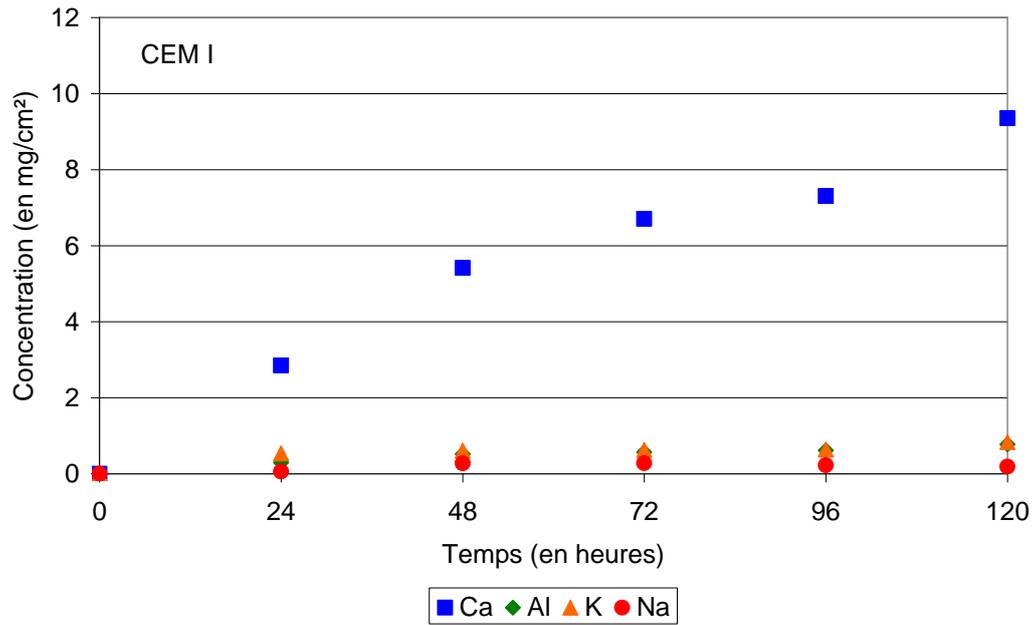


Figure IV-42 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 1.

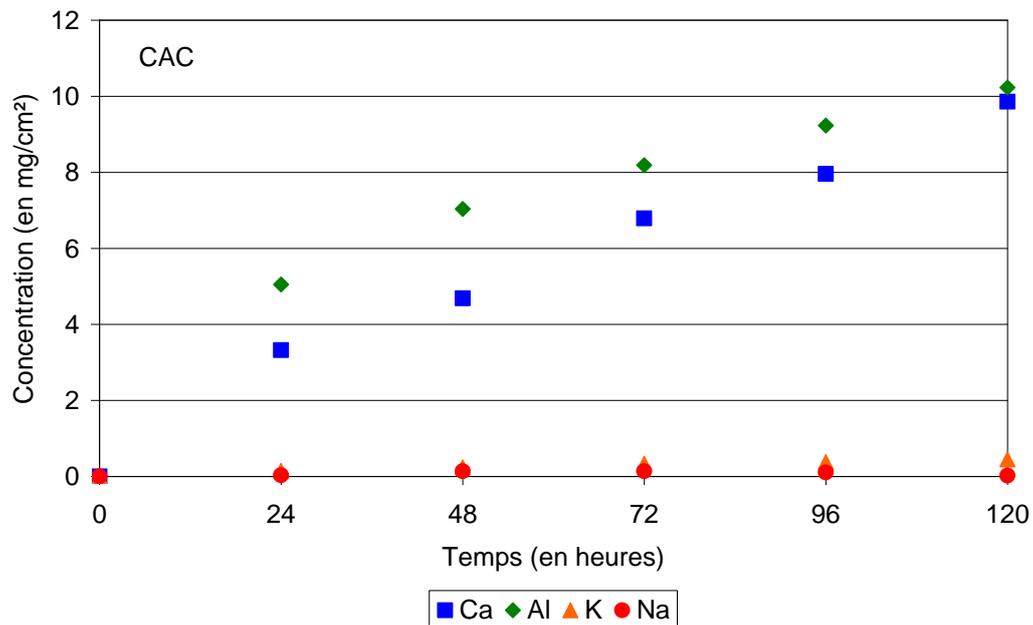


Figure IV-43 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 1.

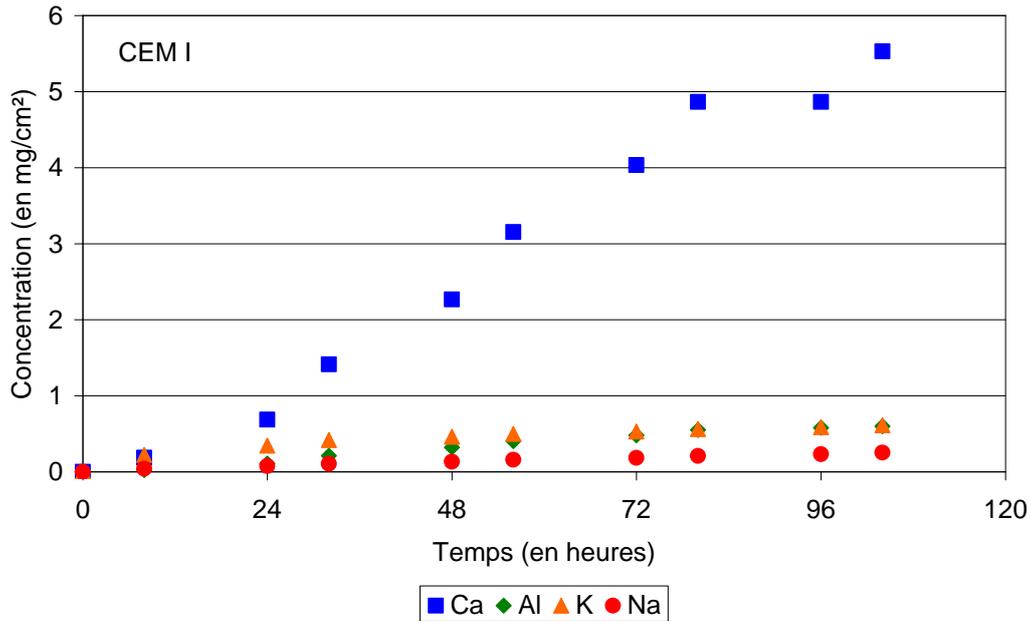


Figure IV-44 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 1.

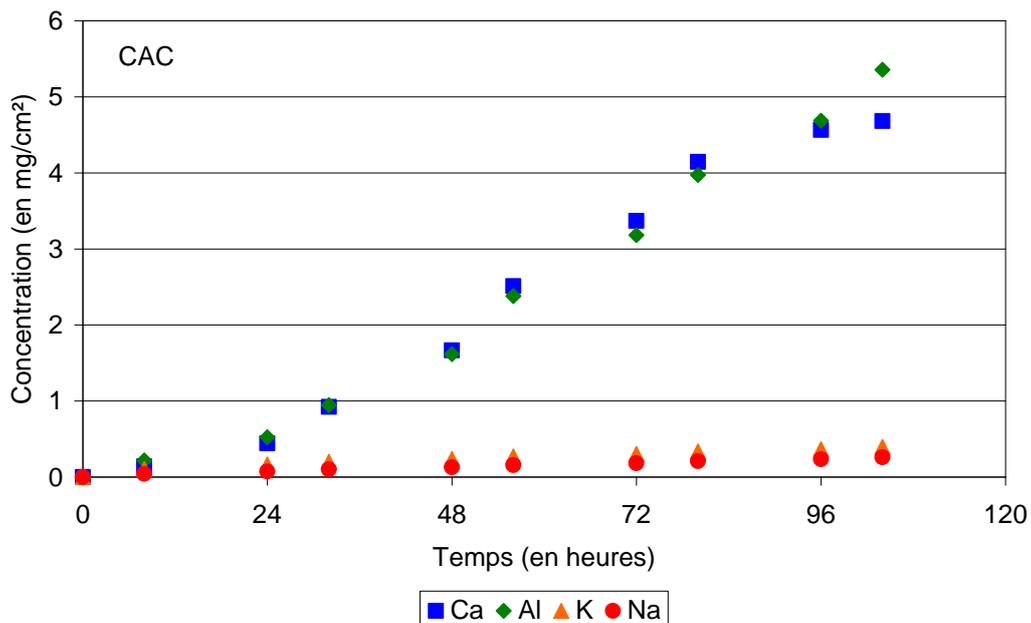


Figure IV-45 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 1.

Deux premières observations peuvent être faites pour l'ensemble de ces courbes d'évolution des ions en solution :

- Les ions sont extraits en fonction de leur teneur présente initialement dans le matériau. Par exemple, les mortiers au ciment d'aluminat de calcium qui contiennent beaucoup d'aluminat présentent une forte teneur en aluminium en solution alors que les mortiers au ciment Portland conduisent à des concentrations faibles en cet élément.
- Pour tous les pH, l'extraction est plus rapide dans les premiers temps des essais sans renouvellement mais diminue en fin d'expérience.

▪ Les concentrations en ions atteintes pour les essais avec renouvellement de la solution acide sont le plus souvent inférieures aux valeurs atteintes pour les essais sans ce renouvellement ce qui peut être expliqué par la mise en place d'une succession d'équilibres dans le cas du renouvellement de la solution acide.

Si on s'intéresse au rapport Ca/Al, on remarque qu'il diminue avec l'abaissement du pH (Tableau IV-15), comme l'on également montré Shi *et al.* [55]. Ceci nous indique que l'aluminium contenu dans les matériaux cimentaires est plus sensible aux attaques acides que ne l'est le calcium. D'après le diagramme de phase d' $Al_2O_3-H_2O$ [56], l'aluminium existe dans une solution sous la forme de différentes espèces hydratées qui dépendent du pH de la solution. La solubilité de ces espèces à pH 1 est plus importante que celle de ces mêmes espèces à un pH plus élevé. Ainsi la concentration en aluminium en solution augmente significativement avec la chute de pH entraînant la diminution du rapport Ca/Al.

Tableau IV-15 : Evolution du rapport Ca/Al suivant le pH.

		pH 1	pH 2	pH 3
Sans renouvellement	CEM I	12,08	48,45	125,00
	CAC+S	0,96	3,15	6,54
Avec renouvellement	CEM I	9,23	8,98	73,07
	CAC+S	0,87	2,16	7,50

En traçant les courbes de la concentration en ions libérés en solution en fonction de la racine carrée du temps (Figures IV-46 et IV-47, Annexe I) on distingue, quel que soit le type d'essai, une zone linéaire commençant au bout de 24 heures et se terminant aux alentours de 72 à 96 heures. Ceci est caractéristique d'un processus de diffusion.

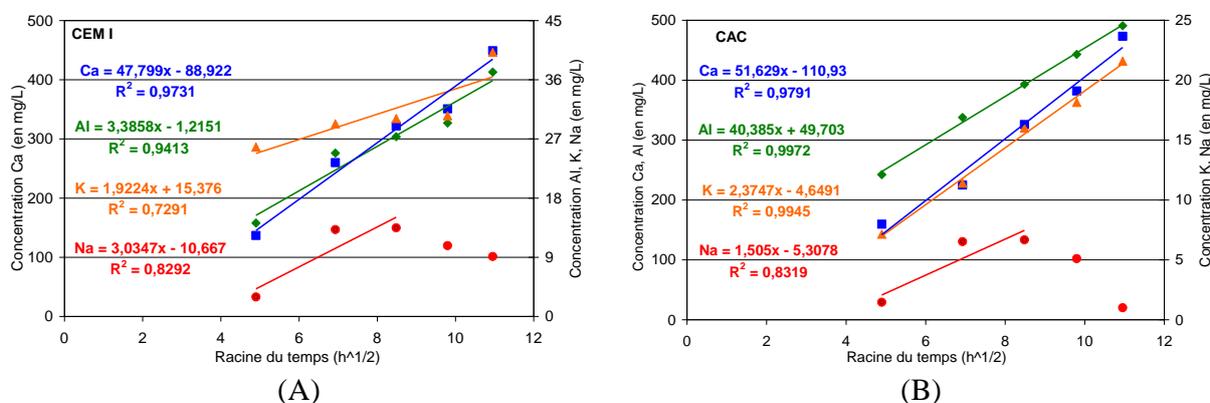


Figure IV-46 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 1 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).

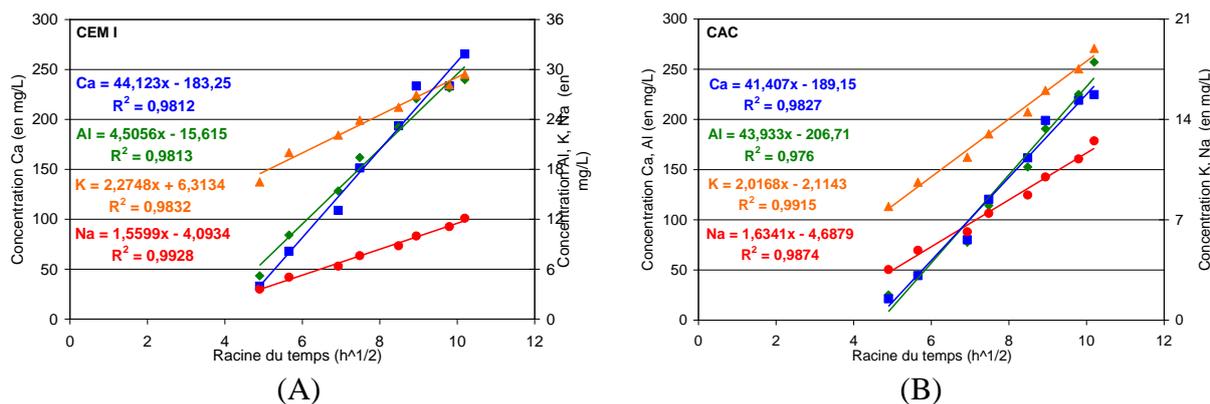


Figure IV-47 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 1 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminat de calcium (B).

Pour les essais sans renouvellement, l'attaque chimique peut être représentée par trois étapes successives. Une première étape d'une durée d'environ 24 heures durant laquelle les processus se mettent en place. La deuxième étape est marquée de façon quasi générale par des processus de diffusion. La dernière étape est un ralentissement des réactions d'attaque résultant vraisemblablement d'une saturation de la solution.

Dans le cas des essais avec renouvellement, les deux premières étapes sont observées avec la phase de diffusion encore active après 5 jours d'expérience compte tenu du renouvellement de la solution d'acide.

Si l'on se focalise sur l'étape de diffusion, la représentation des constantes de diffusion (pentes des droites des Figures IV-62 à IV-71) pour chaque élément en fonction du pH (Figure IV-48) permet de tirer plusieurs enseignements de ces essais :

1. Le renouvellement de la solution acide n'influe pas sur la vitesse de lixiviation mise en place lors de la phase de diffusion. En effet, quel que soit l'élément considéré, les vitesses (Figure IV-48) de mise en solution sont similaires à un pH donné et ce malgré des concentrations en éléments parfois différentes dans les matériaux.

2. Le calcium passe en solution à la même vitesse (Figure IV-48) quelque soit le type de ciment et ce malgré le fait que le ciment d'aluminat de calcium ait une concentration en cet élément deux fois plus faible que celle du ciment Portland. Cela semble indiquer que le maximum de solubilité est atteint ou que les hydrates constitutifs des deux matrices cimentaires de natures différentes se comportent différemment.

3. L'aluminium a une vitesse de diffusion différente suivant le matériau. Il passe en solution quasiment dix fois plus rapidement pour le mortier CAC que pour le mortier CEM I. Une explication possible réside dans la concentration initiale de cet élément dans les deux ciments puisque la concentration en aluminium du CAC est dix fois supérieure à celle du ciment Portland. De plus, l'aluminium n'est pas présent sous la même forme dans les deux ciments et est plus disponible et plus soluble dans le cas du CAC. On peut donc s'interroger sur l'impact de l'aluminium sur l'activité bactérienne lors d'une attaque acide.

4. En ce qui concerne le potassium et le sodium, il n'y a aucune influence du type de ciment sur la vitesse d'extraction. Ces deux éléments, trois et quatre fois moins présents

respectivement dans le ciment CAC atteignent donc leur maximum de solubilité puisque ce sont des ions très solubles.

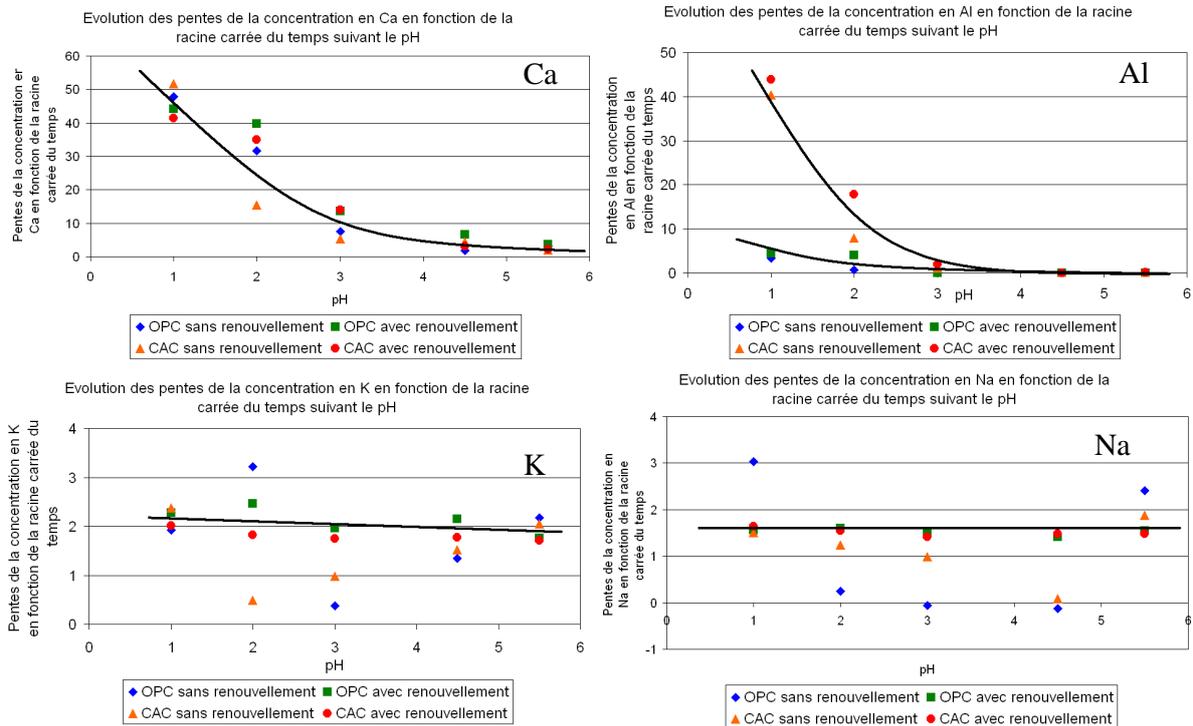


Figure IV-48 : Evolution des vitesses d'extraction de différents éléments en fonction du pH.

IV-3.3. Mécanisme de l'attaque acide

La mise en contact d'une solution fortement acide (pH 1 ou 2) avec un matériau cimentaire conduit à une détérioration importante de la surface de ce matériau.

Le mécanisme d'action de l'acide sulfurique sur des matériaux cimentaires peut être expliqué par un mécanisme en deux voire trois étapes (Figure IV-49) avec dans un premier temps, la solution acide qui va réagir sur le matériau cimentaire entraînant une chute rapide du pH de surface. La deuxième étape est la mise en place d'un phénomène de « double » diffusion dans la zone détériorée avec dans un sens, les protons qui diffusent vers le cœur sain du matériau et de l'autre, les ions mis en solution qui diffusent vers la solution. La troisième étape, est la dissolution totale du matériau. Cette étape n'a pas été observée durant cette étude car les échantillons ont conservé leur taille initiale. Les pertes de masse sont essentiellement dues au passage des ions en solution.

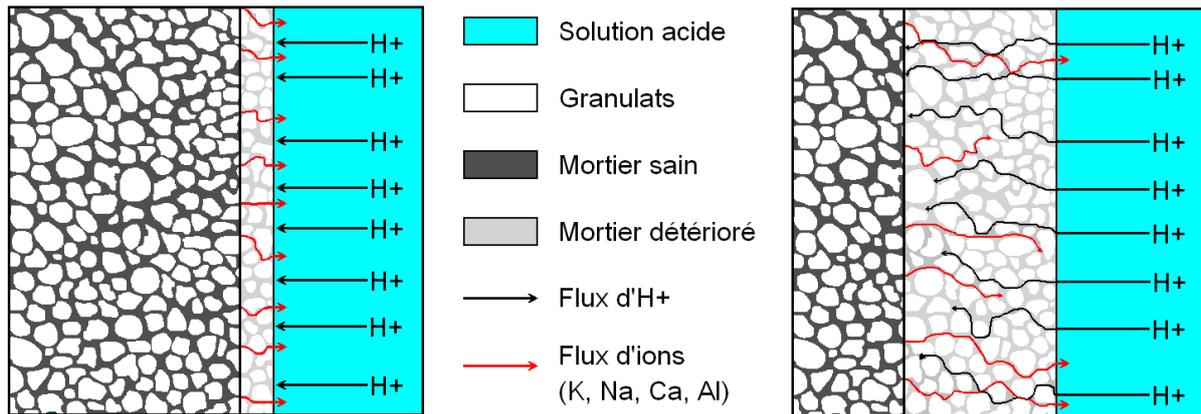


Figure IV-49 : Schéma d'une attaque acide d'un matériau cimentaire.

Différentes équipes de recherches ont travaillé sur les attaques acides (faibles ou fortes) des matériaux cimentaires [54, 57-59] et leurs résultats montrent que le type de ciment a une influence majeure dans la durabilité des matériaux cimentaires. Tous montrent que le ciment Portland est le plus vulnérable face aux attaques acides sauf dans le cas de béton auto-compactant où les additions (cendres volantes, poudre de quartz, laitiers de haut-fourneaux) semblent dégrader la résistance à l'acide. Pour la majorité des auteurs, les matériaux cimentaires des plus sensibles au plus durable en présence d'acide sont : le ciment Portland sans C_3A , le ciment Portland, le ciment Portland avec ajout de cendres volantes et le ciment Portland contenant du laitier. La présente étude va dans le même sens puisque l'on peut voir des différences de comportement entre les deux ciments étudiés d'un point de vue du passage en solution des ions, de la perte de masse et des observations visuelles.

Certains auteurs comme Helmut [60] précise que les ciments contenant de grandes quantités d'alumine sont résistants aux solutions acides entre pH 4 et 5, ce que l'on peut observer pour la présente étude. La meilleure performance de ces ciments comparés à celle des ciments Portland pourrait être attribuée non seulement à l'absence d'hydroxyde de calcium mais également à la présence d'hydrates d'aluminate de calcium plus stables dans la matrice cimentaire ainsi qu'à la présence d'hydroxyde d'aluminium qui encapsuleraient les produits d'hydratation et les protégeraient contre l'attaque acide.

De manière générale, Zivica *et al.* [54, 61] concluent dans leurs travaux qu'aucun matériau cimentaire actuel n'est durable en présence d'une solution acide et qu'il serait nécessaire de développer une nouvelle génération de liants adaptés aux environnements acides.

IV-3.4. Conclusion

L'attaque de matériaux cimentaires par l'acide sulfurique est une détérioration difficile à interpréter car elle dépend à la fois du type de matériau exposé mais également de la quantité d'acide mis en contact avec ce matériau. Sans surprise, les pH les plus bas induisent les détériorations les plus importantes.

Le renouvellement de la solution agressive est un paramètre important qui influe grandement sur la réponse du matériau. Sans renouveler la solution d'acide, on se place dans le cas d'une exposition limitée à une solution acide. Dans ce cas, la réponse du matériau est en trois phases : amorçage des mécanismes, diffusion, stabilisation.

Dans le cas d'un renouvellement de la solution acide, le mécanisme est en deux étapes : une phase d'amorçage puis une phase de diffusion.

Dans la problématique des réseaux d'assainissement, il faut considérer que l'on se trouve dans le cas du renouvellement de la solution agressive car les bactéries produisent en continu de l'acide sulfurique.

S'ils sont utiles pour comprendre les mécanismes de dissolution des matériaux cimentaires, les essais purement chimiques d'attaque par de l'acide sulfurique ne peuvent pas être envisagés pour l'étude des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement car ils ne reflètent pas le comportement réel de ces matériaux sur site. En particulier, les étapes précédant l'attaque chimique sont fonction de la nature des matériaux cimentaires et il y a donc nécessité de passer par l'intervention de microorganismes pour définir un essai accéléré sélectif.

Les essais purement chimiques ne parviennent pas à expliquer la bonne tenue des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium dans les réseaux d'assainissement puisqu'ils conduisent à une perte de masse importante. Sur site, le pH se stabilise à environ 3-4 et la perte de masse est négligeable, laissant penser que la matrice est protégée par la formation d'un gel d'alumine en surface. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de biodétérioration des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium, il est nécessaire d'étudier cette phase hydratée et son impact sur les propriétés du matériau.

IV-4. Influence de l'alumine hydratée

Les essais d'immersion dans des solutions acides ont mis en évidence que les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium ont une résistance plus faible que les matériaux à base de ciment Portland pour des pH fortement acides (pH 1 ou 2) alors qu'ils présentent une meilleure tenue sur site. Des essais complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre cette différence de comportement.

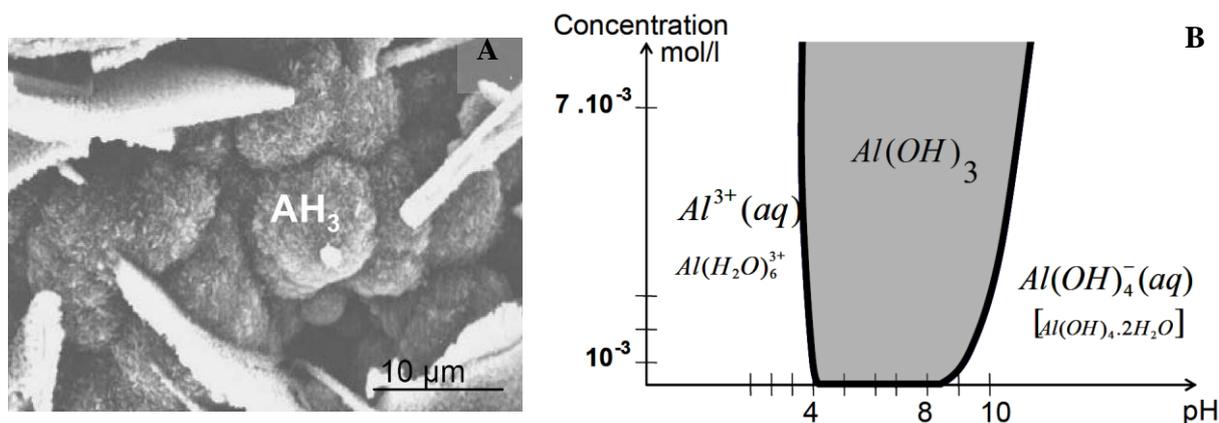
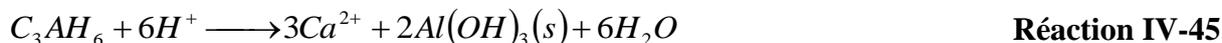
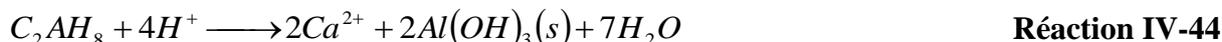
L'hydratation des ciments conduit à la formation de composés alcalins qui assurent un pH élevé à la solution interstitielle, de l'ordre de 11 à 14 suivant le type de ciment employé.

L'alcalinité des matériaux cimentaires à base de ciment Portland est essentiellement assurée par la portlandite ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), par les C-S-H (silicates de calcium hydratés) et dans une moindre mesure par les hydroxydes de potassium et de sodium [62, 63]. Les réactions de la portlandite et des C-S-H avec un acide conduisent à la formation de sels de calcium (Réactions IV-41 et IV-42) comme par exemple le sulfate de calcium avec l'acide sulfurique.



Les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium sont basés sur un système chimique différent et l'alcalinité de ces matériaux est assurée par les principaux aluminates hydratés (CAH_{10} , C_2AH_8 , C_3AH_6 et AH_3) [64]. La réaction des hydrates d'aluminate de calcium avec un acide (Réactions IV-43 à IV-45) conduit à la précipitation de trihydrate d'alumine (AH_3 ou $\text{Al}(\text{OH})_3$) à la surface des matériaux ou dans la porosité proche et peut ainsi limiter l'accès au matériau sain sous jacent [29] (Figure IV-50-A). Par ailleurs, l' AH_3 est

un composé stable sur une large gamme de pH allant de 3-4 à 10 et ne peut être dissous que lorsque le pH est inférieur à 4 (Figure IV-50-B).



La quantification de la réserve alcaline passe par la réalisation d'un dosage par un acide fort du matériau cimentaire mis en solution. Cependant, cette information n'est pas suffisante pour caractériser le comportement d'un matériau cimentaire dans un environnement acide puisqu'elle ne laisse pas au matériau le temps de se mettre en équilibre. Pour mieux appréhender les cinétiques de réaction, il est nécessaire de quantifier la capacité de neutralisation à l'acide qui se définit, selon la norme XP CEN/TS 15364, comme la quantité d'acide nécessaire pour abaisser le pH d'une suspension de produit à une valeur donnée.

IV-4.1. Réserve alcaline

La réserve alcaline a été quantifiée pour l'ensemble des mortiers étudiés (Chapitre II-1) en faisant varier le type d'acide. Pour certains mortiers (CEM I et CAC+S) cette détermination a également été réalisée après carbonatation. Le protocole expérimental consiste à introduire 1 g de matériau cimentaire broyé finement dans 100 mL d'eau distillée et à réaliser un dosage par une solution d'acide nitrique (1 M) ou par une solution d'acide sulfurique (0,5 M). Le volume d'acide introduit et le pH sont mesurés en continu par un titrateur automatique couplé à une électrode de pH.

L'acide nitrique est utilisé car il correspond au type d'acide généralement employé pour les méthodes d'essais sur matériaux cimentaires [65]. Le choix de travailler également avec l'acide sulfurique est motivé par le fait qu'il est le principal agent agressif dans le cadre de notre étude sur la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement.

Comme nous pouvons l'observer sur les Figures IV-51 et IV-52 le type d'acide n'a pas d'influence majeure sur la quantité nécessaire au dosage des réserves alcalines des différentes formulations de mortiers. Le mortier à base de ciment CEM I possède la réserve alcaline la plus importante et les autres matériaux ont une réserve alcaline similaire.

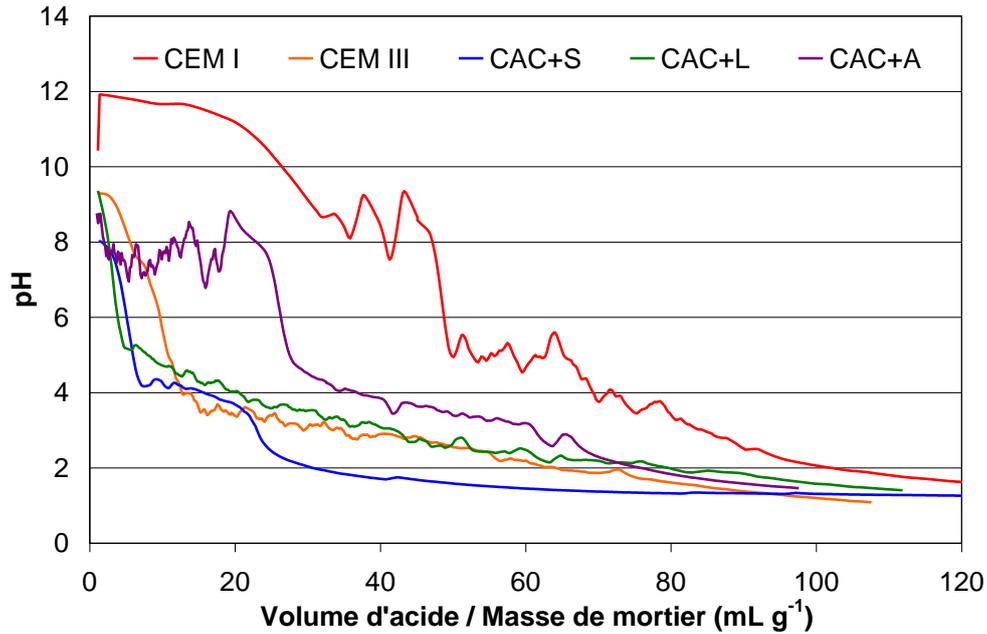


Figure IV-51 : Dosage de la réserve alcaline des différents matériaux cimentaires par de l'acide nitrique à 1M.

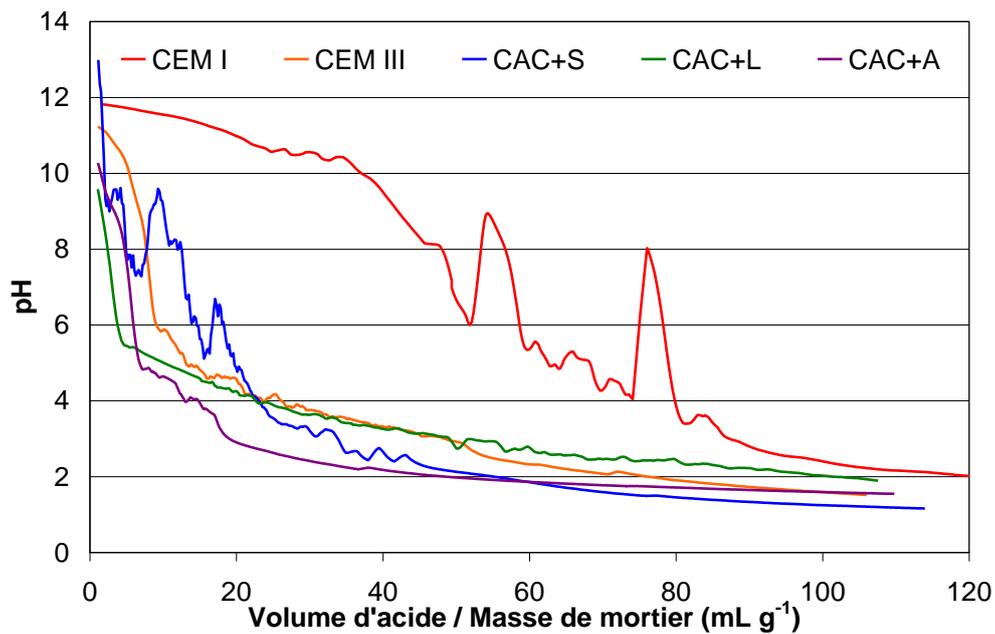


Figure IV-52 : Dosage de la réserve alcaline des différents matériaux cimentaires par de l'acide sulfurique à 0,5 M.

L'étude de l'influence de la carbonatation sur la réserve alcaline indique que les matériaux carbonatés présentent une réserve alcaline beaucoup plus faible que les matériaux non carbonatés (Figures IV-53 et IV-54).

La carbonatation engendre des modifications de la matrice cimentaire par réaction avec les hydrates. Dans le cas des matériaux cimentaires à base de ciment Portland, les C-S-H sont décalcifiés avec une diminution tout d'abord du rapport Ca/Si, puis avec une transformation en gel de silice hydraté très poreux [66]. Quand le pH est inférieur à 10, les C-S-H riches en

silice (typiquement pour des rapports Ca/Si inférieur à 0,65) coexistent avec un gel de silice [67]. De plus, la portlandite, l'ettringite $((CaO)_6 (Al_2O_3)(SO_3)_3, 32H_2O)$ et les phases AFm (monosulfate de calcium hydraté : $((CaO)_3(Al_2O_3)(CaSO_4), 12H_2O)$) réagissent également avec le CO_2 pour être transformées respectivement en carbonate de calcium, gypse ($CaSO_4, 2H_2O$) et alumine (Al_2O_3). Dans le cas des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium, le dioxyde de carbone réagit avec tous les hydrates présents pour donner du carbonate de calcium et des aluminates hydratés (Réactions IV-46 à IV-48) [64]. Des monocarboaluminates peuvent également se former de manière transitoire.

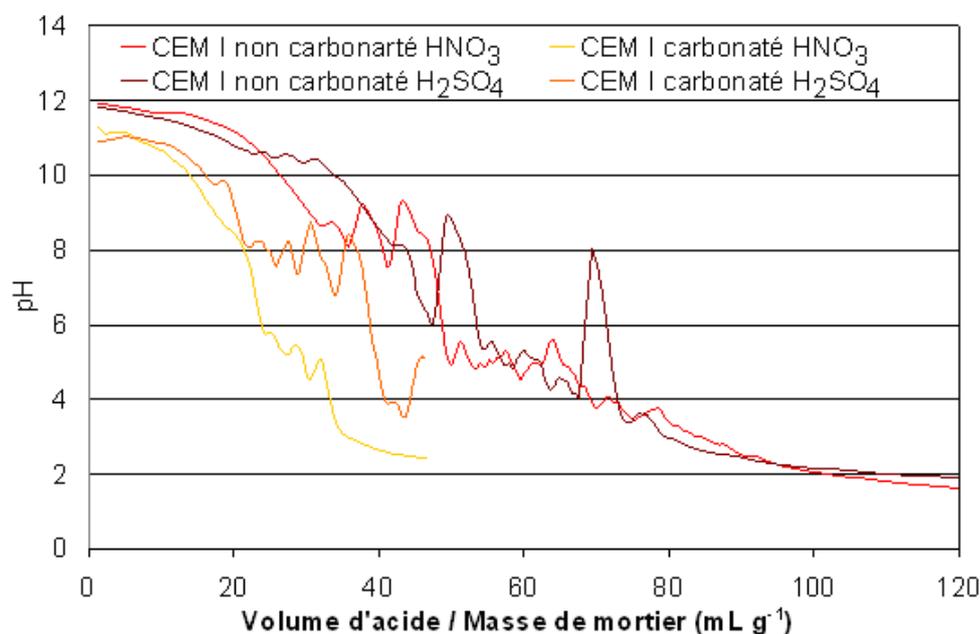


Figure IV-53 : Dosage de la réserve alcaline des mortiers CEM I non carbonaté et carbonaté par de l'acide nitrique à 1M et par de l'acide sulfurique à 0,5 M.

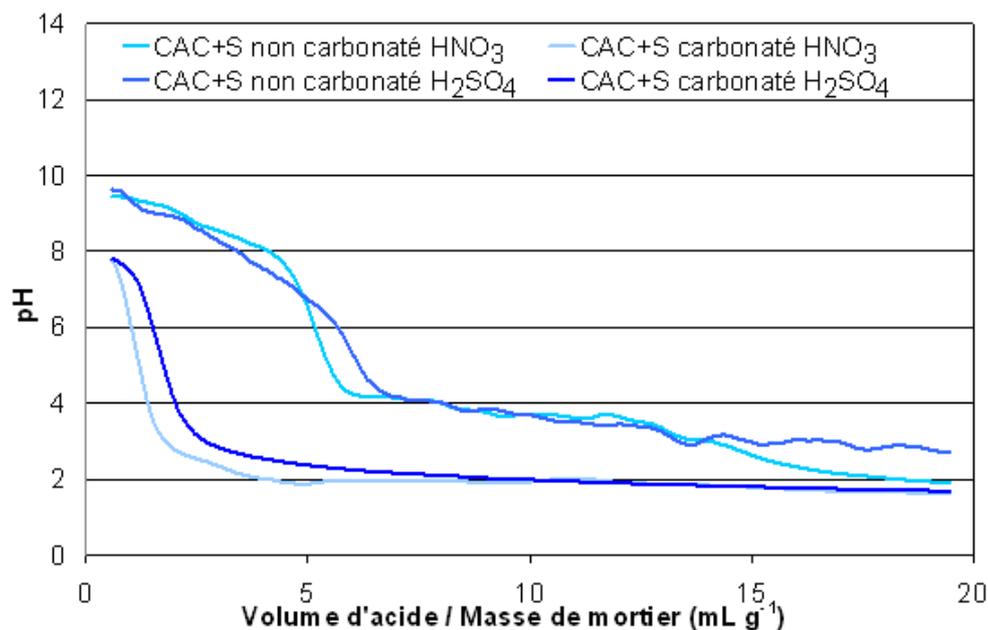


Figure IV-54 : Dosage de la réserve alcaline des mortiers CAC+S non carbonaté et carbonaté par de l'acide nitrique à 1M et par de l'acide sulfurique à 0,5 M.

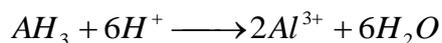
IV-4.2. Capacité de neutralisation à l'acide

La capacité de neutralisation à l'acide a été mesurée en suivant le protocole fixé par la norme XP CEN/TS 15364 intitulée « Caractérisation des déchets. Essais de comportement à la lixiviation. Essai de capacité de neutralisation acide et basique ». 15 grammes de mortier broyé finement sont introduits dans un flacon de 250 mL. 150 mL d'acide nitrique sont ensuite introduits en trois fois ($t = 0$, $t+30$ min et $t+2$ h) pour éviter une exothermie excessive. Le pH mesuré à 44 et 48 heures à l'aide d'une électrode de pH est considéré à l'équilibre si la variation est inférieure à 0,3 unité. Dix concentrations en acide nitrique ont été étudiées (Tableau IV-16) sur les mortiers à base de CEM I et de CAC+S.

Tableau IV-16 : Concentration en acide nitrique contenu dans les 150 mL de chaque flacon.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H ₃ O ⁺ (en mol L ⁻¹)	0	0,41	0,81	1,23	2,04	2,86	3,67	4,08	4,90	5,71

La capacité de neutralisation à l'acide du mortier au ciment d'aluminat de calcium diminue rapidement pour se stabiliser à un pH compris entre 3 et 4 (Figure IV-55). La réaction de six moles d'acide avec chaque mole de trihydrate d'alumine (Réaction IV-49) augmente considérablement la capacité de neutralisation à l'acide des ciments d'aluminat de calcium. De plus, la précipitation/dissolution progressive de l'AH₃ entraîne que l'intérieur du matériau cimentaire est protégé de l'acide [68].



Réaction IV-49

Comme les attaques acides des mortiers au ciment d'aluminat de calcium conduisent à la transformation des hydrates (CAH₁₀, C₂AH₈ et C₃AH₆) en AH₃, ces matériaux ont un fort potentiel de réponse aux environnements acides.

Au contraire, le mortier au ciment Portland possède une capacité de neutralisation à l'acide initiale plus importante mais elle chute de façon continue et devient nulle pour des concentrations en acide plus faibles.

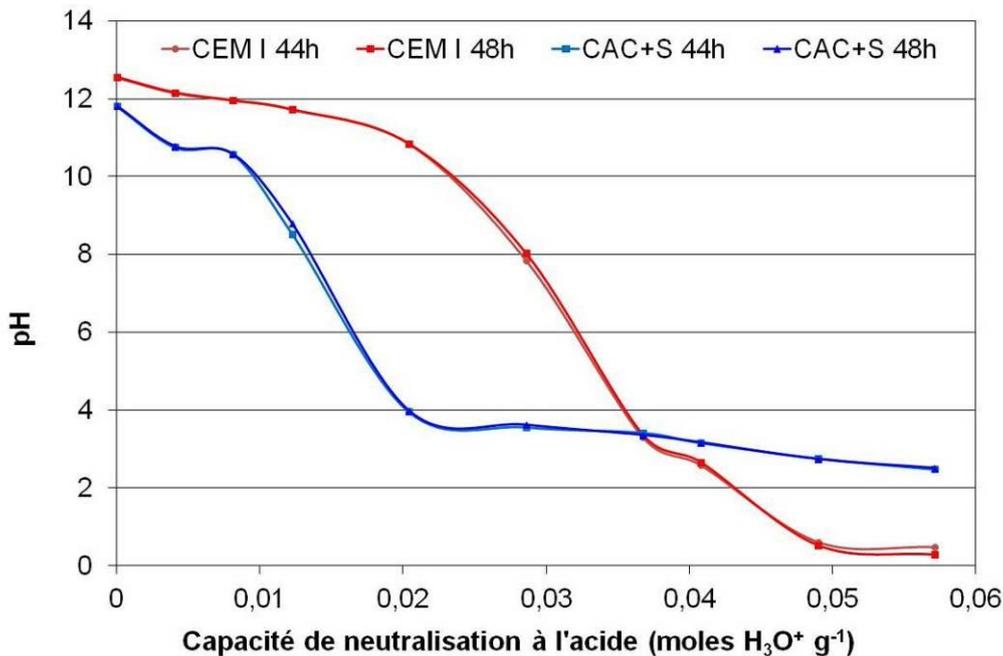


Figure IV-55 : Capacité de neutralisation à l'acide des mortiers CEM I et CAC+S à 44 et 48 h après l'ajout d'acide nitrique.

IV-4.3. Formation du gel d'alumine hydraté

Les mortiers au ciment d'aluminat de calcium ont donc une meilleure résistance à l'acide que ceux à base de ciment Portland car plus d'acide est nécessaire pour annuler le pouvoir tampon d'une quantité de matière initiale identique.

La détermination de la réserve alcaline et de la capacité de neutralisation à l'acide donnent deux informations complémentaires. La première permet de connaître la quantité de base directement accessible lors d'une attaque acide et la quantité d'acide que peut recevoir une matrice cimentaire en continue. La seconde laisse plus de place aux cinétiques de réactions et permet d'apprécier le pouvoir tampon d'une matrice cimentaire face à un apport ponctuel d'acide.

Si on laisse le temps aux ciments d'aluminat de calcium de s'équilibrer avec un environnement acide, ils sont capables de créer une couche qui va les protéger pendant un temps plus long que ne le permettrait leur réserve alcaline initiale. Cette résistance est attribuée à la capacité tampon du gel d'alumine formé à plus haut pH qui va fixer le pH de surface du mortier à des valeurs comprises entre 3 et 4. Cette particularité de l'alumine hydratée participe donc grandement au bon comportement des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminat de calcium sur site car elle explique la stabilisation du pH de surface à des valeurs voisines de la zone de stabilité du gel d'alumine. On peut donc faire l'hypothèse que la production d'acide à la surface des canalisations d'assainissement est suffisamment lente, ou met suffisamment de temps à se mettre en place, pour que le matériau ait le temps de créer une couche de gel d'alumine qui le protège.

Pour observer la formation du gel d'alumine hydratée nous avons immergé pendant 24 heures une éprouvette de mortier à base de ciment d'aluminat de calcium dans une solution d'acide sulfurique à pH 3. Le pH a ensuite été remonté progressivement à des valeurs supérieures à 4 pour atteindre la zone de stabilité du trihydrate d'alumine. L'échantillon est resté immergé pendant 40 jours.

Ces conditions d'immersion ont conduit à la formation d'une couche blanche gélatineuse à la surface de l'échantillon de mortier (Figure IV-56). Visuellement et mise à part cette couche, l'échantillon n'est pas dégradé.

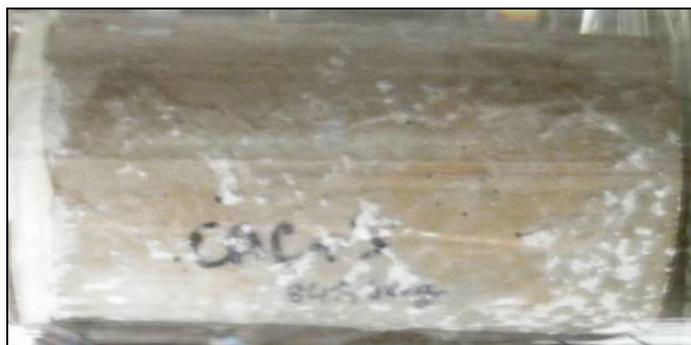


Figure IV-56 : Photographie de l'échantillon de mortier CAC+S immergé pendant 40 jours dans une solution d'acide sulfurique présentant la formation d'un gel en surface de l'éprouvette.

La couche blanche récupérée a été séchée et analysée par diffraction des rayons-X. Le diffractogramme obtenu (Figure IV-57) se caractérise par une ou plusieurs phases cristallisées responsables des raies fines et une autre phase mal cristallisée responsable des raies larges. La phase cristallisée principale est identifiée comme étant de la bayerite, une alumine hydratée (raie à 4,74 Å). Les quatre raies de diffraction larges correspondent à de la boehmite, un oxyde d'aluminium hydraté (AlO(OH)). Un épaulement visible à 4,83 Å peut être une autre alumine hydratée comme la nordstrandite ou gibbsite, toute deux polymorphes de la bayerite.

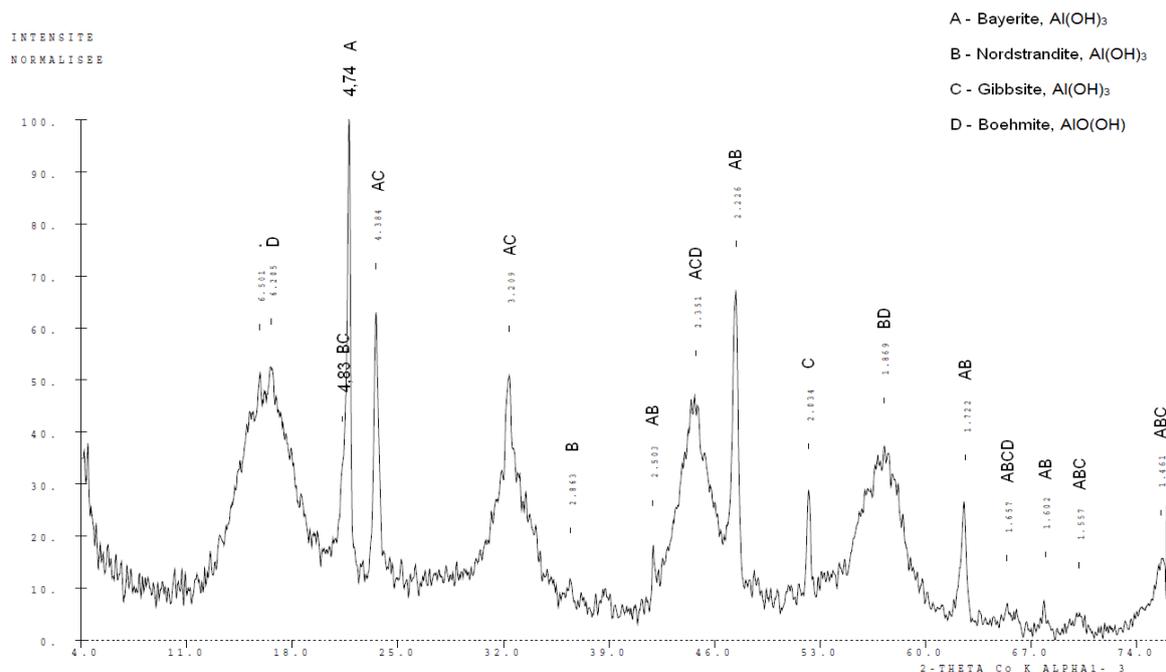


Figure IV-57 : Diffractogramme du produit blanc formé en surface de l'échantillon de CAC+S immergé dans une solution d'acide sulfurique.

A la fin de la période d'immersion, de la phénolphthaléine a été pulvérisée sur une coupe de l'échantillon pour mettre en évidence les zones de pH (Figure IV-58). Ce test montre que l'échantillon n'est attaqué qu'en surface ce qui peut également être un indice du rôle protecteur que peut jouer l' $\text{Al}(\text{OH})_3$ en précipitant à la surface de l'échantillon.



Figure IV-58 : Test à la phénolphthaléine sur la section de l'échantillon de mortier CAC+S immergé pendant 40 jours dans une solution d'acide sulfurique à pH 4,5.

IV-4.4. Influence du trihydrate d'alumine sur la croissance de bactéries

Comme les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium se couvrent d'un gel d'alumine en surface, il nous a semblé important d'étudier l'impact de ce type de composé sur la croissance des bactéries impliquées dans le processus de biodétérioration. Nous avons donc suivi la croissance de différentes souches bactériennes en présence de trihydrate d'alumine.

Pour cela, 0,1 mL d'une suspension bactérienne de *Starkeya novella*, *Thiomonas intermedia*, *Halothiobacillus neapolitanus* ou *Acidithiobacillus thiooxidans* en phase plateau a été réparti sur des boîtes de pétri contenant leur milieu de culture (voir Chapitre III-2.2) additionné de 20 g L⁻¹ d'Agar. 0,25 g de trihydrate d'alumine stérile est ensuite saupoudré sur la moitié de la gélose. Enfin, les boîtes de Pétri sont incubées à 30±1°C pendant respectivement 24 h, 48 h, 24 h et 5 jours avant dénombrement.

La masse de trihydrate d'alumine apportée résulte d'une estimation de la quantité potentiellement présente en solution lors d'une attaque acide. Nous nous sommes basé sur l'épaisseur de la couche d'altération formée durant l'attaque acide à pH 1 pour réaliser ce calcul (voir Chapitre IV-3).

D'après les résultats présentés dans la Figure IV-59 et le Tableau IV-17, l'alumine hydratée a un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries étudiées puisque moins de colonies se sont développées sur la partie avec alumine. Cette inhibition est très probablement due à la présence d'une concentration d'ion aluminium à la surface de la gélose qui interagit avec les colonies bactériennes. Elle est importante pour *S. novella*, *T. intermedia* et *H. neapolitanus* mais beaucoup moins marquée pour *A. thiooxidans*. Seidel *et al.* [69] ont également montré que l'apport d'alumine à 2 et 10% dans le milieu de culture d'*A. thiooxidans* induit une augmentation du temps de latence mais n'influe pas sur leur croissance à proprement parler.

On peut donc penser que dans les réseaux d'assainissement si les premières souches bactériennes impliquées dans la succession de colonisation sont inhibées par l'aluminium, la dernière souche, *A. thiooxidans*, aura plus de mal à s'implanter.

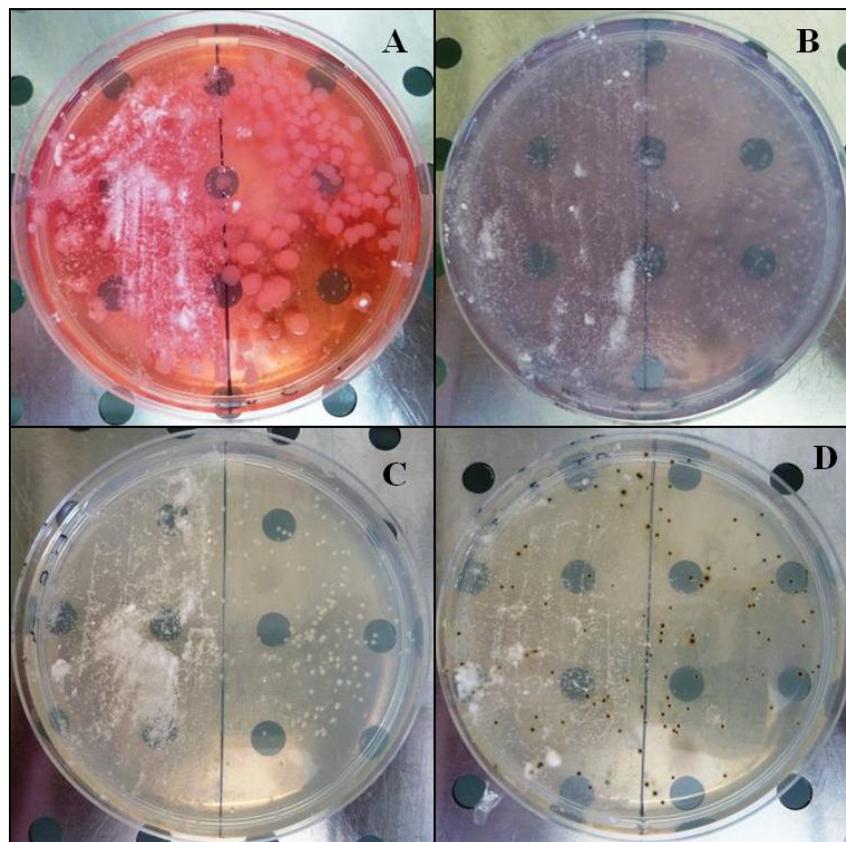


Figure IV-59 : Impact du trihydrate d'alumine (moitié gauche) sur la croissance de *Starkeya novella* (A), *Halothiobacillus neapolitanus* (B), *Thiomonas intermedia* (C) et *Acidithiobacillus thiooxidans* (D).

Tableau IV-17 : Résultat de l'impact du trihydrate d'alumine sur la croissance de bactéries. Dénombrement réalisé en triplicata.

	Dilution	Nombre de colonies sur boîte témoin	Nombre de colonies par demi-boîte	
			Sans Alumine	Avec Alumine
<i>S. novella</i>	10^{-4}	340	155 ± 18	17 ± 3
<i>T. intermedia</i>	10^{-5}	36	23 ± 3	5 ± 1
<i>H. neapolitanus</i>	10^{-3}	206	77 ± 15	16 ± 3
<i>A. thiooxidans</i>	10^{-2}	139	65 ± 8	52 ± 12

IV-4.5. Conclusion

L'alumine a un rôle important dans la bonne tenue des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium dans les réseaux d'assainissement. Elle permet de stabiliser le pH de surface des matériaux cimentaires à une valeur proche de 3-4 augmentant considérablement la capacité de neutralisation à l'acide. Sa teneur élevée en aluminium induit également une limitation de la croissance des bactéries impliquées dans le processus de biodétérioration et donc une plus faible production d'acide en surface du matériau. Ainsi cette phase est en grande partie responsable de la bonne tenue des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium dans les réseaux d'assainissement.

IV- Conclusion

La biodétérioration des matériaux cimentaires dans la partie aérienne des réseaux d'assainissement est la conséquence d'une succession de quatre étapes qui aboutissent à la ruine des canalisations. Cette étude s'est portée sur trois d'entre elles : l'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire, l'influence de la source de soufre sur la croissance des bactéries sulfo-oxydantes impliquées dans le phénomène de biodétérioration et enfin l'attaque acide et ses conséquences sur les matériaux cimentaires.

L'étude de l'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré, la première étape de ce processus, permet de conclure qu'il est nécessaire d'être dans des conditions d'humidité relative importante pour que cette réaction soit possible et conduise à la formation de cristaux de soufre de forme majoritairement orthorhombique. L'humidité relative a une influence forte sur l'oxydation de l' H_2S à la surface des matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium convertis puisqu'à 75% d'humidité relative, la quantité de soufre retrouvé en surface est deux fois plus importante qu'à la saturation. L'influence de l'humidité relative est moins marquée pour les autres matériaux. Par ailleurs, la transformation de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire à la surface des matériaux cimentaires nécessite l'intervention d'un catalyseur représenté par une particule métallique (Cu, Fe, Zn) ou par un cation (Ca^{2+}) dans les auréoles de transitions. La composition du matériau influe également sur l'importance de l'oxydation étant donné qu'un matériau cimentaire à base de ciment Portland favorise plus l'oxydation de l' H_2S qu'un matériau cimentaire à base de ciment d'aluminate de calcium.

L'oxydation de l'hydrogène sulfuré ne s'arrête pas nécessairement au soufre élémentaire mais peut conduire à la formation d'autres composés soufrés tels que le thiosulfate ou les polythionates. Les microorganismes présents en surface des matériaux cimentaires vont utiliser l'ensemble de ces molécules soufrées comme source d'énergie pour faire fonctionner leur métabolisme en produisant de l'acide sulfurique. L'étude de la croissance de souches bactériennes sélectionnées ne permet pas de conclure avec certitude sur l'influence de la source de soufre puisque ces bactéries semblent utiliser l'ensemble des molécules soufrées aussi facilement. Il est donc nécessaire d'utiliser de l'hydrogène sulfuré car ce gaz s'oxyde jusqu'à des stades différents fournissant toutes les sources de soufre nécessaire à la croissance de l'ensemble des bactéries. Le type trophique imposé aux souches bactériennes est aussi important dans le cas des bactéries mixotrophes car leur taux de croissance est fortement ralenti mais permet d'atteindre pour *S. novella* une biomasse plus importante. Identifier les meilleures conditions de croissance permet d'optimiser la production d'acide sulfurique produit qui va pouvoir interagir avec le matériau cimentaire.

Une matrice cimentaire soumise à une attaque acide conduit à la dissolution de la pâte de ciment et à la formation de produits non cohésifs et/ou expansifs tel que le gypse et ou l'ettringite. La concentration de l'acide et son renouvellement sont déterminants pour les mécanismes mis en jeu. Lorsqu'un matériau cimentaire est soumis à une quantité limitée d'acide, une réaction en trois temps va se mettre en place avec tout d'abord une phase d'amorçage suivie d'une phase de diffusion et d'une phase de stabilisation. Ces trois phases correspondent à trois vitesses de lixiviations différentes des ions constitutifs de la matrice cimentaire. Quand un matériau cimentaire est mis en contact avec une quantité d'acide constamment renouvelée, les mécanismes mis en place n'atteignent pas la phase de stabilisation. La matrice cimentaire du matériau est rongée petit à petit par l'acide. Dans ces

deux situations, plus l'acide est concentré (plus son pH est bas) et plus il détériore les matériaux cimentaires. Ceux à base de ciment d'aluminat de calcium se dégradent d'avantage que les matériaux cimentaires à base de ciment Portland lorsqu'ils sont soumis à de l'acide sulfurique à bas pH (1-2). Or sur site, les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminat de calcium sont plus durables comme leur pH se stabilise à 3,5-4. Cette stabilisation est due à la formation d'une couche protectrice d'alumine hydratée en surface et dans la porosité qui va considérablement augmenter le pouvoir tampon de ces matériaux tout en limitant les échanges avec l'environnement agressif. Ce gel riche en aluminium est une des raisons pour lesquelles les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminat de calcium ont une meilleure durabilité sur site puisqu'il a également un effet bactériostatique plus ou moins marqué sur la plupart des bactéries sulfo-oxydantes étudiées.

L'étude des mécanismes de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement a permis de faire ressortir différentes informations indispensables en vue de développer et mettre au point un essai accéléré en laboratoire.

IV- Références bibliographiques

- [1] United State Protection Agency (1974) Process Design Manual for Sulfide Control in Sanitary Sewerage Systems. Technology Transfer Office: Washington, DC, 1974; EPA-625/1-74-005.
- [2] Wilmot, P.D., Cadee, K., Katinic, J.J., Kavanagh, B.V.J. (1988) Kinetics of sulfide oxidation by dissolved oxygen. *Water Pollution Control Federation*, 60, 1264-1270.
- [3] Kotronarou, A., Hoffmann, M.R. (1991) Catalytic autoxidation of hydrogen sulfide in wastewater. *Environmental Science and Technology*, 25, 1153-1160.
- [4] Jolley, R.A., Forster, C.F. (1985) The kinetics of sulphide oxidation. *Environmental Technology Letters*, 6, 1-10.
- [5] Roberts, D.J., Nica, D., Zuo, G., Davis, J.L. (2002) Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, 227-234.
- [6] Islander, R.L., Deviny, J.S., Mansfeld, F., Postyn, A., Shih, H. (1991) Microbial ecology of crown corrosion in sewers. *Journal of Environmental Engineering*, 117, 751-770.
- [7] Joseph, A.P., Keller, J., Bustamante, H., Bond, P.L. (2012) Surface neutralisation and H₂S oxidation at early stages of sewer corrosion: Influence of temperature, relative humidity and H₂S concentration. *Water Research*, 46, 4235-4245.
- [8] Chen, K.Y., Morris, J.C. (1972) Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. *Environmental Science & Technology*, 6, 529-537.
- [9] Chiu, G., Meehan, E.J. (1977) Monodisperse sulfur sols from the air oxidation of hydrogen sulfide solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 62, 1-7.
- [10] O'brien, D.J., Birkner, F.B. (1977) Kinetics of oxygenation of reduced sulfur species in aqueous solution. *Environmental Science & Technology*, 11, 1114-1120.
- [11] Steudel, R. (2003) Aqueous sulfur sols. Elemental sulfur and sulfur-rich compounds I. Topics in Current Chemistry, 2003, Volume 230/2003, 69-78, DOI: 10.1007/b12113
- [12] Steudel, R. (1996) Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 35, 1417-1423.
- [13] http://old.lhce.lu/Chimie/Publications/PDF/3_soufre.pdf
- [14] Diamond, S. (2001) Consideration in image analysis as applied to investigations of the ITZ in concrete. *Cement and Concrete Composites*, 23, 171-178.

- [15] Diamond, S., Huang, J. (2001) The ITZ in concrete – a different view based on image analysis and SEM observations. *Cement and Concrete Composites*, 23, 179-188.
- [16] Oprime, M.E.A.G., Garcia, O., Cardoso, A.A. (2001) Oxidation of H₂S in acid solution by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Process Biochemistry*, 37, 111-114.
- [17] Rohwerder, T., Sand, W. (2007) Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering Life Science*, 7, 301-309.
- [18] Lesley, A.R., Kuenen, J.G. (2006) The Genus *Thiobacillus*. *Prokaryotes*, 5, 812-827.
- [19] Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D., Willey, J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. (2010) Microbiologie. Editeur : De Boeck, date de parution 11/06/2010 (3ème édition), 1088 pages.
- [20] Rohwerder, T., Sand, W. (2007) Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering Life Science*, 7, 301-309.
- [21] Beffa, T., Fischer, C., Aragno, M. (1993). Growth and respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus novellus* (type strain) grown on thiosulfate. *Current Microbiology*, 26, 323–326.
- [22] London, J. (1963). *Thiobacillus intermedius nov. sp.*, a novel type of facultative autotrophe. *Archiv für Mikrobiologie*, 46, 329–337.
- [23] Matin, A., Rittenberg, S.C. (1970) Utilization of glucose in heterotrophic media by *Thiobacillus intermedia*. *Journal of Bacteriology*, 104, 234-238.
- [24] Johnson, C.L., Vishniac, W. (1970) Growth inhibition in *Thiobacillus neapolitanus* by histidine, methionine, phenylalanine and threonine. *Journal of Bacteriology*, 104, 1145-1150.
- [25] Lors, C., Chehade, M.H., Damidot, D. (2009) pH variations during growth of *Acidithiobacillus thiooxidans* in buffered media designed for an assay to evaluate concrete biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 880-883.
- [26] Klein, D.P., Charles, A.M. (1983) Media effects on the growth of *Thiobacillus novellus*. *Current Microbiology*, 15, 107-110.
- [27] Hondjuila Miokono, E., Lors, C., Lamberet, S., Damidot, D. (2011) Mise au point d'un test accéléré de biodétérioration de mortiers mettant en jeu une succession de bactéries sulfoxydantes. *Matériaux et Techniques*, 99, 555-563.
- [28] Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H. (2007) Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 971-980.
- [29] Lamberet, S., Guinot, D., Lempereur, E., Talley, J., Alt, C. (2008) Field investigations of high performance calcium aluminate mortar for wastewater applications – Calcium aluminate Cements, proceedings of the centenary Conference, Avignon, 30 June – 2 July 2008. Fentiman C.H., Mangabhai R.J. and Scrivener K.L. (editors). IHS BRE Press, 2008, EP94. ISBN 978-1-84806-045-6.
- [30] Smith, D.W., Rittenberg, S.C. (1974) On the sulfur-source requirement for growth of *Thiobacillus intermedius*. *Archives of Microbiology*, 100, 65-71.
- [31] Wood, A.P., Woodall, C.A., Kelly, D.P. (2005) *Halothiobacillus neapolitanus* strain OSWA isolated from “The Old Sulphur Well” at Harrogate (Yorkshire, England). *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 746-748.
- [32] *Chemical Abstracts Service* (numéro CAS 7704-34-9).
- [33] Prange, A., Chauvistre, R., Modrow, H., Hormes, J., Trüper, H.G., Dahl, C. (2002) Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur. *Microbiology (UK)*, 148, 267-276.
- [34] Steudel, R. (1989) in autotrophic bacteria (Eds.: Schlegel H.G., Bowien, B.), Science Technology Publishers, Madison, WI, 1989, pp. 289-303.

- [35] Janssen, A.J.H., Lettinga, G., de Keizer, A. (1999) Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur: Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 151, 389-397.
- [36] Jones, G.E., Starkey, R.L. (1961) Surface-active substances produced by *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 82, 788-789.
- [37] Jones, G.E., Benson, A.A. (1965) Microbial physiology and metabolism phosphatidyl glycerol in *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 89, 260-261.
- [38] Vishniac, W., Santer, M. (1957) The *Thiobacilli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 21, 195-213.
- [39] Suzuki I. (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 97-105.
- [40] Schlegel, H.G. (1995) General Microbiology, 7th ed. Cambridge University Press, Cambridge, p.390.
- [41] Visser, J.M., Stefess, G.C., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1997) *Thiobacillus sp.* W5, the dominant autotroph oxidizing sulfide to sulfur in a reactor for aerobic treatment of sulfidic wastes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72, 127-134.
- [42] Sommer, R. (1998) Yeast extract: production, properties and components, *Food Australia*, 50, 181-183.
- [43] Reed, G., Nagadawithana, T.W. (1991) Yeast Technology (second ed.), New York: Avi Publishing p.765.
- [44] Nagadawithana, T. (1994) Savory flavours, In (Series Ed.) & A. Gabelman (Vol. Eds.), Bioprocess Production of Flavour Fragrance and Color Ingredients. (pp. 135-168).
- [45] Mechalis, B., Rittenberg, S.C. (1960) Energy coupling in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Bacteriology*, 80, 501-507.
- [46] Huang, M.H., Li, Y.M., Gu, G.W. (2010) Chemical composition of organic matters in domestic wastewater. *Desalination*, 262, 36-42.
- [47] Akarsubasi, A.T., Ince, O., Kirdar, B., Oz, N.A., Orhon, D., Curtis, T.P., Head, I.M., Ince, B.K. (2005) Effect of wastewater composition on archeal population diversity. *Water Research*, 39, 1576-1584.
- [48] Peyre Lavigne, M. (2009) Revue bibliographique : Biodétérioration des ciments en réseaux d'assainissement, LISBP INSA-Toulouse, 27 p.
- [49] Gottschal, J.C., de Vries, S., Kuenen, J.G. (1979) Competition between the facultatively chemolithotrophic *Thiobacillus* A2, an obligately chemolithotrophic *Thiobacillus*, and a heterotrophic *Spirillum* for inorganic and organic substrates. *Archives of Microbiology*, 121, 241-249.
- [50] Gottschal, J.C., Nanninga, H., Kuenen, J.G. (1981) Growth of *Thiobacillus* A2 under alternating growth conditions in the chemostat. *Journal of General Microbiology*, 126, 85-96.
- [51] Kelly, D.P., Wood, A.P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 511-516.
- [52] Kuenen, J.G., Beudeker, R.F. (1982) Microbiology of thiobacilli and other sulphur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, 298, 473-497.
- [53] Espinosa, B., Letourneux, R., Marcdargent, S. (1996) Acid attack of hydraulic cement-bound materials: corrosion kinetics and neutralisation capacity. *Proceeding of the 13th International Corrosion Congress*, 4, 494-503.

- [54] Zivica, V., Bajza, A. (2002) Acidic attack of cement-based materials – a review Part 2. Factors of rate of acidic attack and protective measures. *Construction and Building Materials*, 16, 215-222.
- [55] Shi, C., Stegemann, J.A. (2000) Acid corrosion resistance of different cementing materials. *Cement and Concrete Research*, 30, 803-808.
- [56] Baes, C.F., Mesmer, R.E. (1986) Hydrolysis of cations, Krieger Publishing, Florida.
- [57] De Belie, N., Verselder, H.J., De Blaere, B., Van Nieuwenburg, D., Verschoore, R. (1996) Influence of the cement type on the resistance of concrete to feed acids. *Cement and Concrete Research*, 26 (11), 1717-1725.
- [58] Bergamaschi, J.M., Serrasqueiro, M., Segre, N., Joekes, I. (2011) Acid attack to mortars: Influence of cement type and conditioning factors on the rate of reaction and mass loss. 13th International Congress on the Chemistry of Cement, Madrid, 3-8 July 2011.
- [59] Cizer, O., Elsen, J., Feys, D., Heirman, G., Vandewalle, L., Van Gemert, D., Desmet, B., Vantomme, J., De Schutter, G. (2011) Microstructural changes in self-compacting concrete by sulphuric acid attack. 13th International Congress on the Chemistry of Cement, Madrid, 3-8 July 2011.
- [60] Helmut, R. (1997) Durability. *Cement Research Progress*, 195-230.
- [61] Zivica, V., Bajza, A. (2001) Acidic attack of cement based materials – a review. Part 1. Principle of acidic attack. *Construction and Building Materials*, 15, 331-340.
- [62] Almusallam, A.A. (2001) Effect of degree of corrosion on the properties of reinforcing steel bars. *Construction and Building Materials*, 15, 361-368.
- [63] Ishida, T., Maekawa, K. (2000) Modelling of pH profile in pore water based on mass transport and chemical equilibrium theory. Translation from Proceedings of JSCE, 47, N° 648, May 2000.
- [64] Chapitre 13: Calcium Aluminate Cement. In Lea's chemistry of cement and concrete, Fourth edition, edited by Peter C. Hewlett 1988, ISBN: 0750662565, Publisher: Elsevier Science & Technology Books, Pub. Date: January 2004, pp. 713-782.
- [65] Touze, P., Godart, B. (1997) Méthode d'essai LPC N°48 Évaluation de la teneur en alcalins équivalents actifs dans les ciments.
- [66] Johannesson, B., Utgenannt, P. (2001) Microstructural changes caused by carbonation of cement mortar. *Cement and Concrete Research*, 31, 925–931.
- [67] Chen, Q.Y., Hills, C.D., Yuan, M.H., Liu, H.H., Tyrer, M. (2008) Characterisation of carbonated tricalcium silicate and its sorption capacity for heavy metals: A micron-scale composite adsorbent of active silicate gel and calcite. *Journal of Hazardous Materials*, 53, 775-783.
- [68] Marcdargent, S., Espinosa, E., Letourneaux, R., In: Proceedings of the 13th International Corrosion Congress, Melbourne, 1996.
- [69] Seidel, A., Zimmels, Y., Armon, R. (2001) Mechanism of bioleaching of coal fly ash by *Thiobacillus thiooxidans*. *Chemical Engineering Journal*, 83, 123-130.

Chapitre V

MISE AU POINT D'UN ESSAI ACCELERE

V-Introduction

Comme nous l'avons explicité dans l'étude bibliographique, la biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement est un phénomène complexe qui préoccupe les gestionnaires de systèmes d'assainissement compte tenu de l'évolution actuelle qui conduit à l'augmentation de la présence d'hydrogène sulfuré. En effet, la tendance générale est à l'agrandissement du linéaire de conduite pour collecter les eaux usées issues des habitations des zones de plus en plus reculées engendrées par l'étalement urbain. Parallèlement, la politique économique aggrave cette situation puisqu'elle est de plus en plus contraignante et encourage à optimiser les coûts en réduisant le nombre de postes de traitement des eaux usées, ce qui allonge les temps de rétention des effluents et favorise la formation d'hydrogène sulfuré. De même, la prise de conscience générale des problèmes environnementaux, associés aux problèmes économiques actuels, conduit les usagers à réduire leur consommation d'eau ce qui génère des effluents davantage chargés en matière organique et minérale et qui aboutit encore une fois à l'augmentation de la production d'hydrogène sulfuré. Cette hausse de production conduit à l'aggravation des problèmes de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement. Par conséquent, il devient impératif d'identifier les matériaux les plus adaptés et les plus durables pour répondre aux conditions agressives rencontrées dans ce type d'environnement.

Il existe des textes normatifs (NF EN 206-1, XP P18-305) relatifs aux matériaux cimentaires qui prennent en compte la durabilité de ces matériaux en s'appuyant sur des classes d'expositions. Les zones des réseaux d'assainissement touchées par la biodétérioration sont classées en tant qu'environnement à forte agressivité chimique (XA3) compte tenu que la concentration en H_2S y est supérieure à 10 mg m^{-3} et une liste exhaustive de matériaux est recommandée par le fascicule de documentation FD P18-011 pour assurer une certaine durabilité tout en réduisant les coûts d'entretiens et de gestion. Il s'agit des ciments CEM III/A, B et C, CEM V/A et B conformes à la norme NF P 15-319, des ciments d'aluminates de calcium conformes à la norme NF EN 14647 et des ciments CEM IV/B conformes à la norme NF EN 197-1. La mise au point d'un essai accéléré est toutefois indispensable, d'une part, pour identifier les matériaux les plus aptes à résister à l'attaque acide résultant de l'activité des microorganismes et, d'autre part, pour enrichir ou mieux définir la liste de matériaux préconisés.

Notre objectif est de définir un essai accéléré qui puisse être normalisé, c'est-à-dire dont les paramètres sont totalement maîtrisés et validés. En nous basant sur les travaux menés par différentes équipes de recherches et nos propres études sur plusieurs types de matériaux cimentaires ayant des comportements très différents sur site, nous avons défini un essai accéléré qui recrée en laboratoire les conditions aériennes d'un réseau d'assainissement.

Les essais d'attaque acide sur les mortiers au ciment Portland et au ciment d'aluminate de calcium nous ont montré que les essais purement chimiques ne sont pas adaptés pour étudier la durabilité des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement puisque les mortiers au ciment d'aluminate de calcium résistent bien en conditions réelles mais se dégradent totalement lors d'immersion dans des solutions acides à pH 1 ou 2. Ainsi l'implication de microorganismes est essentielle pour arriver à recréer les caractéristiques des matériaux cimentaires observées sur site (pH, évolution de la surface,...).

La littérature donne une liste de bactéries sulfo-oxydantes généralement trouvées à la surface des matériaux cimentaires soumis à la biodétérioration [1, 2]. Avec les connaissances acquises

sur ces bactéries nous pouvons fixer la température de l'essai accéléré à 30°C, ce qui correspond à leur optimum de croissance [3, 4]. Ces microorganismes utilisent différentes sources de soufre pour croître et produire de l'acide sulfurique. Leur fournir de l'hydrogène sulfuré permet d'obtenir toutes les sources possibles de molécules soufrées à différents niveaux d'oxydation car ce gaz s'oxyde à la surface des matériaux cimentaires en soufre élémentaire ou d'autres produits soufrés plus oxydés comme les thiosulfates ou les polythionates.

Les expositions réalisées *in situ* nous indiquent que cet essai accéléré doit fonctionner avec une concentration moyenne en H₂S de 30 à 50 ppm pour être proche des conditions du site S2 (Chapitre III) où on observe des dégradations importantes. L'humidité doit également être régulée pour permettre la condensation puisqu'en période « sèche », aucune dégradation n'est observable.

L'Université de Hambourg a mis au point dans les années 90 une chambre de biodétérioration qui répond à l'ensemble de ces critères mais cet essai reposait sur une inoculation à partir de microorganismes issus d'une zone impactée par les phénomènes de biodétérioration du réseau d'assainissement de la ville de Hambourg. Dans le but de réaliser un essai accéléré qui puisse être normalisé, il nous a semblé indispensable d'utiliser des souches bactériennes issues de collection.

Nous allons exposer dans ce chapitre l'ensemble des choix que nous avons fait pour arriver à l'essai proposé. Pour cela, le matériel et les méthodes employés sont décrits puis nous analysons les résultats de l'exposition de cinq formulations de mortier. Enfin, une analyse critique de l'essai est faite en vue de sa future amélioration.

V-1. Définition de l'essai

La mise au point d'une enceinte pour la réalisation d'un essai accéléré en laboratoire qui représente les conditions rencontrées dans les réseaux d'assainissement doit passer par une maîtrise totale des paramètres environnementaux que sont la température, l'humidité relative et la concentration d'H₂S. Cette enceinte de grand volume, pour comparer un nombre important d'échantillons, doit être la plus homogène possible au niveau de son atmosphère afin d'assurer les mêmes conditions de détérioration à tous les échantillons exposés. Enfin, cet essai doit être basé sur la pulvérisation d'une succession bactérienne, qui permet de diffuser les bactéries et leur milieu de culture sans passer par une phase d'immersion qui engendre généralement la formation de précipités en surface des matériaux [5, 6] et modifie également les conditions chimiques au niveau de ces surfaces.

Pour répondre à l'ensemble de ces critères nous nous sommes fondés sur un système expérimental mis au point pour l'étude de la corrosion des métaux qui est l'essai au brouillard salin. En effet, ce type d'essai basé sur la norme ISO 9227 utilise une chambre d'essai dans laquelle une solution saline est vaporisée sur les échantillons à tester dans des conditions définies d'humidité et de température.

V-1.1. Enceinte de biodétérioration

La chambre d'essai choisie (ASCOTT S1000XP) a un volume utile de 1 m³ (Figure V-1). Elle est équipée d'un système de contrôle de la température et de l'humidité relative ainsi que d'un

système de pulvérisation utilisé pour vaporiser la suspension bactérienne sur les échantillons. L'humidité relative est contrôlée grâce à l'introduction d'une quantité importante d'eau dans le fond de l'enceinte qui est chauffée par une résistance à une température supérieure de quelques degrés (2-3°C) de celle de l'atmosphère. Cette différence de température provoque l'évaporation de l'eau qui condense sur toutes les surfaces. Le réglage de l'humidité relative, de la température et de la pulvérisation est personnalisable au moyen d'un programme.

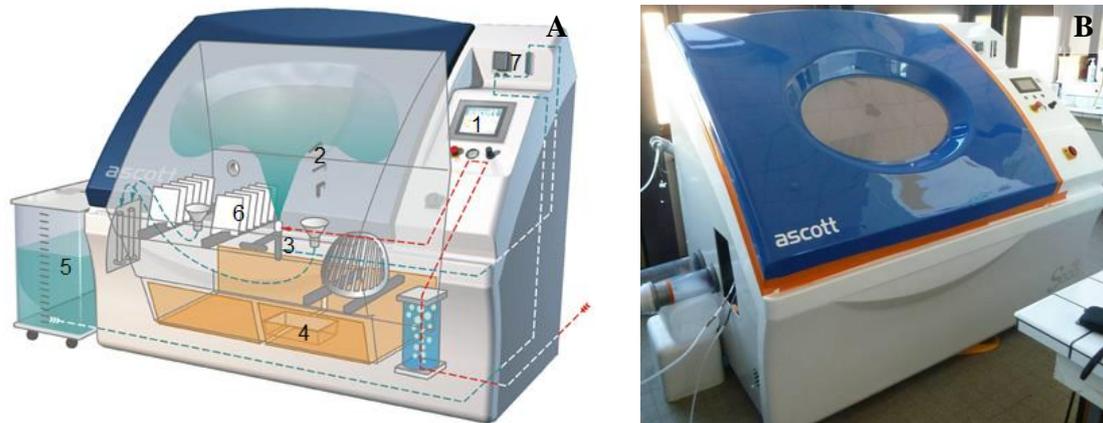


Figure V-1 : A – Schéma de l'enceinte de biodétérioration, 1 - Panneau de contrôle, 2 –Capteurs de température et d'humidité relative, 3 – Buse de diffusion, 4 – Résistance chauffante, 5 – Solution diffusée dans l'enceinte, 6 – Echantillons, 7 – Pompe péristaltique pour la solution à pulvériser. B - L'enceinte de biodétérioration de cette étude.

Nous avons procédé à différents contrôles à la réception de l'enceinte pour vérifier que les caractéristiques de l'atmosphère étaient bien homogènes dans tout le volume de la chambre d'essai. La température, fixée à 30°C, et l'humidité relative, définie à saturation, ont été suivies par l'utilisation de mini-enregistreurs de température et d'hygrométrie positionnés en trois points de la chambre. Le premier a été placé à l'avant gauche, le second au fond sur le milieu et le dernier à l'avant droite. Par ailleurs, le contrôle de ces paramètres est également géré par l'enceinte elle-même et les mesures peuvent être consultées et extraites pour s'assurer de son bon fonctionnement.

La température et l'humidité relative sont homogènes dans l'enceinte de biodétérioration mais il faut attendre quelques heures (Figures V-2 et V-3) pour que l'atmosphère soit régulée convenablement.

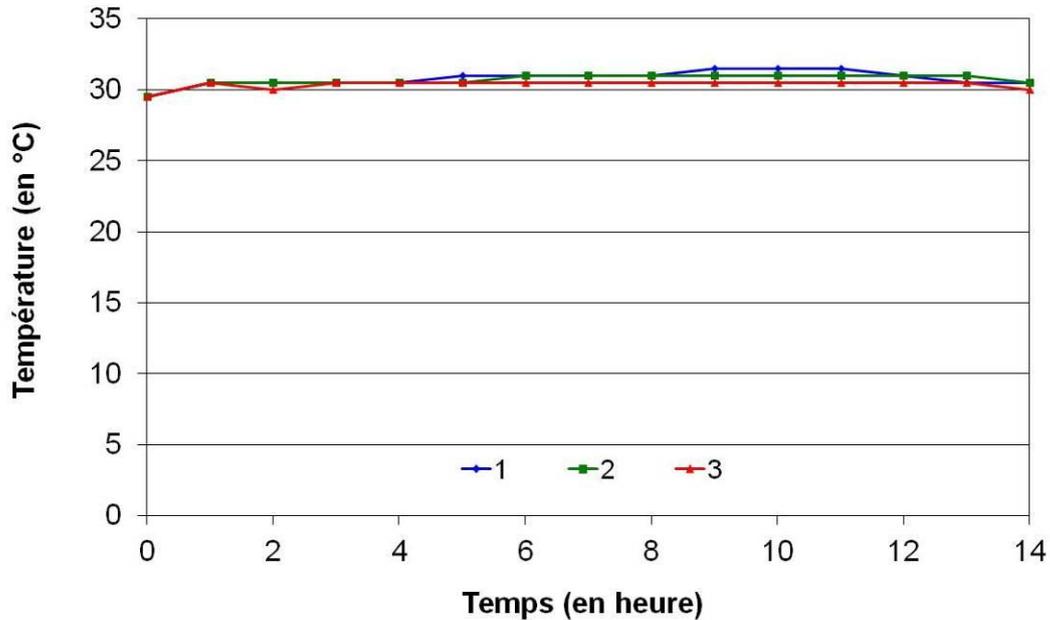


Figure V-2 : Suivi de la température en trois points dans l'enceinte de biodétérioration (consignes : 30°C, 100% HR). Moyenne : $30,6 \pm 0,45^{\circ}\text{C}$.

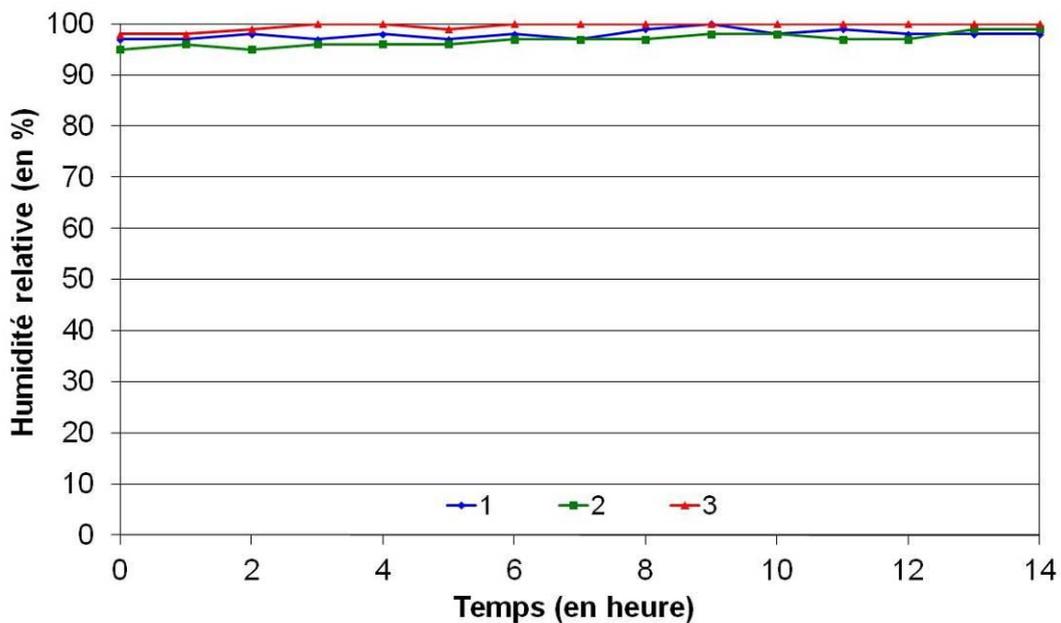


Figure V-3 : Suivi de l'humidité relative en trois points dans l'enceinte de biodétérioration (consignes : 30°C, 100% HR). Moyenne : $98 \pm 0,45$.

L'homogénéité du système de pulvérisation a également été contrôlée en vaporisant de l'eau à l'intérieur de l'enceinte qui contenait onze récipients identiques répartis sur toute la surface (Figure V-4). Deux pulvérisations successives, de 36 minutes et 1h36, ont été effectuées avec à chaque fois un suivi de la masse des récipients.



Figure V-4 : Contrôle de l'homogénéité de la pulvérisation.

La pulvérisation est homogène au sein de l'enceinte de biodétérioration sauf pour les positions 6, 9 et 10 qui reçoivent plus d'eau (Figure V-5). Il a ainsi été décidé d'éviter de positionner les échantillons au niveau de ces zones pour avoir des conditions de détérioration homogènes.

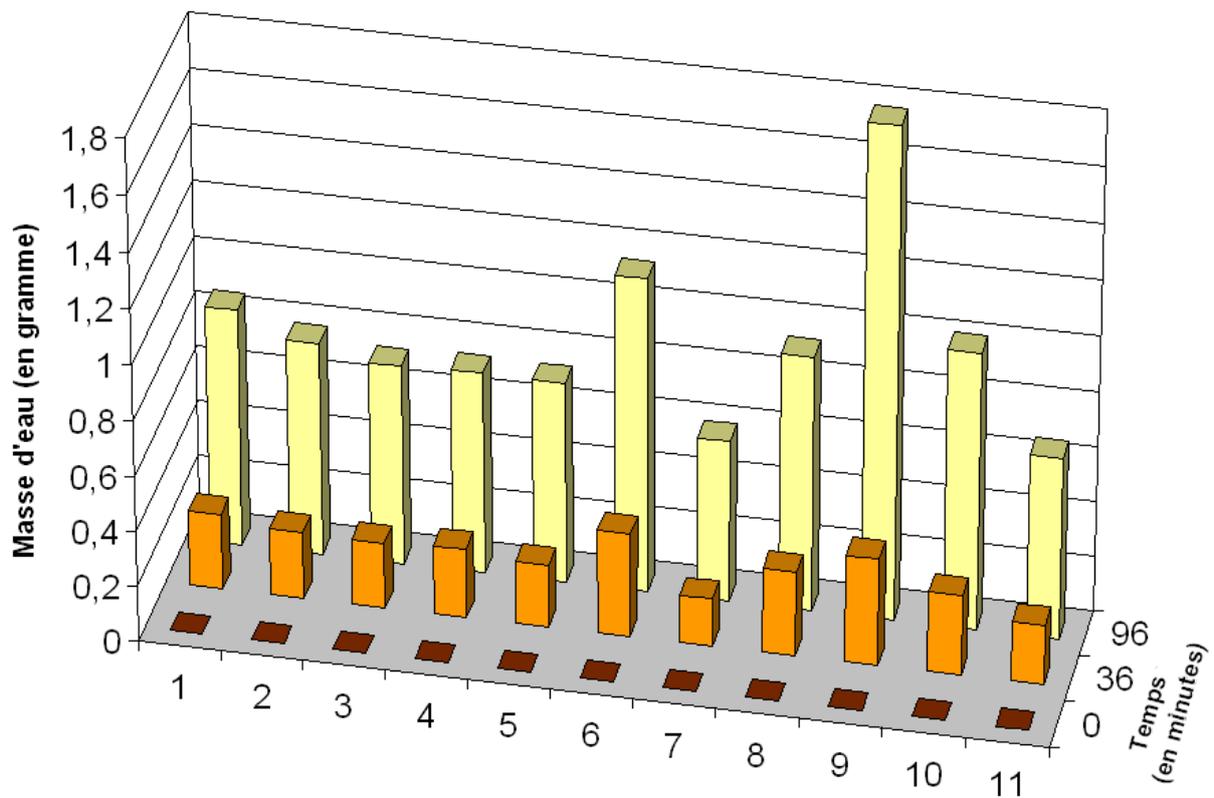


Figure V-5 : Suivi de la masse des verres utilisés pour contrôler l'homogénéité du système de pulvérisation.

V-1.2. Système de ventilation

D'après les travaux menés à Hambourg, un système de ventilation est nécessaire pour assurer une bonne homogénéité des caractéristiques environnementales dans la chambre et accélérer les échanges entre l'atmosphère et la surface des matériaux. L'ajout d'un tel système a permis à Ehrich *et al.* d'atteindre un facteur d'accélération de 24 [7], c'est-à-dire que l'exposition d'un échantillon pendant 1 an dans leur enceinte représente 24 ans d'exposition dans le réseau d'assainissement choisi pour modèle. Sans ce brassage de l'atmosphère, le facteur d'accélération est divisé par trois [8].

Notre choix s'est porté sur un ventilateur centrifuge. Ce type de ventilateur est constitué d'une roue à aubes entraînée par un moteur qui tourne dans un stator épousant la roue. Ce stator comporte deux ouvertures, la première alimente la partie centrale de la roue en fluide, lequel pénètre par dépression et est soufflé par effet centrifuge par le second orifice. Ce type d'appareil permet une régulation modulée du débit d'air en maintenant une pression constante.

L'atmosphère de la chambre étant corrosive, une attention particulière a été portée à la composition des matériaux du système de ventilation. Le ventilateur retenu est intégralement constitué de polypropylène avec un moyeu en nylon graffité (Figure V-6). Les raccordements entre l'enceinte et le ventilateur sont réalisés à partir de tuyau en polychlorure de vinyle. L'ensemble de ces matériaux a une bonne tenue en présence d'hydrogène sulfuré à température ambiante.



Figure V-6 : Système de ventilation de l'enceinte de biodétérioration.

Ce ventilateur tourne à une vitesse de 1 500 tours par minute, aspire l'air dans la partie basse de l'enceinte et le réémet directement à l'intérieur. Le flux, d'environ $230 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, est orienté vers la partie haute de la paroi inclinée afin d'imposer un débit d'air qui va brasser la totalité de l'atmosphère.

L'homogénéité du système de ventilation de la chambre de biodétérioration a été contrôlée en disséminant des éléments mobiles de petite taille sur toute la superficie du capot puis en enclenchant le ventilateur. Le flux imposé a mis en mouvement l'ensemble des éléments nous indiquant que tout l'air de l'enceinte est brassé.

V-1.3. Approvisionnement en hydrogène sulfuré

L'essai accéléré se base sur l'emploi d'hydrogène sulfuré comme source de soufre pour la croissance des bactéries sélectionnées. L'un des buts de ce travail étant de mettre au point un essai normatif, il est important de contrôler au mieux la concentration d' H_2S .

Deux façons d'apporter de l'hydrogène sulfuré ont été testées. La première correspond à l'utilisation de bouteilles d' H_2S commercial à 20, 50 ou 500 ppm couplées à un régulateur de débit fixé à $0,017 \text{ L min}^{-1}$. La concentration des bouteilles d' H_2S a été augmentée au cours du temps selon le planning détaillé dans la Figure V-7.

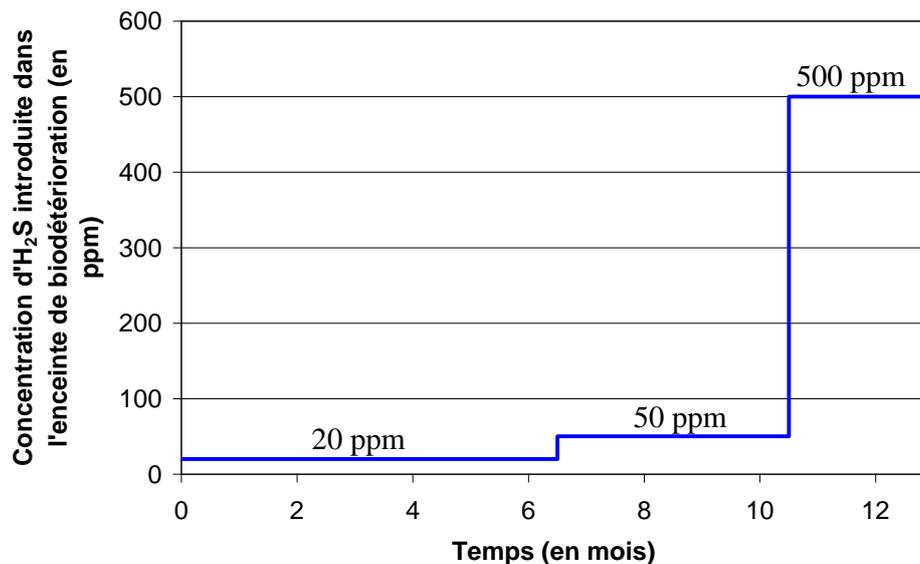
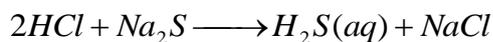


Figure V-7 : Evolution au cours du temps des concentrations d' H_2S en bouteille apportées dans l'enceinte de biodétérioration.

L'autre façon d'approvisionner l'enceinte en hydrogène sulfuré est la production en laboratoire de ce gaz à partir d'un mélange de sulfure de sodium (Na_2S) et d'acide chlorhydrique (HCl) (Réaction V-1) comme c'est le cas pour les travaux de Gutiérrez-Padilla *et al.* [9].



Réaction V-1

L'hydrogène sulfuré étant un ampholyte, il est en équilibre avec les autres formes de sulfures (Figure V-8). De ce fait, il est nécessaire de se placer dans la zone de pH où l' H_2S est dominant pour en optimiser l'émission, c'est-à-dire pour des valeurs comprises entre 0 et 7. Par conséquent, la production d'hydrogène sulfuré doit être réalisée en dosant une solution d'acide chlorhydrique par une solution de sulfure de sodium.

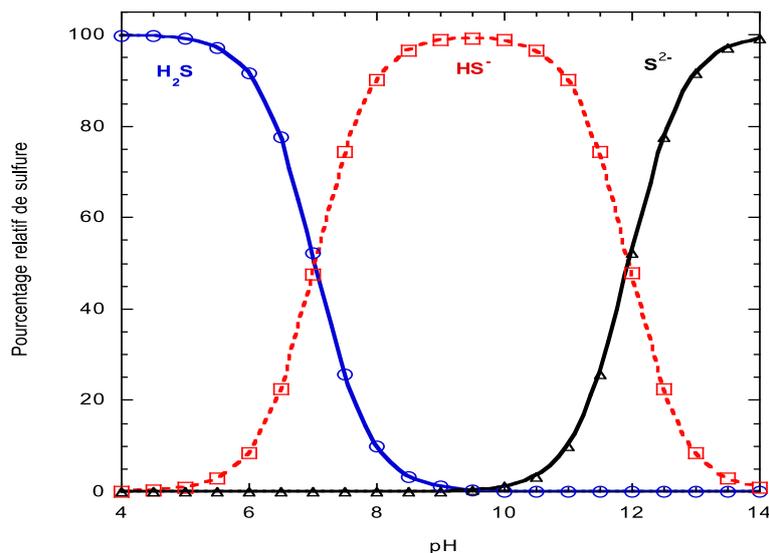


Figure V-8 : Diagramme de prédominance des sulfures en fonction du pH.

La production d' H_2S (Figure V-9) est réalisée à l'aide d'un titrateur automatique (A) qui introduit la solution de sulfure de sodium (B) à $0,32 \text{ M}$ (25 g L^{-1}) avec un débit de $0,06 \text{ mL min}^{-1}$ dans 750 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (1 M) (C) sous forte agitation (D). Un faible débit d'air comprimé est introduit dans le flacon de titration (E) pour acheminer l' H_2S gazeux émis vers l'enceinte (F). Le suivi de la concentration en H_2S est réalisé directement dans la chambre d'essai à l'aide d'un capteur de type Odalog.

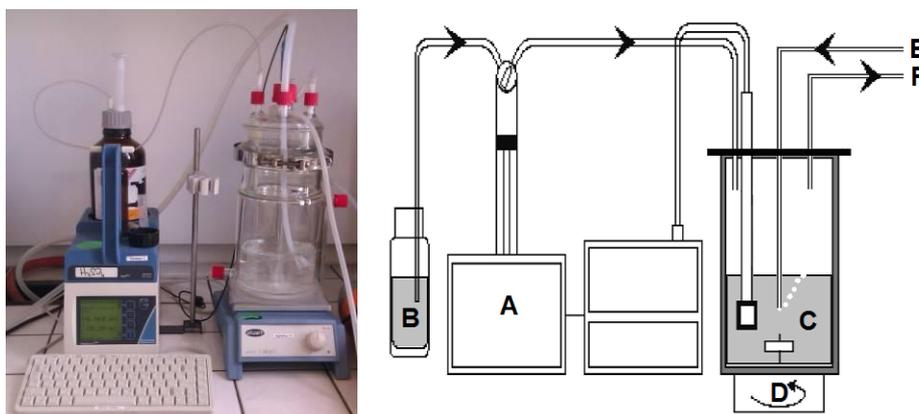


Figure V-9 : Système de production de l'hydrogène sulfuré.

V-1.4. Approvisionnement en bactéries sulfo-oxydantes

L'essai accéléré se base sur l'introduction de bactéries sulfo-oxydantes sensées représenter la succession naturelle rencontrée *in situ* [1, 2]. Les souches bactériennes sélectionnées (*Starkeya novella* (DSMZ 506), *Thiomonas intermedia* (DSMZ 18155), *Halothiobacillus neapolitanus* (DSMZ 15147) et *Acidithiobacillus thiooxidans* (DSMZ 14887)) sont cultivées dans des réacteurs de grand volume (7 L) suivant les recommandations de DSMZ (voir Chapitre II-2.2).

Deux manières d'introduire ces souches bactériennes dans l'enceinte de biodétérioration ont été essayées. Dans un premier temps, nous avons inoculé les échantillons de mortier en pulvérisant deux cultures en alternance tous les dix jours correspondant au mélange à même volume des trois souches neutrophiles d'une part et d'*A. thiooxidans* d'autre part. Par ailleurs,

nous avons utilisé un autre milieu de culture unique pour toutes les souches bactériennes (Tableau V-1) mis au point par l'équipe de recherche de l'université d'Hambourg [10]. Tous les 15 jours, 160 mL de chacune des suspensions bactériennes sont prélevés, centrifugés à 3 000 g pendant 10 minutes à 20°C puis mis en suspension dans 1 L de milieu de culture. Cette suspension bactérienne est ensuite introduite au niveau du système de pulvérisation pour être vaporisée dans la chambre de biodétérioration.

Tableau V-1: Composition pour un litre de milieu de culture utilisé pour l'enceinte de biodétérioration, d'après [10].

	Masse (en g)
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	0,4
NH ₄ Cl	0,4
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,65

La modification de l'introduction des bactéries dans l'enceinte de biodétérioration a été effectuée en même temps que le changement sur l'apport d'hydrogène sulfuré.

Quelle que soit la solution choisie pour apporter les bactéries sulfo-oxydantes, nous avons programmé l'enceinte de biodétérioration pour gérer la pulvérisation de la suspension bactérienne. Ce programme débute par une phase d'humidité saturée à 30°C pendant 23,9 heures et se termine par la pulvérisation de la suspension bactérienne pendant 0,1 heure. Ce cycle de programmation permet de conserver un environnement humide et d'apporter une fois par jour les nutriments et les microorganismes indispensables à la colonisation des surfaces.

V-1.5. Prélèvement des échantillons

Tous les mois, la chambre est ouverte pour observer l'avancée du phénomène de biodétérioration et des photos sont prises pour l'ensemble des échantillons. Trois échantillons de chaque formulation sont ensuite récupérés pour analyser leur évolution. Ces échantillons sont pesés puis photographiés et le pH de surface est mesuré à l'aide de papier pH. Chacun des échantillons est ensuite soumis à une analyse spécifique. Le premier échantillon est fixé pour observer dans un premier temps par épifluorescence avec deux marqueurs fluorescents (Dead/Live), l'un rouge pour mettre en évidence les cellules mortes et l'autre vert pour les cellules vivantes. Puis sa surface est examinée au microscope électronique à balayage pour mettre en évidence le biofilm et les structures formées. Les deux derniers échantillons sont plongés dans 10 mL d'eau distillée, passés 10 min dans un bain à ultrason et trois analyses biochimiques sont pratiquées. La première est une mesure d'ATP, la seconde est un dénombrement des bactéries par épifluorescence après marquage au DAPI et la dernière, un dosage des protéines. Les détails des modes opératoires sont rassemblés dans les annexes d à g.

V-2. Résultats

Le développement d'un essai accéléré normatif nécessite d'utiliser des paramètres clairement définis. Nous avons travaillé selon deux conditions expérimentales qui diffèrent dans la façon de fournir l'hydrogène sulfuré et le milieu de culture nécessaires au développement des microorganismes. Dans le premier cas, nous avons approvisionné l'enceinte de biodétérioration avec de l'H₂S en bouteille et en utilisant une alternance de deux milieux de

culture. Dans le second cas, l' H_2S est produit par réaction chimique et un seul milieu de culture est utilisé.

V-2.1. Premières conditions expérimentales

La solution la plus simple pour approvisionner l'enceinte de biodétérioration en hydrogène sulfuré semble être l'utilisation de bouteilles de gaz commerciales dont la concentration est fixée et qui sont couplées à un régulateur de débit. Cependant, les mesures effectuées directement dans l'enceinte de biodétérioration ne correspondaient pas à la valeur de la concentration de consigne. Par exemple, en utilisant une bouteille d' H_2S à 500 ppm, nous ne mesurons que 15 ppm au bout de 2h30 (Figure V-10). Des essais de laboratoire ont été réalisés pour comprendre cette différence de concentration.

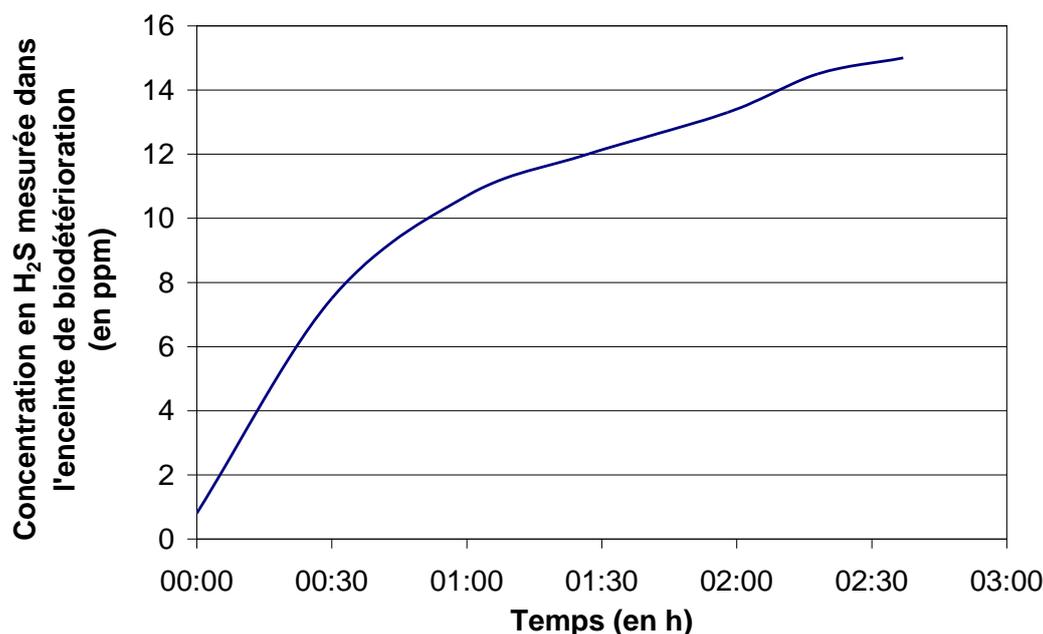


Figure V-10 : Evolution de la concentration en H_2S mesurée dans la chambre d'essai pour 500 ppm introduit.

Nous avons introduit dans la phase aérienne de deux réacteurs de l' H_2S à 20 ppm. Le premier contient un volume d'eau, le second contient une poche d'air utilisée pour occuper une place équivalente au volume d'eau. Ainsi, la phase atmosphérique a un volume comparable dans les deux cas et nous pouvons étudier l'impact de la présence d'eau sur la concentration d' H_2S . Cet essai est constitué de deux phases, la première est la montée en concentration jusqu'à atteindre un équilibre. La seconde est le suivi de la chute d' H_2S à partir de cet équilibre. Ces deux étapes permettent d'obtenir un suivi cinétique de l'augmentation et de la baisse de la concentration en hydrogène sulfuré.

Ces suivis (Figure V-11) nous indiquent qu'en présence d'eau, la concentration d' H_2S atteint un seuil différent de la concentration injectée (15 ppm au lieu de 20 ppm) et avec une cinétique plus lente qu'en absence d'eau. Par conséquent, ce gaz se dissout et/ou s'oxyde en présence d'eau. Il en va de même quand l'apport d' H_2S est coupé, la disparition de ce gaz est plus rapide en présence d'eau. Le grand volume d'eau introduit dans le fond de la chambre d'essai et l'environnement humide impose donc une chute de la concentration en H_2S .

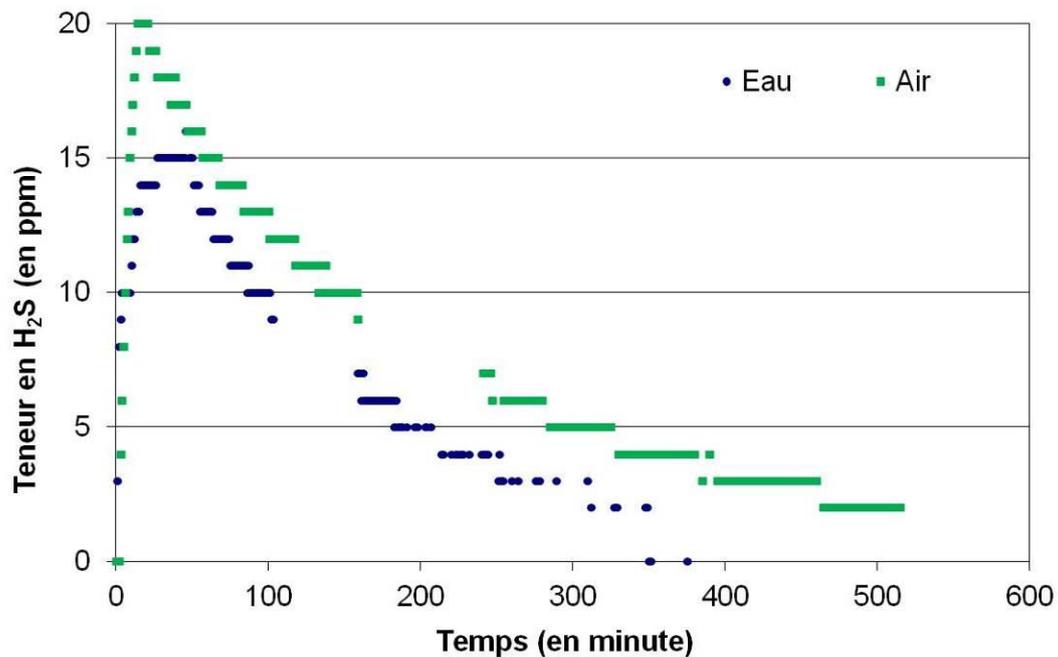


Figure V-11 : Suivi de l'augmentation et de la baisse de la concentration en H_2S dans un réacteur contenant de l'air ou de l'eau. L' H_2S est introduit avec une concentration de 20 ppm.

Les échantillons exposés dans l'enceinte de biodétérioration ont été étudiés sur une période d'un an malgré la faible concentration en hydrogène sulfuré.

Lorsque l' H_2S est apporté à partir d'un mélange d'air reconstitué en bouteille et que l'alternance des milieux de cultures est utilisée, les échantillons se couvrent progressivement de cristaux et de précipités (Figure V-12). Au bout d'un an, les échantillons de mortier à base de ciment CEM I, CAC+S et CAC+A en sont majoritairement recouverts alors que les mortiers contenant du laitier de hauts-fourneaux (CEM III et CAC+L) sont moins impactés par ces altérations. Ces derniers présentent néanmoins en surface des dépôts faiblement adhérents qui font penser à des microchampignons de par leur texture. Les échantillons de mortier montrent une très faible évolution après un an passés dans l'enceinte de biodétérioration (Figure V-13).

	CEM I	CEM III	CAC+S	CAC+L	CAC+A
87 jours d'exposition					
311 jours d'exposition					

Figure V-12 : Détails des faces des échantillons exposés 87 et 311 jours dans la chambre d'essai approvisionnée en H_2S en bouteille.

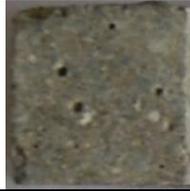
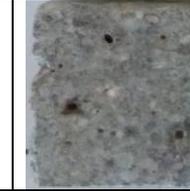
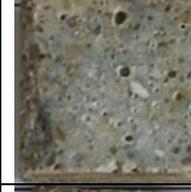
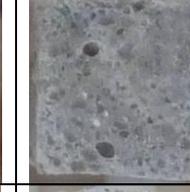
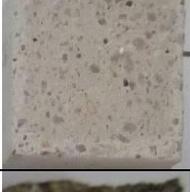
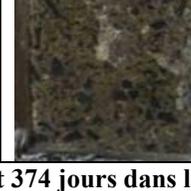
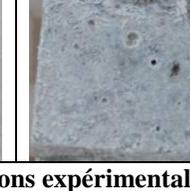
	Sans exposition	52 jours	87 jours	116 jours	150 jours	269 jours	311 jours	374 jours
CEM I								
CEM III								
CAC+S								
CAC+L								
CAC+A								

Figure V-13 : Evolution des échantillons de mortier exposés pendant 374 jours dans l'enceinte de biodétérioration suivant les premières conditions expérimentales.

La masse de chaque échantillon a été mesurée à chaque échéance (Figure V-14). Nous constatons que les évolutions sont similaires quelle que soit la matrice cimentaire considérée. En effet, tous les échantillons prennent de la masse durant les trois premiers mois puis se stabilisent. Cette évolution de la masse est attribuée à la saturation en eau des échantillons.

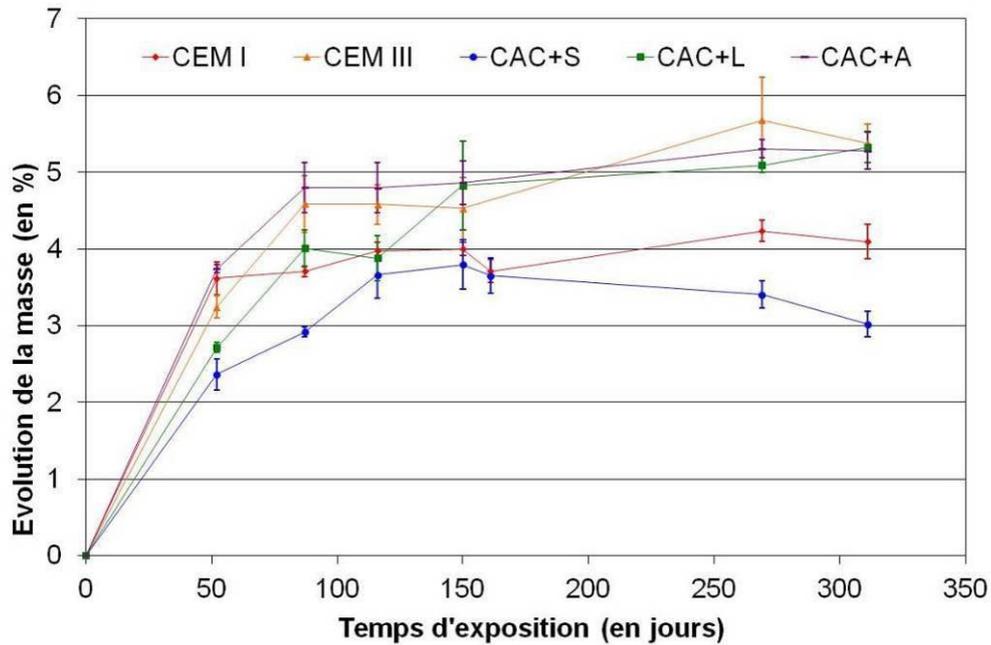


Figure V-14 : Evolution de la masse des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.

Les mesures du pH (Figure V-15) nous indiquent que les mortiers de ciment CEM I ont un pH initialement élevé qui diminue pour se stabiliser à des valeurs proches de 6. Les mortiers au laitier (CEM III et CAC+L) ont un pH qui varie peu tout au long de l'exposition alors que ceux au ciment d'aluminat de calcium (CAC+S et CAC+A) subissent dans un premier temps une augmentation du pH puis une chute importante, de l'ordre de trois unités.

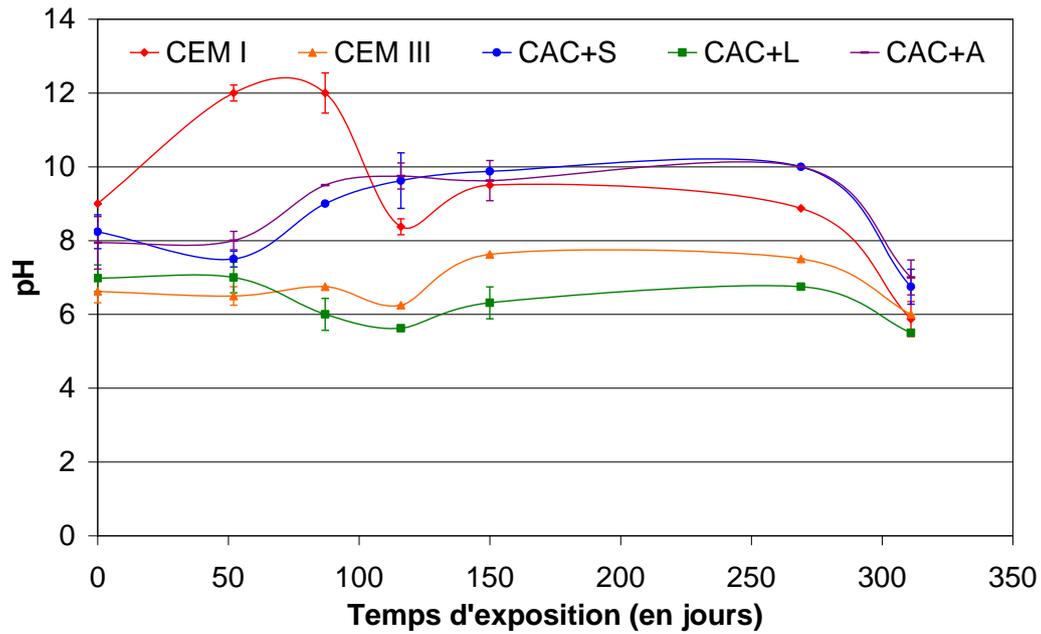


Figure V-15 : Evolution du pH de surface des matériaux cimentaires soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.

Les biofilms formés à la surface des différents échantillons de mortiers ont été caractérisés du point de vue de leur biomasse (dénombrement au DAPI) et de leur activité (quantification de l'ATP et dosage des protéines). Les dénombrements réalisés à plusieurs échéances (Figure V-16) nous indiquent que le nombre de microorganismes présents au cm^2 est similaire pour toutes les matrices cimentaires testées et qu'il n'y a pas d'évolution particulière de la quantité de bactéries au cours du temps.

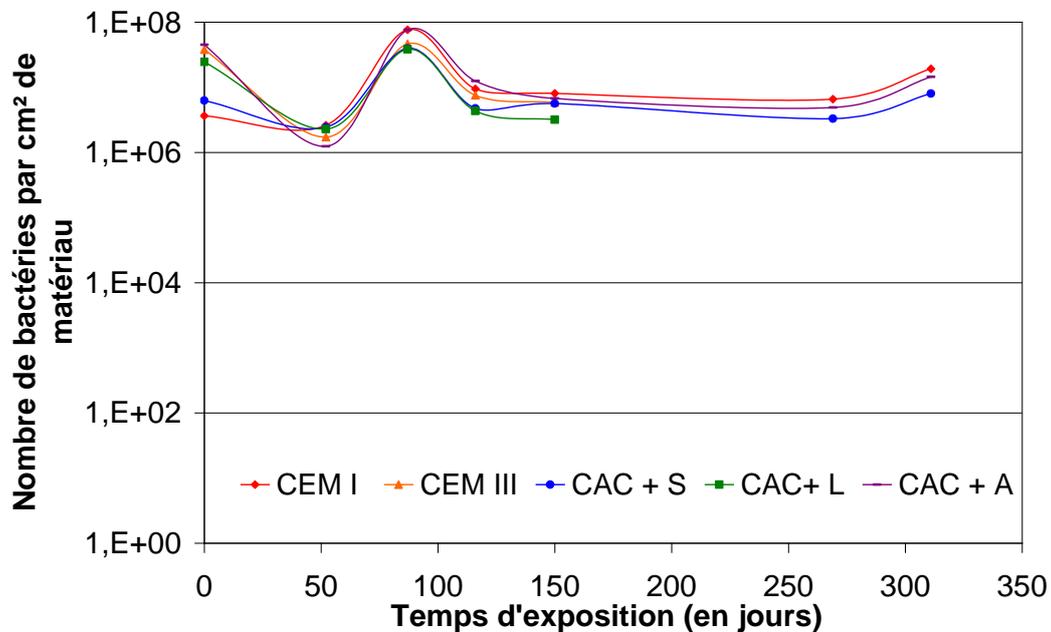


Figure V-16 : Dénombrement de la population microbienne présente à la surface des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.

De manière générale (Figure V-17) la quantité d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) est passée de 10^5 RLU (Unité Relative de Lumière) pour les échantillons sans exposition à 10^7 - 10^8 RLU pour ceux qui ont séjournés dans l'enceinte de biodétérioration.

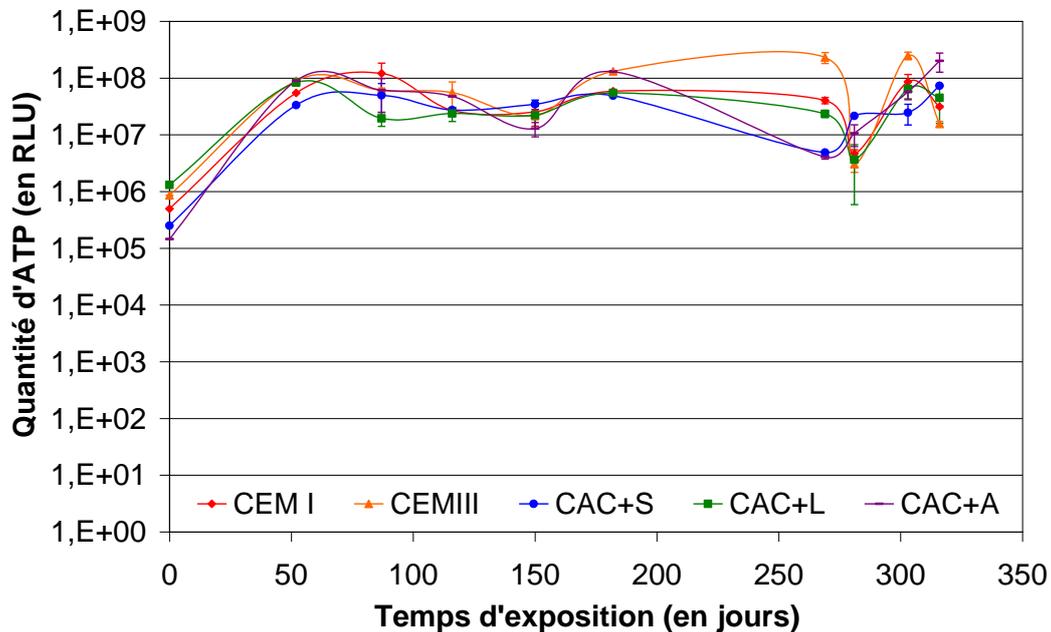


Figure V-17 : Evolution de la quantité d'ATP mesurée à la surface des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.

La concentration en protéines a été mesurée durant les dernières échéances (Figure V-18) et permet d'observer des différences de comportement entre les échantillons de mortier. Les échantillons de mortier de CAC+S ont un pic de la quantité de protéines à 280 jours. Les échantillons de mortier de CAC+A ont une concentration de protéines toujours plus importante que les autres échantillons et qui quintuple lors de la dernière échéance. Les autres échantillons présentent une faible augmentation de la concentration en protéines sur les trois dernières analyses.

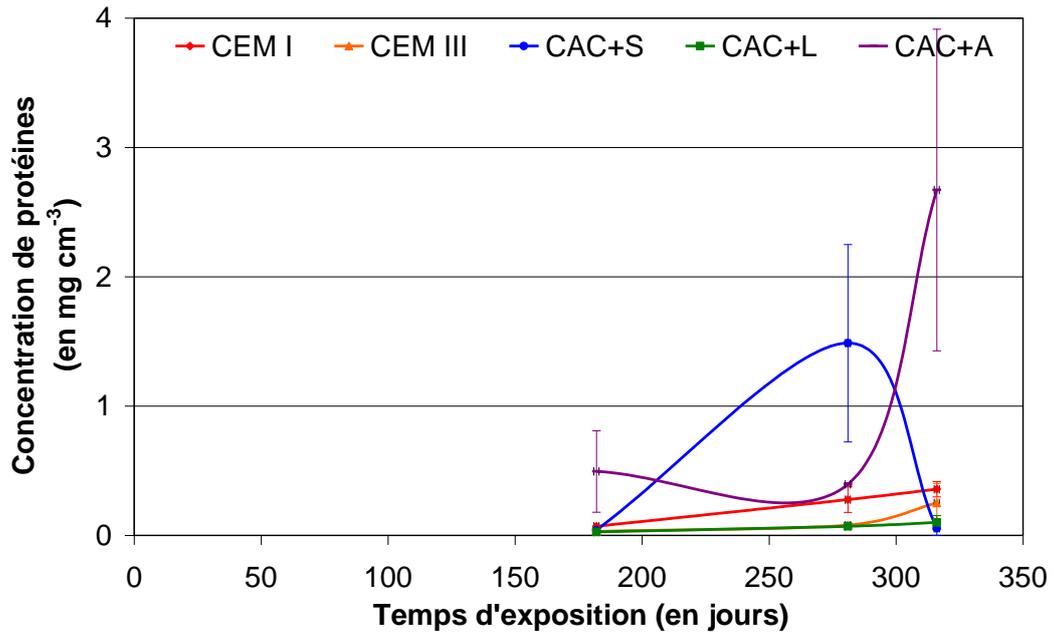


Figure V-18 : Evolution de la concentration en protéines par cm² des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les premières conditions expérimentales.

L'ensemble des échantillons se sont recouvert d'une couche plus ou moins épaisse de phosphate de calcium (Figure V-19) issu des milieux de culture. Le phosphate de calcium prend la forme de petites aiguilles qui s'accrochent au fur et à mesure pour former une couche homogène.

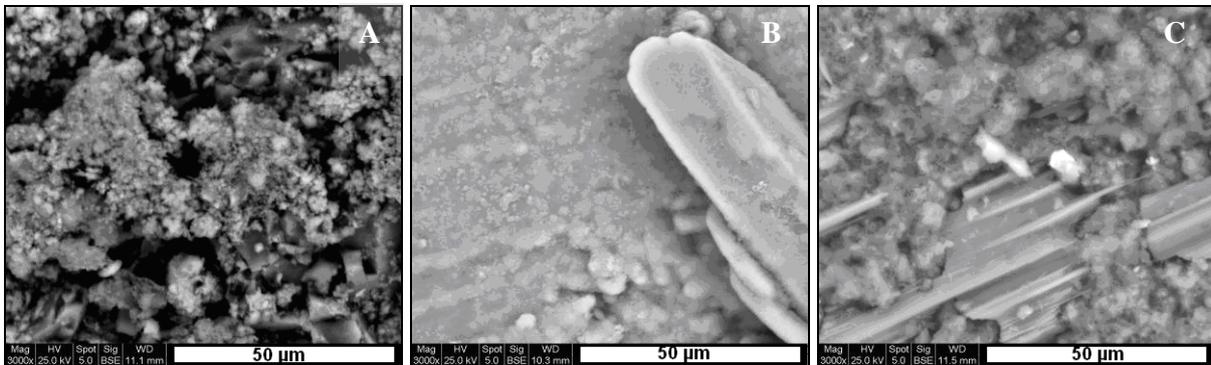


Figure V-19 : Observation au MEB de phosphates de calcium sur les échantillons de mortiers CEM I (A), CAC+S (B) et CAC+A (C) exposés 316 jours.

L'observation des échantillons exposés durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration (Figures V-21 à V-25) a permis de mieux apprécier la différence de colonisation des matériaux. Le mortier CEM I (Figure V-20) se couvre quasi totalement d'un biofilm à l'aspect cotonneux.

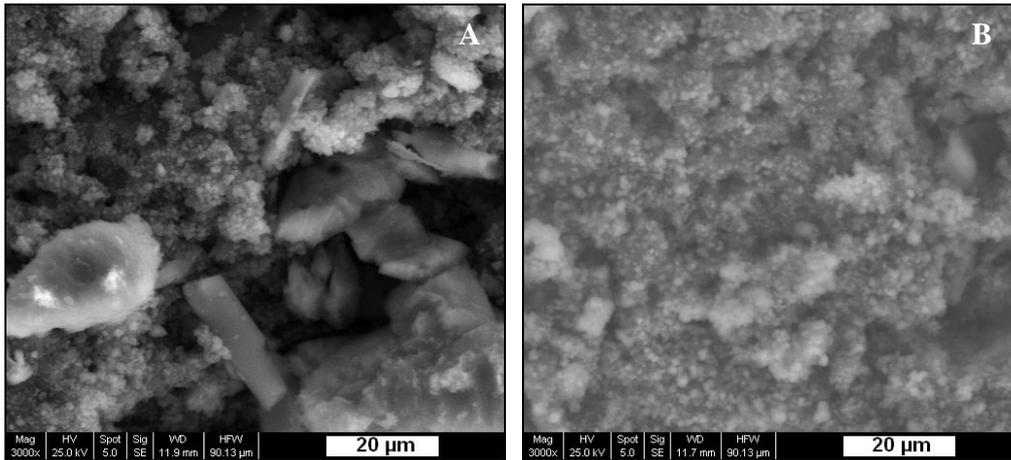


Figure V-20 : Observation au MEB de la surface du mortier CEM I exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Biofilm recouvrant la matrice cimentaire et cristal de soufre détérioré. B- Biofilm recouvrant la matrice.

Les observations en microscopie électronique réalisées sur le mortier CEM III nous montrent un biofilm plus épars associé à des phases détériorées (Figure V-21-A). Il est également possible d'observer des zones où les bactéries, regroupées en amas, sont associées en chaînette à la surface du mortier (Figure V-21-B).

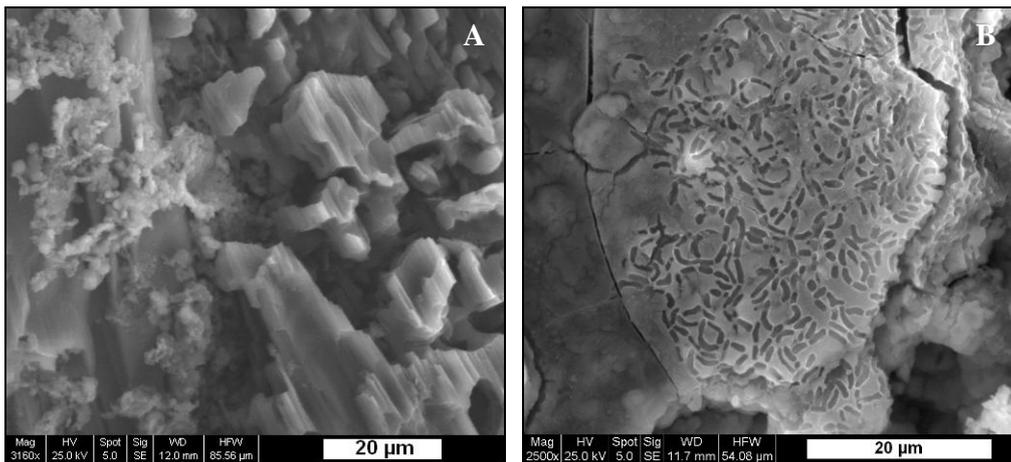


Figure V-21 : Observation au MEB de la surface du mortier CEM III exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Biofilm et phase détériorée. B- Amas de bactéries associées en chaînette.

Les bactéries observées à la surface du mortier de ciment d'aluminate de calcium CAC+S (Figure V-22-A) ne sont pas cohésives et ne forment donc pas de biofilm. Il est toutefois possible d'observer localement des phases détériorées (Figure V-22-B).

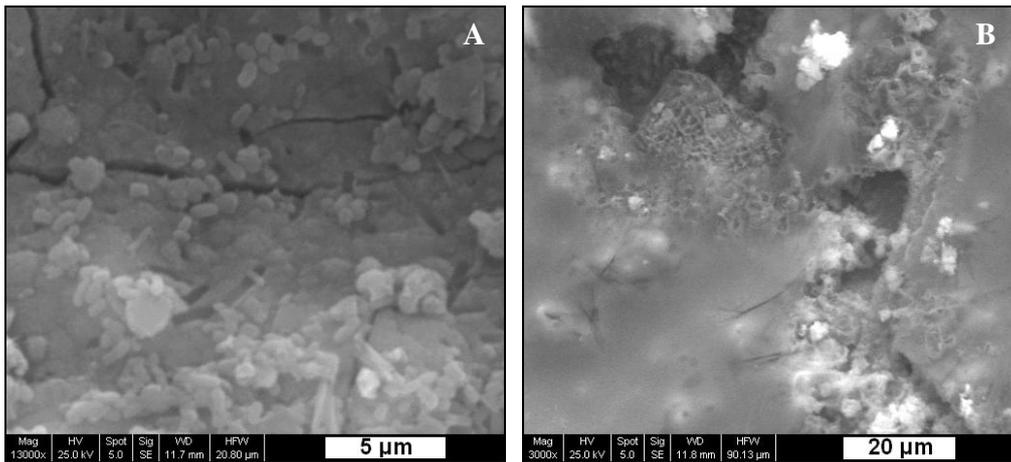


Figure V-22 : Observation au MEB de la surface du mortier CAC+S exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Bactéries réparties sur la surface. B- Phase détériorée.

Il en va de même pour les échantillons de mortier de ciment d'aluminate de calcium CAC+L puisque des bactéries sont observables mais pas sous la forme de biofilm (Figure V-23-A). On notera la présence d'une contamination de la chambre d'essai par un microchampignon (Figure V-23-B) qui ne semble pas entraîner de détérioration du matériau.

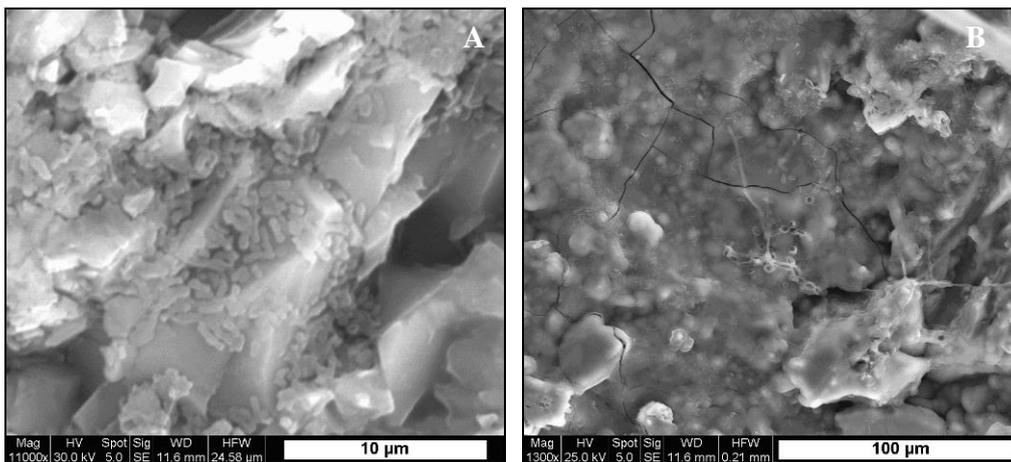


Figure V-23 : Observation au MEB de la surface du mortier CAC+L exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Amas de bactéries cohésives. B- Microchampignon sur gel d'alumine.

Les échantillons de mortier de ciment d'aluminate de calcium CAC+A sont essentiellement recouverts d'un gel d'alumine qui a tendance à recouvrir toute la surface. Malgré tout, il est possible de voir des structures biologiques en des endroits localisés. Les microorganismes sont surtout observés associés à de longs filaments riches en carbone (Figure V-24-A) mais nous avons également pu constater la présence de spores fongiques ou bactériennes (Figure V-24-B). Une spore bactérienne est la forme de résistance que prend une bactérie stressée pour s'isoler de son environnement. Quand les conditions deviennent à nouveau favorables, cette spore va germer et donner un nouvel individu viable. Tant qu'elle est sous forme de spore, la bactérie perd sa capacité à se diviser.

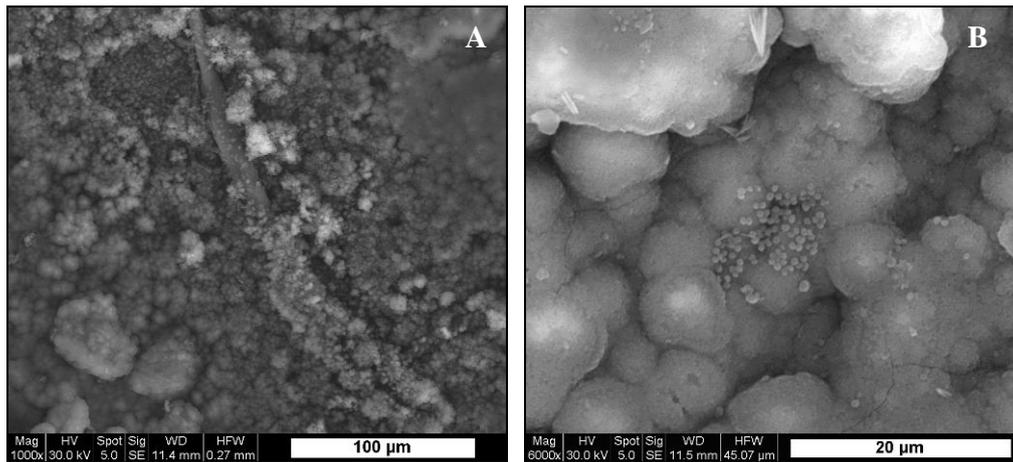


Figure V-24 : Observation au MEB de la surface du mortier CAC+A exposé durant 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Fibre riche en carbone colonisée par des bactéries. B- Spores (fongiques ou bactériens).

Les observations des matériaux cimentaires réalisées par microscopie électronique à balayage nous indiquent que le biofilm est plus important sur les matériaux cimentaires à base de ciment Portland et plus particulièrement sur le CEM I. Lors de ces observations, nous avons constaté que les cristaux de soufre de tailles très variables présents en surface ont une morphologie particulière (Figures V-25 à V-28). Ils apparaissent parfois sous la forme classique rhomboédrique mais le plus souvent, ils présentent une forme monoclinique ou une forme intermédiaire mal définie. De plus, ces cristaux ont une texture de surface granuleuse sur laquelle des bactéries sont parfois visibles. Nous notons également l'absence de cristaux de soufre à la surface du mortier au ciment d'aluminat de calcium CAC+L à cette échéance.

Les cristaux de soufre retrouvés sur le mortier au ciment Portland CEM I sont fortement détériorés (Figure V-25-A). Ils sont également creux et présentent un film en surface. Certains cristaux présentent des bactéries à leur surface (Figure V-25-B) qui sont pris dans une fine matrice adhérente.

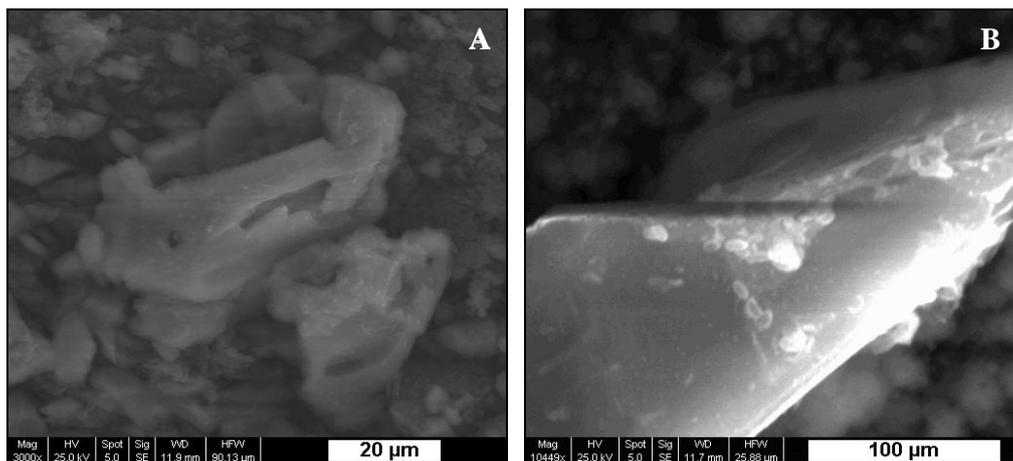


Figure V-25 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CEM I exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristaux de soufre détériorés. B- Bactéries sur un cristal de soufre.

Les anfractuosités des cristaux formés sous la configuration rhomboédrique sont plus clairement visibles sur les matrices cimentaires à base de ciment CEM III (Figure V-26-A). Il semble que les faces des cristaux soient majoritairement attaquées alors que la forme générale

du cristal est conservée puisque les arrêtes sont intactes. Les cristaux les plus attaqués (Figure V-26-B) exhibent un voile translucide à leur surface qui épouse totalement la structure du cristal.

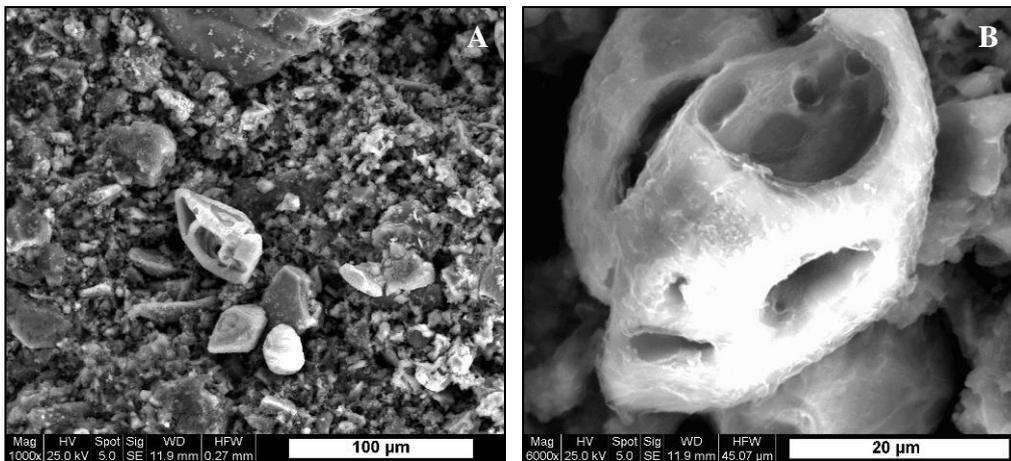


Figure V-26 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CEM III exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristaux de soufre détériorés. B- Gros plan d'un cristal de soufre détérioré

Cette peau est également observable sur les cristaux formés sur les échantillons de mortier à base de ciment d'aluminat de calcium CAC+S (Figure V-27) quelle que soit leur forme.

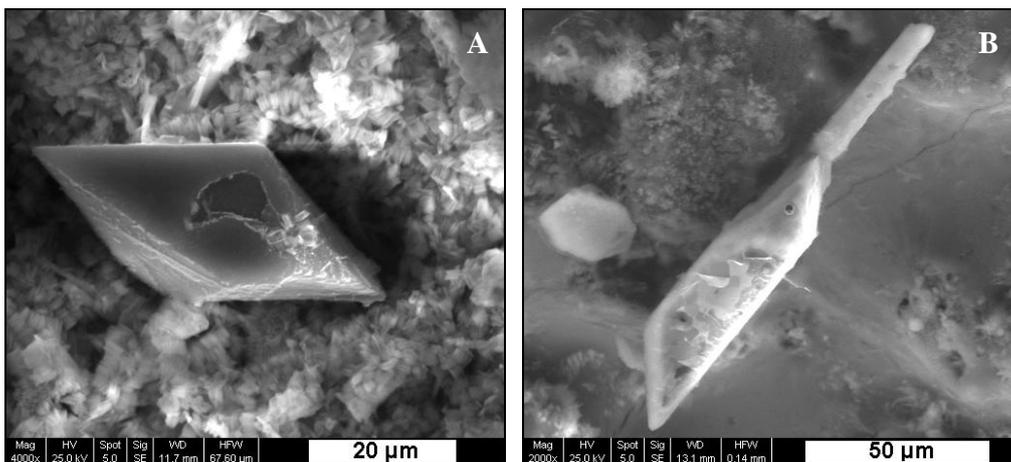


Figure V-27 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CAC+S exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristal de soufre rhomboédrique bioaltéré. B- Cristal de soufre monoclinique bioaltéré.

La peau des cristaux de soufre formés sur les échantillons de mortier au ciment d'aluminat de calcium CAC+A peut être très travaillée (Figure V-28-A) et donne au cristal une apparence martelée. Les cristaux de soufre rencontrés sur gel d'alumine (Figure V-28-B) sont beaucoup moins détériorés mais présentent toujours un voile.

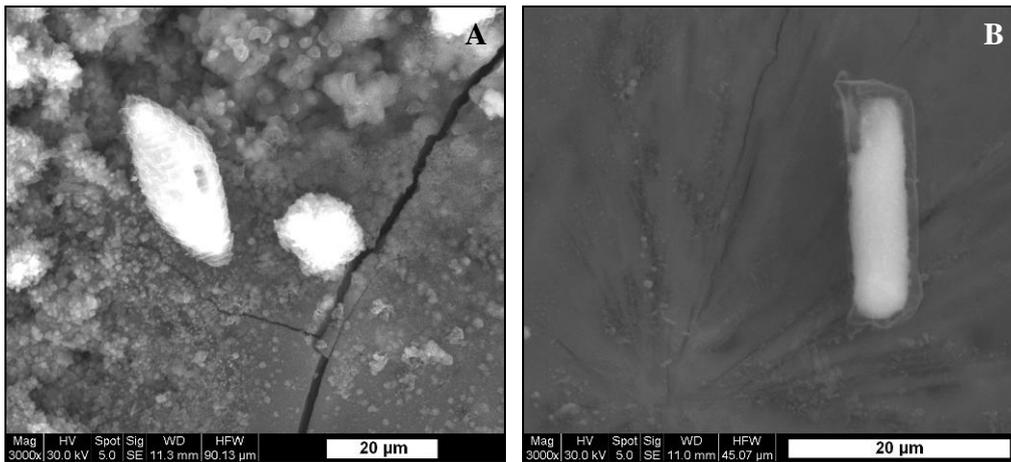


Figure V-28 : Cristaux de soufre observés au MEB à la surface des échantillons de mortier CAC+A exposés 281 jours dans l'enceinte de biodétérioration. A- Cristaux de soufre détériorés. B- Cristal de soufre sur gel d'alumine.

Les analyses effectuées sur l'ensemble des échantillons exposés en présence d'une faible teneur en hydrogène sulfuré (bouteille) et d'une alternance de milieu de culture nous indiquent la présence de microorganismes actifs qui oxydent le soufre élémentaire présent en surface des échantillons. Les matériaux cimentaire à base de ciment Portland (CEM I et CEM III) se couvrent d'un biofilm au contraire des échantillons de mortier au ciment d'aluminate de calcium (CAC+S, CAC+L et CAC+A) sur lesquels les bactéries semblent isolées. L'essai n'est pas totalement au point car la teneur en hydrogène sulfuré n'est pas suffisante pour recréer les conditions rencontrées dans les réseaux d'assainissement et la couche de phosphate de calcium qui s'est formée sur les échantillons a empêché la matrice cimentaire d'interagir avec l'atmosphère de la chambre d'essai.

V-2.2. Secondes conditions expérimentales

Compte tenu de la précipitation de phosphate de calcium à la surface des matériaux cimentaires soumis à l'essai de biodétérioration, il est apparu nécessaire de modifier la composition du milieu de culture pulvérisé. Ce nouveau milieu contient entre 7,5 et 10 fois moins de phosphate que les milieux initiaux. Par ailleurs, la teneur en hydrogène sulfuré représentait également un frein dans le processus de biodétérioration. Etant donné le nombre de bouteilles nécessaire, de la concentration d' H_2S à utiliser pour atteindre une concentration suffisante dans la chambre d'essai, de la dangerosité associée et de leur coût, il est apparu plus simple de produire directement de l' H_2S au niveau de la chambre de biodétérioration.

La production d' H_2S est réalisée par titration d'une solution d'acide chlorhydrique par une solution de sulfure de sodium (Réaction V-1). Les paramètres choisis permettent d'atteindre dans l'enceinte de biodétérioration une concentration moyenne de 38 ppm stabilisée au bout de 18 heures (Figure V-29). Il est intéressant de noter que les périodes de pulvérisation entraînent des chutes journalières de 5 ppm d' H_2S dans la chambre d'essai (Figure V-29) mais la concentration de ce gaz revient à l'équilibre en 3 heures, ce qui est satisfaisant.

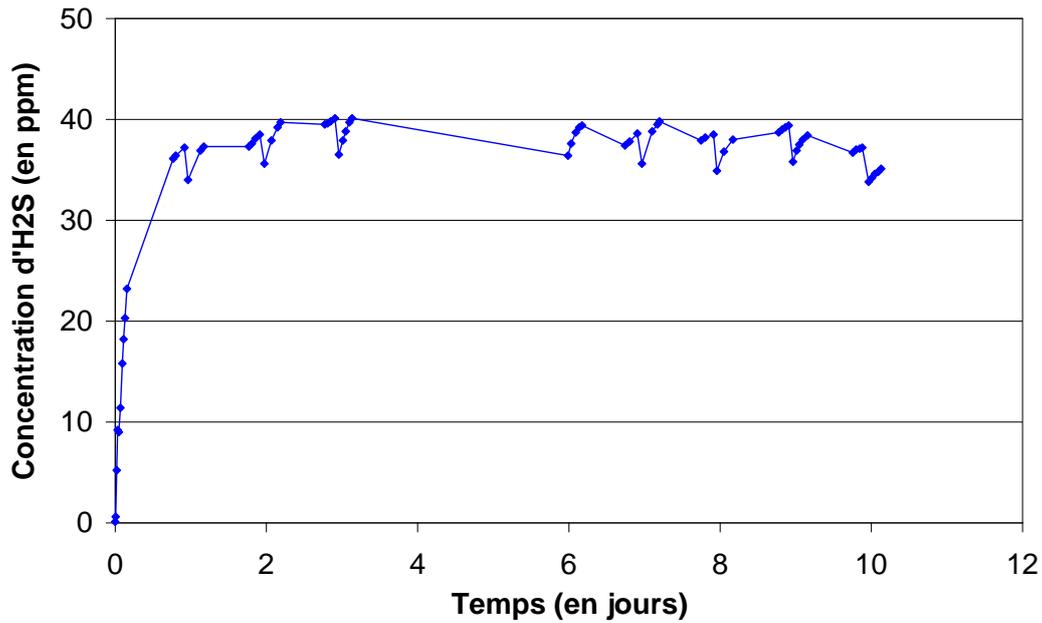


Figure V-29 : Suivi de la concentration d'H₂S dans la chambre d'essai.

Les échantillons exposés dans l'enceinte de biodétérioration avec ces nouveaux paramètres subissent des modifications visuellement plus évidentes en surface dès le premier mois d'exposition (Figure V-30). La matrice cimentaire des échantillons de mortier CEM I, CAC+S et CAC+A s'assombrie sans engendrer de modification de la géométrie des échantillons. Au contraire, les échantillons de mortier CEM III et CAC+L ne semblent pas évoluer.

	Sans exposition	30 jours	58 jours
CEM I			
CEM III			
CAC+S			
CAC+L			
CAC+A			

Figure V-30 : Echantillons de mortier soumis à l'essai accéléré avec production d' H_2S au laboratoire et milieu de culture unique.

La masse de l'ensemble des échantillons de mortier augmente rapidement à cause de leur prise en eau (Figure V-31). Si nous comparons la prise de masse à 2 mois pour les échantillons exposés suivant les deux conditions expérimentales nous constatons que ceux exposés à de l' H_2S produit en laboratoire ont pris 1% en masse en plus.

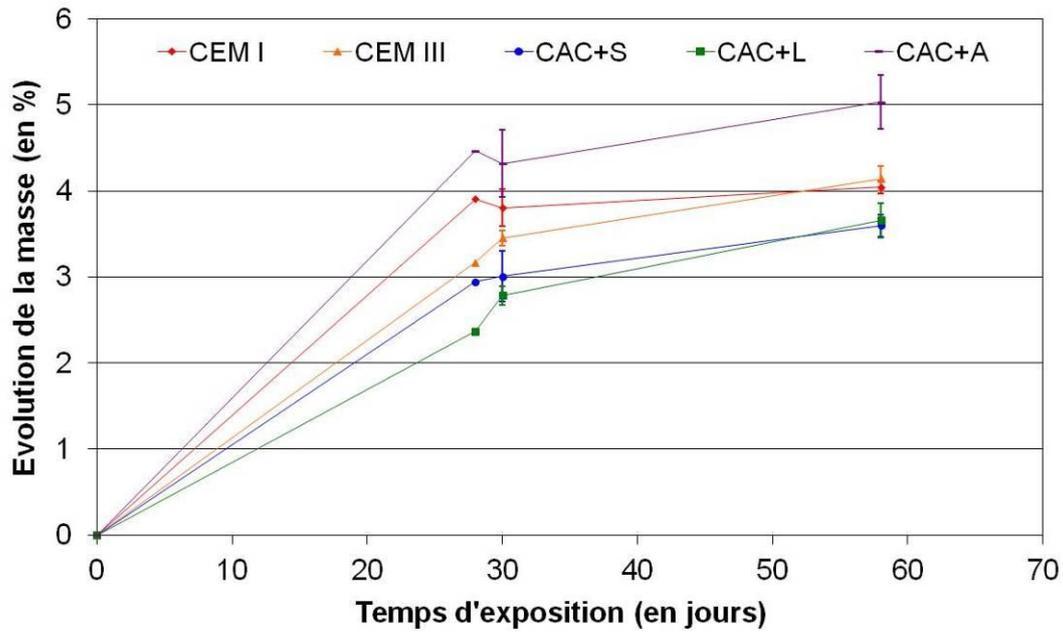


Figure V-31 : Evolution de la masse des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.

L'évolution du pH de surface des échantillons de mortiers (Figure V-32) suit les mêmes tendances que les échantillons soumis aux premières conditions expérimentales puisque durant 1,5 mois le pH des échantillons restait stable sauf pour le mortier de ciment CEM I qui avait subi une augmentation de 3 unités de pH. Nous retrouvons cette augmentation du pH du mortier de ciment CEM I mais elle est trois fois moins importante. De manière générale, le pH est stable sur ces deux premiers mois d'exposition.

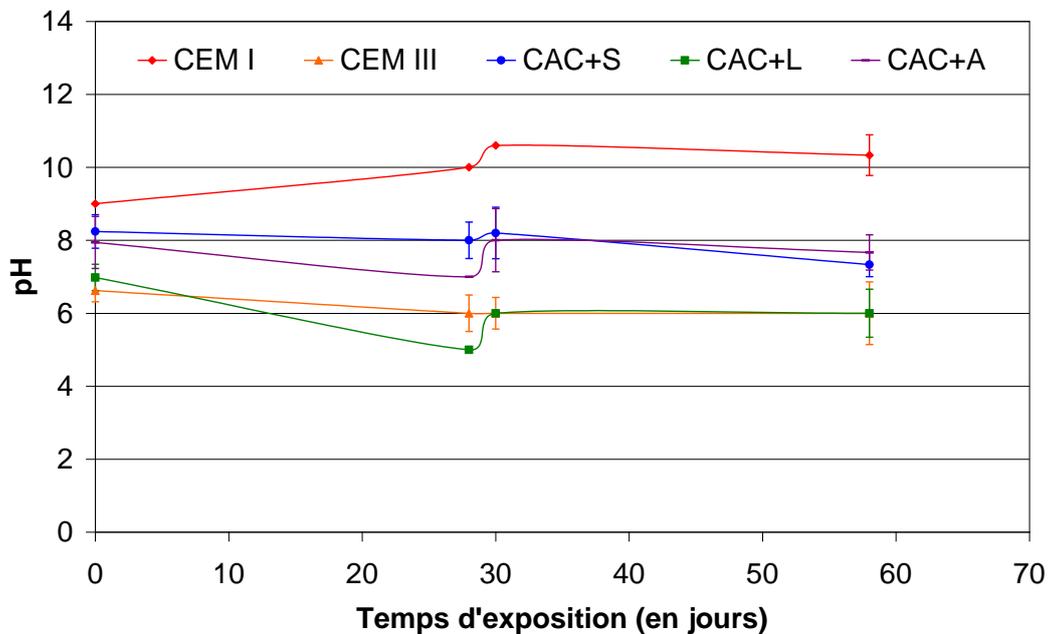


Figure V-32 : Evolution du pH de surface des matériaux cimentaires soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.

Le dénombrement des microorganismes présents à la surface des matériaux cimentaires étudiés (Figure V-33) ne montre pas d'évolution particulière de la biomasse.

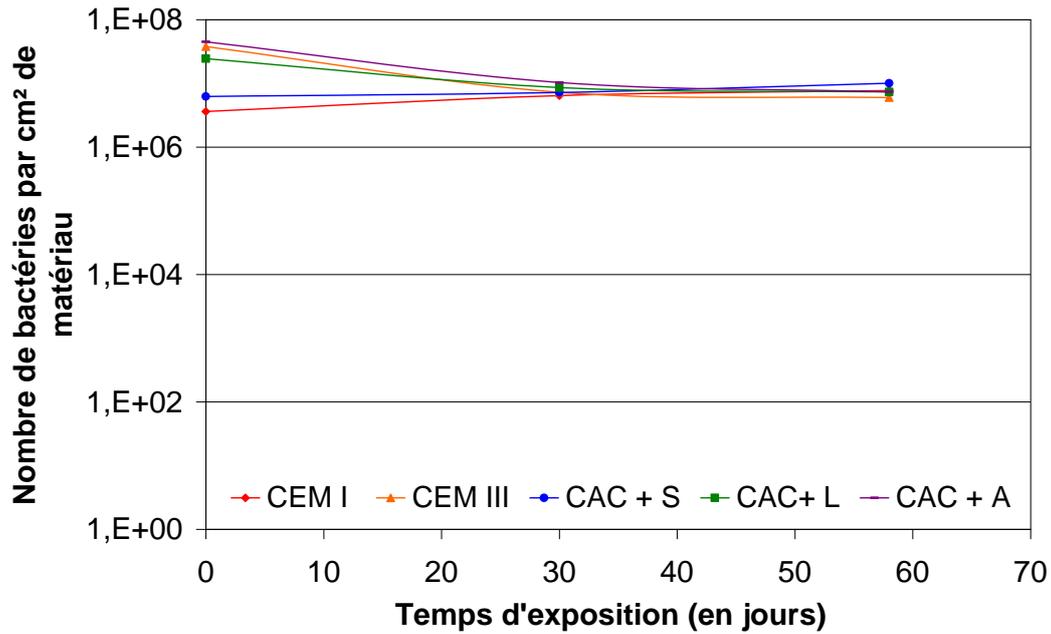


Figure V-33 : Dénombrement de la population microbienne présente à la surface des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.

La quantité d'ATP augmente sensiblement à la première échéance mais se stabilise lors de la seconde échéance (Figure IV-34).

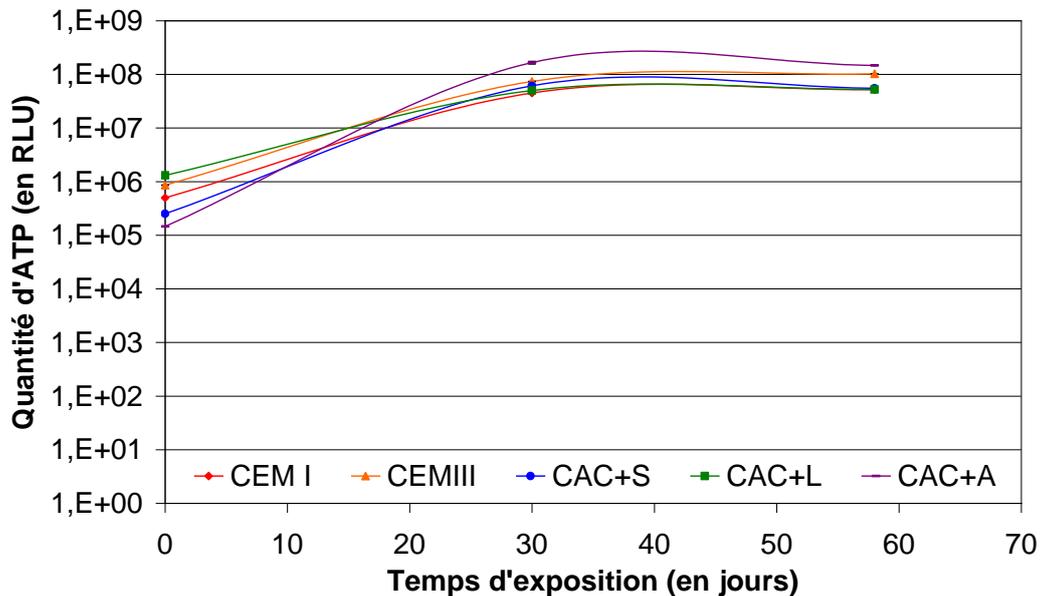


Figure V-34 : Evolution de la quantité d'ATP mesurée à la surface des échantillons de mortier soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.

Le dosage des protéines ne semble pas indiquer de différences importantes de comportement entre les différents échantillons (Figure V-35). Néanmoins, deux échéances ne suffisent pas à déterminer avec certitudes les tendances d'évolution.

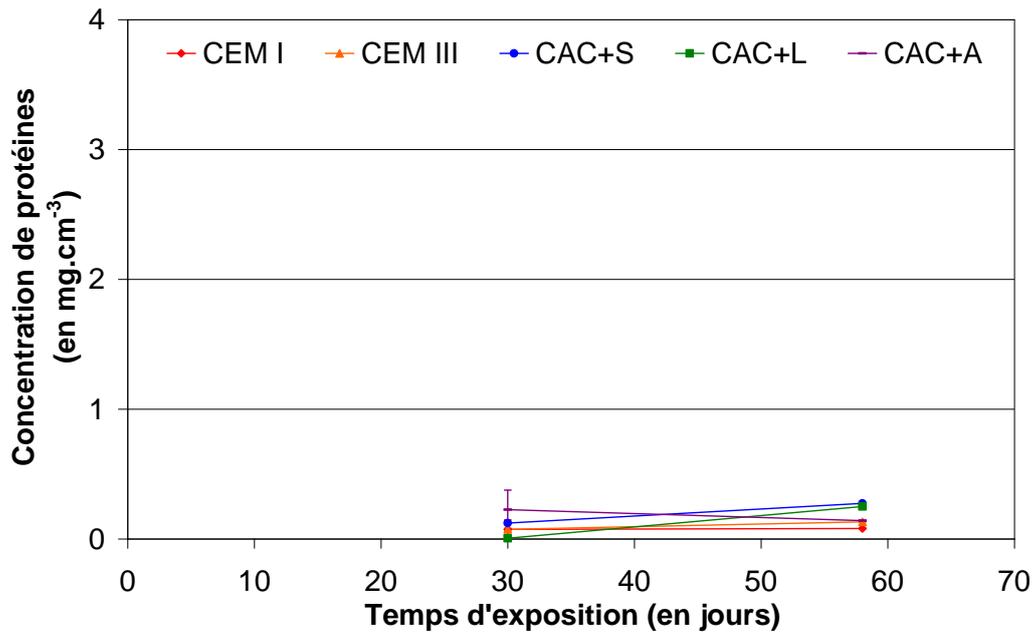


Figure V-35 : Evolution de la concentration en protéines par cm² des échantillons de mortiers soumis à l'essai accéléré suivant les secondes conditions expérimentales.

L'évaluation de l'état physiologique des microorganismes a été réalisée en utilisant un kit de deux fluorochromes qui va marquer les cellules intactes en vert et celles endommagées en rouge.

Les bactéries vivantes mises en évidence par ce marquage (Figure V-36) sont essentiellement retrouvés en association avec des cristaux de soufre (Figure V-36-B, D et E). Ces cristaux apparaissent blancs sur les images en microscopie optique classique. Par ailleurs, les microorganismes sont plus présents sur les matrices cimentaires à base de ciment Portland que de ciment d'aluminat de calcium puisque la coloration verte y est plus intense.

Les microorganismes se développent essentiellement sur la matrice cimentaire et plus particulièrement à l'interface entre les granulats et la pâte de ciment comme illustré par la Figure V-37.

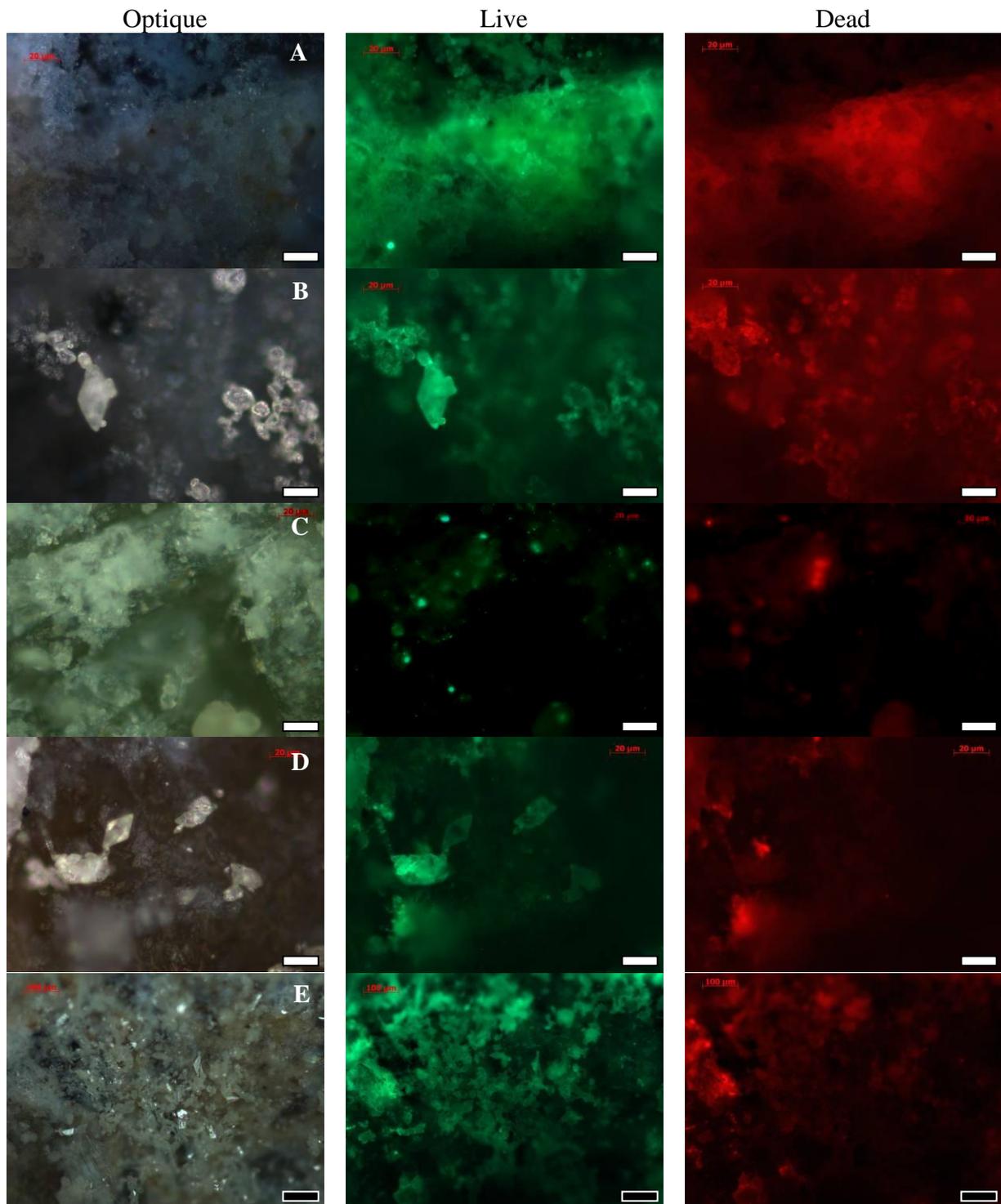


Figure V-36 : Marquage du biofilm formé en 28 jours sur les différentes matrices cimentaires à l'aide du kit Live/Dead®. A- CEM I, B- CEM III, C- CAC+S, D- CAC+L, E- CAC+A. Les barres blanches correspondent à 20 µm et les barres noires à 100 µm.

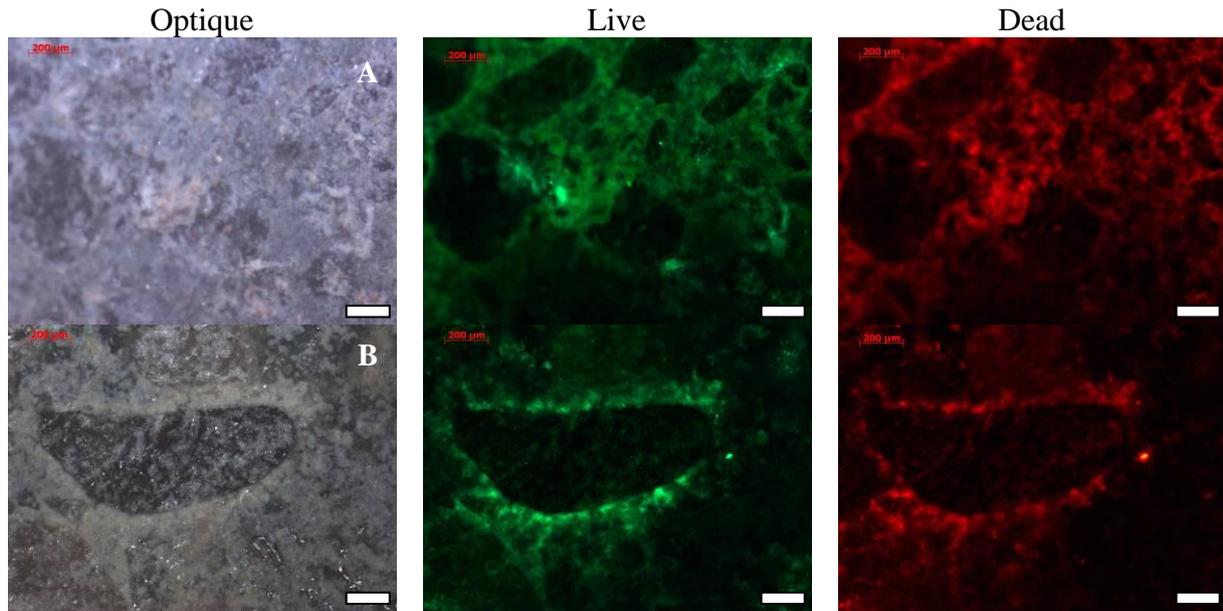


Figure V-37 : Marquage du biofilm formé en 58 jours sur un mortier au ciment CEM I (A) et sur un mortier au ciment CAC+S (B) à l'aide du kit Live/Dead®. Les barres blanches correspondent à 200 µm.

La surface des échantillons a été observée par microscopie électronique à balayage. En deux mois d'exposition, les échantillons ne montrent pas d'évolution particulière de leur surface. Le phosphate de calcium retrouvé en abondance avec les premières conditions d'essai n'est pas visible avec l'emploi de ce nouveau milieu de culture.

Les analyses microbiologiques (dénombrement au DAPI, mesure d'ATP, dosage des protéines et marquage au Dead/Live) indiquent qu'un biofilm s'est formé sur la surface des matrices cimentaires de l'ensemble des échantillons de mortier. Ces biofilms permettent essentiellement la croissance de microorganismes neutrophiles car le pH de surface est stabilisé à des valeurs comprises entre 6 et 10. Par ailleurs, les échantillons se sont imprégnés d'eau, en moyenne à hauteur de 4% et ne sont pas dégradés. L'évolution visuelle est néanmoins prometteuse puisqu'elle rappelle l'évolution des échantillons exposés sur le site S2 durant les premiers mois.

V-3. Discussion

L'évolution visuelle des échantillons de mortier soumis à 38 ppm d'H₂S et au milieu de culture amoindri en phosphate rappelle l'aspect des échantillons exposés quatre mois sur le site S2 (132 jours) puisque la pâte de ciment s'assombrie. Cette transformation n'avait pas eu lieu avec la première série d'échantillons exposée à de faibles teneurs en H₂S (bouteille). Le noircissement est très certainement dû à la présence de sulfure en surface des matériaux qui n'ont pas été mis en évidence par microscopie électronique à balayage. Les échantillons exposés dans l'enceinte de biodétérioration montrent un noircissement de leur surface en quelques heures seulement. Cette coloration s'intensifie ensuite progressivement mais ne semble pas toucher les échantillons contenant du laitier de haut fourneau (CEM III et CAC+L). Cette distinction indique que la matrice cimentaire influe sur cette coloration. Une différence majeure entre les échantillons de mortier au laitier de hauts-fourneaux et les autres échantillons est leur teneur en fer, le ciment Portland en contient 3,31%, le ciment d'aluminate de calcium 2,25% alors que le laitier de hauts-fourneaux n'en contient que 0,4%.

Il est donc possible que l'assombrissement des échantillons de mortier résulte d'une formation de sulfures de fer à la surface des mortiers. D'autres précipités ont également pu se former tel que des thiocyanates. Ehrich [10] indique que l'exposition d'échantillons dans la chambre de biodétérioration de Hambourg entraîne également un changement de couleur mais dans son cas, la surface passe du gris au marron et est attribuée à la croissance du biofilm.

La prise de masse des échantillons de mortier des deux conditions expérimentales évoluent de la même manière mais ceux exposés à une teneur d' H_2S plus importante et au milieu de culture amoindri en phosphate prennent plus rapidement de la masse. Cette différence de l'ordre de 1% est potentiellement due à l'impact du milieu de culture. Moins de phosphates étant présent en solution, ils ne peuvent pas précipiter à la surface des matériaux ni dans sa porosité. Ainsi l'eau imprègne facilement les matériaux. Une autre hypothèse pour expliquer cette différence de masse réside dans l'influence de l'hydrogène sulfuré vis-à-vis de la carbonatation. D'après Joseph *et al.* [11] la réduction abiotique du pH intervenant au début du processus de biodétérioration des matériaux cimentaires est essentiellement engendrée par l' H_2S et non par le CO_2 . La carbonatation entraîne un blocage de la porosité par formation de carbonate de calcium ($CaCO_3$) tandis que l'attaque directe de l' H_2S mène à la formation de produits solubles. La porosité restant accessible, l'eau peut imprégner les échantillons plus facilement.

Les échantillons exposés dans l'enceinte de biodétérioration prennent plus rapidement de la masse que les échantillons exposés sur site. Cette différence de comportement peut être expliquée par le fait que sur site l'humidité relative varie et conduit ponctuellement au séchage partiel des échantillons. Les conditions utilisées pour l'essai accéléré assurent la condensation constante de l'eau dans la chambre ce qui sature rapidement les échantillons en eau.

L'ensemble des échantillons de mortiers exposés dans l'enceinte de biodétérioration ont leur pH de surface qui a chuté pour se stabiliser à environ 6. Ce pH correspond au domaine de prédominance des souches bactériennes neutrophiles et est notamment plus proche de l'optimum de croissance d'*Halothiobacillus neapolitanus*. En théorie, *Thiomonas intermedia* devrait croître en faisant chuter le pH jusqu'à des valeurs de l'ordre de 3-4 mais elle ne semble pas être suffisamment active pour y parvenir. La souche sélectionnée pour l'essai accéléré a été isolée à partir d'une eau douce naturelle, ce qui pourrait expliquer ses difficultés à croître sur des matrices minérales.

L'évolution du pH de surface des échantillons de mortiers exposés dans la chambre de biodétérioration peut être comparée à l'évolution de ces mêmes échantillons sur site. Les échantillons de mortiers soumis aux premières conditions expérimentales (faibles teneur en H_2S et milieux de cultures riches en phosphates) ont un pH qui se stabilise en un an à environ 7 pour l'ensemble des échantillons alors que sur site, le pH atteint une valeur d'environ 6 en 4,3 mois (132 jours). Ces premières conditions expérimentales ne sont donc pas optimales. Les échantillons exposés selon les secondes conditions expérimentales (teneur d' H_2S = 38 ppm, milieu de culture pauvre en phosphates) permettent d'atteindre en 2 mois des valeurs plus proches de celles retrouvées sur site. Cette évolution plus rapide du pH est engageante quand à la mise au point de l'essai accéléré.

Selon Roberts *et al.* [1] et Islander *et al.* [12] la production d'acide sulfurique devient importante dès lors que les microorganismes acidophiles s'implantent à la surface des matériaux cimentaires. Le pH de nos échantillons étant trop élevé pour qu'*Acidithiobacillus*

thiooxidans puisse coloniser efficacement la surface, nous n'avons pas constaté de dégradation. En effet, cette souche bactérienne est capable de croître à partir d'un pH de 5,5 mais avec un temps de latence élevé et un taux de génération (μ) faible [13 - 15].

Les souches bactériennes sont vaporisées dans l'enceinte de biodétérioration en même temps qu'un milieu de culture qui a une influence importante sur les échantillons. La solution initialement choisie qui consistait à pulvériser les milieux de culture de croissance des bactéries dans la chambre a entraîné la formation d'une couche de phosphate de calcium qui a protégé les matrices cimentaires de l'impact direct de l'hydrogène sulfuré et surtout des microorganismes. Les phosphates de calcium sont des composés très peu solubles ($4,3 \cdot 10^{-2}$ g L⁻¹ pour le CaHPO₄, $2 \cdot 10^{-2}$ g L⁻¹ pour le Ca₃(PO₄)₂) qui ont fortement limité les interactions entre les échantillons de mortier et le milieu extérieur. Le nouveau milieu de culture pulvérisé contient entre 7,5 et 10 fois moins de phosphate que les milieux initiaux. Les observations au microscope électronique à balayage des échantillons de mortier soumis à ce nouveau milieu de culture ne montrent pas de phosphate de calcium. Nous nous affranchissons donc de son influence pour les nouveaux échantillons exposés.

Les biofilms présents à la surface de chacun des échantillons se stabilisent en 1 à 3 mois à 10^7 individus par cm². Cette valeur est cohérente vis-à-vis des travaux d'Ehrich [10] puisque leurs échantillons se couvrent d'une biomasse majoritairement comprise entre 10^6 et 10^8 bactéries par cm². La chute du nombre de bactéries à la première échéance (Figures V-16 et V-33) est très certainement due au changement d'environnement des échantillons de mortiers qui possédaient initialement une certaine microflore adaptée aux conditions du laboratoire. L'introduction des échantillons dans l'enceinte de biodétérioration a totalement modifié l'environnement conduisant à la mort de la plupart des microorganismes. Le nouveau biofilm formé en surface des échantillons s'est reconstitué à partir des microorganismes vaporisés et d'une partie de la microflore initiale.

Le fait que le nombre de microorganismes se stabilise à environ 10^7 bactéries par cm² ne signifie pas nécessairement que le biofilm est constitué de cette quantité de microorganismes. En effet, pour quantifier le nombre d'individu présent en surface des matériaux nous passons par une étape de mise en solution du biofilm au moyen d'ultrasons. Néanmoins, un biofilm est, entre autre, caractérisé par sa capacité à s'accrocher aux surfaces et aux difficultés à l'en détacher totalement. Il est donc possible que nous ayons mis en solution uniquement la partie supérieure du biofilm. Les observations réalisées au microscope électronique à balayage vont dans ce sens puisque les matrices cimentaires à base de ciment Portland semblent plus colonisées, avec un biofilm plus épais, que les matériaux au ciment d'aluminate de calcium.

Les observations des échantillons au microscope électronique à balayage indiquent que les mortiers au ciment Portland exposés durant de longues durées à l'atmosphère de l'enceinte de biodétérioration présentent une biomasse généralement plus importante que celle des échantillons au ciment d'aluminate de calcium. Ce résultat est en adéquation avec les résultats obtenus sur site puisque la quantité d'ADN total extrait des biofilms est plus importante pour les matériaux à base de ciment Portland indiquant donc que plus de biomasse est présente.

L'essai accéléré étant au point depuis quelques mois seulement, il n'a pas été possible de montrer avec certitude d'influence particulière du type de granulats sur la biodétérioration. Néanmoins, les observations de la surface des échantillons de mortier au microscope à épifluorescence avec un marquage en Dead/Live nous montrent que les bactéries s'implantent préférentiellement sur la matrice cimentaire et non sur les granulats siliceux et plus

particulièrement au niveau de l'auréole de transition (interface granulat pâte de ciment). Les essais de laboratoire ont mis en évidence que l'oxydation abiotique de l' H_2S intervenait généralement dans cette zone en conduisant à la formation de cristaux de soufre (Chapitre IV-1). Il est donc possible que grâce à la porosité, à la surface spécifique plus importante de cette zone et à la présence d'une source d'électrons, les microorganismes s'y développent mieux car les conditions y sont plus favorables en termes de nutriments et d'humidité. Par ailleurs, les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium avec des granulats de synthèse ALAG® ont une matrice homogène du point de vue de la composition chimique. Nous ne retrouvons donc pas cette distinction granulats / pâte de ciment pour ces matériaux. Les travaux d'Ehrich [10] indiquent cependant que les granulats de synthèse ALAG® diminuent la perte de poids des échantillons soumis à la biodétérioration ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur site.

L'exposition des échantillons de mortiers dans l'enceinte de biodétérioration a conduit à la formation de cristaux de soufre plus ou moins bien constitués et généralement de grandes tailles à la surface de l'ensemble des échantillons. Si nous comparons ces résultats avec ceux de l'oxydation abiotique de l' H_2S (Chapitre IV-1), nous retrouvons davantage de cristaux de soufre à la surface des matériaux cimentaires issus de l'enceinte de biodétérioration. Ce résultat est en concordance avec les résultats obtenus par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis [16], Wilmot *et al.* [17] et Kotronarou *et al.* [18] qui montrent que l'oxydation de l' H_2S est majoritairement réalisée par voie biotique. Selon l'agence de protection environnementale, le taux d'oxydation par voie biotique est plus important que le taux d'oxydation par voie abiotique mais aucun chiffre n'est avancé. Pour Wilmot *et al.* [17] la voie biotique représenterait de 12 à 56% de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré. Enfin pour Kotronarou *et al.* [18] les microorganismes seraient impliqués à hauteur de 70% dans l'oxydation de l' H_2S .

Les défauts des cristaux de soufre rencontrés durant l'essai d'oxydation abiotique ne sont pas identiques à ceux issus de l'enceinte de biodétérioration. Durant l'essai sans bactérie, les anfractuosités étaient nettes et bien définies (Chapitre IV-1) laissant penser que les cristaux étaient en formation. Au contraire, les cristaux formés dans la chambre d'essai présentent des trous beaucoup plus importants et arrondis certainement attribuables à leur détérioration par des microorganismes.

Ces cristaux de soufre présentent également tous une peau ou un voile transparent en microscopie électronique à balayage. Ce voile est d'autant plus visible et modelé que les échantillons sont soumis longtemps à l'essai accéléré. Les cristaux de soufre observés durant les essais d'oxydation abiotique de l' H_2S ne présentaient pas cet aspect de surface. Nous pouvons donc l'attribuer à l'impact des bactéries qui colonisent les cristaux et les dégradent. Le fait que cette couche soit transparente aux électrons et qu'elle laisse donc voir une composition chimique différente à cœur nous donne une information sur son épaisseur. En effet, pour qu'un matériau soit transparent aux électrons, il ne doit pas avoir une épaisseur supérieure à 100 nm [19]. Il est possible que cette couche soit constituée de substances polymériques extracellulaires ou de tensioactifs (agents mouillants) produits par les bactéries pour pouvoir utiliser le soufre [20, 21].

Des cristaux de soufre sont quasiment toujours retrouvés dans la macroporosité ouverte des échantillons de mortiers ainsi que sur la face rugueuse des échantillons (face correspondant à la partie supérieure de l'échantillon lors du moulage). Ces espaces permettent une rétention d'eau et favorisent donc la prolifération des microorganismes. Pour preuve, les dégradations

sur site sont amorcées à partir des zones de retentions où l'eau ainsi que l'acide sulfurique biogénique s'accumulent et impactent le matériau.

V- Conclusion

La biodétérioration des matériaux cimentaires dans la phase aérienne des réseaux d'assainissement est un phénomène complexe que nous avons simplifié pour mettre au point un essai accéléré. Cet essai se base, d'une part, sur les informations recueillies dans la littérature et, d'autre part, sur les données obtenues à partir des expositions sur site et des études en laboratoire des étapes du mécanisme de biodétérioration.

Cet essai accéléré consiste à suivre l'évolution bio-physico-chimique d'échantillons de mortier dans une enceinte de biodétérioration de grand volume (1 m^3) dont les paramètres sont totalement stables et maîtrisés et dans laquelle quatre souches bactériennes sulfo-oxydantes sont pulvérisées. La température est fixée à 30°C et l'humidité relative à 100% pour offrir aux bactéries sulfo-oxydantes des conditions optimales de croissance. De l'hydrogène sulfuré est apporté dans l'enceinte pour atteindre une teneur de 38 ppm ce qui permet aux bactéries de l'oxyder pour se procurer l'énergie nécessaire au fonctionnement de leur métabolisme. L' H_2S s'oxyde également de façon abiotique en d'autres molécules soufrées qui pourront être utilisées par les microorganismes pour croître. Un système de ventilation permet d'homogénéiser l'atmosphère de la chambre d'essai.

Nous avons travaillé avec deux conditions expérimentales. La première correspond à une faible teneur en hydrogène sulfuré couplée à un milieu de culture riche en phosphate alors que la seconde utilise une concentration en H_2S plus importante et un milieu de culture plus pauvre en phosphate.

La première condition expérimentale conduit à la formation d'une couche de phosphate de calcium à la surface des matériaux cimentaires qui inhibe les échanges et protège les mortiers des bactéries produisant de l'acide. Les microorganismes se développent à la surface des échantillons de manière différente suivant la matrice cimentaire. Ils colonisent les mortiers de ciment CEM I sous forme d'un biofilm épais, les mortiers de ciment CEM III par un biofilm épars et les mortiers de ciment d'aluminate de calcium de façon isolée. Malgré la présence de microorganismes, aucune détérioration n'a pu être mise en évidence.

La seconde condition expérimentale, mise en place plus récemment, aboutit à une évolution visuelle des surfaces proche de celle observée lors des expositions sur site. De plus, les analyses microbiologiques indiquent que des bactéries sont présentes et actives à la surface des matériaux cimentaires étudiés. Cette dernière condition expérimentale semble donc prometteuse et sera poursuivie jusqu'à la détérioration des matériaux.

V- Références bibliographiques

- [1] Roberts, D.J., Nica, D., Zuo, G., Davis, J.L. (2002) Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, 227-234.
- [2] Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H. (2007) Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 971-980.

- [3] Kelly, D.P., Wood, A.P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 511-516.
- [4] Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (2006) The Genus *Thiobacillus*. *Prokaryotes*, 5, 812-827.
- [5] Roux, S., Feugeas, F., Cornet, A. (2006) Altération des pâtes de ciment par colonisation bactérienne. *Matériaux et Techniques*, Hors série 94, 495-506.
- [6] Bach, M., Feugeas, F., Farcas, F., Dupont, I., Marie-Victoire, E., Cornet, A. (2005) Influence bactérienne sur le comportement et l'efficacité d'un inhibiteur de corrosion organo-minéral pour des éléments métalliques en fer pur. *Matériaux et Techniques*, Hors série 93, 99-109.
- [7] Ehrich, S., Helard, L., Letourneux, R., Willocq, J., Member ASCE, Bock, E. (1999) Biogenic and Chemical sulfuric acid corrosion of mortars. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 11, 340-344.
- [8] Sand, W. (1987) Importance of hydrogen sulfide, thiosulfate, and methylmercaptan for growth of *thiobacilli* during simulation of concrete corrosion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1645-1648.
- [9] Gutiérrez-Padilla, G.D., Bielefeldt, A., Ovtchinnikov, S., Hernandez, M., Silverstein, J. (2009) Biogenic sulfuric acid attack on different types of commercially produced concrete sewer pipes. *Cement and Concrete Research*, 40, 293-301.
- [10] Ehrich, S. (1998) *Untersuchungen zur biogenen Schwefelsäurekorrosion von zementgebundenen Baustoffen*, PhD dissertation.
- [11] Joseph, A.P., Keller, J., Bustamante, H., Bond, P.L. (2012) Surface neutralization and H₂S oxidation at early stages of sewer corrosion: Influence of temperature, relative humidity and H₂S concentration. *Water Research*, 46, 4235-4245.
- [12] Islander, R.L., Devanny, J.S., Mansfeld, F., Postyn, A., Shih, H. (1991) Microbial ecology of crown corrosion in sewers. *Journal of Environmental Engineering*, 117 (6), 751-770.
- [13] Kelly, D.P., Wood, A. (2000) In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology published by David R. Boone, Don J. Brenner, Richard W. Castenholz, George M. Garrity, Noel R. Krieg, James T. Staley.
- [14] Lors, C., Hajj Chehade, M., Damidot, D. (2009) pH variations during growth of *Acidithiobacillus thiooxidans* in buffered media designed for an assay to evaluate concrete deterioration. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 880-883.
- [15] Hondjuila Miokono, E., Lors, C., Lamberet, S., Damidot, D. (2011) Mise au point d'un test accéléré de biodétérioration de mortiers mettant en jeu une succession de bactéries sulfoxydantes. *Matériaux et Techniques*, 99, 555-563.
- [16] United State Environmental Protection Agency (1974) Process Design Manual for Sulfide Control in Sanitary Sewerage Systems. Technology Transfer Office: Washington, DC, 1974; EPA-625/1-74-005.
- [17] Wilmot, P.D., Cadee, K., Katinic, J.J., Kavanagh, B.V.J. (1988) Kinetics of sulfide oxidation by dissolved oxygen. *Water Pollution Control Federation*, 60, 1264-1270.
- [18] Kotronarou, A., Hoffmann, M.R. (1991) Catalytic autoxidation of hydrogen sulfide in wastewater. *Environmental Science and Technology*, 25, 1153-1160.
- [19] Thomas, G., Goringe, M.J. (1979) Transmission Electron Microscopy of Materials. John Wiley. ISBN 0-471-12244-0.
- [20] Jones, G.E., Starkey, R.L. (1961) Surface-active substances produced by *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 82, 788-789.
- [21] Jones, G.E., Benson, A.A. (1965) Microbial physiology and metabolism phosphatidyl glycerol in *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 89, 260-261.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de recherche s'est intéressé à l'étude des mécanismes de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement pour développer et mettre au point un essai accéléré qui soit proche des conditions rencontrées sur site. Dans ce but, des matériaux cimentaires à base de ciment Portland, de ciment d'aluminate de calcium et de laitier de haut-fourneaux ont été étudiés *in situ* et en laboratoire pour comprendre leur comportement et les paramètres clés qui influent sur leur durabilité.

Deux sites d'étude ayant des caractéristiques différentes ont été sélectionnés pour exposer des échantillons de mortier. Le premier site possède une faible teneur en H₂S et une température de l'ordre de 16°C. Le second site présente une teneur en H₂S d'environ 100 ppm pour une température moyenne de 20°C. En 496 jours d'exposition les échantillons de mortier au ciment CEM I et CEM III se sont fortement détériorés alors que ceux à base de ciment d'aluminate de calcium (CAC+S, CAC+L et CAC+A) ont conservé leur géométrie initiale. Les matériaux peuvent être classés du moins au plus durable de la façon suivante : CEM I < CEM III < CAC+S < CAC+L / CAC+A. Les analyses de la quantité d'ATP à la surface des échantillons indiquent que les mortiers à base de ciment Portland avec ou sans ajout de laitier sont plus bioréceptifs que les mortiers à base de ciment d'aluminate de calcium. La concentration en ions aluminium a été mesurée et la mise en relation avec les teneurs en ATP permet de conclure à un effet inhibiteur de cet ion à partir d'une concentration de 350 mg L⁻¹. Enfin, la biodiversité microbienne est fortement influencée par la composition de la matrice cimentaire ainsi que par les paramètres environnementaux. Les expositions sur sites permettent de conclure de façon générale que pour que les mécanismes de biodétérioration puissent avoir lieu, il est nécessaire que les matériaux soient humides, que la température soit proche de l'optimum de croissance des microorganismes (≈ 30°C) et que de l'hydrogène sulfuré soit présent en quantité suffisante.

Les mécanismes de biodétérioration des matériaux cimentaires en phase aérienne ont été étudiés en laboratoire en considérant que ces matériaux sont soumis à un mécanisme en quatre étapes avec tout d'abord l'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire à la surface des matériaux. Les microorganismes utilisent dans une deuxième étape l'ensemble des sources de soufre présentes en surface des matériaux et les oxydent en acide sulfurique qui va diffuser, dans une troisième étape, à travers une couche de gypse pour aller attaquer dans une dernière étape le matériau sain sous-jacent.

L'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré a été étudiée en exposant différents matériaux à deux concentrations d'hydrogène sulfuré (20 et 50 ppm) et à trois humidités relatives (≈ 30%, 75% et 100%). Ces expositions permettent de conclure qu'il est nécessaire d'avoir une humidité relative importante pour que la transformation de l'hydrogène sulfuré en soufre élémentaire soit possible et qu'une concentration plus importante d'H₂S entraîne une augmentation de la quantité de soufre à la surface des matériaux cimentaires. La composition de la matrice cimentaire va également influencer sur la transformation de l'H₂S puisque les quantités de cristaux de soufre sont plus importantes à la surface des mortiers formulés avec les ciments CEM I et CEM III que pour les mortiers à base de ciment d'aluminate de calcium. Ces cristaux de soufre sont potentiellement utilisés par les microorganismes comme source d'électrons. Le fait que les surfaces des matériaux cimentaires à base de ciment Portland se couvrent de plus de soufre peut donc conduire à une meilleure croissance des bactéries sulfuroxydantes et ainsi une détérioration plus importante. De manière générale, les cristaux de soufre se forment au niveau de sites catalytiques définis par exemple par certaines particules métalliques (Cu, Zn, Fe,...) ou au niveau des zones de transition à l'interface avec les

granulats qui possèdent des concentrations en calcium, des porosités et des surfaces spécifiques plus importantes.

L'étude de la source de soufre sur la croissance des microorganismes n'a pas permis de mettre en évidence de comportement particulier des souches bactériennes étudiées. Ces bactéries sulfo-oxydantes semblent capables de faire de grandes réserves pour se développer ce qui entraîne une croissance même en absence de source de soufre. Les essais menés en parallèle sur l'influence de la source de carbone sur les bactéries mixotrophes montrent des résultats plus probants avec des temps de latence qui augmentent considérablement, des taux de croissance qui chutent et une charge maximale qui va être totalement différente lors d'une croissance en autotrophie.

L'acide sulfurique produit par les microorganismes réagit avec les matrices cimentaires. Suivant la quantité d'acide présente, deux mécanismes ont été mis en évidence. Dans le cas d'une exposition à une quantité limitée d'acide, l'attaque se déroule en trois étapes : une phase d'amorçage, une phase de diffusion et une phase de stabilisation qui résulte de la formation d'une couche de détérioration. Dans le cas d'une exposition à une quantité « illimitée » d'acide, la couche de détérioration se dissout beaucoup plus rapidement ce qui entraîne un mécanisme en deux étapes. En outre, les attaques acides conduisent à la lixiviation des ions dont une grande quantité d'aluminium pour les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium.

Les attaques acides aboutissent également à la formation de produits secondaires. Les matériaux cimentaires à base de ciment d'aluminate de calcium soumis à une attaque acide modérée se couvrent d'une couche d'alumine hydratée qui protège le matériau en bouchant la porosité, en augmentant la capacité tampon de façon importante et en ayant un effet bactériostatique. Cette phase est donc la principale raison de la bonne tenue des matériaux à base de ciment d'aluminate de calcium sur site.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de recherche en association avec les informations identifiées dans la littérature ont permis de définir les conditions d'un essai accéléré.

La bibliographie nous a permis de dresser une liste de microorganismes généralement impliqués dans les processus de biodétérioration. Les conditions de croissance de ces bactéries sulfo-oxydantes permettent de fixer la température de l'essai à leur optimum de croissance, c'est-à-dire 30°C. Par ailleurs, des études antérieures ont montré la nécessité d'utiliser un système de ventilation qui homogénéise l'atmosphère et favorise les échanges entre les matériaux et la phase atmosphérique.

L'enceinte de biodétérioration mise au point utilise de l'hydrogène sulfuré. Sa capacité à s'oxyder en soufre élémentaire ou en d'autres molécules soufrées permet d'assurer un apport nutritionnel en soufre à toutes les bactéries qui se développent dans l'enceinte. La concentration de ce gaz corrosif est comprise entre 30 et 50 ppm et l'humidité relative est fixée à saturation. Ce choix est également fait pour assurer des conditions hydriques optimales au biofilm et permettre l'oxydation de l'hydrogène sulfuré.

Les premières conditions expérimentales définies pour l'essai accéléré (faible teneur en H₂S et milieu de culture riche en phosphate) n'ont pas abouti, en un an, à des détériorations importantes. Au contraire, une couche de phosphate de calcium s'est développée à la surface des matériaux les protégeant des microorganismes qui se développaient sur cette couche.

Les conditions ont été modifiées pour augmenter la quantité d'H₂S et réduire la proportion de phosphate pulvérisé. L'évolution visuelle des échantillons exposés deux mois dans ces

conditions est similaire à celle des échantillons exposés sur site pendant quatre mois. Les premiers résultats dans ces conditions de travail sont donc encourageants.

Cette étude ouvre de nombreuses perspectives. Les échantillons exposés sur site seront maintenus en place ce qui constitue une opportunité pour évaluer la durée de vie des matériaux à base de ciment d'aluminat de calcium puisqu'à ce jour seuls les mortiers au ciment CEM I et CEM III ont montrés des signes de détérioration. Par ailleurs, une étude a débutée pour suivre l'évolution des populations de microorganismes en fonction des conditions environnementales et du type de matériaux. Un premier travail a été réalisé pour quantifier l'ADN et les populations microbiennes sur certains des échantillons. Identifier précisément les espèces importantes permettra de valider ou non celles qui ont été sélectionnées pour l'essai accéléré.

L'étude des mécanismes de biodétérioration a mis en évidence un comportement d'ampleur inattendue des bactéries en absence de soufre. Elles ont la capacité de stocker une grande quantité de soufre pour se développer. Des essais complémentaires sont donc nécessaires pour épuiser ces souches de leurs réserves afin d'observer un impact plus marqué de la source de soufre.

Enfin, l'enceinte de biodétérioration est mise au point depuis quelques mois seulement et doit encore être validée. L'apparition de détérioration permettra d'estimer le facteur d'accélération de ce test vis-à-vis des résultats obtenus sur notre site de référence (S2) présentant une concentration importante d' H_2S . Lorsque l'essai accéléré aura été validé, un document type normatif pourra être rédigé afin de tester de manière maîtrisée des matériaux destinés à être utilisés dans des réseaux d'assainissement.

ANNEXES

Annexe a : Liste des normes

Directive 91/271/CEE :

Traitement des eaux urbaines résiduaires. 21 mai 1991.

NF EN 13508-1 :

État des réseaux d'évacuation et d'assainissement à l'extérieur des bâtiments - Partie 1 : exigences générales. Mai 2004.

NF EN 13508-2 :

Condition des réseaux d'évacuation et d'assainissement à l'extérieur des bâtiments - Partie 2 : système de codage de l'inspection visuelle. Septembre 2003.

NF EN 598 :

Tuyaux, raccords et accessoires en fonte ductile et leurs assemblages pour l'assainissement – Prescriptions et méthodes d'essai. Novembre 2007.

FD P 18-011 :

Bétons - Classification des environnements agressifs. Décembre 2009.

NF EN 206-1 :

Béton - Partie 1 : spécification, performances, production et conformité. Avril 2004.

NF P 15-319 :

Liants hydrauliques - Ciments pour travaux en eaux à haute teneur en sulfates. Septembre 2006.

NF P 15-313 :

Liants hydrauliques - Ciment sursulfaté - Composition, spécifications et critères de conformité. Mai 2005.

NF EN 14647 :

Ciment d'aluminates de calcium - Composition, spécifications et critères de conformité. Décembre 2006.

NF EN 197-1 :

Ciment - Partie 1 : composition, spécifications et critères de conformité des ciments courants. Février 2001.

NF P 15-315 :

Liants hydrauliques - Ciment alumineux fondu. Avril 1991.

NF EN 598+A1 :

Tuyaux, raccords et accessoires en fonte ductile et leurs assemblages pour l'assainissement - Prescriptions et méthodes d'essai. Août 2009.

ASTM C-267 :

Méthodes d'essais normalisés pour tester la résistance chimique de mortiers, de ciments, de surfaces monolithiques et de bétons aux polymères. Janvier 2006.

XP P18-305 :

Béton prêt à l'emploi. 1996

ISO 9227 :

Essais de corrosion en atmosphères artificielles -- Essais aux brouillards salins. 2006

Annexe b : Les ciments

Pour simplifier les écritures des phases solides et des réactions chimiques, il existe une notation cimentaire très largement utilisée. Les éléments majeurs de ce système sont indiqués ci-dessous :



Le ciment courant est constitué principalement de clinker qui est obtenu à partir d'un mélange de calcaire et d'argile, dans des proportions moyennes de 80% et 20% respectivement. Ce mélange est intimement homogénéisé puis cuit à 1450°C et refroidit brusquement. Le clinker ainsi obtenu est broyé finement et additionné de constituants secondaires suivant le type de ciment recherché. Il existe cinq types de ciment courant répondant à des applications particulières :

Le CEM I ou ciment Portland, contient au moins 95% de clinker et au plus 5% de constituants secondaires. Les CEM I conviennent pour le béton armé ou le béton précontraint où une résistance élevée est recherchée.

Le CEM II ou Ciment Portland composé, contient au moins 65% de clinker et au plus 35% d'autres constituants : laitier de haut-fourneau, fumée de silice (limitée à 10%), pouzzolane naturelle, cendres volantes, calcaires... De façon générale, les CEM II sont bien adaptés pour les ouvrages massifs exigeant une élévation de température modérée, les routes et le béton manufacturé.

Le CEM III ou ciment de haut-fourneau, contient entre 36 et 95% de laitier de haut-fourneau et 5 à 64% de clinker.

Le CEM IV est un ciment de type pouzzolanique. Ce type de ciment n'est pas fabriqué en France.

Le CEM V ou ciment composé contient de 20 à 64% de clinker, de 18 à 50% de cendres volantes et de 18 à 50% de laitier de haut-fourneau.

Les CEM III et CEM V qui comportent du laitier de haut-fourneau sont bien adaptés aux ouvrages hydrauliques souterrains, aux fondations et aux ouvrages en milieu agressif. Ils peuvent également être employés dans les travaux en eaux agressives ou dans les ouvrages massifs. Leur utilisation permet en outre de réduire considérablement les émissions de CO₂ grâce à la substitution du clinker par d'autres constituants. Entre 2000 et 2008, la part de production de ce type de ciment est ainsi passée de 5 à 11%.

Le détail des proportions et des sous classes des différents types de ciment est indiqué dans le Tableau b-1.

Tableau b-1 : Composition des principaux types de ciment (extrait de la norme NF EN 197-1, article 6, tableau 1).

Principaux types	Notation des 27 produits (types de ciment courant)		Composition (pourcentage en masse)										Constituants secondaires	
			Constituants principaux											
			Clinker	Laitier de haut fourneau	Fumée de silice	Pouzzolanes		cendres volantes		Schiste calciné	Calcaire			
K	S	D	Naturelle P	Naturelle calcinée Q	Siliceuse V	Calcaïque W	T	L	LL					
CEM I	Ciment Portland	CEM I	95-100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-5
CEM II	Ciment Portland au laitier	CEM II/A-S	80-94	6-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-5
		CEM II/B-S	65-79	21-35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-5
	Ciment Portland à la fumée de silice	CEM II/A-D	90-94	-	6-10	-	-	-	-	-	-	-	-	0-5
	Ciment Portland à la pouzzolane	CEM II/A-P	80-94	-	-	6-20	-	-	-	-	-	-	-	0-5
		CEM II/B-P	65-79	-	-	21-35	-	-	-	-	-	-	-	0-5
		CEM II/A-Q	80-94	-	-	-	6-20	-	-	-	-	-	-	0-5
	Ciment Portland aux cendres volantes	CEM II/B-Q	65-79	-	-	-	21-35	-	-	-	-	-	-	0-5
		CEM II/A-V	80-94	-	-	-	-	6-20	-	-	-	-	-	0-5
		CEM II/B-V	65-79	-	-	-	-	21-35	-	-	-	-	-	0-5
		CEM II/A-W	80-94	-	-	-	-	-	6-20	-	-	-	-	0-5
		CEM II/B-W	65-79	-	-	-	-	-	21-35	-	-	-	-	0-5
	Ciment Portland au schiste calciné	CEM II/A-T	80-94	-	-	-	-	-	-	6-20	-	-	-	0-5
		CEM II/B-T	65-79	-	-	-	-	-	-	21-35	-	-	-	0-5
	Ciment Portland au calcaire	CEM II/A-L	80-94	-	-	-	-	-	-	-	6-20	-	-	0-5
		CEM II/B-L	65-79	-	-	-	-	-	-	-	21-35	-	-	0-5
CEM II/A-LL		80-94	-	-	-	-	-	-	-	-	6-20	-	0-5	
Ciment Portland composé	CEM II/B-LL	65-79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21-35	0-5	
	CEM II/A-M	80-94	← 6-20 →										0-5	
	CEM II/B-M	65-79	← 21-35 →										0-5	
CEM III	Ciment de haut fourneau	CEM III/A	35-64	36-65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-5
		CEM III/B	20-34	66-80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-5
		CEM III/C	5-19	81-95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-5
CEM IV	Ciment pouzzolanique	CEM IV/A	65-89	-	← 11-35 →					-	-	-	0-5	
		CEM IV/B	45-64	-	← 36-55 →					-	-	-	0-5	
CEM V	Ciment composé	CEM V/A	40-64	18-30	-	← 18-30 →			-	-	-	-	0-5	
		CEM V/B	20-38	31-50	-	← 31-50 →			-	-	-	-	0-5	

La chimie du ciment se construit essentiellement à partir de quatre oxydes majeurs : CaO, SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, présents dans les matières premières. La fabrication du clinker entraîne la formation de quatre constituants anhydres principaux : le C₃S, le C₂S, le C₃A et le C₄AF. Généralement du gypse (CaSO₄·2H₂O ou C \overline{S} H₂) est ajouté comme régulateur de prise grâce à son action sur le C₃A. En présence d'eau, ces constituants se recombinaient pour former des silicates, des aluminates de calcium hydratés et de la portlandite, à l'origine du phénomène de « prise ».

Avant d'atteindre son stade final, l'évolution du ciment passe par trois phases successives : la phase dormante, la prise et le durcissement.

La phase dormante est caractérisée par une apparence inchangée de la pâte de ciment malgré la mise en place des premières réactions. Cette phase peut durer de quelques minutes à plusieurs heures.

La seconde phase est la prise durant laquelle le matériau subit une augmentation de sa viscosité jusqu'à devenir un matériau rigide et non déformable. Cette phase est accompagnée d'un dégagement de chaleur.

La dernière phase, le durcissement, est marquée par l'augmentation de la résistance mécanique du matériau dû à la poursuite du processus d'hydratation. La résistance mécanique conventionnellement retenue est celle à 28 jours.

Le gâchage du ciment avec de l'eau (et le sable et les granulats dans le cas du béton) conduit à la formation d'une pâte dans laquelle l'eau entoure chaque grain de ciment. Les composés anhydres du ciment vont être solubilisés en surface par l'eau et vont s'hydrater. Les silicates de calcium (C_3S et C_2S) s'hydratent en formant un gel de silicate de calcium hydraté C-S-H et de la portlandite $Ca(OH)_2$ à la surface du ciment. Ces deux composés hydratés vont progressivement boucher les interstices entre les grains et entraîner un raidissement de la pâte (Figure b-1).

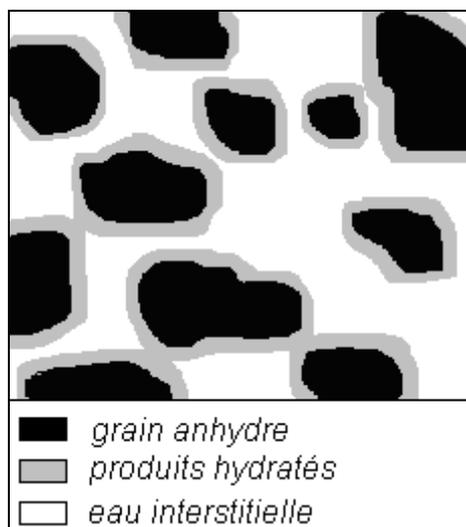


Figure b-1 : Processus d'hydratation d'un ciment courant.

Le Tableau b-2 décrit l'hydratation de tous les composés du ciment qui se fait par dissolution puis précipitation à partir de la solution.

Tableau b-2 : Hydratation des composés du ciment.

Composé anhydre du ciment	Réactif	Produits d'hydratation
C_2S et C_3S	H	$C-S-H$ CH
C_3A	H	C_2AH_8 C_4AH_{13} C_3AH_6
	$C\bar{S}H_n$	$C_3A \cdot 3C\bar{S} \cdot H_{32}$ $C_3A \cdot C\bar{S} \cdot H_{12}$
C_4AF	H	$C_2(A,F)H_8$ $C_4(A,F)H_{13}$ $C_3(A,F)H_6$
	$C\bar{S}H_n$	$C_3(A,F) \cdot 3C\bar{S} \cdot H_{32}$ $C_3(A,F) \cdot C\bar{S} \cdot H_{12}$

Les matériaux cimentaires se structurent au cours du temps pour aboutir à un matériau qui peut être considéré comme la superposition d'une matrice solide et de vides. Cette porosité résulte :

- de la structure particulière de certaines phases solides,
- des vestiges des espaces intergranulaires des matériaux anhydres de départ,
- des éventuelles contraintes mécaniques (fissuration) ou attaques chimiques.

Il existe également d'autres types de ciment tel que le ciment d'aluminates de calcium (CAC). Ce ciment est obtenu à partir d'un mélange de calcaire et de bauxite. Deux procédés de fabrication peuvent être utilisés : la fusion et le frittage.

Comme les matériaux initiaux ne sont pas les mêmes que les ciments courants, la minéralogie de ces ciments va être différente. Il existe différents types de ciment alumineux suivant la leur teneur en différents éléments (Tableau b-3).

Tableau b-3 : Composition des ciments alumineux.

	couleur	Al ₂ O ₃	CaO	SiO ₂	Fe ₂ O ₃ + FeO	TiO ₂	MgO	Na ₂ O	K ₂ O
« Standard » pauvre en alumine	Gris ou chamois à noir	36-42	36-42	3-8	12-20	<2	~1	~0,1	~0,15
Pauvre en alumine, pauvre en fer	Chamois léger ou gris à blanc	48-60	36-42	3-8	1-3	<2	~0,1	~0,1	~0,05
Moyen en alumine	blanc	65-75	25-35	<0,5	<0,5	<0,05	~0,1	<0,3	~0,05
Riche en alumine	blanc	≥80	<20	<0,2	<0,2	<0,05	<0,1	<0,2	~0,05

Le mécanisme d'hydratation reste très proche de celui des ciments courants. Les phases anhydres se dissolvent dans l'eau de gâchage puis les hydrates précipitent à partir de la solution (Figure b-2).

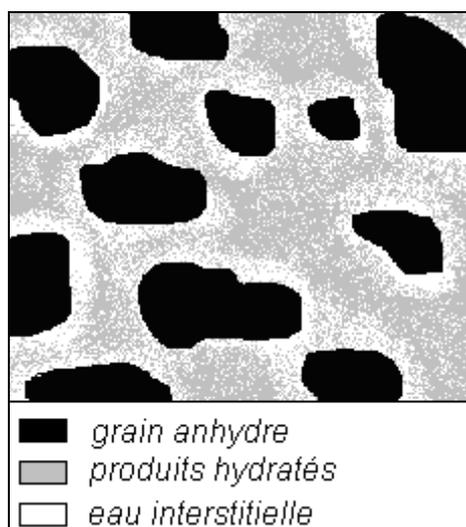


Figure b-2 : Processus d'hydratation d'un ciment d'aluminate de calcium.

De manière plus détaillée, on peut identifier quatre phases dans ce processus :

- La dissolution des anhydres (CA et $C_{12}A_7$) sans précipitation dans l'eau.
- Quand la concentration atteint une valeur critique pour C_2AH_8 et AH_3 , une faible partie de ces hydrates va précipiter. La concentration va donc retomber sous le seuil de saturation.
- Les hydrates continuent de se dissoudre augmentant leur concentration dans la solution.
- Après une période d'induction durant laquelle les noyaux de précipitation atteignent une taille critique, la précipitation massive des hydrates intervient et la concentration en solution baisse jusqu'à atteindre la courbe de solubilité des hydrates.

Contrairement aux ciments courants, la température influence énormément le processus d'hydratation et plus particulièrement le type d'hydrate formé (Tableau b-4). A température élevée (supérieure à 65°C) les hydrates qui se forment majoritairement sont thermodynamiquement stables, il s'agit du C_3AH_6 et de l' AH_3 . Au contraire, à plus faible température, les hydrates qui se forment, CAH_{10} et C_2AH_8 , sont métastables. Ils évoluent donc avec le temps vers la forme thermodynamiquement stable, le C_3AH_6 . Ce mécanisme est connu sous le nom de conversion et peut prendre plusieurs années.

Tableau b-4 : Types d'hydrates majoritairement formés suivant la température de prise

	CAH_{10}	C_2AH_8	C_3AH_6
Température (en $^\circ\text{C}$)	27-35	35-65	$> 65^\circ\text{C}$

La conversion entraîne une modification des propriétés du matériau. Le développement de la résistance des CAC avec le temps suit un schéma particulier constitué d'une augmentation de la résistance jusqu'à un maximum puis une diminution suivit par une période de léger gain de résistance. La résistance n'est pas le seul paramètre impacté puisque la porosité est également touchée. En effet, la conversion entraîne une augmentation de la porosité due au changement de cristallinité des différents hydrates. Le CAH_{10} et le C_2AH_8 sont des hydrates ayant une structure hexagonale alors que le C_3AH_6 a une structure cubique, les produits de conversion sont donc plus denses que les hydrates initiaux.

Les propriétés du CAC sont différentes de celle des ciments courants et il ne s'emploie donc pas dans les mêmes conditions. On peut distinguer quatre propriétés propres à ce ciment :

- Une prise rapide.
- Un développement rapide de la résistance mécanique même à faible température.
- Une résistance aux températures élevées et aux changements de température.
- Une résistance à l'abrasion et aux impacts.
- Une résistance aux attaques acides.
- L'absence de réaction en présence de sulfates.

Son association avec d'autres ciments tels que le ciment Portland, permet :

- Un contrôle de l'expansion.
- Une compensation du retrait.

L'ensemble de ces propriétés permettent l'utilisation du ciment d'aluminate de calcium dans des domaines très variés tel que les bétons réfractaires, la réparation de ponts ou de pistes

d'aéroport, la fabrication de porte d'écoulement de barrage, de sol de fonderie, d'installation cryogénique, d'installation de formation au feu, de réseaux d'assainissement,...

Annexe c : Caractérisation des matériaux sains

Les matériaux sains ont été caractérisés avant détérioration pour connaître leur état initial et pour pouvoir suivre les évolutions des matériaux.

Le pH a été mesuré sur l'ensemble des matériaux sains (Tableau c-1). Les mortiers au ciment CEM I ont le plus haut pH (9,5) puis vient les mortiers au ciment CAC+S et CAC+A. Enfin l'impact du laitier est observé avec les mortiers au ciment CEM III et CAC+L qui ont le pH le plus bas.

La porosité (Tableau c-1) est similaire entre les mortiers au ciment CEM I et ceux à base de ciment CAC+S. Elle est quasiment deux fois plus importante pour les ciments CEM III, CAC+L et CAC+A.

La surface spécifique de l'ensemble des échantillons, ou aire BET est faible (Tableau c-1). Néanmoins, les mortiers au ciment CEM I et au ciment CAC+A présentent une surface spécifique deux fois plus importante que les autres mortiers.

Enfin la méthode BJH permet de confirmer ce résultat (Tableau c-1) puisque les mortiers au ciment CEM I et au ciment CAC+A adsorbent plus d'azote que les autres types de mortier. Le mortier CEM I est donc capable d'adsorber une quantité de molécules plus importante que le mortier CAC+S malgré une valeur de porosité comparable.

Tableau c-1 : Valeurs des porosités (en %), des aires BET (en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), du volume total adsorbé cumulé (en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) et du pH de surface pour les différents échantillons de mortier sains.

	CEM I	CEM III	CAC+S	CAC+L	CAC+A
pH	9,5	6,5	8	7	8
Porosité (en %)	9,8	16,8	8,9	14,5	18,8
Aire BET (en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	4	2,2	2,3	2,5	4,2
Volume total adsorbé cumulé (en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	11	6,4	5,4	7,5	12,5

Des analyses thermiques ont été réalisées sur les échantillons de mortiers sains pour déterminer leur composition. Un descriptif de chacun des échantillons est effectué ci-après. Selon ces résultats, l'ensemble des mortiers au ciment d'aluminate de calcium est non converti puisqu'ils sont composés des hydrates métastables (CAH_{10} et C_2AH_8).

CEM I :

L'analyse thermique effectuée sous balayage d'air sur ce mortier à base de ciment CEM I donne une perte au feu totale de 13,38% (Figure c-1). La courbe commence par présenter une perte d'eau importante (7,01%) jusqu'à 280°C et correspond à l'eau libérée par la décomposition des C-S-H et de l'ettringite (pic endothermique à 133,3°C). La deuxième perte correspond à une perte continue d'eau basse température sans palier (1,56%) jusqu'à 445°C. La troisième perte (1,57%) est due à la décomposition de la portlandite provenant de l'hydratation du ciment. Elle permet d'estimer la teneur en portlandite à 6,5%. La quatrième perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (0,36%) jusqu'à 625°C correspondant à du quartz.

A partir de cette température, la perte de poids correspond à un départ de CO₂. La courbe présente deux pertes de poids dans le domaine de la décomposition des carbonates. La première (0,20%) correspond au CO₂ de carbonatation alors que la seconde (2,26%) permet d'estimer la teneur en calcite contenu dans ce mortier à 5,1%. La dernière perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (0,40%) jusqu'à 1140°C.

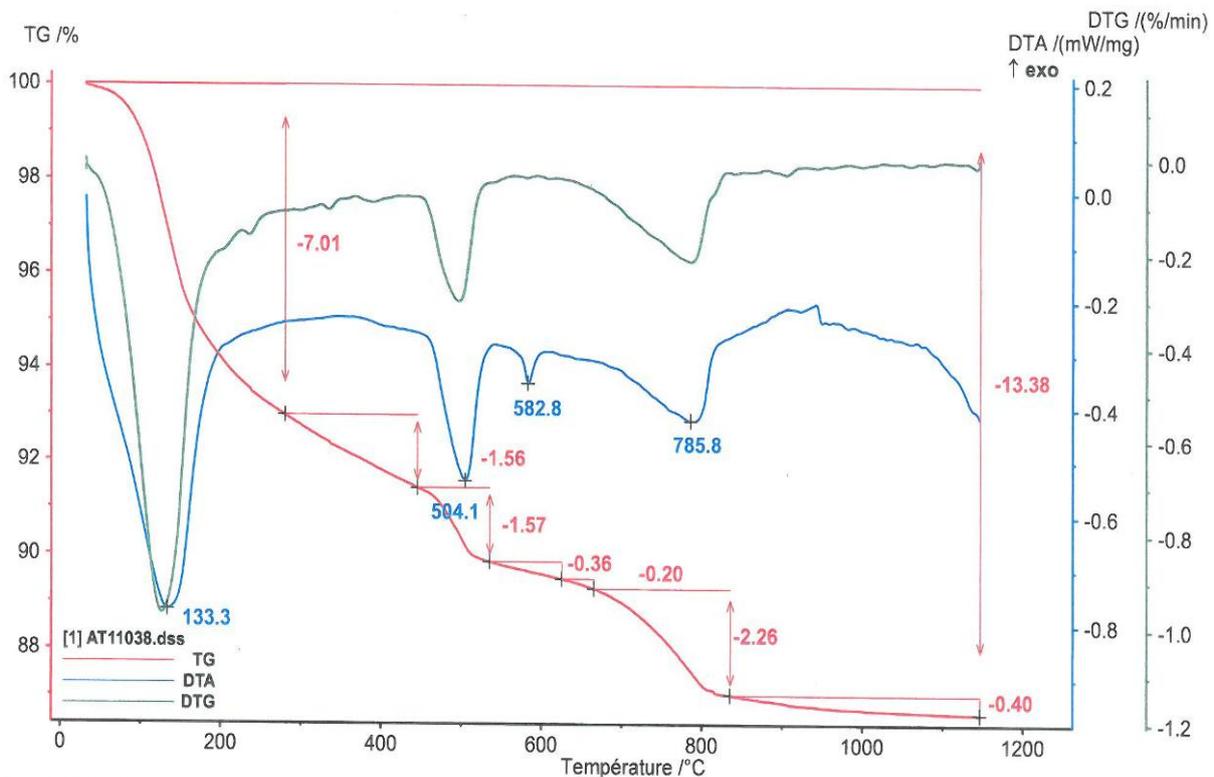


Figure c-1 : Courbes ATD et ATG du mortier CEM I non exposé.

CEM III :

L'analyse thermique effectuée sous balayage d'air sur ce mortier à base de ciment CEM III donne une perte au feu totale de 12,70 % (Figure c-2). La courbe commence par présenter une perte d'eau importante (6,94%) jusqu'à 280°C et correspond à l'eau libérée par la décomposition des C-S-H et de l'ettringite (pic endothermique à 134,9°C). La deuxième perte correspond à une perte continue d'eau basse température sans palier (0,67%) jusqu'à 378,9°C. La troisième perte (0,32%) est due à la décomposition de la portlandite provenant de l'hydratation du ciment. Elle permet d'estimer la teneur en portlandite à 9,1%. La quatrième perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (2,64%) jusqu'à 679,7°C et est associée au quartz.

A partir de cette température, la perte de poids correspond à un départ de CO₂. La courbe présente une perte de poids dans le domaine de la décomposition des carbonates (1,44%) permet d'estimer la teneur en calcite contenu dans ce mortier à 3,3%. La dernière perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (0,69%) jusqu'à 1140°C.

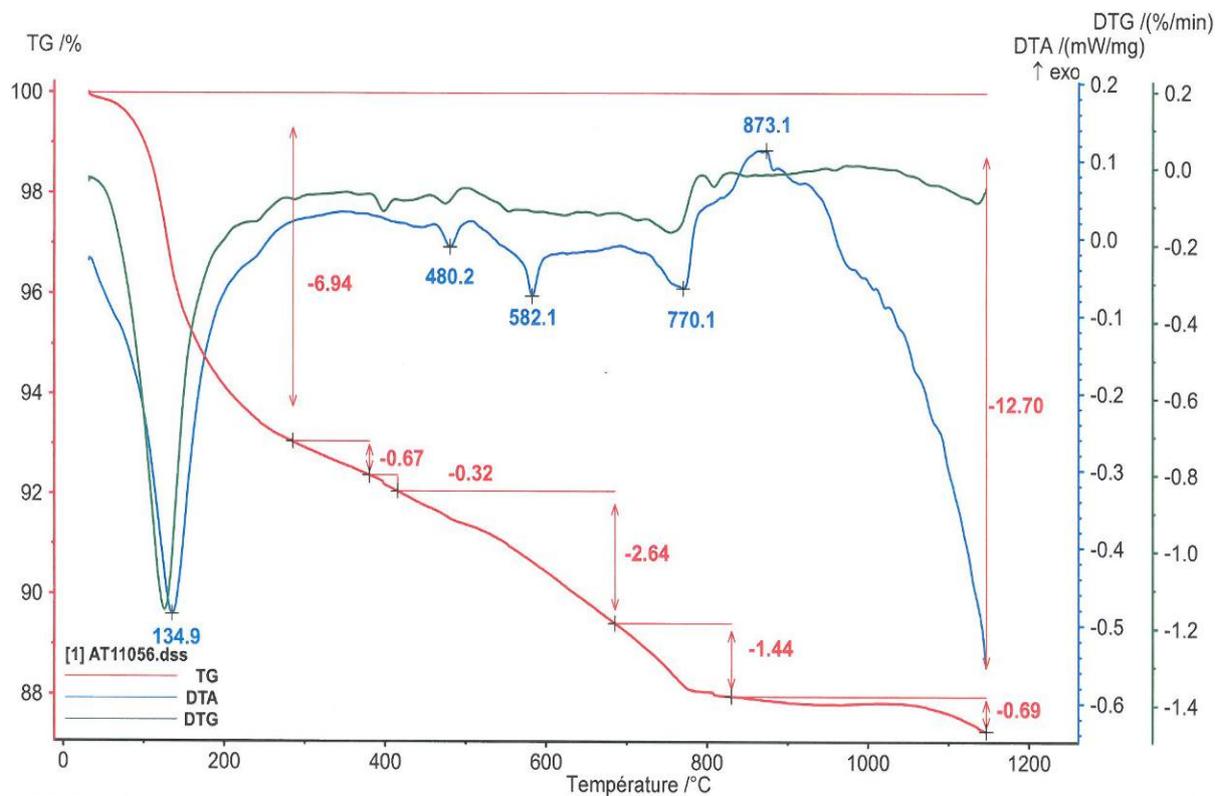


Figure c-2 : Courbes ATD et ATG du mortier CEM III non exposé.

CAC+S :

L'analyse thermique effectuée sous balayage d'air sur ce mortier à base de ciment CAC+S donne une perte au feu totale de 15,47 % (Figure c-3). La courbe commence par présenter une perte d'eau importante (5,63%) jusqu'à 210,5°C et correspond à l'eau libérée par la décomposition des CAH_{10} et C_2AH_8 (pic endothermique à 130,6°C). La deuxième perte correspond à une perte d'eau basse température (1,25%) jusqu'à 252,6°C associée aux sels de Friedel (AFm). La troisième perte (3,40%) est due à la décomposition de l'alumine (AH_3). La quatrième perte correspond à une perte d'eau (2,64%) jusqu'à 679,7°C correspondant aux C_3AH_6 . La cinquième perte d'eau (1,31%) est associée à la fraction quartzitique.

A partir de cette température, la perte de poids correspond à un départ de CO_2 . La courbe présente une perte de poids dans le domaine de la décomposition des carbonates (0,77%) permet d'estimer la teneur en calcite contenu dans ce mortier à 1,7%. La dernière perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (0,47%) jusqu'à 1140°C.

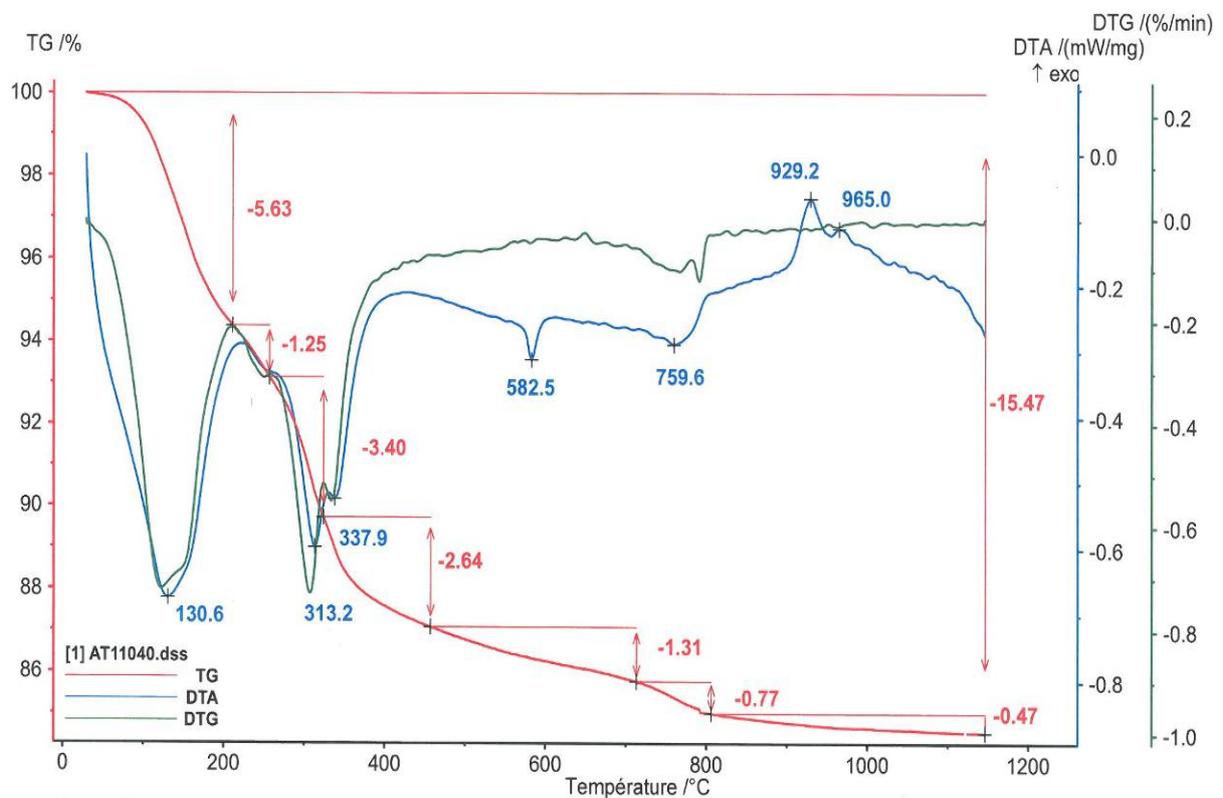


Figure c-3 : Courbes ATD et ATG du mortier CAC+S non exposé.

CAC+L :

L'analyse thermique effectuée sous balayage d'air sur ce mortier à base de ciment CAC+L donne une perte au feu totale de 9,77 % (Figure c-4). La courbe commence par présenter une perte d'eau importante (4,05%) jusqu'à 243,6°C et correspond à l'eau libérée par la décomposition des CAH_{10} et C_2AH_8 (pic endothermique à 123,8°C). La deuxième perte correspond à une perte d'eau basse température (1,31%) jusqu'à 324,8°C associée à la décomposition de l'alumine (AH_3). La troisième perte correspond à une perte d'eau (0,71%) jusqu'à 409,0°C correspondant aux C_3AH_6 . La quatrième perte d'eau (1,36%) est associée à la décomposition du quartz.

A partir de cette température, la perte de poids correspond à un départ de CO_2 . La courbe présente deux pertes de poids dans le domaine de la décomposition des carbonates. La première (0,64%) correspond au CO_2 de carbonatation alors que la seconde (1,42%) permet d'estimer la teneur en calcite contenu dans ce mortier à 5,9%. La dernière perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (0,28%) jusqu'à 1140°C.

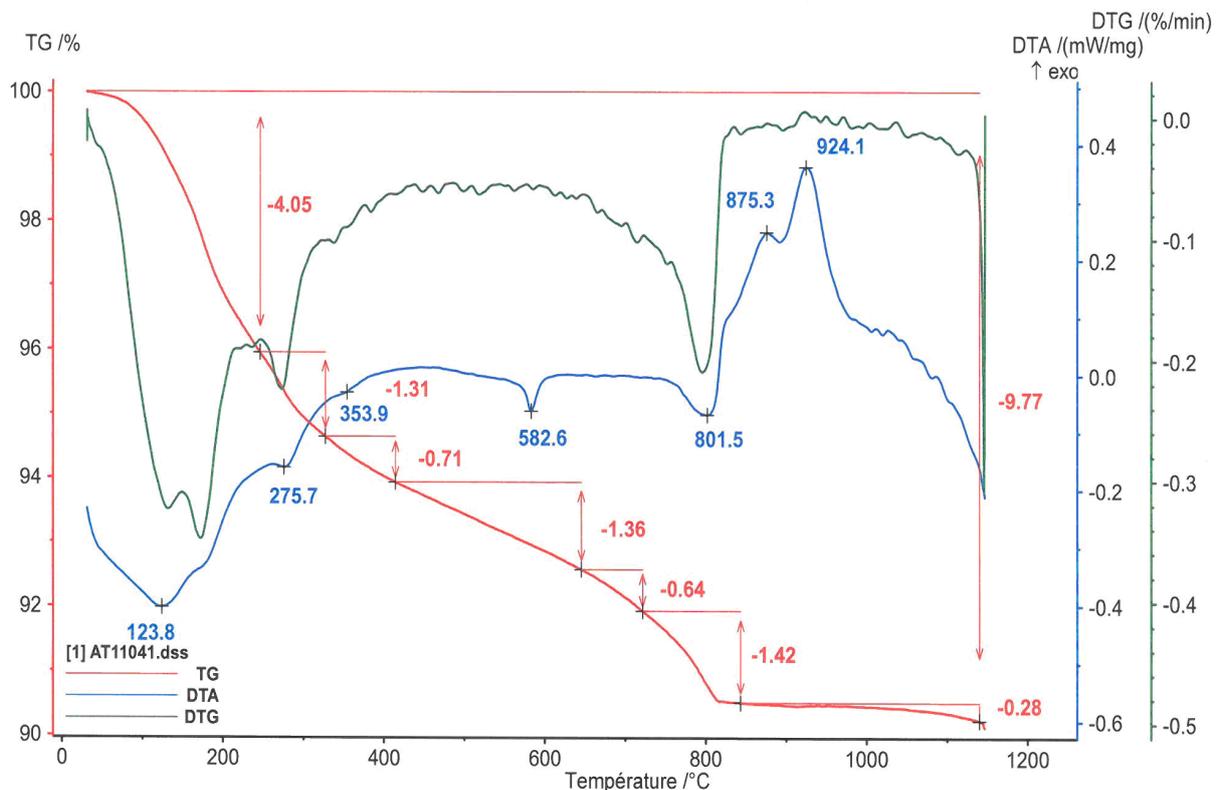


Figure c-4 : Courbes ATD et ATG du mortier CAC+L non exposé.

CAC+A :

L'analyse thermique effectuée sous balayage d'air sur ce mortier à base de ciment CAC+L donne une perte au feu totale de 16,89% (Figure c-5). La courbe commence par présenter une perte d'eau importante (6,14%) jusqu'à 210,5°C et correspond à l'eau libérée par la décomposition des CAH_{10} et C_2AH_8 (pic endothermique à 136,5°C). La deuxième perte correspond à une perte d'eau basse température (5,42%) jusqu'à 330,8°C associée à la décomposition de l'alumine (AH_3). La troisième perte correspond à une perte d'eau (2,01%) jusqu'à 457,1°C correspondant aux C_3AH_6 . La quatrième perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (1,08%) jusqu'à 643,6°C.

A partir de cette température, la perte de poids correspond à un départ de CO_2 . La courbe présente deux pertes de poids dans le domaine de la décomposition des carbonates. La première (0,95%) correspond au CO_2 de carbonatation alors que la seconde (0,88%) permet d'estimer la teneur en calcite contenu dans ce mortier à 2,0%. La dernière perte correspond à une perte continue d'eau haute température sans palier (0,41%) jusqu'à 1140°C.

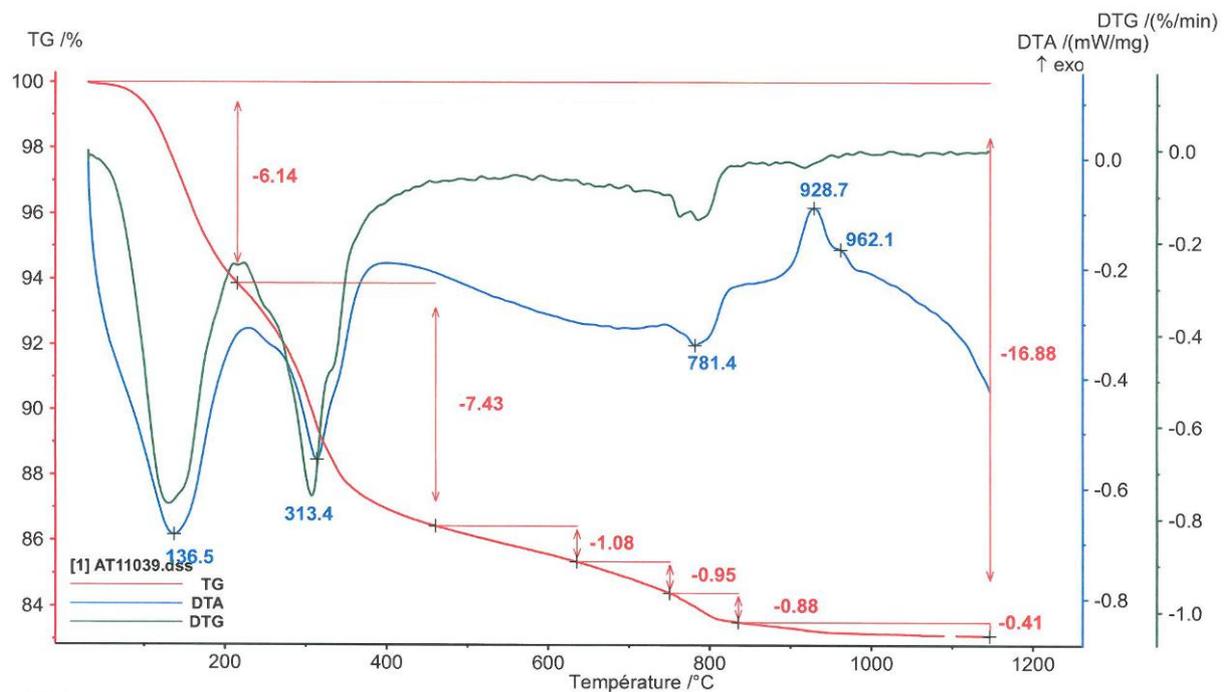


Figure c-5 : Courbes ATD et ATG du mortier CAC+A non exposé.

Annexe d : Marquage au DAPI

Suite à l'incubation des échantillons en présence de bactéries, nous souhaitons quantifier le nombre de microorganismes présents à leur surface. La méthode choisie implique l'utilisation d'un fluorochrome, le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), qui se fixe à l'ADN en émettant de la fluorescence bleue.

Les principales étapes de ce protocole sont la préparation des échantillons en vue d'être mis en contact avec le DAPI puis la coloration et enfin l'observation au microscope optique à épifluorescence. L'analyse des photographies prises durant l'essai, permet de remonter au nombre de bactéries présentes à la surface de l'échantillon.

d-1. Préparation des solutions

La préparation de la solution de fixation et de celle de DAPI passe, dans un premier temps, par la préparation d'un tampon phosphate à pH 7.

d-1.1. Tampon phosphate pH 7

Cette solution est élaborée à partir du mélange volumique de 40% d'une solution A et 60% d'une solution B.

La solution A est confectionnée dans une fiole jaugée de 100 mL en introduisant 1,36 g de KH_2PO_4 et complétée jusqu'au trait de jauge par de l'eau distillée.

La solution B est préparée dans une fiole jaugée de 100 mL en introduisant 1,78 g de Na_2HPO_4 et complétée jusqu'au trait de jauge par de l'eau distillée.

d-1.2. Solution de glutaraldéhyde à 5%

La solution de fixation est préparée dans une fiole jaugée de 50 mL dans laquelle est introduit 10 mL de glutaraldéhyde à 25%. La fiole est ensuite complétée jusqu'au trait de jauge avec la solution de tampon phosphate à pH 7.

d-1.3. Solution de DAPI

La solution de DAPI est réalisée en introduisant 0,5 mg de DAPI dans une fiole jaugée de 100 mL et complétée jusqu'au trait de jauge avec le tampon phosphate à pH 7. Cette solution est conservée à 5°C et à l'obscurité.

d-2. Marquage au DAPI

Les échantillons de mortier sont récupérés de l'enceinte de biodétérioration et mis dans des béchers de 25 mL et recouvert de 10 mL d'eau distillée. Ces béchers sont ensuite introduits dans un bain à ultrasons pendant 10 min pour détacher le biofilm.

Les échantillons sont ensuite retirés des béchers, 900 μL de la solution est prélevé et introduit dans un tube Falcon de 25 mL contenant 200 μL de glutaraldéhyde à 5%, 8,1 mL d'eau distillée et 1 mL de DAPI. Ce mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex puis conservé à l'obscurité pendant 30 min.

5 mL de cette solution est ensuite prélevée et filtré sur une membrane en polycarbonate noir. La membrane est rincée deux fois à l'eau distillée puis montée sur une lame de verre conservée à l'obscurité le temps qu'elle sèche.

L'observation de la lame est réalisée au microscope à épifluorescence (grossissement x500). 20 clichés aléatoires sont pris de la membrane et le nombre de bactérie est quantifié sur chaque photographie.

d-3. Dénombrement bactérien

Le dénombrement bactérien consiste à faire la moyenne du nombre de bactéries présentes sur chaque photographie et à ramener ce nombre à 1 μm^2 pour remonter au nombre de bactéries introduites sur l'ensemble de la membrane. Le calcul du nombre de bactéries présentent sur 1 cm^2 de l'échantillon est ensuite calculé en prenant en compte les dilutions successives réalisées.

Aire du champ d'observation : $2,4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$

Aire de la membrane : $1,73 \cdot 10^9 \mu\text{m}^2$

Aire du cube : 24 cm^2

Le nombre de bactéries (x) sur la membrane est :

$$x = z \times \frac{1,73 \cdot 10^9}{2,4 \cdot 10^4}$$

avec z le nombre moyen de bactéries comptées par champ.

Sur le matériau, le nombre de bactéries par cm^2 (Y) est donc de :

$$Y = x \times \frac{10 \times 10,2}{24 \times 0,9 \times 5}$$

Annexe e : Marquage au Dead/Live

Cet essai a pour but d'observer l'état physiologique d'un biofilm à la surface des échantillons de mortiers en marquant les cellules à l'aide de deux fluorochromes. Le SYTO-9 va colorer toutes les bactéries indépendamment de l'état de leur membrane et l'iodure de propidium va pénétrer uniquement dans les cellules dont les membranes sont abimées. Le SYTO-9 est excité à 480 nm et émet à 500 nm (vert), l'iodure de propidium est excité à 490 nm et émet à 635 nm (rouge).

Le marquage au Dead/Live repose sur trois étapes : la fixation du biofilm qui permet de conserver la structure des microorganismes, le marquage qui permet de colorer les microorganismes avec les différents colorants et l'observation.

e-1. Matériels

Les échantillons sont observés au moyen d'un microscope à épifluorescence de type Axio Scope A1 de chez Carl Zeiss équipé du filtre GFP (*Green Fluorescent Protein*) pour mettre en évidence le SYTO-9 et d'un filtre AF 546 pour révéler la répartition de l'iodure de propidium.

e-2. Préparation des solutions

La solution de fixation est préparée dans une fiole jaugée de 50 mL dans laquelle est introduit 10 mL de glutaraldéhyde à 25%. La fiole est ensuite complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

La solution de coloration au Dead/Live est préparée en diluant 200 fois la solution commerciale (BacLight™ Live/Dead® bacterial Viability Kit L7012). Ainsi, 5 µL de colorant sont mélangés à 995 µL d'eau distillée.

e-3. Marquage et observation

Les biofilms des échantillons de mortiers sont fixés au glutaraldéhyde à 5% puis 100 µL de la solution de coloration est déposée sur chacune des faces des échantillons. Ils sont ensuite entreposés dans l'obscurité pendant 20 min avant d'être rincé une première fois à l'eau distillée puis en déposant 1 mL d'isopropanol pendant 2 min. Les échantillons sont ensuite séchés et observés au microscope à épifluorescence en utilisant les filtres adaptés aux longueurs d'ondes d'émissions des fluorochromes.

Annexe f : ATPmétrie

L'ATPmétrie est une technique permettant de quantifier le niveau d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) d'un échantillon. Connaître le niveau d'ATP d'une biomasse permet d'estimer son activité puisqu'on estime qu'il s'agit de la molécule énergétique de toutes cellules.

f-1. Matériels

Le dosage est réalisé grâce à l'ATPmètre Novalum de chez Charm Sciences, initialement prévu pour l'industrie alimentaire, couplé aux écouvillons Water Giene.

f-2. Matériels

Les échantillons de mortier sont récupérés de l'enceinte de biodétérioration et mis dans des béchers de 25 mL et recouvert de 10 mL d'eau distillée. Ces béchers sont ensuite introduits dans un bain à ultrasons pendant 10 min pour détacher le biofilm.

Les échantillons sont ensuite retirés des béchers et l'écouvillon Water Giene est remué dans la solution pendant 1 min. Ensuite il est introduit dans la capsule contenant, entre autre la luciférine, et agité pendant une autre minute. La lecture de la quantité relative de lumière se fait sur le Novalum avec un temps de comptage de 20 s.

Le résultat obtenu est ensuite divisé par l'aire de l'échantillon de mortier soit 24 cm² pour obtenir une valeur surfacique.

Annexe g : Dosage des protéines

Le dosage des protéines permet d'estimer l'activité d'une suspension bactérienne à un instant donné. La méthode de Bradford est utilisée pour estimer ce paramètre. Ce dosage colorimétrique se base sur l'utilisation du bleu de Coomassie G-250 qui passe du marron au bleu en présence de protéines. Le changement d'absorbance est directement proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Ce protocole nécessite de préparer une solution de colorant (réactif de Bradford) et une gamme étalon basée sur des concentrations croissantes de protéines. La protéine modèle utilisée est l'albumine sérique bovine (BSA). Les protéines extraites du biofilm grâce à une centrifugation et à une sonication sont dosées spectrophotométriquement à 594 nm après ajout de réactif de Bradford.

g-1. Matériels

Ce protocole d'essai est basé sur l'utilisation d'un spectrophotomètre UV à double faisceau de type JASCO V-630 dont la longueur d'onde est fixée à 594 nm et dont le trajet optique est de 1 cm et d'un sonificateur Vibra Cell 75041 de chez Bioblock Scientific.

g-2. Préparation des solutions

g-2.1. Réactif de Bradford

Dans une fiole jaugée d'1 L introduire 100 mg de bleu de Coomassie G-250 avec 50 mL d'éthanol à 95% et 100 mL d'acide phosphorique à 85%. Compléter à 1 L avec de l'eau distillée.

g-2.2. Gamme étalon

La gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère d'albumine sérique bovine à 0,25 g L⁻¹. Elle est réalisée dans une fiole jaugée de 200 mL en introduisant 50 mg de BSA et en complétant jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

La gamme étalon est composée de cinq valeurs de concentrations en BSA croissantes : 0,0005 ; 0,001 ; 0,005 ; 0,01 et 0,025 g L⁻¹ réalisées suivant le Tableau g-1. La densité optique de cette gamme étalon est lue à 594 nm.

Tableau g-1 : Préparation de la gamme étalon

Concentration (en g L ⁻¹)	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,025
Dilution	10 ^{ème}	25 ^{ème}	50 ^{ème}	250 ^{ème}	500 ^{ème}
Volume de solution mère	10 µL	10 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Volume d'eau	4,99 mL	2,49 mL	4,9 mL	2,4 mL	900 µL

g-3. Dosage des protéines

Les échantillons de mortier sont récupérés de l'enceinte de biodétérioration et mis dans des béchers de 25 mL et recouvert de 10 mL d'eau distillée. Ces béchers sont ensuite introduits dans un bain à ultrasons pendant 10 min pour détacher le biofilm.

Les échantillons sont ensuite retirés des béchers, 9 mL de la solution est prélevée et mise à centrifuger à 3 000 g pendant 10 min à 5°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 3 mL d'eau distillée. Cette prise d'essai est soniquée à la sonde avec huit cycles de pulse à 20% d'amplitude de 20 s et 30 s de repos entre chaque pulse. Le récipient est conservé dans la glace pour cette étape. Les échantillons sont stockés à 5°C avant et après sonication.

Les mélanges soniqués sont centrifugés à 3 000 g pendant 10 min à 5°C puis 500 µL des surnagents sont prélevés et introduits dans des cuves spectrophotométrique avec 1,1 mL de réactif de Bradford [1]. La lecture de la densité optique se fait à 594 nm avec un temps minimal d'attente de 5 min.

[1] Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Annexe h : Polymorphisme de Conformation des Simples Brins

Tous les quatre mois, différents paramètres sont suivis sur site dont la biodiversité des biofilms formés à la surface des éprouvettes de mortiers à l'aide de la CE-SSCP (*Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism*). Pour cela, le biofilm est échantillonné sur un quart de l'échantillon et l'ADN de ce prélèvement est extrait puis amplifié avec des sondes spécifiques aux bactéries et aux eucaryotes. La CE-SSCP réalisée sur ce prélèvement permet d'avoir une empreinte à un instant donné de la biodiversité du biofilm.

h-1. Matériels

L'extraction de l'ADN est réalisée au moyen d'un kit MP Biomedical « Fast DNA SPIN Kit for Soil » qui permet d'extraire et de purifier le matériel génétique provenant d'un échantillon d'origine environnemental (sol, fèces, eaux usées, boues,...). Ce kit présente l'avantage d'isoler rapidement (moins de 30 min) l'ADN génomique pour être utilisé en PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Les analyses de CE-SSCP sont effectuées sur une électrophorèse quadri-capillaire de type ABI 3130 de chez Applied Biosystems.

h-2. Mode opératoire

Sur site, les échantillons destinés à l'étude de la colonisation microbienne sont brossés sur un quart de leur surface au moyen d'un écouvillon plongé dans 500 μ L d'une solution de guanidine thiocyanate à pH 7,5. Cette solution permet d'extraire et de préserver l'ADN jusqu'à l'extraction. Les échantillons sont stockés à -80°C pour le transport et la conservation.

L'ADN est extrait en utilisant un kit d'extraction adapté aux sols (« Fast DNA Kit for Soil » de chez MP Biomedicals) qui permet d'obtenir du matériel génétique amplifiable par PCR.

L'ADN procaryote et eucaryote est ensuite amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques. Le w104 (marquée 6-FAM) (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') et le w49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3') vont s'associer à la région V3 de l'ADN ribosomal 16S des procaryotes (bactéries). Le w16 (5'-CTTAATTTGACTCAACACGG-3') et le w131 (marqué) (5'-GGGCATCACAGACCTGTT-3') vont s'associer à la région V7 de l'ADN ribosomal 18S. Le mélange d'amplification PCR contient 1,25 unité de Turbo Pfu (Stratagene, La Jolla, CA), 5 mL de tampon x 10, 200 mM de dNTPs (deoxyribonucleotides triphosphates) et 200 ng de chaque amorce. Ce mélange est réalisé dans 50 mL d'eau distillée. Le cycle de PCR se compose d'une première incubation de 2 min à 94°C puis de 25 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s, 61°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s.

L'analyse SSCP est pratiquée sur 1 μ L des fragments d'ADN amplifiés. Les spectres obtenus sont normalisés sous Stat Fingerprints.

h-3 Références bibliographiques

- [1] Delbes, C., Moletta, R., Godon, J.J. (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction - single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, 2, 506-515.
- [2] Delbes, C., Moletta, R., Godon, J.J. (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 19-26.

Annexe i : Etude de l'eau de condensation

L'eau de condensée dans les tubes en PVC des échantillons de mortiers exposés sur site a été caractérisée au bout de 375 jours par des analyses ICP (concentrations des éléments), par la détermination du pH et de la quantité d'ATP (en unité relative de lumière).

Tableau i-1 : Mesures de la concentration en ions, du pH et de l'ATP réalisées sur l'eau condensée dans les manches en PVC des échantillons exposés 375 jours sur le site S1.

		S1				
		CEM I	CEM III	CAC+S	CAC+L	CAC+A
ICP (en mg L ⁻¹)	[Al]	45,99	349,84	2243,36	674,57	100,42
	[Ca]	7,12	753,01	539,22	600,92	530,96
	[S]	1052,16	2106,32	5336,79	3395,57	1057,7
	[Fe]	9,62	38,1	90,56	72,26	9,67
	[K]	136,34	129,15	109,56	41,04	300,83
	[Mg]	33,5	310,1	49,25	285,67	19,45
	[Mn]	8,87	15,1	8,07	14,69	1,68
	[Na]	115,9	114,39	102,4	94,67	148,24
	[Si]	40,61	95,21	125,6	149,1	24,16
	[Ti]	0,03	0,44	1,8	0,49	0,04
pH		2	2	2	1	3
ATP		709 239 917	1 102 288	109 576	108 553	133 745 197

Tableau i-2 : Mesures de la concentration en ions, du pH et de l'ATP réalisées sur l'eau condensée dans les manches en PVC des échantillons exposés 375 jours sur le site S2.

		S2				
		CEM I	CEM III	CAC+S	CAC+L	CAC+A
ICP (en mg L ⁻¹)	[Al]	474,73	379,99	3362,97	874,42	1375,74
	[Ca]	637,14	652,34	482,26	669,75	513,35
	[S]	3069,23	3556,54	7014,66	4518,15	3941,95
	[Fe]	229,67	66,78	204,78	113,95	249,49
	[K]	114,91	44,95	46,67	34,92	22,28
	[Mg]	81,59	323,44	41,8	302,76	24,19
	[Mn]	21,43	15,1	7,28	15,46	4,42
	[Na]	525,71	473,84	481,14	426,13	442,41
	[Si]	62,44	50,64	125,56	53,44	70,8
	[Ti]	7,25	3,29	7,33	6,29	0,56
pH		1	1	1	1	1
ATP		2 221 456	42 191	0	0	0

Annexe j : Analyses SSCP

Les analyses de polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP) permettent d'obtenir l'empreinte moléculaire d'un échantillon révélant ainsi sa biodiversité. Ces analyses ont été effectuées sur site pour chaque échéance.

Cette annexe se compose de deux parties. La première est constituée des résultats de la biodiversité procaryotique et la suivante, de la biodiversité eucaryotique. En fin de chaque partie se trouve un tableau rassemblant les différents indices calculés sur ces spectres : la richesse, l'indice de diversité de Shannon et l'indice de diversité de Simpson. La richesse d'un échantillon représente le nombre d'espèces microbiennes présentes dans l'échantillon. Plus un échantillon aura une richesse importante et plus il sera diversifié. L'indice de diversité de Shannon [1] prend en compte le nombre d'espèces et leur abondance relative dans l'échantillon. Il est fortement corrélé à la richesse et croit de façon logarithmique avec la complexité génétique de l'échantillon. L'indice de diversité de Simpson [1] représente la probabilité que deux individus choisis au hasard au sein de l'échantillon appartiennent à la même espèce. L'indice de Simpson croit également de façon logarithmique avec la complexité génétique de l'échantillon.

j-1. Analyses SSCP procaryotiques

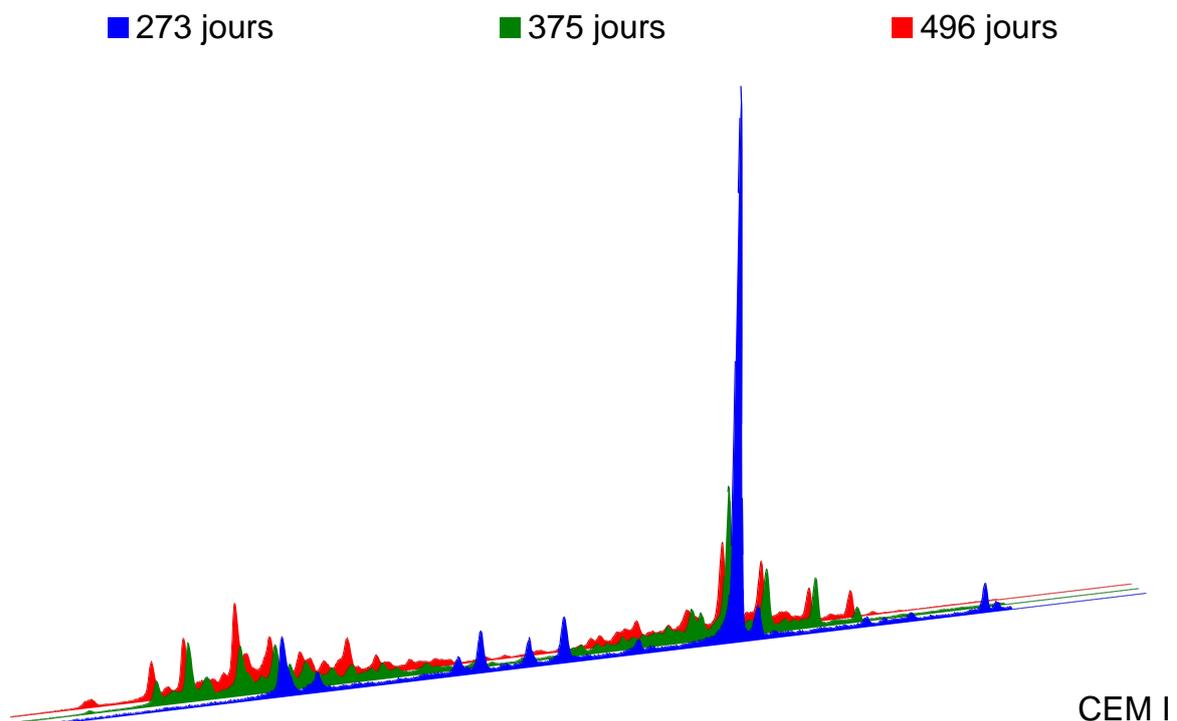


Figure j-1 : Evolution des profils SSCP procaryotiques au cours du temps du mortier au ciment CEM I sur le site S2.

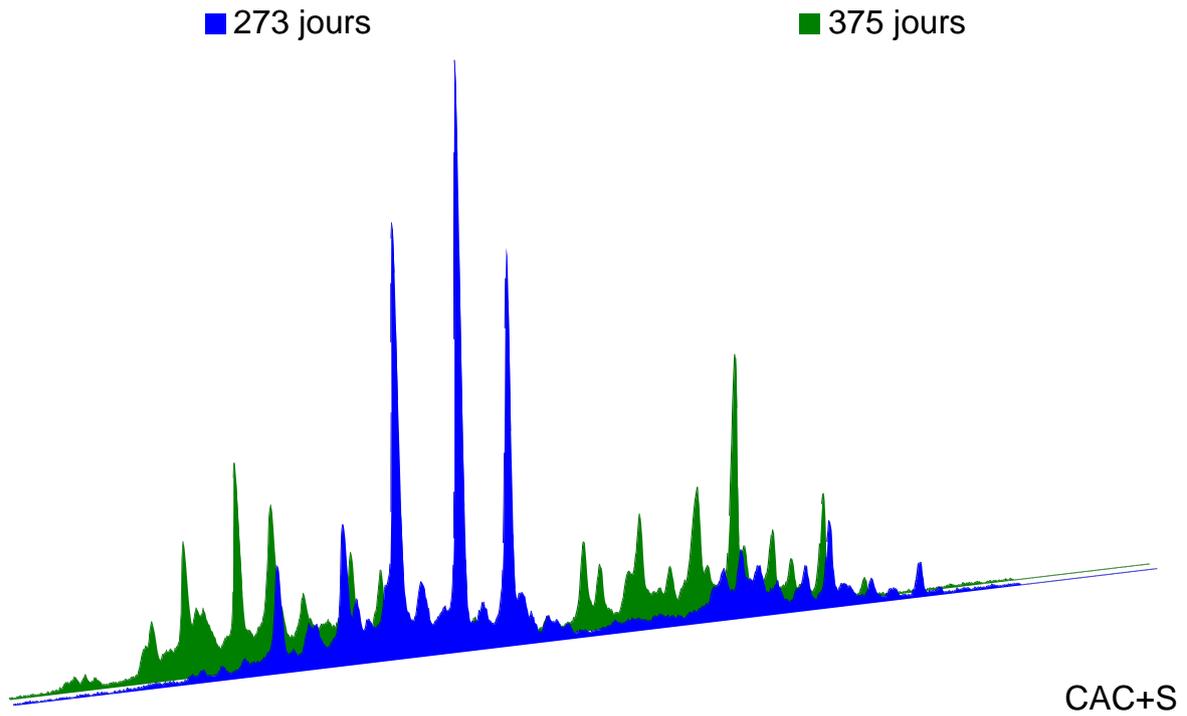


Figure j-2 : Evolution des profils SSCP procaryotiques au cours du temps du mortier au ciment CAC+S sur le site S2.

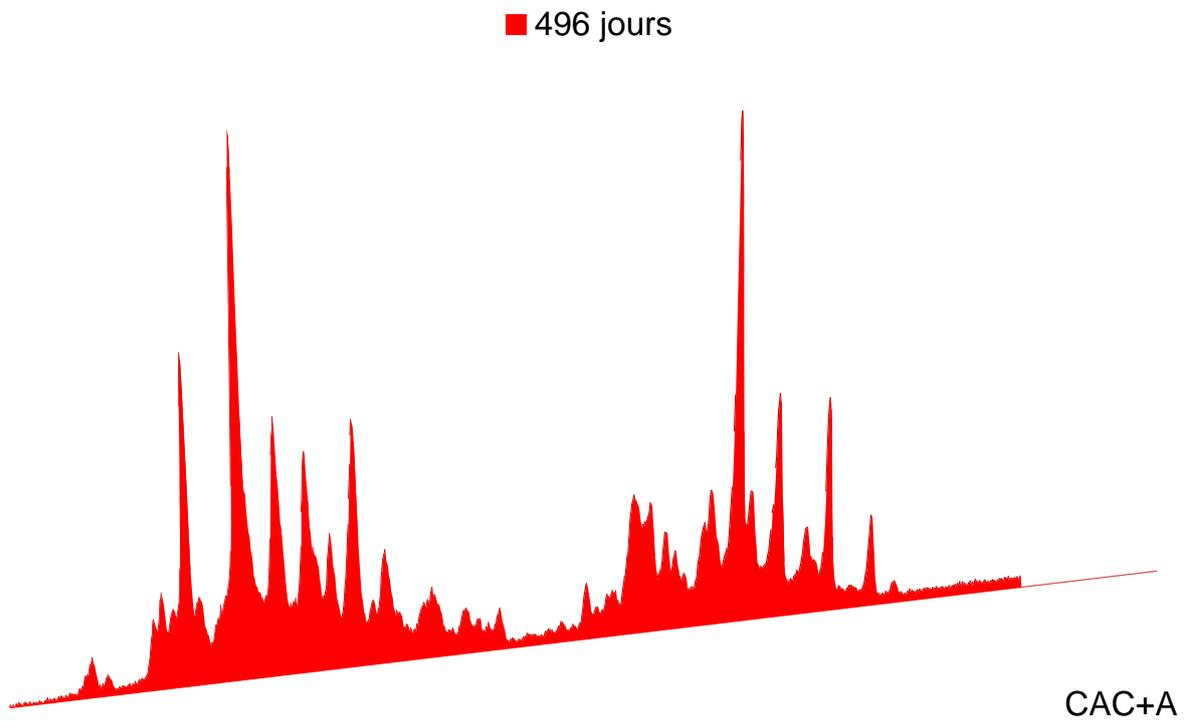


Figure j-3 : Profil SSCP procaryotiques du mortier au ciment CAC+A sur le site S2.

Tableau j-1 : Valeurs des indices de richesse, de Shannon et de Simpson sur les analyses SSCP procaryotiques.

	CEMI			CAC+S			CAC+A		
	Richesse (nombre de pic)	Indice de Shannon	Indice de Simpson	Richesse (nombre de pic)	Indice de Shannon	Indice de Simpson	Richesse (nombre de pic)	Indice de Shannon	Indice de Simpson
0									
132									
273	11	1	1,8	30	1,4	3,4	-	-	-
375	30	1,5	4,1	29	1,5	4,6	27	1,3	4,5
496	30	1,9	4,1	29	1,3	4,7	27	1,4	4,5

j-2. Analyses SSCP eucaryotiques

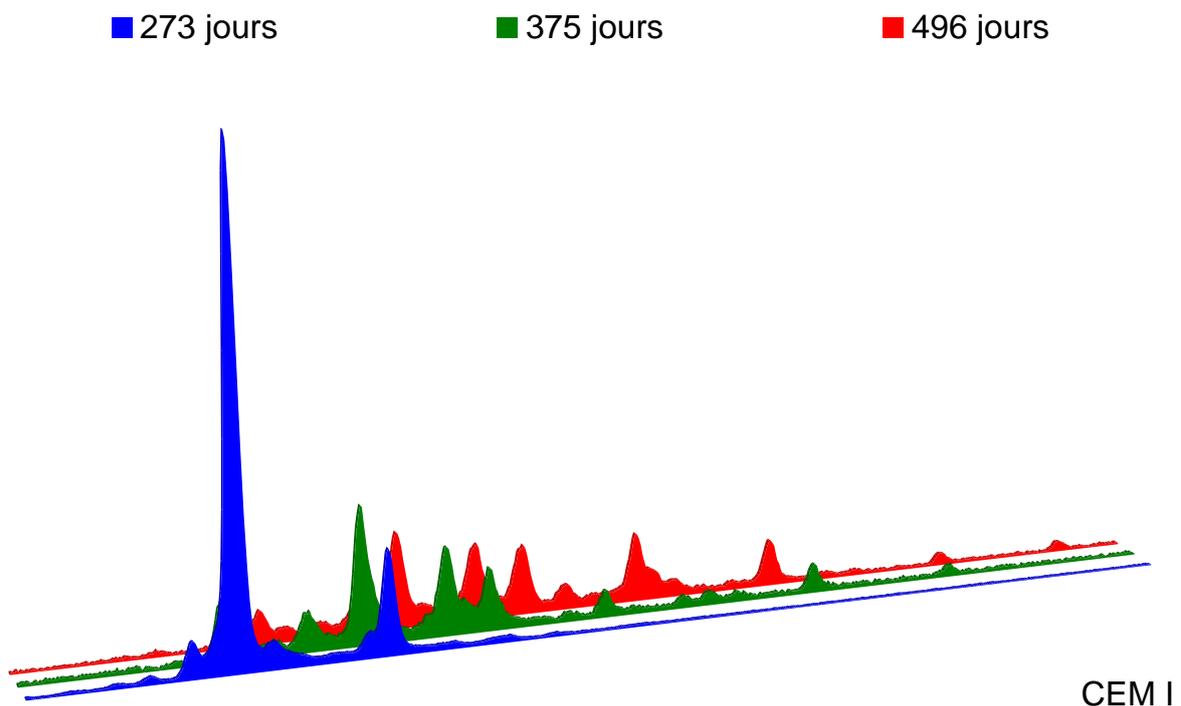


Figure j-4 : Evolution des profils SSCP eucaryotiques du mortier au ciment CEM I sur le site S2.

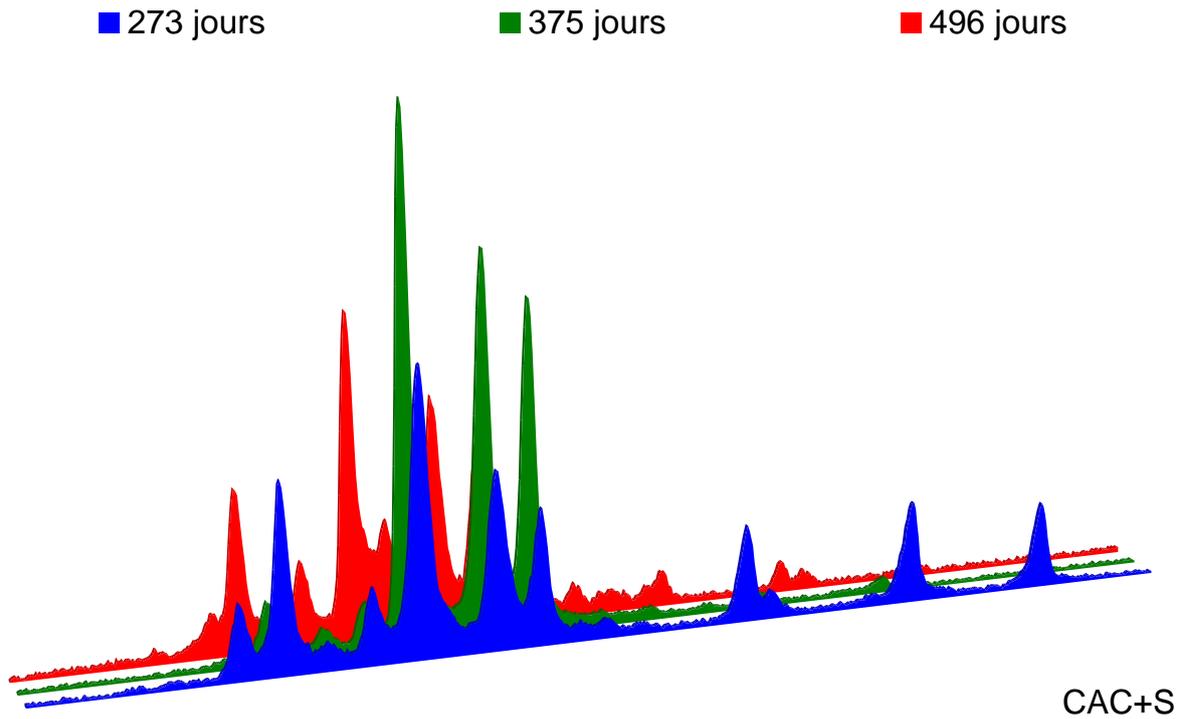


Figure j-5 : Evolution des profils SSCP eucaryotiques du mortier au ciment CAC+S sur le site S2.

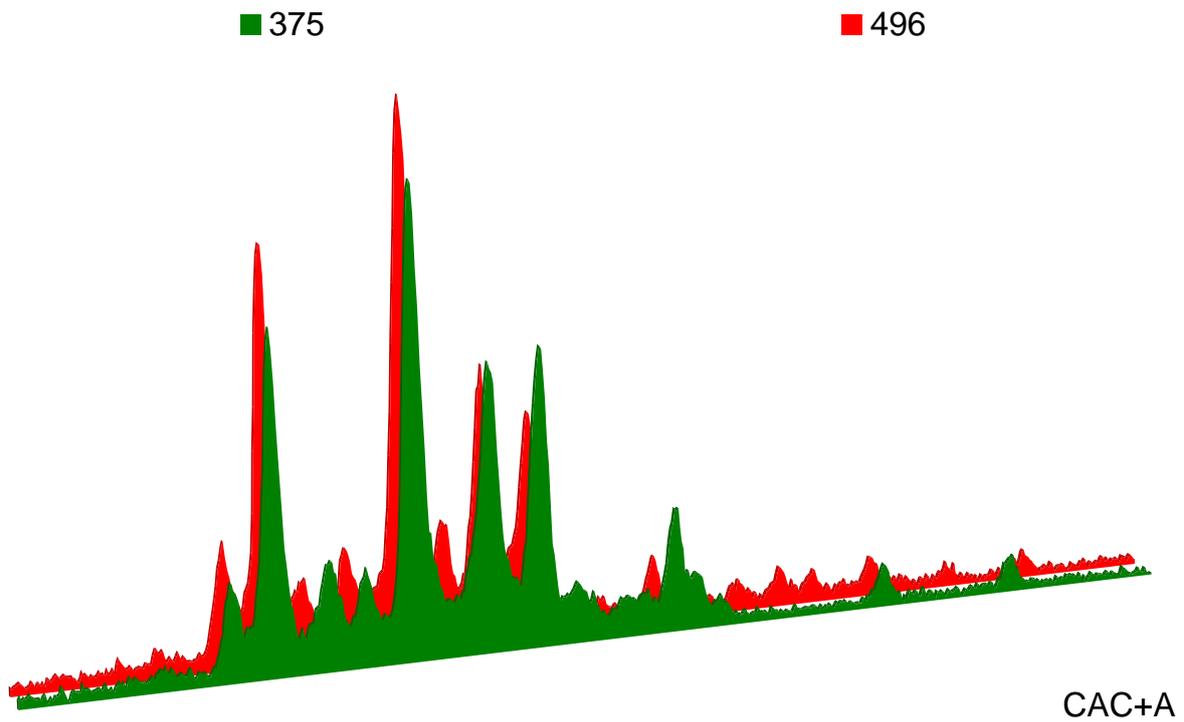


Figure j-6 : Evolution des profils SSCP eucaryotiques du mortier au ciment CAC+A sur le site S2.

Tableau j-2 : Valeurs des indices de richesse, de Shannon et de Simpson sur les analyses SSCP eucaryotiques.

	CEM I			CAC+S			CAC+A		
	Richesse (nombre de pic)	Indice de Shannon	Indice de Simpson	Richesse (nombre de pic)	Indice de Shannon	Indice de Simpson	Richesse (nombre de pic)	Indice de Shannon	Indice de Simpson
0									
132									
273	5	0,7	1,3	13	1,5	3,2	-	-	-
375	27	1,5	3,4	8	1,1	2,4	26	1,5	3,2
496	24	1,5	3,6	21	1,5	3,2	25	1,4	3,1

j-2. Référence bibliographique

[1] Mercon, E. (2012) Mesures de la biodiversité, rapport EcoFoG (Ecologie des Forêts de Guyane).

Annexe k : Analyses ICP des attaques acides de pH 2 à 5,5

L'évolution des analyses ICP des ions passant en solution au cours du temps après lixiviation par des solutions acides sont rassemblées dans cette partie. Deux types de mortiers ont été soumis à des solutions acides à des pH de 2 à 5,5 soit en continu soit en renouvellement toutes les 8 et 16 h la solution agressive.

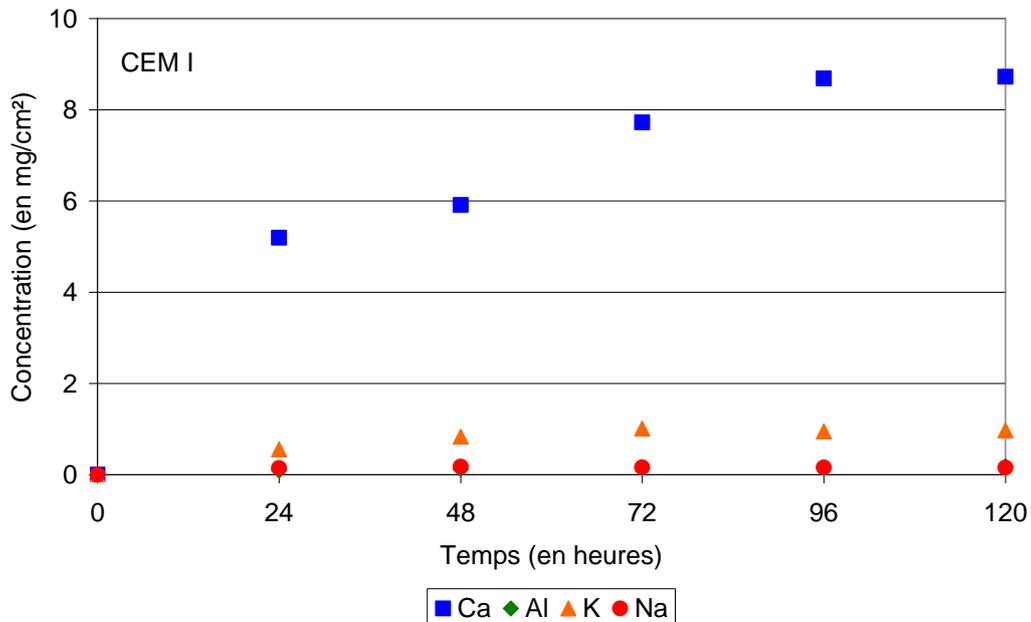


Figure k-1 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 2.

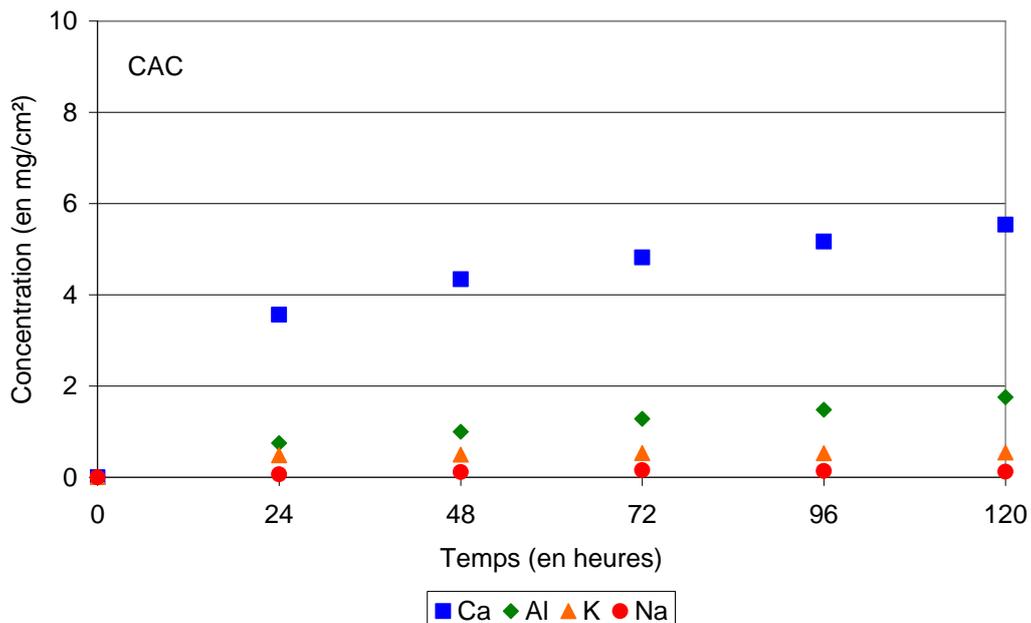


Figure k-2 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminate de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 2.

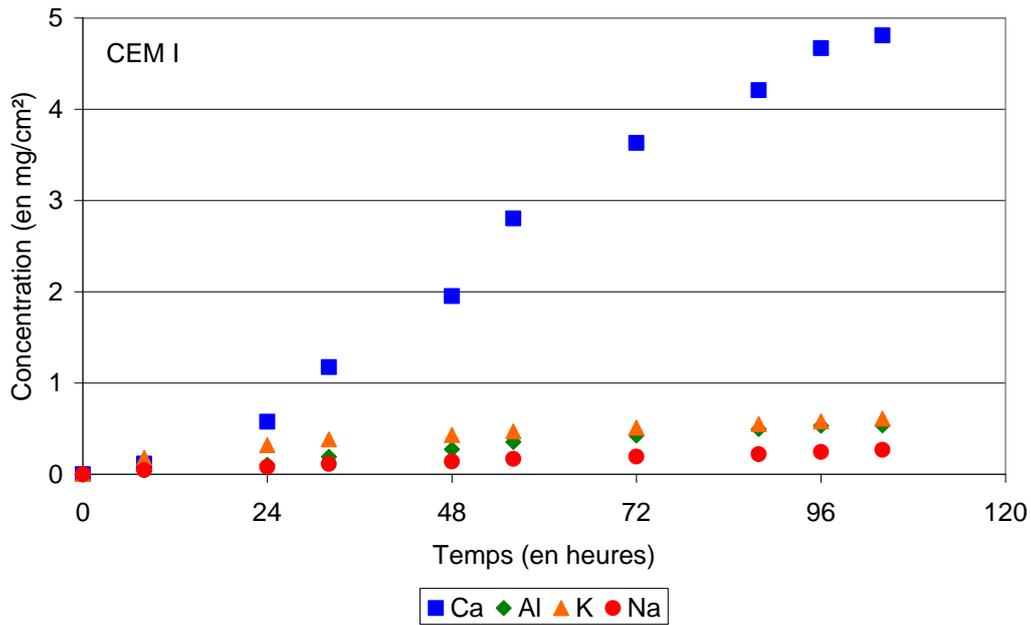


Figure k-3 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 2.

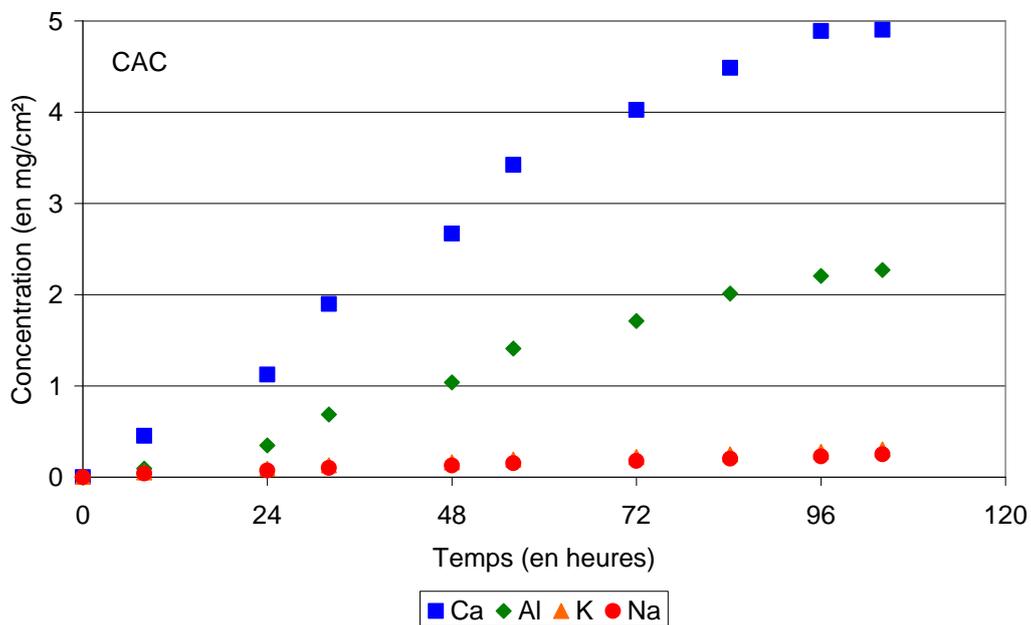


Figure k-4 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 2.

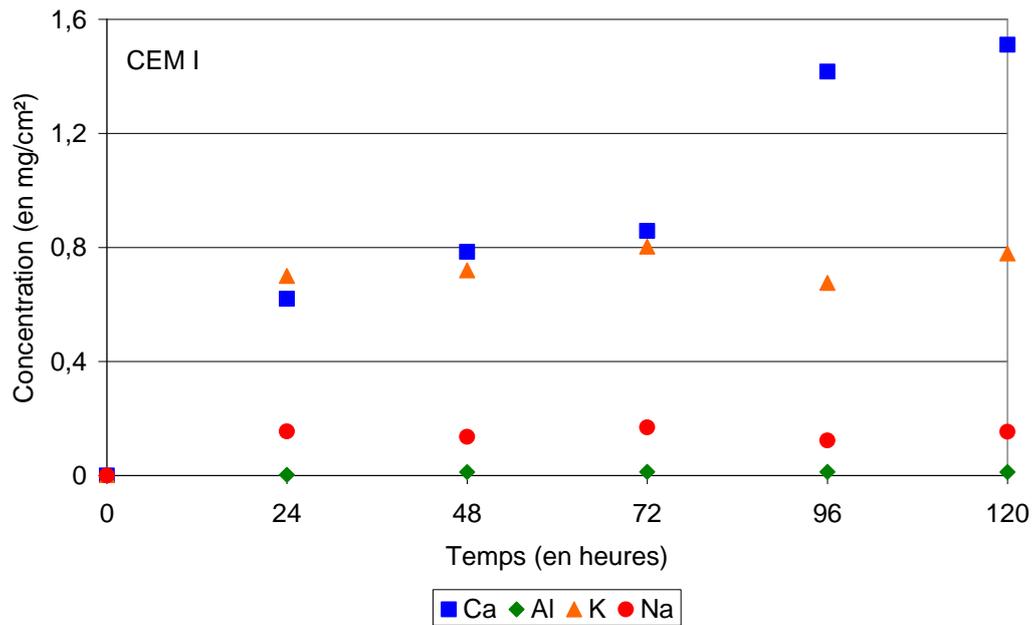


Figure k-5 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 3.

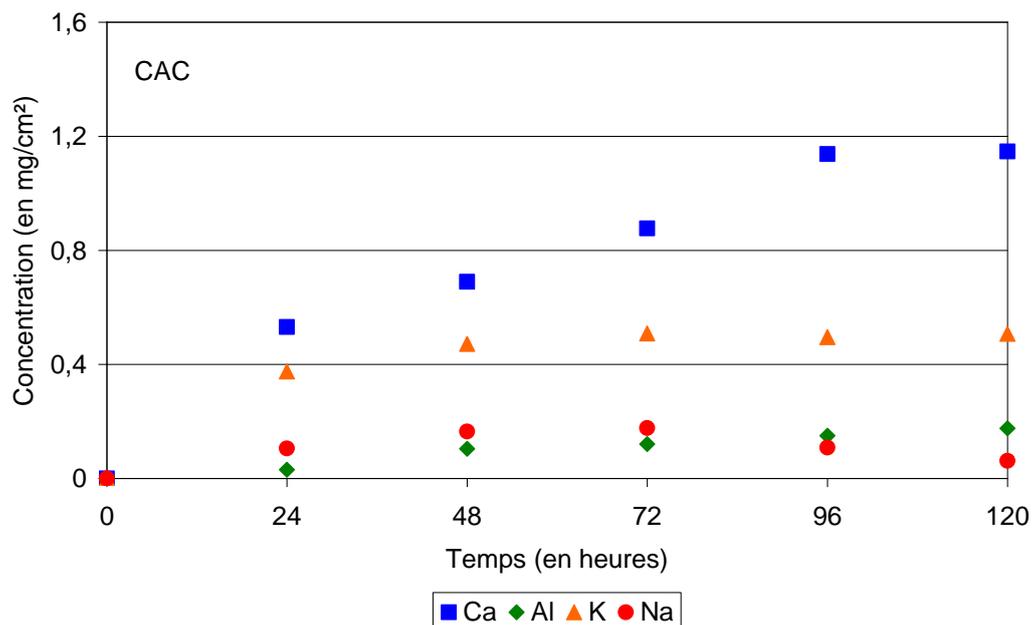


Figure k-6 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 3.

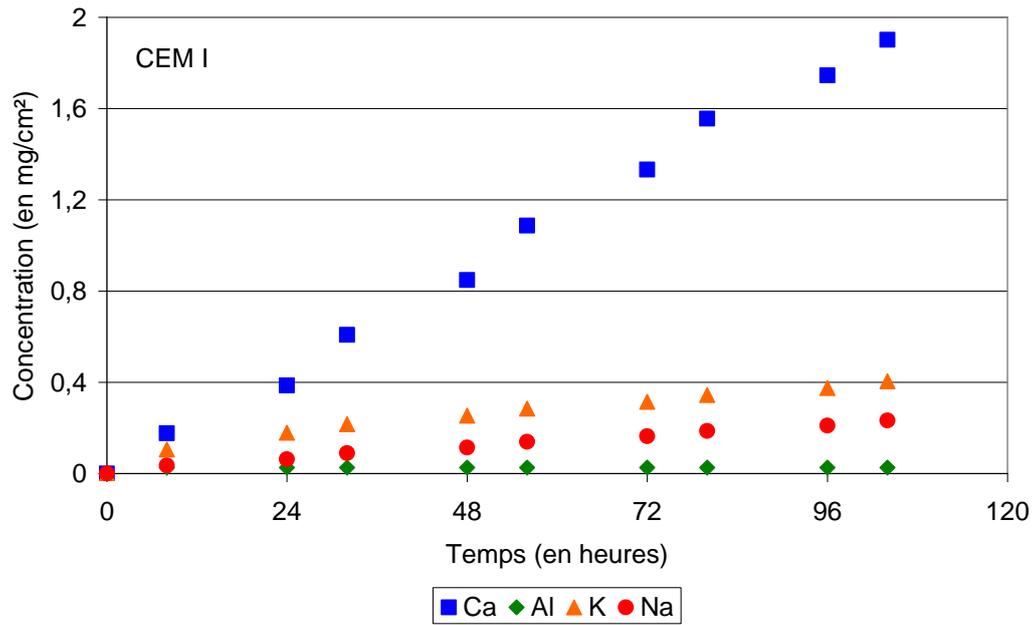


Figure k-7 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 3.

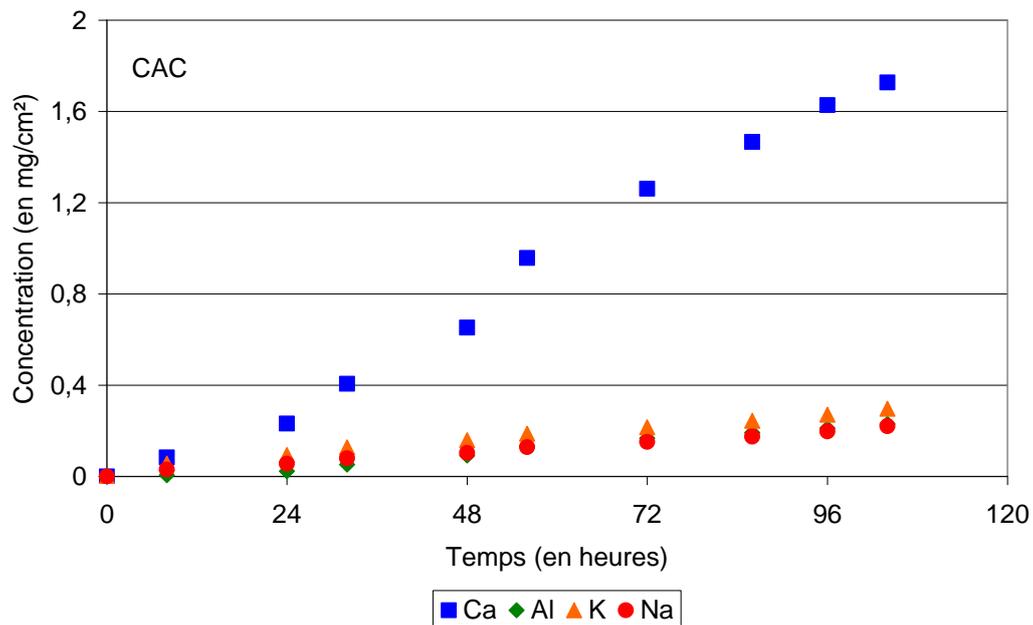


Figure k-8 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 3.

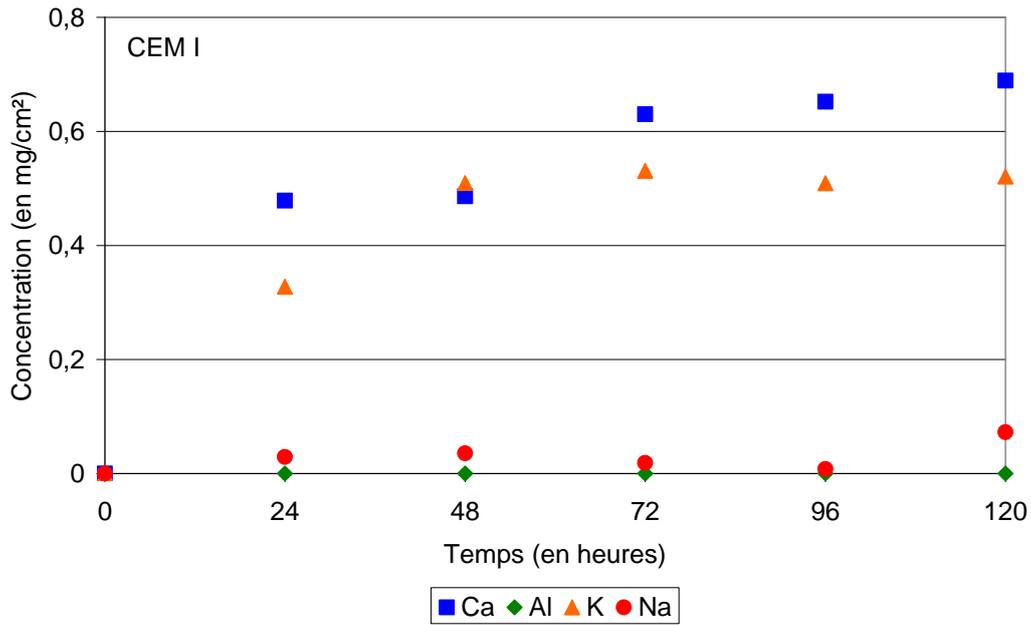


Figure k-9 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 4,5.

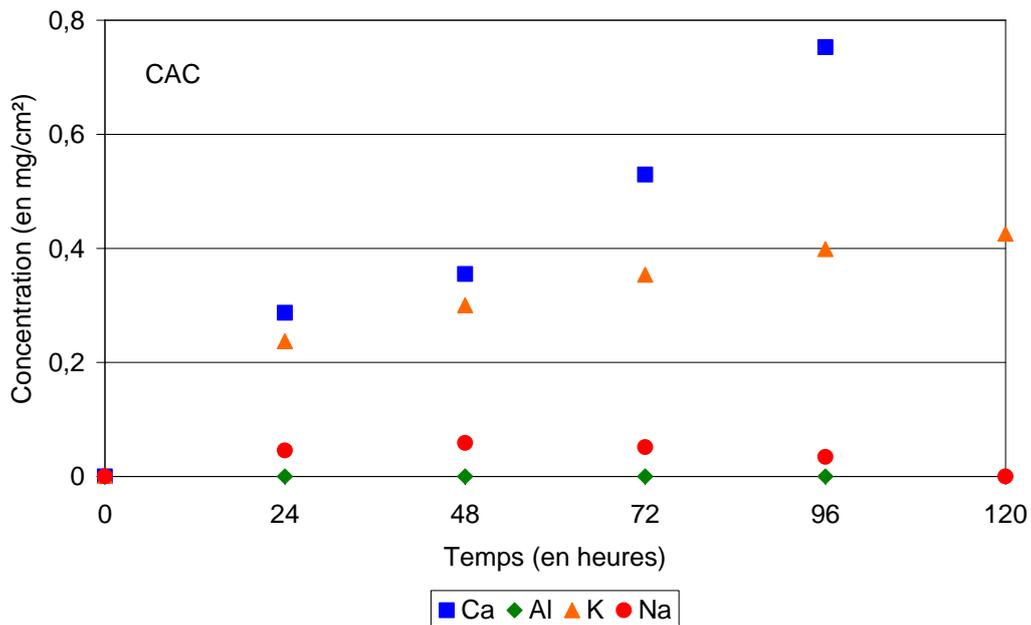


Figure k-10 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 4,5.

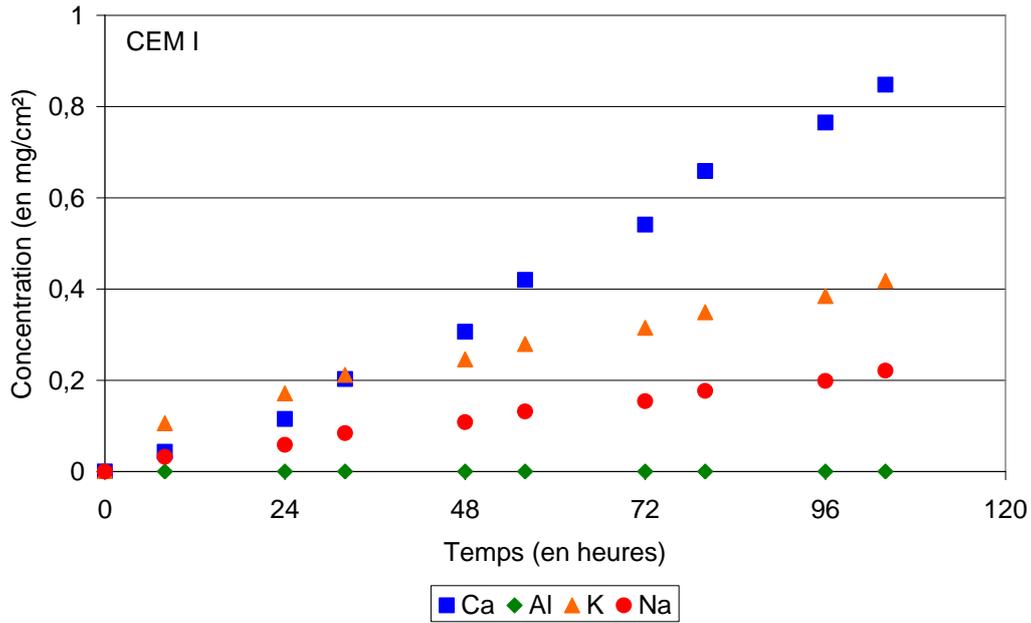


Figure k-11 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 4,5.

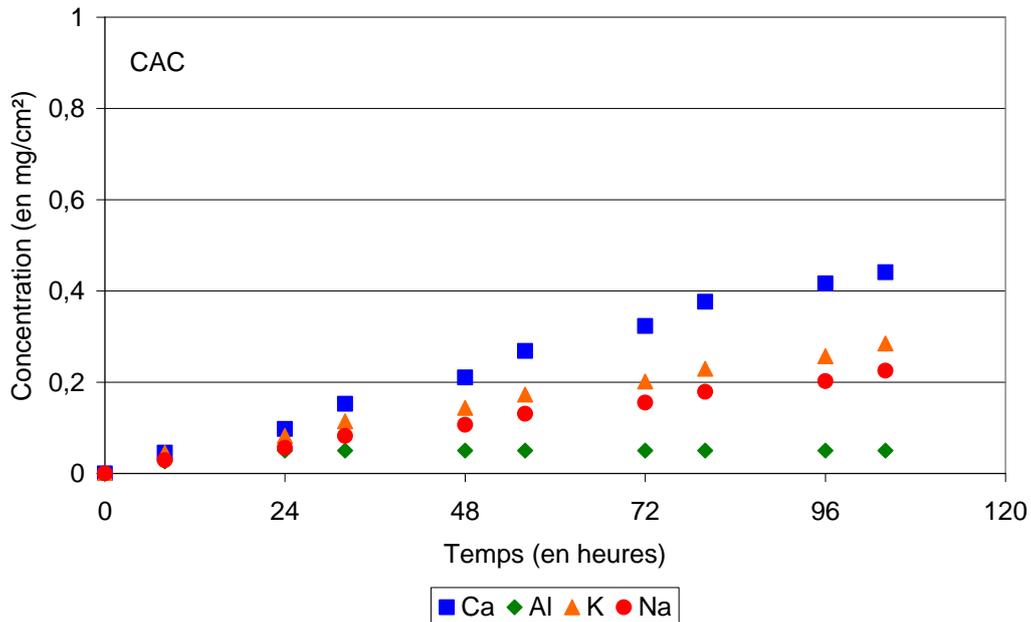


Figure k-12 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 4,5.

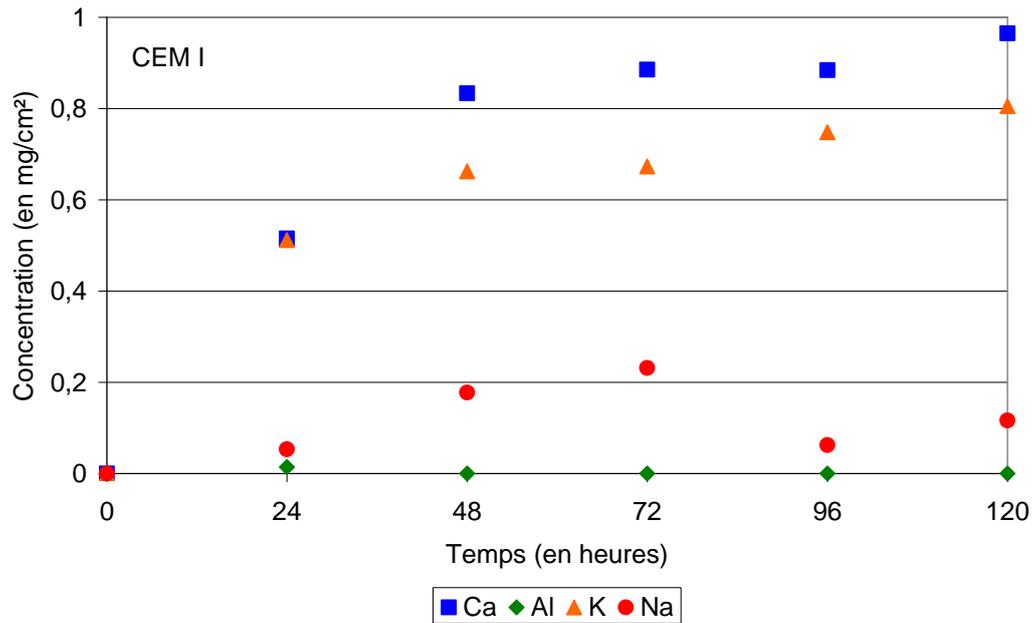


Figure k-13 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 5,5.

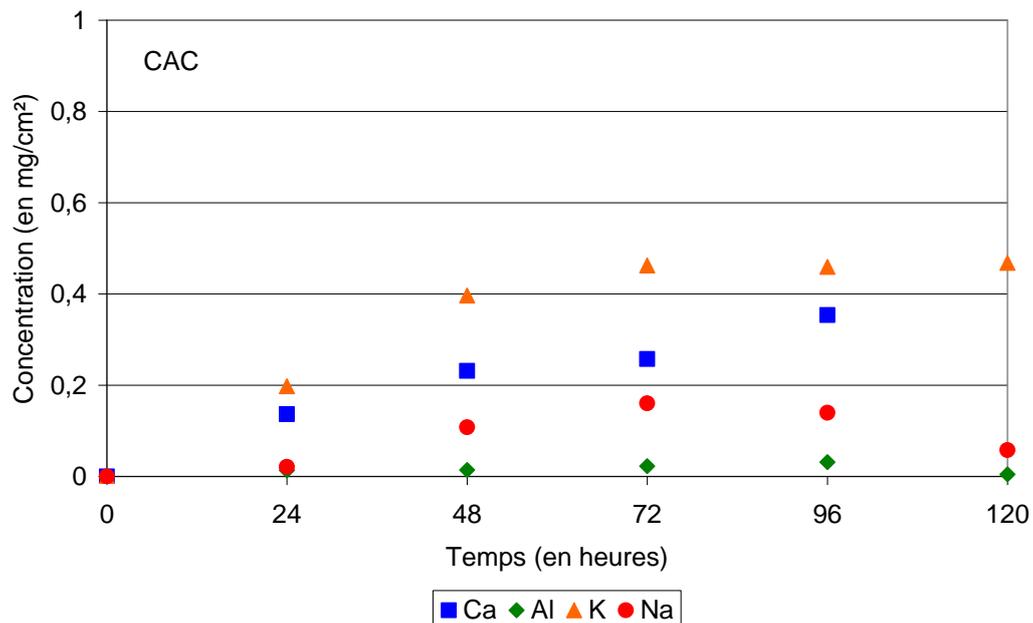


Figure k-14 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 5,5.

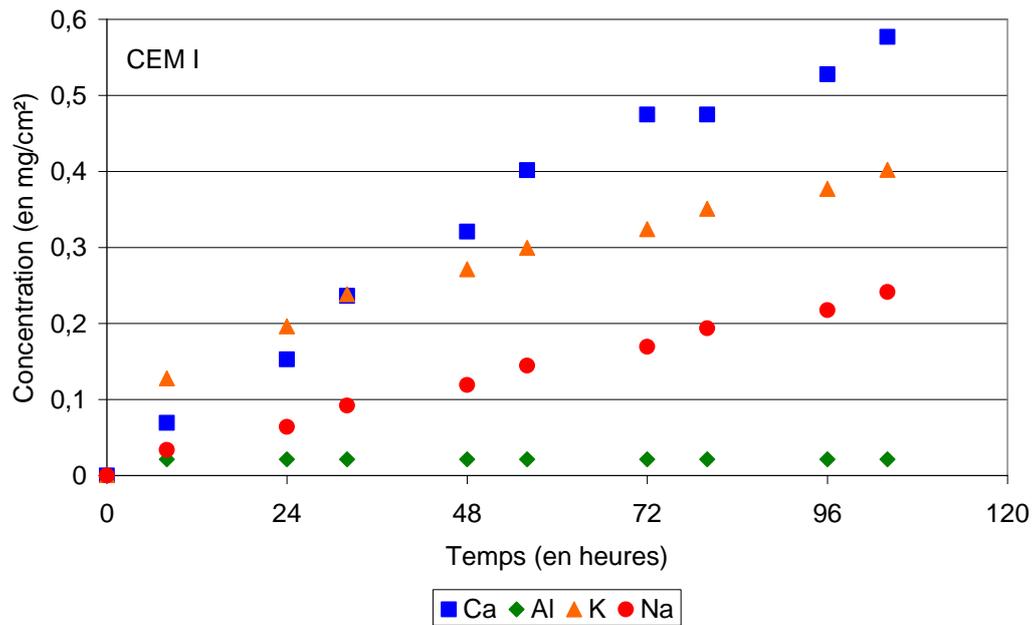


Figure k-15 : Evolution pour le mortier au ciment Portland de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 5,5.

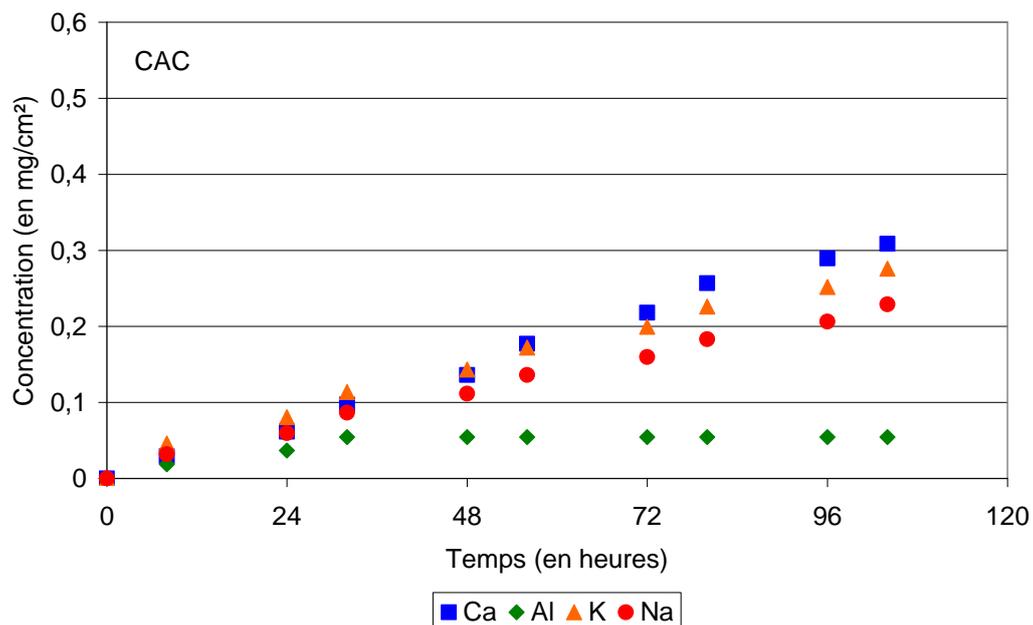


Figure k-16 : Evolution pour le mortier au ciment d'aluminat de calcium de la concentration en ions mobilisés en fonction du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 5,5.

Annexe 1 : Mise en évidence de la diffusion

L'évolution de la concentration en ions mobilisés en fonction de la racine carrée du temps pour les essais avec et sans renouvellement de la solution acide de pH 2 à 5,5 et pour les mortiers de ciment CEM I et CAC+S sont rassemblées dans cette partie.

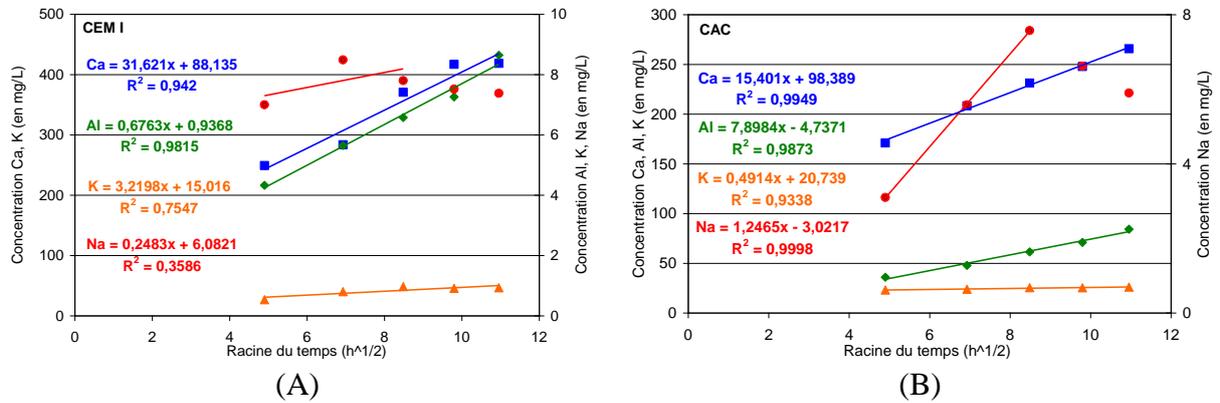


Figure I-1 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 2 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminat de calcium (B).

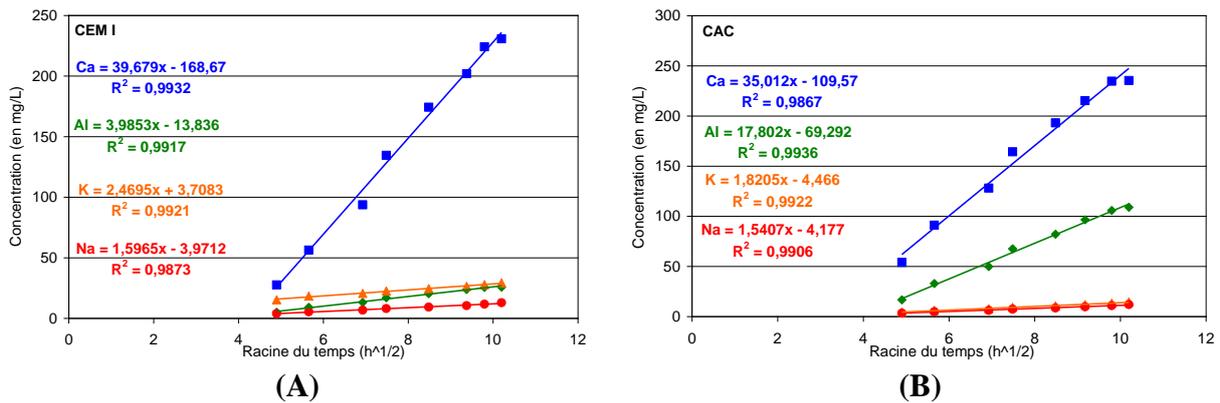


Figure I-2 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 2 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminat de calcium (B).

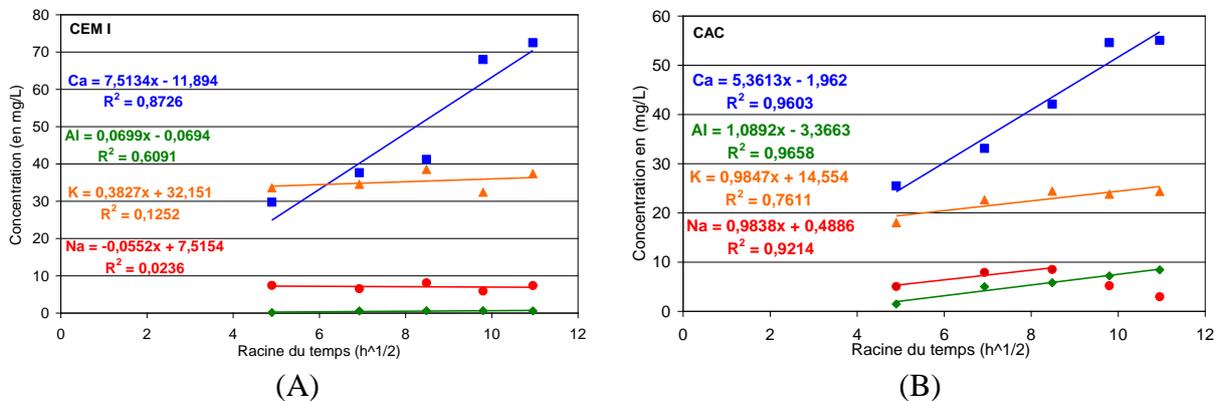
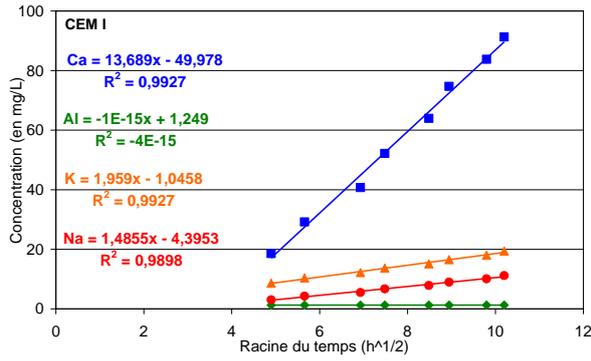
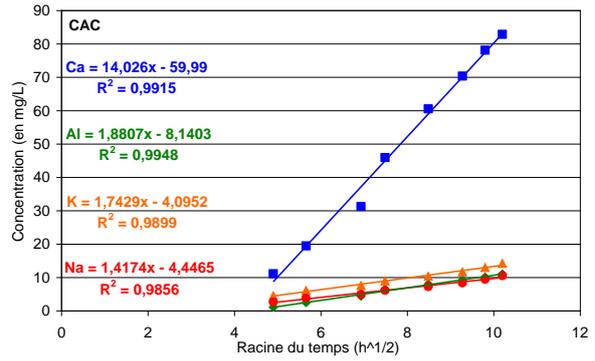


Figure I-3 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 3 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminat de calcium (B).

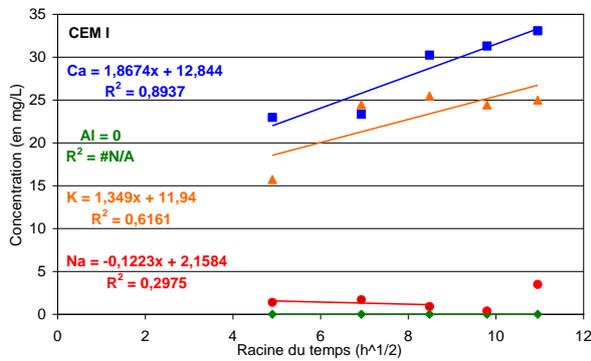


(A)

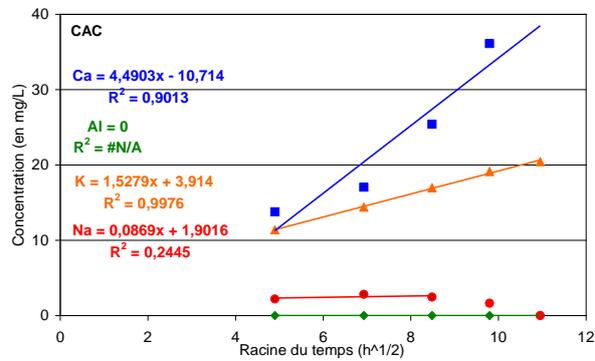


(B)

Figure I-4 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 3 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminat de calcium (B).

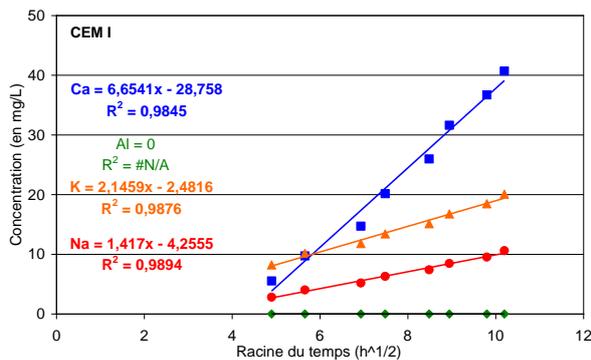


(A)

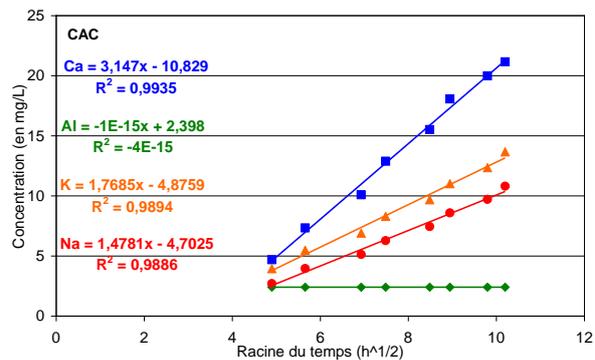


(B)

Figure I-5 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 4,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminat de calcium (B).



(A)



(B)

Figure I-6 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 4,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminat de calcium (B).

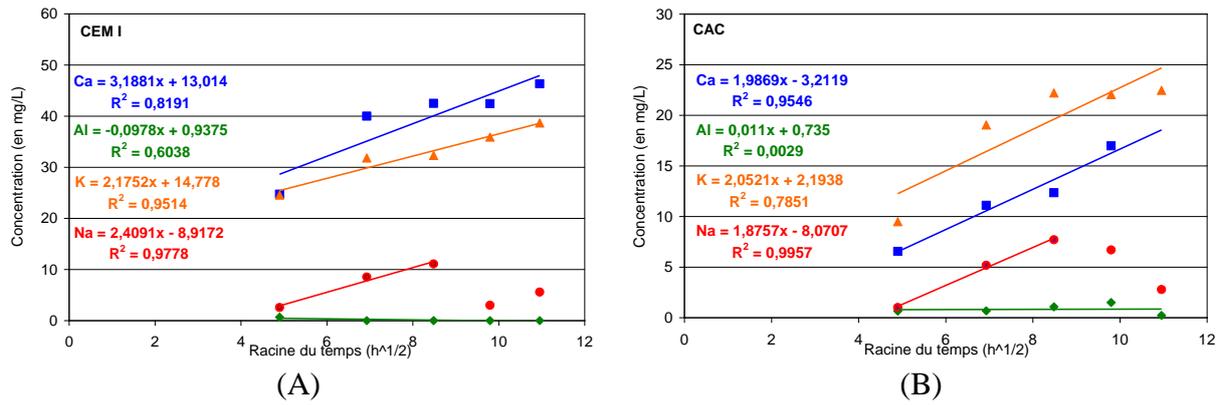


Figure 1-7 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai sans renouvellement d'acide à pH 5,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).

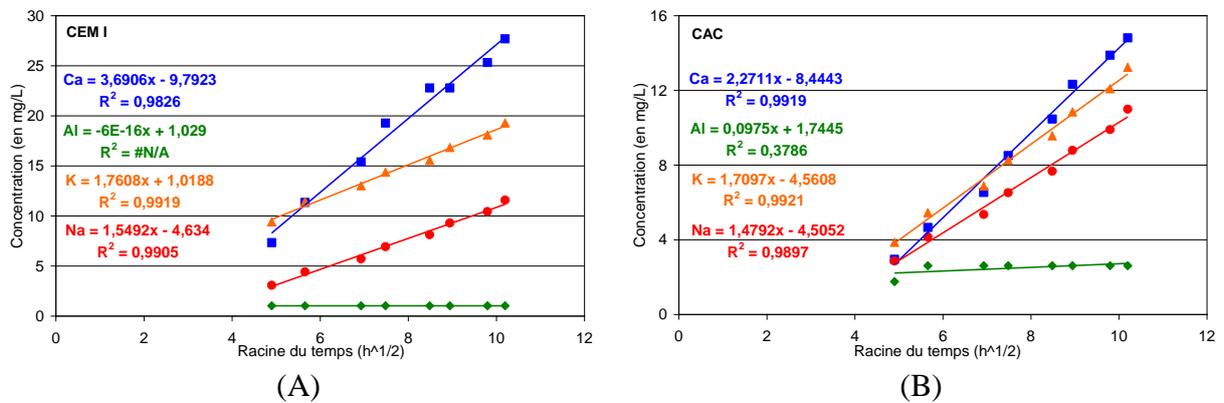


Figure 1-8 : Evolution de la concentration en ions en fonction de la racine carrée du temps pour l'essai avec renouvellement d'acide à pH 5,5 des mortiers à base de ciment Portland (A) et à base de ciment d'aluminate de calcium (B).

Résumé :

La nécessité de rénover les réseaux d'assainissement des grandes villes et les besoins de construire de nouvelles structures conduisent les gestionnaires de réseaux d'assainissement et les fabricants de canalisation à rechercher des solutions pour obtenir des installations d'assainissement durables. Parmi les détériorations rencontrées dans ces structures, 9% peuvent être attribués à la biodétérioration des matériaux cimentaires.

Cette étude a deux objectifs principaux. Le premier est de développer un essai accéléré reproductible en laboratoire et qui donne des résultats proches de ceux obtenus sur site. Le second est d'étudier la biodétérioration des matériaux cimentaires pour mieux comprendre les mécanismes et plus spécifiquement la différence de comportement entre les matériaux à base de ciment d'aluminate de calcium (CAC) et de ciment Portland ordinaire (OPC). Dans ce cadre, différentes formulations cimentaires ont été exposées *in situ* afin de déterminer les paramètres influant sur la biodétérioration. En parallèle, des expériences en laboratoire ont été réalisées pour mieux comprendre chaque étape du mécanisme de biodétérioration.

Les résultats des expositions sur site montrent que les matériaux à base de CAC ont une durabilité plus importante que les autres formulations cimentaires. Les études réalisées en laboratoire permettent d'attribuer ces meilleures performances à la teneur en aluminium qui inhibe la croissance des microorganismes tout en protégeant la matrice grâce à la précipitation d'une couche d'alumine hydratée dans la porosité et à la surface de ces matériaux et qui maintient le pH à 3,5-4. La chimie de surface a également un rôle important en favorisant ou non l'oxydation abiotique de l' H_2S . Les résultats des expositions sur site et des différents essais de laboratoire ont été utilisés pour développer un essai accéléré donnant des résultats prometteurs.

Mots-clés : Biodétérioration, Matériaux cimentaires, Réseaux d'assainissement, Sulfure d'hydrogène, Ciment d'aluminate de calcium, Test accéléré.

Summary:

The need for renovation of sewer networks in major cities and the necessity to build new structures lead managers of sewer pipe and manufacturers to seek for solutions for sustainable sanitation. 9% of damages encountered in these structures can be attributed to the biodeterioration of cementitious materials.

This study has two main objectives. The first one is to develop an accelerated reproducible laboratory test that gives results similar to those obtained on site. The second is to study the biodeterioration of cementitious materials in order to better understand the mechanisms and more especially the durability differences between materials based on calcium aluminate cement (CAC) and ordinary Portland cement (OPC). Within this framework, different cement formulations were exposed *in situ* to identify the parameters influencing biodeterioration. Meanwhile, laboratory experiments were conducted to better understand each step of the biodeterioration's mechanisms.

Results of on site exposition show that materials based on CAC have a greater durability than other cement formulations. Laboratory studies assign these best performances to the aluminum content which inhibits the growth of microorganisms while protecting the matrix by precipitation of a hydrated alumina layer in the porosity and on the surface of these materials. This layer maintains the pH at 3.5-4. Surface chemistry was shown to play an important role in catalyzing abiotic oxidation of H_2S . The results of on-site exhibitions and various laboratory tests were used to develop an accelerated test giving promising results.

Keywords: Biodeterioration, Cementitious materials, Sewer networks, Hydrogen sulfide, Calcium aluminate cement, Accelerated test.