



HAL
open science

Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé

Marion Médevielle

► **To cite this version:**

Marion Médevielle. Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé. Génie civil. École centrale de Nantes, 2017. Français. NNT : 2017ECDN0031 . tel-02124134

HAL Id: tel-02124134

<https://theses.hal.science/tel-02124134v1>

Submitted on 9 May 2019

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.

Thèse de Doctorat

Marion MÉDEVIELLE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention
du grade de Docteur de l'École Centrale de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : **Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture**

Discipline : **Génie civil**

Unité de recherche : **Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux, Département Matériaux et Structures, Laboratoires Comportement Physico-chimique et Durabilité des Matériaux & Matériaux pour Infrastructures de Transport**

Soutenue le lundi 6 novembre 2017

Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé.

JURY

Rapporteurs : **GAGNE Richard**, Professeur, Université de Sherbrooke
SPERANDIO Mathieu, Professeur, INSA Toulouse – **Président du Jury**

Examineurs: **GARCIA-DIAZ Éric**, Professeur, IMT Mines d'Alès
PECHAUD Yoan, Maître de Conférence, Université Paris Est Marne La Vallée
HILLOULIN Benoît, Maître de Conférence, Ecole Centrale de Nantes

Invité: **GRIZEAU Dominique**, Enseignant-chercheur, Polytech Nantes

Directeur de thèse : **HAMMOUM Ferhat**, Directeur de recherche, Ifsttar

Co-encadrante de thèse : **GUEGUEN Marielle**, Chargée de recherche, Ifsttar
Co-encadrant de thèse : **SEDRAU Thierry**, Ingénieur Divisionnaire des TPE, Ifsttar

Thèse de Doctorat

Marion Médevielle

Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé.

Use of alkalophilic bacterial strains, inducing calcium carbonates precipitation, to improve the recycled concrete aggregates quality.

Résumé

Les sables issus de la déconstruction du béton (GBR), ont une porosité importante du fait de la présence du mortier résiduel issu du béton primaire. Ceci est un frein à leur recyclage dans le béton, comme cela serait souhaitable dans le cadre d'une économie circulaire de la filière. La carbonatation naturelle par voie aérienne des GBR est connue pour améliorer leurs performances. Par contre elle est très lente et les contraintes de stockage associées ne sont pas acceptables industriellement. Par ailleurs, des bactéries calcifiantes sont utilisées depuis quelques années pour améliorer des sols ou des pierres de monuments. Dans ce contexte, l'objet de cette thèse consiste à développer un procédé de calcification accéléré par dépôt de bactéries à la surface des GBR.

La thèse est divisée en 2 phases :

- Sélection et adaptation à un pH de 12 de souches bactériennes alcalino-résistantes au cours desquelles leur croissance et leur rendement en CaCO_3 ont été évaluées *in vitro*, en fonction du milieu environnant (pH, présence d'urée, concentration en calcium...);
- Mise en contact suivant différents procédés avec du sable de béton recyclé (GBR) et des disques de mortier lisses. L'efficacité du traitement était évaluée par la diminution de la porosité du matériau.

A l'issue de ce travail, une souche bactérienne ayant un rendement calcique satisfaisant au contact de GBR a été identifiée. Toutefois la diminution de porosité des GBR traités avec cette bactérie reste limitée. Les observations effectuées montrent que cela est lié à un dépôt hétérogène des produits calciques à la surface des GBR. Des pistes d'amélioration du procédé sont proposées en conclusion du travail.

Mots clés

granulats de béton recyclé, biocalcification, *Bacillus halodurans*

Abstract

Sands produced from demolition wastes (RCA) have a significant porosity due to the residual mortar resulting from the primary concrete. This is a brake on their recycling in concrete, as would be desirable to develop the circular economy of the sector. The natural carbonation by air of RCA is known to improve their performance. On the other hand, it is very slow and the associated storage constraints are not industrially acceptable. In addition, calcifying bacteria have been used for years to improve soils or monumental stones. In this context, the object of this thesis is to develop a method of accelerated calcification by deposition of bacteria on the surface of RCA.

This thesis is divided in 2 phases:

- Selection and adaptation to pH12 of alkalophilic bacteria with the study of their growth and their CaCO_3 production yield, *in vitro*, in different environments (pH, urea or not, calcium concentration...)
- RCA and mortar disk treatment with different processes whose efficiency is evaluated by a diminution of the material porosity.

At the end of this work, a bacterial strain with a satisfying calcific production in contact with RCA was identified. However, the porosity reduction of the treated RCA porosity remains limited. The observations made show that this is linked to a heterogeneous deposit of calcium product on the surface of RCA. To conclude this work, several areas to be explored are proposed to improve the process.

Key Words

recycled concrete aggregate, biocalcification, *Bacillus halodurans*

A ma mère

Que de temps perdu à gagner du temps

Paul Morand

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse Ferhat Hammoum et mes encadrants de thèse, Marielle Guéguen-Minerbe et Thierry Sedran pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet combinant à la fois la microbiologie et un domaine qui m'était méconnu, le béton. Je les remercie pour leur disponibilité, leur encadrement et tous les conseils prodigués. Je remercie aussi Thierry Chaussadent, Dominique Grizeau et Faisl Bousta pour avoir suivi l'avancée des travaux et pour avoir su nous faire profiter de leur expertise pour développer des essais et comprendre des résultats.

Je tiens ensuite à remercier tous ceux qui m'ont aidé à mettre en place les essais, à analyser les échantillons et à traiter les données obtenues : Issam Nour, pour toute l'aide apportée pour les essais réalisés et pour son coaching qui a permis de maintenir le moral des troupes, Julien Vincent pour la quantité impressionnante d'échantillons analysés en un temps record, Béatrice Desrues pour toutes les observations au microscope optique à balayage, Anthony Cussoneau et Julien Le Mouel pour ma formation et tous les tests d'absorption en eau réalisés, ainsi que Mickaël Saillio pour toutes les interprétations de données réalisées, menées en un rien de temps. J'adresse aussi mes remerciements aux équipes CPDM et MIT pour leur accueil et leur soutien.

Un grand merci à toute la bande de thésards, de docteurs et de stagiaires, qui ont su être un véritable soutien au cours de ces trois années. Tout d'abord Anaïs Grandclerc, celle avec qui je partageais non seulement le bureau, mais également les meilleurs comme les plus mauvais moments vécus pendant ces 3 années. Je voudrais également remercier ceux qui sont arrivés par la suite et avec lesquels l'ambiance du travail et de l'après-travail s'est trouvée plus allégée : Guillaume Delannoy, Thomas Cadu et Lucy Travailleur. Ces 3 années n'auraient pas été les mêmes sans eux. Une pensée amicale également pour celles et ceux qui n'ont été que de passage ou présents par intermittence : Marie Malbois, Mehdi Mejdj, Jacques Jabbour, Hajer Rabbi, Astrid Billon et Mathieu Le Rouzic. Je remercie enfin ma stagiaire, Inès Moralès, pour le travail qu'elle a accompli sur les matrices synthétiques, ainsi que pour sa bonne humeur et sa camaraderie.

Et enfin, je remercie tous mes proches, qui m'ont soutenu sans faillir pendant ces trois années. Je les remercie tous pour leurs encouragements, les repas préparés pendant la période de rédaction, les soirées au QG, les moments de tranquillité et leur présence, tout simplement. En un mot comme en cent : you rock !

Table des matières

Introduction	27
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	33
1. Introduction	35
2. Les granulats de béton	35
2.1. Origine et composition	35
2.2. Caractéristique des granulats recyclés	37
2.2.1. Valorisation des granulats issus de la déconstruction	37
2.2.2. Granulométrie, rugosité, angularité	38
2.2.3. Caractéristiques mécaniques	38
2.2.4. Porosité des granulats recyclés	39
2.3. Propriétés mécaniques des bétons incorporant les granulats issus de la déconstruction	40
2.3.1. Résistance à la compression	40
2.3.2. Contrainte à la rupture	41
2.3.3. Modules de rupture et d'élasticité	42
2.4. Traitement et réemploi des granulats	42
2.4.1. Les différents traitements des granulats issus de la déconstruction	42
2.4.1.1. Carbonatation naturelle	42
2.4.1.2. Traitements chimiques	43
2.4.1.3. Traitements biologiques	44
2.4.2. Conclusion	44
3. La production de carbonates de calcium	45
3.1. Paramètres impactant la formation des carbonates de calcium	45
3.2. La formation des carbonates de calcium par les bactéries	47
3.2.1. Les mécanismes de la biocarbonatation de CaCO_3	49
3.2.2. Paramètres impactant la biocarbonatation	50
3.3. Conclusion	52
4. Utilisation de la bioprécipitation	52
4.1. Différents domaines d'étude	52
4.2. Différents supports étudiés	55
4.2.1. Les roches carbonatées	55
4.2.1.1. Apport de bactéries capables de biominéralisation	55
4.2.1.2. Application de molécules biologiques	57
4.2.1.3. Activation des bactéries capables de biominéralisation, <i>in situ</i>	58

4.2.1.4.	Conclusion	60
4.2.2.	Les sols et sables	60
4.2.2.1.	Apport de micro-organismes capables de produire des CaCO ₃	60
4.2.2.2.	Apport de milieu favorisant la croissance de micro-organismes capables de produire des CaCO ₃	61
4.2.2.3.	Conclusion	62
4.2.3.	Les matériaux cimentaires	62
4.2.3.1.	Traitement de la surface de la matrice cimentaire par dépôt de souches alcalino-résistantes	63
4.2.3.2.	Traitement de fissures formées sur la matrice cimentaire	64
4.2.3.2.1.	Emploi de bactéries alcalino-résistantes	64
4.2.3.2.2.	Incorporation de souches bactériennes dans une matrice protectrice	65
4.2.3.3.	Incorporation des souches dans la matrice cimentaire	66
4.2.3.3.1.	Emploi de bactéries alcalino et thermorésistantes	67
4.2.3.3.2.	Incorporation de souches bactériennes dans une matrice protectrice	69
4.2.3.4.	Conclusion	70
4.2.4.	Conclusion	70
5.	Objectifs de l'étude	72
6.	Bibliographie	75
Chapitre 2 :	Matériau et Techniques	81
1.	Introduction	83
2.	Techniques expérimentales	83
2.1.	Mise en culture des souches bactériennes congelées	83
2.2.	Dénombrements	84
2.2.1.	Dénombrement bactérien sur cellule de Thoma	84
2.2.2.	Dénombrement sur milieux gélosés	86
2.2.3.	Suivis de croissance par densité optique	88
2.2.4.	Dead/Live	88
2.2.5.	Estimation de la concentration bactérienne initialement introduite dans les traitements des matériaux	89
2.3.	Masses et rendements de production des CaCO ₃	89
2.3.1.	Calcul des masses cumulées de CaCO ₃ dans les échantillons	90
2.3.2.	Calcul des rendements de production de CaCO ₃	90
2.4.	Quantification et qualification des CaCO ₃	92
2.4.1.	Préparation des échantillons	92
2.4.2.	L'ATG	92
2.4.3.	La DRX	94

2.5.	Préparation des échantillons pour observations au MEB	95
3.	Les granulats de béton recyclés	96
3.1.	Analyses menées sur les GBR	97
3.1.1.	Mesure de l'absorption en eau	97
3.1.2.	Analyses de la distribution de la taille des pores et de la surface spécifique...	99
3.1.2.1.	...par porosimétrie par intrusion au mercure.	99
3.1.2.2.	...par analyse gravimétrique d'adsorption de vapeur d'eau (DVS)	100
3.1.3.	Mesure du pH de surface	100
3.2.	Résultats obtenus et discussion	101
3.3.	Conclusion	102
4.	Bibliographie	103
Chapitre 3 : Bioprécipitation des carbonates de calcium sur GBR – Essais de faisabilité		
105		
1.	Introduction	107
2.	Sélection des souches bactériennes	109
3.	Etude de la croissance bactérienne	112
3.1.	Protocoles de suivis de croissance bactérienne	112
3.2.	Résultats	115
3.3.	Conclusion	117
4.	Production de CaCO ₃	118
4.1.	Croissance des souches en présence d'urée	119
4.2.	Suivi de production de CaCO ₃ par <i>B.halodurans</i> et <i>M.lactis</i> en présence d'urée	120
4.2.1.	Protocole	122
4.2.2.	Résultats et discussion des productions de CaCO ₃ avec 5g/L d'acétate de calcium	123
4.2.3.	Résultats et discussion des productions de CaCO ₃ avec 50g/L d'acétate de calcium	127
4.2.4.	Conclusions	130
4.3.	Comparaison des productions de CaCO ₃ en présence et absence d'urée	132
4.3.1.	Protocole de production des carbonates de calcium en présence et absence d'urée	132
4.3.2.	Résultats	134
4.3.3.	Conclusion	140
4.4.	Conclusion sur les essais de production de CaCO ₃ <i>in vitro</i>	141
5.	Traitement des GBR	142
5.1.	Protocole d'essai	142
5.2.	Résultats	144

5.3.	Discussion-----	147
5.4.	Conclusions-----	149
6.	Conclusions des essais de faisabilité-----	149
7.	Bibliographie-----	150
Chapitre 4 : Bioprécipitation des carbonates de calcium sur GBR – Amélioration du procédé 153		
1.	Introduction-----	155
2.	Adaptation des souches à l'eau de contact des GBR-----	155
2.1.	Analyse de l'eau de contact-----	155
2.2.	Mise en contact avec l'eau des GBR-----	157
2.3.	Conclusion-----	157
3.	Utilisation de matrice protectrice pour traiter les GBR-----	158
3.1.	Etude de la survie de <i>B. halodurans</i> dans les matrices, au contact d'un milieu fortement alcalin-----	159
3.1.1.	Essais en présence d'un milieu alcalin modèle-----	159
3.1.1.1.	Production des matrices-----	159
3.1.1.2.	Test de survie de <i>B. halodurans</i> dans la matrice d'agar, au contact d'un milieu alcalin 160	
3.1.1.3.	Test de survie de <i>B. halodurans</i> dans la matrice de silice, au contact d'un milieu alcalin 160	
3.1.1.4.	Résultats-----	161
3.1.2.	Test de suivi de la survie de <i>B. halodurans</i> dans la matrice d'agar, au contact d'un mortier 161	
3.1.3.	Conclusions-----	162
3.2.	Traitement des GBR avec <i>B. halodurans</i> protégé par matrice-----	163
3.2.1.	Protocoles-----	163
3.2.1.1.	Formulation des matrices synthétiques pour application sur GBR-----	163
3.2.2.	Protocoles d'essais-----	165
3.2.3.	Résultats obtenus et discussions-----	166
3.2.4.	Conclusions-----	173
3.3.	Conclusions-----	173
4.	Adaptation pH 12-----	174
4.1.	Sélection sur milieu gélosé-----	174
4.2.	Conclusion-----	175
5.	Rendements de production de CaCO ₃ à pH 12 sans urée-----	176
5.1.	Protocoles-----	176
5.2.	Résultats et discussions-----	176

5.3.	Conclusion -----	180
6.	Traitement des GBR avec <i>B.halodurans</i> adaptée à pH 12-----	181
6.1.	Traitements par immersion-----	181
6.1.1.	Prétraitement des GBR-----	182
6.1.2.	Traitement des GBR-----	183
6.1.3.	Résultats des traitements des GBR-----	184
6.1.4.	Protocole – Augmentation de la teneur en acétate de calcium.-----	187
6.1.5.	Résultats de l’augmentation de la teneur en acétate de calcium -----	188
6.1.6.	Conclusions sur les essais d’immersion -----	190
6.2.	Essais par aspersion -----	191
6.2.1.	Résultats -----	193
6.3.	Conclusions-----	196
7.	Conclusion -----	197
8.	Bibliographie -----	200
Chapitre 5 : Amélioration de l’homogénéisation du dépôt de carbonates de calcium sur mortier 203		
1.	Introduction-----	205
2.	Mise en place des essais -----	205
2.1.	Production des mortiers-----	205
2.2.	Production et application des traitements des disques -----	207
2.2.1.	Préparation des pré-cultures bactériennes pour chaque traitement-----	209
2.2.2.	Protocole d’immersion des disques-----	210
2.2.3.	Protocoles de stress hydrique-----	212
2.2.3.1.	Aspersion du traitement avec ou sans agar -----	212
2.2.3.2.	Détermination des quantités nécessaires pour le protocole d’étalement du traitement à la surface des disques-----	213
2.3.	Analyses menées-----	215
2.3.1.	Rinçage des disques et analyse de l’eau de rinçage-----	215
2.3.2.	Mesure de l’absorption en eau des disques et observations MEB-----	215
3.	Résultats et discussion -----	216
4.	Conclusion -----	238
5.	Bibliographie -----	240
Conclusion générale-----		241
Annexes -----		249

Liste des annexes

Annexe A : Coloration de Gram	251
Annexe B : Granularité d'un sable 0/6,3.....	252
Annexe C : Récapitulatif des concentrations bactériennes obtenues dans nos essais de bioproduction de CaCO ₃	253
Annexe D: Evolution de la surface des disques traités au cours du temps	255

Liste des figures

- Figure 1-1 : Quantités de déchets non dangereux non inertes des Travaux publics et modes de gestion en 2008 (SOeS 2011a, 2011b) La quantité totale de chaque déchet (exprimée en milliers de tonnes) est indiquée à côté de la sphère le représentant. Sont représentés : en bleu foncé, les Mélanges inertes et déchets non dangereux non inertes ; en rouge, les Déchets végétaux ; en vert clair, les Métaux ferreux ou non ferreux ; en vert foncé, le Mélange de déchets non dangereux non inertes ; en marron, le Bois brut ou traité avec des substances non dangereuses ; en orange, les Matières plastiques ; en gris, le Plâtre ; en violet, les Autres types de déchets non dangereux non inertes ; en bleu clair, les Pneus usagés, en rose, les Matériaux isolants. 36
- Figure 1-2 : Quantités de déchets non dangereux non inertes des Bâtiments et modes de gestion en 2008 (SOeS 2011a, 2011b). La quantité totale de chaque déchet (exprimée en milliers de tonnes) est indiquée à côté de la sphère le représentant. Sont représentés : en bleu foncé, les Mélanges inertes et déchets non dangereux non inertes ; en rouge, les Déchets végétaux ; en vert clair, les Métaux ferreux ou non ferreux ; en vert foncé, le Mélange de déchets non dangereux non inertes ; en marron, le Bois brut ou traité avec des substances non dangereuses ; en orange, les Matières plastiques ; en gris, le Plâtre ; en violet, les Autres types de déchets non dangereux non inertes ; en bleu clair, les Pneus usagés, en rose, les Matériaux isolants. 36
- Figure 1-3: Schéma d'un granulats de béton recyclé 37
- Figure 1-4: Schéma des étapes de valorisation des granulats issus de la déconstruction 38
- Figure 1-5: Schéma d'un béton incorporant des granulats de béton recyclé, vu en coupe transversale. Sont représentés : en jaune, la zone d'interphase granulats recyclés-pâte de ciment ; en blanc, la zone d'interphase granulats-mortier primaire. 41
- Figure 1-6 : Schéma résumant les travaux menés par Ann et al. 2008, Li *et al.* 2009, où GBR signifie « granulats de béton recyclé », GN signifie « granulats naturels », et PP correspond à « poudre pouzzolane »..... 44
- Figure 1-7 : les trois polymorphes de CaCO_3 : calcite, aragonite et vaterite (Dizaj *et al.* 2015) 45
- Figure 1-8: Diagramme de prédominance acido-basique relatif aux espèces H_2CO_3 , HCO_3^- et CO_3^{2-} 46
- Figure 1-9: Effets du pH sur les taux de production des polymorphes du CaCO_3 à 7°C (A), 24°C (B) et 58°C (C). Les points ronds correspondent aux résultats obtenus pour la vaterite (V), les points triangulaires, à ceux obtenus pour l'aragonite (A) et les points carrés à ceux obtenus pour la calcite (C). (Tai & Chen 1998)..... 47

Figure 1-10 : Schéma résumant le procédé de biocarbonatation. AC : anhydrase carbonique	48
Figure 1-11: schéma des membranes externes des bactéries à coloration Gram positif (gauche) et des bactéries à coloration Gram négatif (droite).	50
Figure 1-12: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par chaque équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris) dans différentes conditions (encadrés bleus). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage, DRX pour Diffraction des Rayons X et IR pour Infra-Rouge.	56
Figure 1-13: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par chaque équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage et DRX pour Diffraction des Rayons X.....	57
Figure 1-14: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par les équipes au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris) dans différentes conditions (encadrés bleus). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage.....	58
Figure 1-15: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage, DRX pour Diffraction des Rayons X et [Ca] pour concentration en calcium.....	60
Figure 1-16: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par chaque équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : DRX pour Diffraction des Rayons X.....	61
Figure 1-17 : Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : DRX pour Diffraction des Rayons X.....	63
Figure 1-18: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage.	65
Figure 1-19: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : ATG pour Analyse Thermogravimétrique et MEB pour Microscope Electronique à Balayage.....	66
Figure 1-20: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : DRX pour Diffraction des Rayons X et MEB pour Microscope Electronique à Balayage.	68

Figure 1-21 : Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : EDAX pour analyse dispersive en énergie et [O ₂] pour la concentration en dioxygène.....	70
Figure 2-1 : Procédure schématisée de la mise en culture des souches bactériennes congelées	84
Figure 2-2: Schéma du quadrillage d'une cellule de Thoma avec les différentes dimensions qui la caractérisent (en bleu). La cellule est divisée en 16 grands carrés (orange) eux-mêmes divisés en 16 petits carrés (vert). Le dénombrement est réalisé sur 8 grands carrés (orange). Seules les bactéries chevauchant les lignes en haut et à gauche des petits carrés sont dénombrées.....	85
Figure 2-3 : Schéma d'une cellule de Thoma vue de profil. En jaune est représentée la zone de dépôt des échantillons.	85
Figure 2-4 : Schéma du procédé expérimental employé pour la méthode des dilutions en série. Le premier tube de 2mL contient 2mL de bouillon de culture. Les tubes d1 à d7 contiennent 1,8mL de milieu de culture liquide. Au cours de la dilution successive, 200µL sont transvasés de tube en tube.....	87
Figure 2-5: exemple de courbes obtenues en fin d'analyse ATG.....	93
Figure 2-6: Courbe théorique type obtenue par ATD. En 1, un pic ATD lié à un phénomène endothermique, en 2, un pic ATD lié à un phénomène exothermique et en 3, la ligne de base. Le ΔT correspond à la différence de température entre l'échantillon et la référence. (Martias 2009).....	93
Figure 2-7 : Spectres DRX réalisés à température ambiante de poudre de calcite, de dolomite et d'aragonite. (Tai & Chen 1998)	95
Figure 2-8: courbe granulométrique des GBR	97
Figure 2-9 : schéma de l'essai d'absorption en eau des GBR	98
Figure 2-10 : Courbes des distributions majoritaires des tailles de pores obtenues par porosimétrie par intrusion au mercure (gauche) et par analyse DVS (droite)	101
Figure 3-1 : Objectif du travail.....	107
Figure 3-2 : Méthode expérimentale employée pour le suivi de la courbe de croissance de souches étudiées. A chaque prélèvement, 1mL des cultures A et B est versé dans des cuves de spectrométrie, et deux échantillons d'1mL du milieu témoin sont versés dans des cuves afin de servir de blancs.....	113
Figure 3-3: Courbe de croissance bactérienne type. A : phase de latence, B : phase exponentielle, C : phase stationnaire, D : phase de déclin	114

Figure 3-4 : Suivis de croissance de <i>A.ehrlichii</i> [A], <i>B.chagannorensis</i> [B], <i>B.halodurans</i> [C] et <i>M.lactis</i> [D]	116
Figure 3-5: schéma du processus expérimental permettant de comparer la production de CaCO ₃ par <i>B.halodurans</i> et <i>M.lactis</i> sur 1 semaine, en apportant de l'urée (20g/L) et de l'acétate de calcium (5 g/L). Les incubations sont réalisées à 30°C, 140 tr/min.....	122
Figure 3-6 : Masses cumulées de CaCO ₃ déterminées par ATG, liées à l'activité bactérienne, dans les culots des cultures de <i>B.halodurans</i> , en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 5g/L et d'urée de 20g/L.....	123
Figure 3-7 : Masses cumulées de CaCO ₃ , liées à l'activité bactérienne, déterminées par ATG dans des culots dans les cultures de <i>M.lactis</i> , en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 5g/L et d'urée de 20g/L.....	123
Figure 3-8 : Suivi de la concentration bactérienne de <i>B.halodurans</i> et <i>M.lactis</i> dans les milieux contenant 5g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée. (Valeurs en annexe C)	125
Figure 3-9 : Suivi de la concentration bactérienne de <i>B.halodurans</i> et <i>M.lactis</i> dans les milieux contiennent 50g/L d'acétate de calcium (Valeurs en annexe C).....	127
Figure 3-10 : Masses cumulées de CaCO ₃ , liées à l'activité bactérienne, déterminées par ATG dans les culots des cultures de <i>B.halodurans</i> , en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L et d'urée de 20g/L.....	129
Figure 3-11 : Masses cumulées de CaCO ₃ , liées à l'activité bactérienne, déterminées par ATG dans des culots dans les cultures de <i>M.lactis</i> , en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L et d'urée de 20g/L.....	129
Figure 3-12: schéma du processus expérimental permettant de suivre la production de CaCO ₃ par <i>B.halodurans</i> et <i>M.lactis</i> sur 3 semaines, dans des milieux contenant de l'urée ou non. Les incubations sont réalisées à 30°C, 60tr/min, pendant 48h.....	133
Figure 3-13 : Suivi de la concentration bactérienne (nombre de cellules/mL) au cours du temps dans les différentes conditions de production de matière par <i>B.halodurans</i> , en boîte de Pétri : avec un milieu contenant de l'urée à pH 9,7, ou non à pH 9,7.	134
Figure 3-14 : Suivi de la concentration bactérienne (nombre de cellules/mL) au cours du temps dans les différentes conditions de production de matière par <i>M.lactis</i> , en boîte de Pétri: avec un milieu contenant de l'urée à pH 7,4, ou non à pH 7,4.....	135
Figure 3-15 : Masses cumulées de CaCO ₃ , liées à l'activité bactérienne, dans les cultures de <i>B.halodurans</i> , en boîte de Pétri, avec des milieux contenant de l'urée à une concentration de 20 g/L (barres blanches rayées de vert) ou non (barres vertes rayées de blanc), avec un apport systématique d'acétate de calcium de 50g/L	137

Figure 3-16 : Masses cumulées de CaCO ₃ , liées à l'activité bactérienne, dans les cultures de <i>M.lactis</i> , en boîte de Pétri, avec un milieu contenant de l'urée à une concentration de 20 g/L (barres avec carrés blancs) ou non (barres avec carrés verts), avec un apport systématique d'acétate de calcium de 50g/L	137
Figure 3-17 : Suivi du rendement à échéance de production de CaCO ₃ par <i>B.halodurans</i> dans des milieux avec ou sans urée (20g/L) à pH 9,7, additionnés de 50g/L d'acétate de calcium.	138
Figure 3-18 : Suivi du rendement à échéance de production de CaCO ₃ par <i>M.lactis</i> dans des milieux avec ou sans urée (20g/L) à pH 7,4, additionnés de 50g/L d'acétate de calcium.	138
Figure 3-19 : photo au MEB de bactéries calcifiées sur lesquelles des sites de croissance cristalline de CaCO ₃ réalisée de façon abiotique sont observés (flèche) (Castanier <i>et al.</i> 1999)	139
Figure 3-20 : schéma du procédé expérimental employé pour l'essai dit de « faisabilité ». HR = Humidité Relative	144
Figure 3-21: Coefficients d'absorptions en eau des GBR traités par immersion avec un milieu contenant <i>B.halodurans</i> (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée. Le coefficient d'absorption en eau des GBR non traités est marqué en rouge.	145
Figure 3-22 : Coefficients d'absorptions en eau des GBR traités par immersion avec un milieu contenant <i>M.lactis</i> (pH 7,4), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée. Le coefficient d'absorption en eau des GBR non traités est marqué en rouge.....	146
Figure 3-23: Taux d'absorption en eau de GBR avant (WA24 avant) et après (WA24 après) leurs traitements par immersion. (Wang <i>et al.</i> 2017).....	148
Figure 4-1 : photos des milieux des essais de survie de <i>B.halodurans</i> (gauche) et <i>M.lactis</i> (droite) dans l'eau de rinçage des GBR. TEMOIN : correspond au milieu non inoculé, OPT : correspond au milieu optimal de croissance de la souche, GBR : correspond au milieu produit avec l'eau de contact des GBR.....	157
Figure 4-2 : observations au microscope optique à épifluorescence du gel de silice contenant <i>B.halodurans</i> incubé 8 jours à 30°C après coloration par le dead-live	161
Figure 4-3 : observations au microscope optique à épifluorescence de la matrice d'agar contenant <i>B.halodurans</i> incubée 48h à 30°C au contact de mortier et après coloration par le dead-live	162
Figure 4-4 : Schéma du protocole employé pour le traitement des GBR avec des matrices synthétiques renfermant ou non des bactéries.....	166

Figure 4-5 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par enrobage dans une matrice d'agar à 0,1% contenant des bactéries évoluant à leur pH optimal de croissance (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée après 3 semaines de traitement. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge..... 167

Figure 4-6 : Photos MEB de coupes transversales de GBR non traités (A), traités 3 semaines avec une matrice d'agar 0,1% en sans bactéries (B) et contenant des bactéries (C). La surface des GBR est délimitée par les pointillés et les dépôts poreux et irréguliers de matrice d'agar 0,1% sont indiqués par les flèches bleues. 168

Figure 4-7 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par enrobage dans une matrice de silice contenant des bactéries évoluant à leur pH optimal de croissance (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge..... 170

Figure 4-8 : Photos MEB des GBR non traités -vus de surface (A) et de profil (C)- et de GBR traités 3 semaines par une matrice de silice contenant des bactéries en vue de surface (B) et de profil (D). Des bactéries calcifiées sont désignées par des flèches blanches. La surface des GBR est délimitée par les pointillés, sur les vues de profil. Le dépôt poreux et irrégulier de matrice de silice est entouré de bleu et son épaisseur est indiquée en blanc..... 171

Figure 4-9 : Taux d'absorption en eau des GBR traités avec une matrice agar contenant des bactéries évoluant à leur pH optimal de croissance (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée, avant (barres bleues) et après rinçage (barres vertes). Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge..... 172

Figure 4-10 : Schéma du protocole suivi pour adapter les souches à survivre dans un pH de 12 175

Figure 4-11: Suivi de la concentration bactérienne (nombre de cellules/mL) au cours du temps par *B.halodurans*, en boîte de Pétri, dans des milieux sans urée à pH 12 et en apportant 50g/L d'acétate de calcium, produits avec de l'eau distillée (barres blanches avec des traits croisés) ou avec de l'eau de contact des GBR (barres avec des losanges) (Annexe C). 177

Figure 4-12 : Masses cumulées de CaCO₃ dans les cultures de *B.halodurans* à pH12, en boîte de Pétri, en favorisant la voie de l'interconversion, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L 178

Figure 4-13 : Masses cumulées de CaCO₃ obtenues dans les cultures de *B.halodurans* à pH 12, en boîte de Pétri, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L, dans un milieu produit avec l'eau de contact des GBR. Attention, contrairement aux figures précédentes, la masse cumulée des témoins n'a pas été mesurée à 1 et 2 semaines. En conséquence elle n'a pas été retranchée

des masses obtenues dans les milieux inoculés. Pour information la masse cumulée de CaCO ₃ du témoin à 3 semaines a été mesurée égale à 116,1mg.	179
Figure 4-17 : schéma du protocole employé pour le traitement par immersion de GBR prétraités. HR = Humidité Relative.....	184
Figure 4-18 : Observations MEB des profils de GBR : non traités (A), traités par immersion pendant 6 semaines dans un « milieu témoin » à pH 12 (B), traités dans un « milieu inoculé » à pH 12 (C) contenant 4.10 ⁸ bactéries/mL et 50g/L d'acétate de calcium, traités par immersion pendant 6 semaines dans un « milieu témoin » à pH 12, puis rincés à l'eau (D), traités dans un « milieu inoculé » à pH 12 contenant 4.10 ⁸ bactéries/mL et 50g/L d'acétate de calcium, puis rincés (E). Les dépôts poreux et non homogènes de matière calcifiée sont cerclés de bleu, les épaisseurs sont notées en blanc et la surface des GBR est délimitée par les pointillés.....	185
Figure 4-19: Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par immersion après rinçage. Les GBR ont été pré-enrobés d'acétate de calcium avant d'être immergés dans un milieu contenant -ou non- les bactéries (10 ⁸ bactéries/mL) évoluant à pH 12 en présence de 50g/L d'acétate de calcium. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.	186
Figure 4-20 : schéma du protocole employé pour le traitement par immersion des GBR avec un milieu contenant 342,3g/L d'acétate de calcium et 4.10 ⁸ bactéries/mL. HR = Humidité Relative.	188
Figure 4-21 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par immersion, après rinçage à l'eau. Les GBR ont été immergés dans un milieu contenant -ou non- les bactéries (4.10 ⁸ bactéries/mL) évoluant à pH 12 en présence de 342,3g/L d'acétate de calcium (barres mouchetées). Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.	189
Figure 4-22 : Observations MEB des profils de GBR : non traités (A), traités par immersion pendant 6 semaines dans un « milieu témoin » à pH 12 et rincés (B), traités dans un « milieu inoculé » à pH 12 et rincés(C). Les milieux contenaient 4.10 ⁸ bactéries/mL et 85,6g/L d'acétate de calcium. Les dépôts non homogènes de matière calcifiée sont cerclés de bleu, les épaisseurs sont notées en blanc et la surface des GBR est délimitée par les pointillés.	190
Figure 4-23 : schéma des procédés expérimentaux employés pour les essais par aspersion des GBR prétraités. HR = humidité relative.....	193
Figure 4-24 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités, par « double aspersion » (barres bleues) et par « aspersion multiples » (barres grises). Les GBR ont été pré-enrobés d'acétate de calcium avant d'être aspergés 2 fois en 6 semaines par un milieu contenant -ou non- les	

bactéries (4.10^8 bactéries/mL) évoluant à pH 12 en présence de 342,3g/L d'acétate de calcium. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.	194
Figure 4-25: Observations MEB des profils de GBR : non traités (A), traités par du « milieu témoin » pendant 6 semaines à pH 12 et rincés (B), traités par le protocole de double-aspersion avec un « milieu inoculé » à pH 12 et rincés(C) et traités par le protocole aspersion multiples avec un « milieu inoculé » à pH 12 et rincés(C). Les milieux contenaient 4.10^8 bactéries/mL et 342,3g/L d'acétate de calcium. Les dépôts sont cerclés de bleu, les épaisseurs sont notées en blanc et la surface des GBR est délimitée par les pointillés.....	195
Figure 4-26 : Taux d'absorption en eau de GBR avant (WA24 avant) et après (WA24 après) leurs traitements par aspersion avec du milieu inoculé. Les taux d'absorption obtenues pour l'échantillon témoin immergé 3 jours dans une solution d'urée (0,5M) et de nitrate de calcium (0,5M) sont également présentés (Ctrl). (Wang <i>et al.</i> 2017).....	196
Figure 5-1 : schéma du protocole de préparation des disques de mortiers.....	206
Figure 5-2: protocole de préparation des pré-cultures de <i>B.halodurans</i> pH12	210
Figure 5-3 : photo d'un disque de mortier (cerclé de jaune) dans un bécher (paroi intérieure cerclée de bleu).....	211
Figure 5-4 : protocole schématisé du traitement par immersion des disques dans le milieu .	212
Figure 5-5 : protocole schématisé des traitements par aspersion du milieu et aspersion de matrice synthétique d'agar 0,1% contenant le milieu	213
Figure 5-6 : protocole schématisé du traitement par étalement du milieu	214
Figure 5-7 : évolution des disques traités par immersion, au cours du temps.....	216
Figure 5-8 : Etats de surface des disques traités, à chaque échéance, avant et après rinçage des surfaces à l'eau distillée	218
Figure 5-9 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par immersion (B et C), des disques traités 3 semaines par immersion avec des bactéries (D et E), des disques traités 6 semaines par immersion avec des bactéries (F).	220
Figure 5-10 : photos MEB des surfaces des échantillons non traités (A) et des échantillons traités par immersion dans du bouillon bactérien de <i>B.sphaericus</i> (10^7 bactéries/mL) avant séchage et immersion dans le milieu contenant la source de calcium (26g/L) pendant 3 jours (B). Les flèches noires désignent les zones sur lesquelles aucun dépôt n'est observé. (d'après De Mynck <i>et al.</i> (2008b))	221
Figure 5-11 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par aspersion (B et C), des disques traités 3 semaines par aspersion avec des bactéries (D), des disques traités 6 semaines par aspersion avec des bactéries (E et F).	222

Figure 5-12 : image MEB de la surface d'un disque traité par aspersion en présence de bactéries, à l'échéance 3 semaines. La flèche blanche indique une sphère bien définie, la flèche bleue indique des sphères qui fusionnent et la flèche verte indique des excroissances sur les sphères.	223
Figure 5-13 : images MEB des surfaces de mortiers traités par immersion dans un milieu BN (10g/L) contenant <i>B.sphaericus</i> et de l'acétate de calcium (36g/L). La flèche indique la présence de bactéries calcifiées. (De Muynck <i>et al.</i> 2008a)	224
Figure 5-14 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par matrice d'agar 0,1% (B et C), des disques traités 3 semaines par la matrice agar 0,1% contenant des bactéries (D), des disques traités 6 semaines par la matrice agar 0,1% contenant des bactéries (E et F). Les flèches noires désignent les zones sur lesquelles aucun dépôt n'est observé. Les flèches blanches désignent des résidus de matrice ou de l'acétate de calcium.	225
Figure 5-15 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par étalement (B et C), des disques traités 3 semaines par étalement avec des bactéries (D), des disques traités 6 semaines par étalement avec des bactéries (E et F). Les flèches noires désignent les zones sur lesquelles aucun dépôt n'est observé, les flèches blanches désignent l'empreinte des poils du pinceau.....	227
Figure 5-16 : photos MEB des vues de profils des disques traités par aspersion et <i>B. halodurans</i> pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.....	228
Figure 5-17 : photo MEB d'une vue de profil d'un disque traité par aspersion et <i>B. halodurans</i> pendant 3 semaines, sur laquelle l'agglomération de cristaux en forme de sphères se distingue. La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.....	229
Figure 5-18: évolution des fissures traitées par un milieu B4 inoculé par <i>B.subtilis</i> ou du milieu B4 stérile. Traitement par dépôt de 100µL de milieu inoculé ou non directement sur la fissure, renouvelé toutes les 24h pendant 3 jours. Les échantillons sont incubés à 30°C. (Park <i>et al.</i> 2012).....	230
Figure 5-19 : photos MEB des vues de profils des disques traités par la matrice d'agar 0,1% contenant <i>B. halodurans</i> pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.	230
Figure 5-20 : photos MEB des vues de profils des disques traités par étalement et <i>B. halodurans</i> pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.....	231

Figure 5-21: photos MEB des vues de profils des disques traités par immersion dans un milieu contenant <i>B. halodurans</i> pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.	232
Figure 5-22 : photos au microscope optique des vues de profils des échantillons de mortier non traités (A) ou traités par immersion dans du bouillon bactérien de <i>B.sphaericus</i> (10^7 bactéries/mL) avant séchage et immersion dans le milieu contenant la source de calcium (26g/L) pendant 3 jours (B). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du mortier. (d'après De Muynck <i>et al.</i> (2008b)).....	232
Figure 5-23 : graphiques présentant les masses de $CaCO_3$ après évaporation des eaux de rinçage des échantillons issus du traitement par aspersion (A), par aspersion de matrice synthétique en agar 0,1% (B) et par étalement du milieu (C). Les proportions de calcite dans les échantillons sont présentées en marron, celles de vaterite en vert.	233
Figure 5-24 : taux d'absorption en eau mesurés des disques traités par aspersion (barres rayées horizontalement), par aspersion de matrice d'agar 0,1% (barre avec des points), par étalement (barres rayées verticalement) et par immersion (barres avec des carrés). Chaque barre d'erreur indiquée sur les histogrammes correspond aux valeurs minimales et maximales calculées. Le taux d'absorption en eau de disques non traités est indiqué en rouge.....	235
Figure 5-25: Taux d'absorption des coulis de ciment Portland traités par immersion pendant 3 jours (30°C, 50 tr/min) dans des milieux inoculés par <i>E.coli</i> , <i>B.cereus</i> ou <i>B.subtilis</i> , ou un milieu B4 stérile (Témoin sans bactéries). Le milieu de culture est du milieu B4 composé de 15g/L d'acétate de calcium, 4g/L d'extrait de levure et 5g/L de glucose. (Park <i>et al.</i> 2012)	236
Figure 0-1: Schéma du protocole de coloration de Gram ; a=la souche <i>Staphylococcus aureus</i> à coloration Gram positive (violette), b= la souche <i>Escherichia coli</i> à coloration Gram négative (rose) (Turgeon 2015)	251
Figure 0-2 : évolution des disques traités par l'aspersion de milieu, au cours du temps.....	255
Figure 0-3: évolution des disques traités par l'aspersion de matrice synthétique (agar 0,1%), au cours du temps.....	255
Figure 0-4 : évolution des disques traités par l'étalement de milieu, au cours du temps.	255

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Résumé des études menées	54
Tableau 2-1 : Composition en pourcentage par m ³ du béton dont sont issus les granulats de béton recyclés	96
Tableau 3-1 : Caractéristiques des souches bactériennes sélectionnées.....	110
Tableau 3-2 : Composition des milieux de culture de chacune des souches sélectionnées ...	111
Tableau 3-3 : Tableau regroupant les résultats obtenus pour chaque souche	116
Tableau 3-4 : masses cumulées de CaCO ₃ dans les témoins issus de l'essai réalisé avec <i>M.lactis</i> dans du milieu BCSEL pH7,4 additionné de 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée ...	130
Tableau 3-5 : rendements initiaux de production de CaCO ₃ par <i>B.halodurans</i> et <i>M.lactis</i> à 1 semaine et 3 semaines d'incubation, et le pourcentage qu'ils représentent par rapport au rendement optimal de production attendu (rendement du procédé).....	136
Tableau 3-6 : Masses cumulées en mg de CaCO ₃ dans les milieux témoins des essais avec <i>B.halodurans</i> et <i>M.lactis</i>	140
Tableau 4-1 : Eléments détectés dans l'eau de contact des GBR par la méthode ICP.....	156
Tableau 4-2 : Conditions des traitements des GBR avec les matrices agar ou silice.....	166
Tableau 4-3 : rendements initiaux de production de CaCO ₃ par <i>B.halodurans</i> sur 3 semaines d'incubation dans des milieux BN à pH 12 produits avec de l'eau distillée ou de l'eau des GBR, et le pourcentage qu'ils représentent par rapport au rendement optimal de production attendu (rendement du procédé).....	180
Tableau 4-4 : Récapitulatif des essais réalisés sur les GBR, avec <i>B.halodurans</i>	199

Introduction

En Europe, en 2014, 2,5 milliards de tonnes de déchets ont été produits, dont 34,7% ont été générés par les chantiers de construction et de démolition. En France, 200 millions de tonnes de déchets inertes sont produits chaque année, dont 17 millions sont uniquement à base de béton. Or, la directive-cadre européenne du 19 novembre 2008 et la loi dite Grenelle 2 du 12 juillet 2010 définissent un objectif de 70% de valorisation des déchets des bâtiments et travaux publics à l'horizon 2020.

Une façon de recycler les déchets inertes à base de béton est de produire des granulats de béton recyclé (GBR). Ces derniers peuvent être employés à la place de granulats naturels dans de nouvelles constructions en suivant la norme NF EN 206 qui réglemente leur utilisation selon leurs caractéristiques et la classe d'exposition des ouvrages construits. Mais le pourcentage de substitution des granulats naturels par des GBR reste tout de même très limitée et ne peut dépasser les 30%. L'une des raisons à cela est la porosité élevée des GBR qui induit une absorption en eau très importante, par rapport à des granulats naturels : typiquement de l'ordre de 5 à 8% pour les gravillons et de 6 à 10% pour les sables alors que pour les granulats naturels elle est en général inférieure à 2-3%. L'autre raison est liée aux caractéristiques mécaniques des GBR qui sont inférieures à celles des granulats naturels. C'est pourquoi des études sont menées afin de pouvoir améliorer la qualité des GBR pour faciliter leur utilisation et augmenter le pourcentage de remplacement de granulats naturels dans les nouvelles constructions. Ainsi, nous pourrions diminuer les demandes d'extraction des granulats naturels, dont la ressource est limitée.

Un des moyens d'améliorer la qualité des GBR est de les laisser exposés à l'atmosphère. Le CO₂ atmosphérique diffuse alors lentement dans la porosité des granulats et réagit avec la portlandite pour combler la porosité avec du carbonate de calcium. Ce procédé permet de diminuer l'absorption et d'améliorer quelque peu les propriétés mécaniques. Toutefois les temps de contact nécessaire pour obtenir des améliorations notables sont de l'ordre de plusieurs mois à plusieurs années. Ceci nécessite d'aménager des aires de stockage sur de longues périodes. Ce n'est pas possible à proximité des grands centres urbains, gros pourvoyeurs de granulats recyclés, et représente des coûts prohibitifs par rapport au faible coût des granulats naturels.

Une solution consiste à accélérer leur carbonatation, en mettant les GBR en contact avec du CO₂ atmosphérique à une concentration et une pression élevées. Des études menées en laboratoire ont montré la faisabilité du procédé et révélé une amélioration des propriétés mécaniques des GBR ainsi traités, ainsi qu'une diminution de leur taux d'absorption en eau.

L'industrialisation de cette technique reste encore à démontrer mais elle pourrait en plus permettre, par exemple, de stocker le CO₂ atmosphérique dans ces matériaux cimentaires et ainsi réduire l'impact carbone induit par la fabrication du ciment composant les bétons. Toutefois, de nouvelles études –dont fait partie cette thèse- commencent à proposer une autre démarche pour accélérer la carbonatation des GBR : l'utilisation de bactéries capables de produire des carbonates de calcium (CaCO₃).

La bioproduction de CaCO₃ est une capacité très répandue dans le monde du vivant. Chez de nombreuses espèces microbiennes, la production de CaCO₃ survient lorsque la souche met en place un environnement favorisant la formation de CaCO₃, leur nucléation et leur croissance sur sa membrane externe. Ce phénomène de bioproduction de CaCO₃ est déjà employé dans des domaines comme le renforcement de la cohésion des sols, la réparation et la protection de roches calcaires de monuments historiques, ou encore l'amélioration de la durabilité des bétons et leur réparation. Ces solutions se sont développées afin de proposer des techniques plus écologiques que celles déjà proposées sur le marché et, dans le cas des roches carbonatées, la biocarbonatation permet de limiter l'impact visuel des traitements sur les monuments.

La voie de production de CaCO₃ la plus étudiée par ces études est celle de la dégradation de l'urée, au travers de l'enzyme uréase. Au travers de cette voie métabolique, les bactéries forment des ions hydroxyles qui basifient l'environnement proche des cellules et favorisent une réaction entre les ions carbonates également produits et des ions calcium qui auront interagit avec la membrane cellulaire. Une autre voie de production de CaCO₃ a également été identifiée, celle de l'interconversion du CO₂ en HCO₃⁻ au travers de l'activité de l'enzyme anhydrase carbonique.

Toutes ces études menées sur la biocarbonatation au contact des matériaux, ont montré : (1) une amélioration de la cohésion des sols traités sur une certaine profondeur, (2) une diminution du taux d'absorption en eau des roches calcaires et des bétons ou encore (3) la formation d'une couche de CaCO₃ à surface de fissures formées sur des bétons. Ainsi, les bactéries sélectionnées dans ces études sont capables de réaliser la bioproduction de CaCO₃ à la surface de matériaux cimentaires, dont le pH élevé représente un environnement extrême pour les microorganismes.

Ces résultats ont inspiré la mise en place de cette thèse, qui a pour but d'accélérer la carbonatation de GBR au travers de la bioproduction de CaCO₃ par des bactéries. L'utilisation

d'un tel procédé permettrait de développer une filière écologique de retraitement des déchets inertes issus du domaine de la construction et de la démolition. Au cours de cette étude, plusieurs points seront étudiés :

- 1) La caractérisation des GBR utilisés, issus d'une production antérieure datant de 2010, dont la composition est connue mais dont les caractéristiques ont évolué au cours du stockage,
- 2) La sélection de souches bactériennes capables de survivre à des pH très alcalins proche de ceux du béton en milieu aérobie et de produire des CaCO_3 suivant les deux voies métaboliques identifiées,
- 3) Le développement et l'évaluation de l'efficacité de protocoles de mise en contact des bactéries avec les GBR, pour diminuer leur d'absorption en eau par précipitation de CaCO_3

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Introduction

Pour atteindre les objectifs de valorisation de 70% des déchets non inertes non dangereux issus des BTP, avant l'échéance 2020, il est impératif de développer des systèmes de recyclage de ces déchets. L'enjeu est d'autant plus important que la mise en place de vastes projets d'infrastructures comme le Grand Paris peuvent générer entre 30 et 40 millions de tonnes de déchets (Journal Officiel Sénat 2014). Les déchets inertes et non dangereux issus de ces chantiers peuvent être valorisés en gravats dans des assises de chaussées, des remblais de tranchées, être refondus (métaux et plastiques), employés pour produire des emballages (papiers, cartons...) ou encore être incinérés (polystyrène, bois non traités...) (ADEME 2012). Réemployer des matériaux sous forme de gravats directement sur chantier permet d'ailleurs de limiter l'extraction de ressources non renouvelables comme les granulats naturels. Mais, pour que ces matériaux recyclés soient utilisés dans de nouvelles constructions, il faut s'assurer que leur qualité soit suffisante pour ne pas affaiblir les structures. Notre travail se borne à l'étude de matériaux cimentaires recyclés et afin de connaître les problématiques liées à ce matériau et les moyens existant pour les régler, nous commençons par réaliser une étude bibliographique.

2. Les granulats de béton

2.1. Origine et composition

Les chantiers de construction et déconstruction produisent des quantités importantes de matériaux à la composition hétérogène (Figure 1-1 et Figure 1-2).

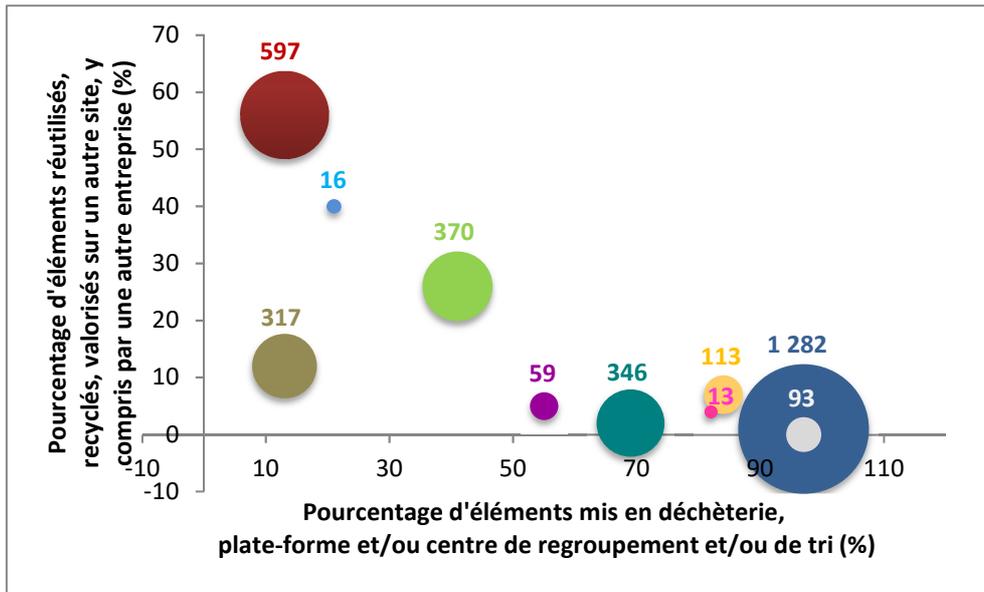


Figure 1-1 : Quantités de déchets non dangereux non inertes des Travaux publics et modes de gestion en 2008 (SOeS 2011a, 2011b). La quantité totale de chaque déchet (exprimée en milliers de tonnes) est indiquée à côté de la sphère le représentant. Sont représentés : en bleu foncé, les Mélanges inertes et déchets non dangereux non inertes ; en rouge, les Déchets végétaux ; en vert clair, les Métaux ferreux ou non ferreux ; en vert foncé, le Mélange de déchets non dangereux non inertes ; en marron, le Bois brut ou traité avec des substances non dangereuses ; en orange, les Matières plastiques ; en gris, le Plâtre ; en violet, les Autres types de déchets non dangereux non inertes ; en bleu clair, les Pneus usagés, en rose, les Matériaux isolants.

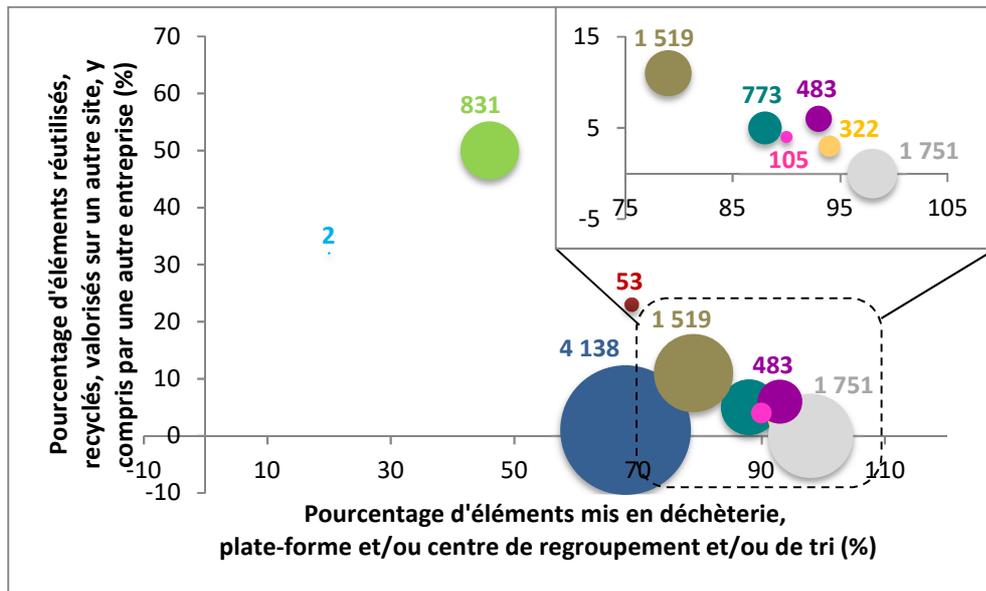


Figure 1-2 : Quantités de déchets non dangereux non inertes des Bâtiments et modes de gestion en 2008 (SOeS 2011a, 2011b). La quantité totale de chaque déchet (exprimée en milliers de tonnes) est indiquée à côté de la sphère le représentant. Sont représentés : en bleu foncé, les Mélanges inertes et déchets non dangereux non inertes ; en rouge, les Déchets végétaux ; en vert clair, les Métaux ferreux ou non ferreux ; en vert foncé, le Mélange de déchets non dangereux non inertes ; en marron, le Bois brut ou traité avec des substances non dangereuses ; en orange, les Matières plastiques ; en gris, le Plâtre ; en violet, les Autres types de déchets non dangereux non inertes ; en bleu clair, les Pneus usagés, en rose, les Matériaux isolants.

La mise en décharge de ces déchets en installation de stockage est une solution de plus en plus problématique pour des raisons environnementales et économiques (Pacheco-Torgal et al. 2013). C'est pourquoi ces déchets sont revalorisés sous forme, notamment, de granulats de

béton recyclé. Pour cela, des étapes de tri, concassage et dé-ferraillage sont imposées aux déchets, la granulométrie des granulats produits dépendant du concasseur employé. Suivant la qualité du béton à partir duquel les granulats recyclés sont produits, une fraction plus ou moins importante des granulats se dégrade en fines en passant dans le concasseur, essentiellement formés du mortier primaire (Hansen 1986). Malgré ce recyclage, les granulats naturels restent entourés par le mortier primaire (Figure 1-3). Ce mortier primaire est un élément très poreux qui réduit la résistance des granulats recyclés et leur apporte une rugosité supérieure à celle des granulats naturels. Ce sont les caractéristiques de ces granulats recyclés que nous allons détailler par la suite.

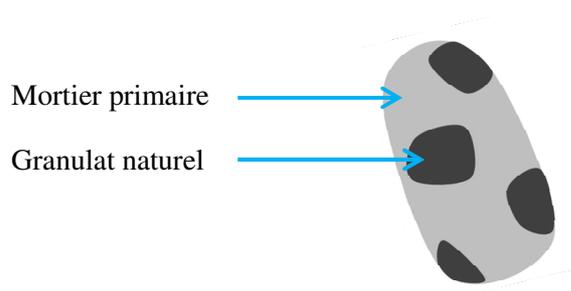


Figure 1-3: Schéma d'un granulats de béton recyclé

2.2. Caractéristique des granulats recyclés

2.2.1. Valorisation des granulats issus de la déconstruction

Le recyclage du béton des ouvrages d'art est plus simple à réaliser que celui du béton issu de bâtiments car, contrairement aux ouvrages d'art, les bâtiments sont composés de plusieurs matériaux différents (bois, verre, céramique...). Le recyclage du béton issu de bâtiments est donc plus onéreux et pas nécessairement réalisé. Pour que le béton recyclé à partir des bâtiments soit utilisable, il faut qu'il subisse une première opération de séparation des matériaux (Figure 1-4) :

- un dé-ferraillage par passage d'un aimant ;
- une élimination des éléments flottants (bois...) par une immersion ;
- un tri visuel

La taille des éléments restant est ensuite réduite par l'utilisation d'un brise-roche hydraulique qui coupe des éléments longs par une cisaille. Les impuretés les plus grosses sont éliminées par une nouvelle étape de tri visuel avant que les éléments subissent une opération de concassage suivi d'un criblage.

Les granulats de béton obtenus sont majoritairement employés dans le domaine routier qui consomme de grandes quantités de matériaux cimentaires. Toutefois, un emploi des granulats recyclés est autorisé dans certains pays, suivant des normes bien précises (UNPG; Corinaldesi 2011; McNeil & Kang 2013; Pacheco-Torgal *et al.* 2013). En effet, les propriétés mécaniques de granulats recyclés ne permettent pas leur mise en œuvre dans les bâtiments ou les ouvrages d'art en remplaçant complètement les granulats naturels.

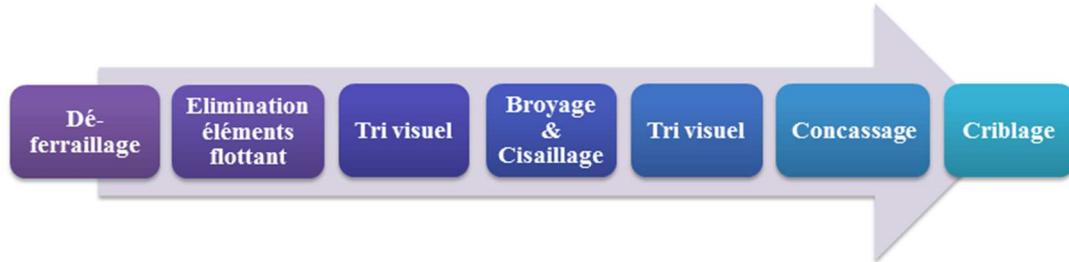


Figure 1-4: Schéma des étapes de valorisation des granulats issus de la déconstruction

2.2.2. Granulométrie, rugosité, angularité

La granulométrie des granulats recyclés est liée à la nature du béton d'origine. Un béton de faible qualité, une fois concassé, aura une plus grande teneur en fines qu'une roche massive subissant le même traitement (Hansen 1986). Cette quantité de fines peut potentiellement améliorer la compacité du mélange en diminuant la porosité. Quant à la présence de l'ancien mortier, il apporte au granulat recyclé une rugosité plus importante que celle d'un granulat naturel, mais en diminue l'angularité (Etxeberria *et al.* 2007; McNeil & Kang 2013). Ces caractéristiques vont améliorer la mise en œuvre des granulats recyclés en favorisant l'écoulement de la pâte de ciment autour des agrégats.

2.2.3. Caractéristiques mécaniques

La résistance des granulats de béton recyclé est influencée par la présence du mortier primaire. La fragilité du mortier adhérent au granulat induit une diminution de la résistance à la fragmentation se traduisant par un coefficient de Los Angeles (LA) plus élevé que celui obtenu pour des granulats naturels. Des études réalisées par Tavakoli et Soroushian (1996) et Shayan et Xu (2003) montrent que les valeurs du coefficient de LA pour des granulats naturels sont de l'ordre de 11% (basalte) et 22,9% (calcaire) tandis que ces valeurs atteignent 32% et 26,4-42,7% pour des granulats recyclés. Ces valeurs montrent que les granulats recyclés

résistent mal aux contraintes mécaniques, ce qui est problématique dans le cadre d'une mise en œuvre dans le domaine routier (qui supporte le passage de véhicules lourds) ou du bâtiment.

2.2.4. Porosité des granulats recyclés

La quantité de mortier primaire adhérent aux granulats est à l'origine de la porosité des granulats recyclés. Cette quantité de mortier est variable à cause de sa faible résistance à la fragmentation au cours du concassage. Une estimation de la quantité de mortier restante peut être réalisée par des techniques telles que (Hansen & Narud 1983; Hansen 1986; Larbi *et al.* 2000; de Juan & Gutiérrez 2009):

- la dissolution dans de l'acide, qui consiste à dissoudre l'ancienne pâte de ciment dans une solution d'acide chlorhydrique et de mesurer la différence de masse avant et après traitement ;
- la production d'un nouveau béton, en mélangeant les granulats recyclés avec une pâte de ciment colorée, permettant d'estimer la proportion de mortier primaire présent sur des tranches du béton ;
- le traitement thermique, en effectuant plusieurs cycles d'immersion des granulats dans de l'eau qui est évaporée à haute température avant une nouvelle immersion des granulats dans de l'eau froide, afin de faciliter l'élimination de l'ancien mortier.

Afin de contrer les conséquences de la forte absorption en eau des granulats de béton recyclé, il est nécessaire d'estimer la quantité de mortier primaire adhérent aux granulats naturels. Des études comparant l'absorption en eau de granulats naturels et de granulats recyclés ont montré que les granulats naturels ont un taux d'absorption en eau de 0,5-1%, voire 1-2,5%, tandis que les granulats recyclés ont une absorption en eau allant de 4-4,7% voire 4,9-5,2%. Toutefois, la porosité des granulats recyclés peut être directement estimée grâce à des techniques permettant d'évaluer la surface spécifique d'un solide, telles que :

- l'adsorption physique d'un gaz sur un solide déterminée par l'utilisation de la théorie de Brunauer, Emmett et Teller qui permet de déterminer le nombre de molécules nécessaires pour recouvrir la surface du solide d'une monocouche moléculaire sans que celle-ci soit effectivement remplie (Rouquerol 1968);
- la méthode de détermination gravimétrique basée sur la mesure de l'évolution de la masse de l'échantillon au cours du temps, à conditions ambiantes fixées, permettant d'obtenir des isothermes d'adsorption de vapeur lorsqu'une méthode dynamique est employée (Ouoba *et al.* 2010).

Il est également possible d'effectuer un essai porométrique au mercure afin de déterminer le volume total des vides par analyse du tracé de la courbe de pression capillaire mercure-vide (Pellerin 1980).

Ces données sont d'autant plus importantes qu'elles peuvent impacter la mise en œuvre d'un béton, avec un apport supplémentaire d'eau dans le mélange pour compenser les taux d'absorption élevés des granulats recyclés. Par ailleurs, la présence d'un matériau aussi poreux que le mortier primaire peut potentiellement impacter les propriétés mécaniques du matériau qui incorpore les granulats recyclés.

2.3. Propriétés mécaniques des bétons incorporant les granulats issus de la déconstruction

2.3.1. Résistance à la compression

La valeur de la résistance d'un béton incorporant les granulats recyclés est influencée par trois facteurs : le ratio eau/ciment, la proportion de granulats naturels remplacés par les granulats recyclés et la quantité de mortier primaire adhérent aux granulats naturels.

La plupart des recherches ont montré que 25 à 30% des granulats naturels peuvent être remplacés par des granulats recyclés sans que la résistance du béton les incorporant ne soit compromise et sans changement de la composition du mélange. La variation de résistance des bétons incorporant les granulats recyclés est liée à la qualité du béton dont sont initialement issus les granulats. La résistance d'un béton incorporant des granulats issus d'un béton à haute résistance sera plus élevée que celle d'un mélange incorporant des granulats recyclés issus d'un béton moins performant (Limbachiya, Leelawat & Dhir 2000; Etxeberria *et al.* 2007; McNeil & Kang 2013). Ces résultats sont liés à la performance de la zone d'interphase entre le granulat et le mortier primaire (Figure 1-5) : si la performance de la zone d'interphase granulat-mortier ancien est plus importante que la zone d'interphase mortier primaire-nouveau mortier, alors, la résistance du béton incorporant les granulats recyclés équivaut à celle d'un béton conventionnel. La résistance diminue quand la zone d'interphase granulat-mortier primaire est plus faible que la zone d'interphase mortier primaire-nouveau mortier. C'est pourquoi des granulats recyclés d'un béton de haute résistance permettront d'obtenir un béton de résistance similaire à celle d'un béton conventionnel (Otsuki, Miyazato & Yodsudjai 2003). Par ailleurs, Yang *et al.* (2008) ont observé dans leur étude qu'un béton produit avec des granulats recyclés présentant une absorption modérée en eau avait une résistance à la compression allant de 60 à 80% de la valeur obtenue pour un béton conventionnel. Ils ont aussi pu constater que cette

valeur de résistance augmentait au cours du temps. En effet, l'eau contenue dans la porosité des granulats est libérée au cours du temps et hydrate plus longtemps le ciment, ce qui augmente la résistance du matériau. Cependant, bien que la résistance du béton contenant des granulats recyclés augmente au cours du temps, elle reste inférieure à celle du béton conventionnel (Nixon 1978).

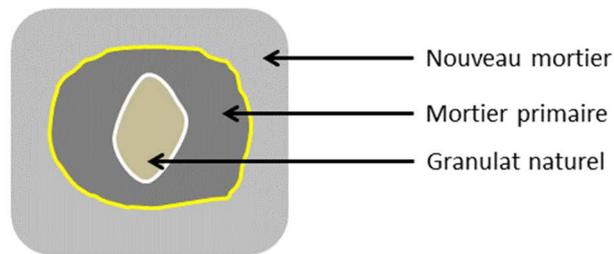


Figure 1-5: Schéma d'un béton incorporant des granulats de béton recyclé, vu en coupe transversale. Sont représentés : en jaune, la zone d'interphase granulat recyclé-pâte de ciment ; en blanc, la zone d'interphase granulat-mortier primaire.

2.3.2. Contrainte à la rupture

La contrainte à la rupture est moins affectée par les granulats de béton recyclé que la résistance à la compression. De nombreux tests ont montré que la contrainte à la rupture des bétons incorporant des granulats de bétons recyclés est comparable à celle du béton conventionnel (Hansen 1986). Dans certains cas, les résultats obtenus avec des bétons contenant des granulats recyclés sont meilleurs que ceux obtenus avec des bétons conventionnels (Kang *et al.* 2012; McNeil & Kang 2013). Ces résultats s'expliqueraient par la présence du mortier primaire adhérent aux granulats et plus particulièrement à son absorption en eau et à l'efficacité de la zone d'interphase granulat recyclé-nouveau mortier (Etxeberria *et al.* 2007). Alors que le mortier résiduel constitue une zone de faiblesse pour les tests de résistance à la compression, une quantité limitée augmente l'élasticité du matériau en créant une transition plus souple entre la pâte de ciment et le granulat recyclé auquel il adhère. Ainsi, tout comme dans le cas de la résistance à la compression, la nature du granulat recyclé affecte les résultats obtenus pour les degrés de résistance à la rupture du béton incorporant ces granulats. L'origine des granulats

recyclés est donc une donnée importante à prendre en compte dans les études menées sur les bétons contenant des granulats recyclés (McNeil & Kang 2013).

2.3.3. Modules de rupture et d'élasticité

Le module de rupture, une mesure de la résistance à la flexion, et le module d'élasticité, une mesure de la rigidité du béton, sont souvent déduits de la résistance à la compression, mais cette relation ne représente pas aussi bien le béton incorporant des granulats recyclés qu'un béton conventionnel.

Généralement, le module d'élasticité des bétons incorporant les granulats recyclés de béton est plus faible que celui des bétons conventionnels, mais l'importance de cette diminution est significativement différente d'une étude à l'autre (Frondistou-Yannas 1977; Hansen 1986; Rao, Jha & Misra 2007; McNeil & Kang 2013). La cause la plus probable de cette variabilité des résultats est la différence des propriétés des granulats recyclés employés dans chaque étude. Cela tendrait à prouver que le module d'élasticité est influencé par les propriétés des granulats recyclés plus que par les propriétés du béton les incorporant. Mais, de même que pour le module de rupture, des études supplémentaires sont à mener afin de développer une relation qui pourrait être employée pour prédire le comportement du béton incorporant des granulats recyclés.

2.4. Traitement et réemploi des granulats

Nous avons pu voir à quel point les propriétés mécaniques des granulats de béton recyclés peuvent influencer les caractéristiques mécaniques des matériaux les incorporant. C'est pourquoi des études sont menées afin d'améliorer la qualité de ces granulats et faciliter leur utilisation.

2.4.1. Les différents traitements des granulats issus de la déconstruction

2.4.1.1. Carbonatation naturelle

Dans le but de diminuer l'absorption en eau des granulats de béton recyclés, des techniques sont étudiées pour accélérer la carbonatation naturelle de ces derniers. Pour cela, les chercheurs (Silva *et al.* 2015) cherchent à favoriser la transformation de la portlandite (Ca(OH)_2), en calcite. Cette réaction se réalise après diffusion du dioxyde de carbone (CO_2) dans le matériau au travers des porosités. Si le matériau est humide, le CO_2 va former de l'acide

carbonique qui réagit avec la portlandite pour former des carbonates de calcium. Ces carbonates de calcium vont alors combler les porosités et diminuer le taux d'absorption en eau des granulats recyclés. Il s'agit d'une réaction naturelle lente, c'est pourquoi plusieurs équipes cherchent à l'accélérer en utilisant des enceintes dans lesquels la concentration du CO₂ est plus importante que dans l'air. Et l'utilisation de ces enceintes en usine ou sur chantier n'est pas encore envisagée.

2.4.1.2. Traitements chimiques

Des recherches sont menées pour employer des additifs permettant d'améliorer la qualité des granulats recyclés et diminuer leur absorption en eau (Figure 1-6). Une étude réalisée par Li et al. (2009) a montré qu'un traitement préalable des granulats recyclés par une poudre pouzzolane (fumée de silice ou cendre volante ou laitier de haut fourneau ou leur combinaison), avant leur incorporation dans un nouveau mélange, améliorerait leurs caractéristiques. Ils ont ainsi pu observer une résistance du béton incorporant ces granulats recyclés traités par une combinaison de poudre pouzzolanes, similaire celle d'un béton incorporant des granulats non traités, après 7 jours et 28 jours. Cela s'expliquerait par l'augmentation de la compacité du mélange grâce à la présence d'éléments à la granulométrie variable, ainsi qu'à un renforcement de la zone d'interphase mortier ancien-nouveau mortier. Cependant, la résistance à la flexion des bétons contenant ces granulats recyclés traités par des poudres pouzzolanes combinées est plus importante que celle du béton contenant des granulats recyclés non traités, après 7 jours et 28 jours. Et cela s'expliquerait par une augmentation de la densité du béton incorporant les granulats recyclés traités, qui le rend moins flexible.

Des résultats similaires ont été obtenus par Ann *et al.* (2008) avec des bétons contenant des granulats recyclés également traités avec des poudres pouzzolanes (cendres volantes ou laitier de haut fourneau granulé). La densité du béton incorporant ces granulats recyclés traités est augmentée non seulement par la plus grande variabilité de taille des éléments incorporés (granulats et poudres pouzzolanes), mais aussi par une hydratation latente des poudres. Le gel insoluble d'hydrate de silicate de calcium (C-S-H) de la matrice cimentaire, résulte d'une réaction pouzzolanique plus lente que la réaction d'hydratation du ciment. En s'étendant, le gel va densifier la matrice cimentaire et améliorer la résistance à la compression du matériau et diminuer sa perméabilité au point de présenter des caractéristiques similaires à celles du béton témoin.



Figure 1-6 : Schéma résumant les travaux menés par Ann et al. 2008, Li et al. 2009, où GBR signifie « granulats de béton recyclé », GN signifie « granulats naturels », et PP correspond à « poudre pouzzolane ».

2.4.1.3. Traitements biologiques

Très récemment, l'utilisation de micro-organismes pour améliorer la qualité des granulats de bétons recyclés a été explorée. Grabiec et al. (2012) et Wang et al. (2017) ont effectué un essai d'amélioration des granulats recyclés au travers d'un traitement de ces derniers dans un bouillon de bactéries (respectivement *Sporosarcina pasteurii* et *Bacillus sphaericus*) capables de produire des carbonates de calcium (CaCO_3). Pour cela, chaque équipe a plongé pendant environ une journée des granulats recyclés de bétons plus ou moins performants, dans des baignoires bactériennes dans lesquelles une source de calcium a été ajoutée. A la fin du traitement, l'absorption en eau des granulats a été déterminée et comparée avec celle mesurée avant traitement. Ainsi, chaque équipe a pu observer un dépôt de CaCO_3 produits par les bactéries à la surface des granulats, ainsi qu'une légère diminution de l'absorption en eau de ces derniers. Mener des recherches supplémentaires sur ce sujet permettrait d'améliorer la qualité des granulats de bétons recyclés en employant une technique plus écologique.

2.4.2. Conclusion

Nous avons pu voir l'importance et l'urgence de la valorisation des matériaux cimentaires issus des chantiers de construction et de déconstruction, notamment sous forme de granulats de béton recyclés. Cependant, les caractéristiques mécaniques de ces granulats recyclés impactent les propriétés mécaniques des matériaux les incorporant. Ainsi, des bétons incorporant des granulats recyclés ont une résistance à la compression inférieure à celle de bétons incorporant des granulats naturels. Toutefois, l'incorporation de granulats de béton recyclés dans un nouveau béton permet de lui conférer une meilleure contrainte à la rupture grâce au module d'élasticité du mortier primaire. Mais pour faciliter l'utilisation des granulats recyclés, il est impératif d'améliorer leur qualité, afin de diminuer leur absorption en eau et leur

impact sur la résistance en compression des matériaux les incorporant. C'est pourquoi des études sont réalisées sur le développement de traitements visant à améliorer les granulats recyclés. Parmi ces derniers, l'utilisation de bactéries productrices de CaCO_3 nous interpelle particulièrement car il permet de développer un traitement écologique et relativement rapide (de l'ordre de quelques semaines). Nous allons donc désormais nous intéresser au phénomène de bioprécipitation des CaCO_3 pour mieux comprendre son fonctionnement.

3. La production de carbonates de calcium

La formation de CaCO_3 se réalise en milieu aqueux par une réaction entre les ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} (Équation 1).



Les carbonates de calcium ainsi formés peuvent se présenter sous six polymorphes. Les plus fréquemment rencontrés sont (Figure 1-7) :

- la calcite, la forme la plus stable, de système cristallin rhomboédrique,
- l'aragonite, métastable, de système cristallin orthorhombique,
- la vaterite, instable, de système cristallin hexagonal.

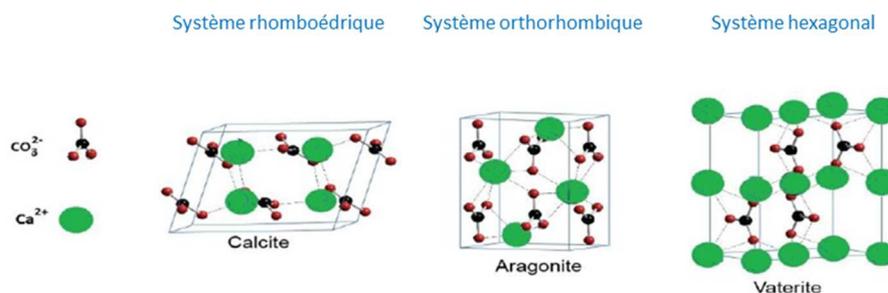


Figure 1-7 : les trois polymorphes de CaCO_3 : calcite, aragonite et vaterite (Dizaj *et al.* 2015)

3.1. Paramètres impactant la formation des carbonates de calcium

La formation de CaCO_3 dépend de la concentration en ions calcium et carbonate doit être suffisante pour qu'aucun des éléments ne soit limitant. Or, l'ion carbonate est issu de la dissociation successive du polyacide H_2CO_3 . Ainsi, d'après le diagramme de prédominance acido-basique relatif aux carbonates, en-dessous d'un pH de 10,3, les ions CO_3^{2-} sont

minoritaires dans le milieu (Figure 1-8). La formation de CaCO_3 serait donc favorisée à un pH supérieur à 11,3, pH à partir duquel les ions CO_3^{2-} sont prédominants.

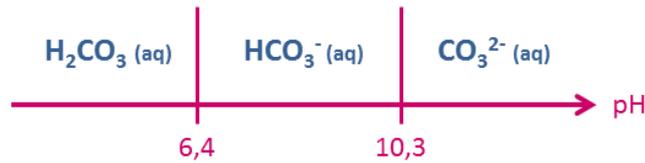


Figure 1-8: Diagramme de prédominance acido-basique relatif aux espèces H_2CO_3 , HCO_3^- et CO_3^{2-}

Par ailleurs, l'espèce H_2CO_3 étant issue de la solubilisation du dioxyde de carbone (CO_2) gazeux (Équation 2), la pression de ce gaz peut également influencer la formation de CaCO_3 . En effet, plus il y a de CO_2 et plus il pourra se solubiliser pour former du H_2CO_3 qui, suivant le pH du milieu, pourra se dissocier en HCO_3^- puis CO_3^{2-} .

Équation 2



En outre, la nucléation et la croissance des cristaux en l'un ou l'autre des polymorphes (calcite, aragonite et vaterite) est déterminée par différents facteurs : le pH, la température, la pression de CO_2 ou encore la présence de cations.

D'après les études menées sur la cristallisation du CaCO_3 , les paramètres les plus influençant sont le pH et la température du milieu. En effet, Tai & Chen (1998) et Weiss *et al.* (2014) ont pu observer des gammes de températures et de pH dans lesquelles les polymorphes du CaCO_3 étaient prédominants (Figure 1-9). Au-delà d'un pH de 12, la calcite est la forme prédominante. A pH inférieur à 12, l'aragonite et la vaterite sont majoritaires par rapport à la calcite mais leurs prédominances varient en fonction de la température. Ainsi à température faible (7°C) la vaterite est majoritaire et à température élevée (58°C) c'est l'aragonite qui prédomine.

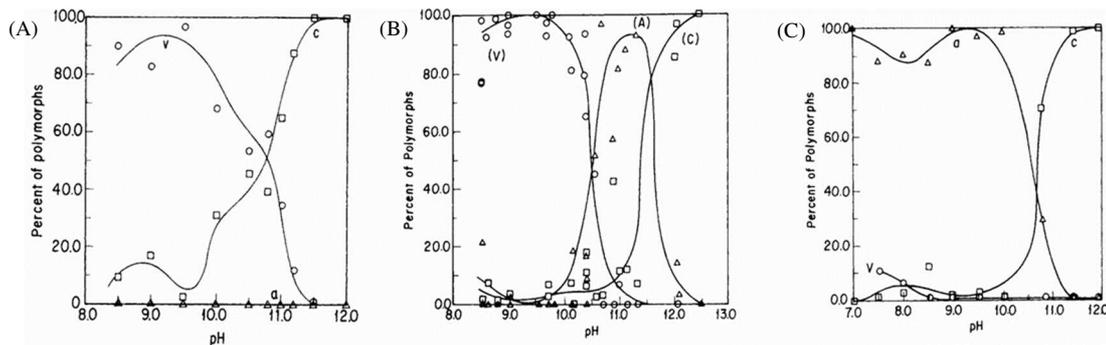


Figure 1-9: Effets du pH sur les taux de production des polymorphes du CaCO_3 à 7°C (A), 24°C (B) et 58°C (C). Les points ronds correspondent aux résultats obtenus pour la vaterite (V), les points triangulaires, à ceux obtenus pour l'aragonite (A) et les points carrés à ceux obtenus pour la calcite (C). (Tai & Chen 1998)

De plus un autre facteur important à prendre en compte est la présence d'autres cations que Ca^{2+} . Ainsi, Matsumoto *et al.* (2010) et Wang *et al.* (2016) ont observé que l'ajout de ces ions dans un milieu censé favoriser la production de calcite, menait à la formation d'aragonite.

La précipitation des carbonates de calcium est un phénomène naturel qui peut s'effectuer de manière abiotique et biotique. Ainsi la capacité à former des carbonates de calcium se trouve chez de nombreuses espèces du vivant telles que les micro-organismes, les végétaux supérieurs ainsi que les animaux supérieurs (mollusques, crustacés, les vertébrés ect.).

3.2. La formation des carbonates de calcium par les bactéries

De nombreuses espèces de bactéries participent à la précipitation de carbonates de calcium selon différentes voies métaboliques distinctes :

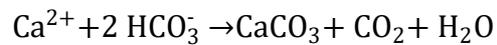
- l'autotrophie, qui est effectuée par les bactéries dont la source de carbone est uniquement ou principalement issue du CO_2 ;
- l'hétérotrophie, qui est réalisée par les bactéries dont la source de carbone provient de constituants organiques.

Trois groupes bactériens autotrophes peuvent produire des carbonates de calcium :

- les méthanogènes non-méthyllogènes, qui utilisent le dihydrogène (H_2) et le dioxyde de carbone (CO_2) de leur environnement pour produire du méthane (CH_4) ;
- les oxygéniques photosynthétiques, qui utilisent l'énergie lumineuse grâce à la chlorophylle et réalisent une photosynthèse avec production d'oxygène;

- les photosynthétiques dites « anoxiques », qui réalisent une photosynthèse sans production d'oxygène *via* des pigments photosynthétiques appelés bactériochlorophylles, en réduisant des éléments soufrés, l'hydrogène ou des composés organiques.

Ces trois mécanismes favorisent la précipitation de carbonate de calcium grâce à leur consommation en carbone provenant du CO₂. En effet, la diminution du CO₂ induit une chute de la pression partielle et oriente l'équilibre des ions carbonate vers la précipitation des carbonates de calcium suivant la réaction suivante :



Les microorganismes hétérotrophes peuvent précipiter les carbonates de calcium de façon active ou passive. La précipitation active par les microorganismes est liée à des phénomènes d'échanges membranaires et notamment au fonctionnement des pompes Ca²⁺. La précipitation passive résulte de la production d'ions carbonate et hydrogénocarbonate, liée au métabolisme, qui vont s'accumuler dans le milieu. En même temps, les déchets du métabolisme vont alcaliniser le milieu. Ces deux facteurs vont favoriser la précipitation de carbonates de calcium. Ces microorganismes hétérotrophes interviennent dans les cycles du soufre ou de l'azote (Castanier et al., 1999). Parmi toutes les voies de production employées par ces organismes hétérotrophes, celle utilisant l'hydrolyse de l'urée est la plus répandue et la plus étudiée (Dhami, Reddy & Mukherjee 2013). Une autre voie métabolique peut se compléter ou se combiner à la précédente : l'interconversion du dioxyde de carbone CO₂ et du bicarbonate H₂CO₃ catalysée par l'anhydrase carbonique (Supuran & Scozzafava 2007; Achal & Pan 2011). Les deux voies sont détaillées dans la Figure 1-10.

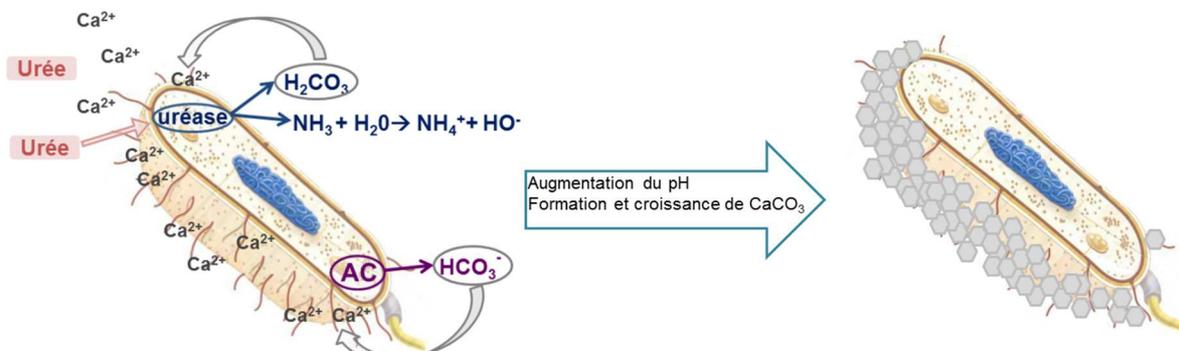


Figure 1-10 : Schéma résumant le procédé de biocarbonatation. AC : anhydrase carbonique

3.2.1. Les mécanismes de la biocarbonatation de CaCO₃

En ce qui concerne la voie de l'hydrolyse de l'urée (H₂N-CO-NH₂), après pénétration de cette molécule dans la cellule bactérienne par diffusion, son hydrolyse suit la réaction présentée dans l'Équation 3 (Krajewska 2009):



Cette réaction, catalysée par l'uréase, produit du carbamate (H₂N-COOH) et de l'ammoniac (NH₃). Une fois dans le milieu extérieur, ces deux produits vont réagir avec l'eau présente dans l'environnement et produire des ions hydroxyles (HO⁻) pour l'ammoniac (Équation 4) et de l'acide carbonique (H₂CO₃) pour le carbamate (Équation 5).



Les ions hydroxyles (Équation 4) vont basifier le milieu et favoriser la réaction entre les carbonates produits (Équation 5) et les ions calcium présents sur les sites de nucléation membranaires (Équation 6).



La réaction de carbonatation crée ainsi une gaine autour de la cellule, qui continuera à s'épaissir jusqu'à ce que les carbonates soient consommés (Castanier, Le Métayer-Levrel & Perthuisot 1998; Li *et al.* 2013).

Pour ce qui est de l'interconversion du CO₂ en HCO₃⁻ (Équation 7) catalysée par l'enzyme AC (EZn²⁺-HO⁻), cette voie se réalise dans la cellule bactérienne suivant l'Équation 7.



De la même façon que précédemment (Équation 6), les ions HCO_3^- vont réagir avec les ions Ca^{2+} présents sur la membrane cellulaire pour former des carbonates de calcium autour de la cellule (Achal & Pan 2011).

L'interaction des ions Ca^{2+} avec la membrane cellulaire chargée négativement permet la nucléation des carbonates de calcium pour les deux voies métaboliques décrites. Les sites d'interactions possibles avec les ions Ca^{2+} présents dans l'environnement de la cellule, vont être différents et plus ou moins accessibles en fonction du type de membrane cellulaire (Gram positif et Gram négatif ; Annexe A et Figure 1-11). Ainsi, chez les bactéries à coloration Gram positif, les cations peuvent interagir avec les acides téichoïques et lipotéichoïques, nombreux et facilement accessibles. Et chez les bactéries à coloration Gram négatif, les cations peuvent interagir avec les lipopolysaccharides, également nombreux, mais sur une zone moins accessible, car proche de la membrane externe.

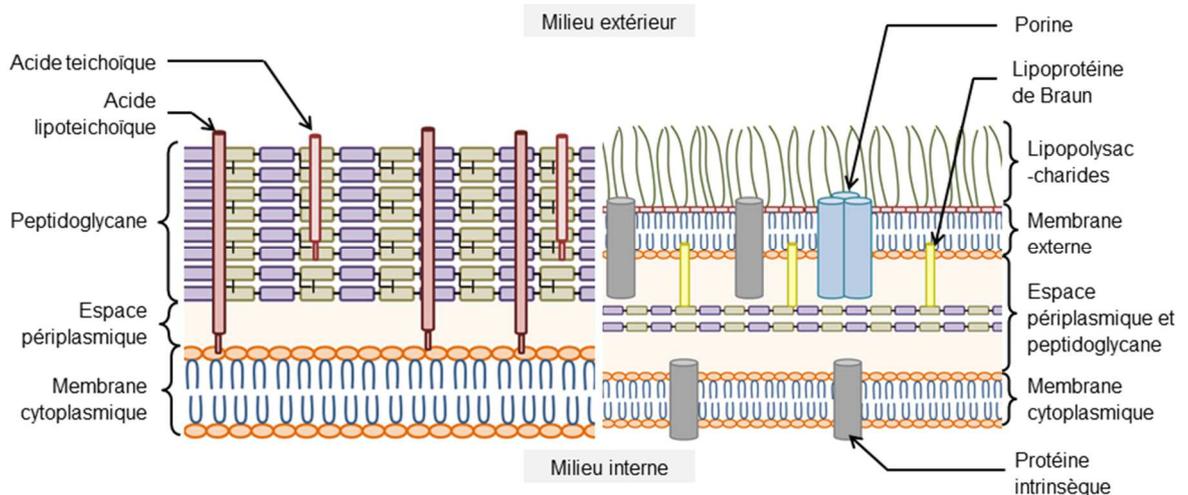


Figure 1-11: schéma des membranes externes des bactéries à coloration Gram positif (gauche) et des bactéries à coloration Gram négatif (droite).

3.2.2. Paramètres impactant la biocarbonatation

La production de CaCO_3 par les bactéries est influencée par différents paramètres tels que le type bactérien, la concentration de cellules dans le milieu et l'activité cellulaire en général. En effet, pour que la nucléation des CaCO_3 se réalise à la surface des microorganismes, il faut choisir des espèces bactériennes proposant des sites de nucléations sur leur paroi, et plus ils seront nombreux et accessibles, plus il y aura potentiellement de carbonatation. Par ailleurs,

puisque la carbonatation est favorisée à des pH basiques, il faut donc choisir des espèces bactériennes capables de se développer à des pH élevés avec de nombreux sites de nucléation.

La production de CaCO_3 pouvant être réalisée via l'interconversion du CO_2 en HCO_3^- ou par dégradation de l'urée, plus le milieu contiendra de bactéries capables de produire des carbonates en combinant ou non ces deux voies métaboliques et plus la production peut être importante. Un autre avantage dans le fait de travailler avec un milieu contenant une concentration cellulaire importante est que les sites de nucléations seront plus nombreux (Stocks-Fischer, Galinat & Bang 1999; Ramachandran, Ramakrishnan & Bang 2001; Anbu *et al.* 2016). Cependant, les études réalisées par Castanier *et al.* (1999) et Miot (2008) sur la bioprécipitation des CaCO_3 ont montré que le phénomène s'initie durant la phase de croissance des souches bactériennes et se poursuit au cours de la phase stationnaire. Il semble donc important de travailler dans des conditions favorisant la croissance des souches bactériennes biocalcifiantes. Ainsi, si la concentration cellulaire est trop importante, la charge maximale du milieu pourra être atteinte et donc limitera la croissance bactérienne.

D'autre part, Okwadha & Li (2010) ont montré qu'une concentration élevée d'urée dans le milieu pouvait diminuer l'efficacité de précipitation des CaCO_3 . C'est pourquoi des études ont été menées sur la concentration idéale d'urée à apporter dans un milieu pour que la précipitation des CaCO_3 soit optimisée au travers de la voie de dégradation de ce composé (De Muynck, De Belie & Verstraete 2010a). Ainsi ils ont pu déterminer que la concentration optimale était de 20g/L.

Les bactéries via leur genre, leur concentration et les nutriments peuvent influencer la quantité de CaCO_3 formé mais elles peuvent également influencer la cristallite formée. En effet, les cellules bactériennes produisent des exo-polysaccharides (EPS) qui leur permettent notamment de s'attacher à une surface ou entre-elles. La présence des EPS permet aux cellules de former plus de carbone inorganique dissous ainsi que d'influencer le polymorphisme et la morphologie des cristaux formés (Tourney & Ngwenya 2009). Les cellules exemptes d'EPS précipitent un mélange de calcite et de vaterite, contrairement aux cellules avec EPS qui précipitent préférentiellement de la calcite (Tourney & Ngwenya 2009). En plus de l'impact des EPS sur la nature des cristaux, la source de calcium a également un rôle important. Ainsi le chlorure de calcium permet d'obtenir des cristaux rhomboédriques alors que l'acétate de calcium est à l'origine de cristaux sphériques (De Muynck *et al.*, 2010).

3.3. Conclusion

La formation de carbonates de calcium -de façon abiotique ou contrôlée par les bactéries- est influencée par plusieurs paramètres (température, pH, nutriment, nature des ions calcium...) qu'il nous faut maîtriser afin d'obtenir une production de CaCO₃ aussi élevé que possible. Il paraît d'ores et déjà indispensable de travailler dans une gamme de pH basique et avec des microorganismes capables de croître et de réaliser la biocarbonatation dans ces conditions.

4. Utilisation de la bioprécipitation

4.1. Différents domaines d'étude

L'utilisation des bactéries capables de produire des carbonates de calcium a été étudiée dans de nombreux domaines. Parmi eux :

- la bioremédiation des contaminants inorganiques, suivant des mécanismes physicochimiques et biologiques complexes, permettant une immobilisation et une bioremédiation de ces éléments (Gadd 2000, 2004, 2010)
- le piégeage du calcium dans les eaux usées permettant de limiter la précipitation des carbonates de calcium durant leur traitement dans un bioréacteur anaérobie, menant ainsi à une diminution de l'efficacité du retraitement des eaux (van Langerak *et al.* 1998; Hammes *et al.* 2003),
- la séquestration du CO₂ atmosphérique, étudiée pour comprendre les mécanismes de formation des sédiments (Castanier *et al.* 1998; Castanier, Le Métayer-Levrel & Perthuisot 1999) et afin de diminuer le taux de ce gaz dans notre atmosphère (Ramanan *et al.* 2009),
- la consolidation des roches calcaires des monuments historiques par diminution de la perméabilité des pierres ou comblement des fissures (Le Métayer-Levrel *et al.* 1999),
- la consolidation des matériaux de construction (De Muynck *et al.* 2010a; Dhami *et al.* 2013),
- la modification des propriétés du sol, comme par l'augmentation de sa cohésion et de sa solidité afin de permettre le développement de constructions (Whiffin, van Paassen & Harkes 2007; Ivanov & Chu 2008).

Les domaines d'étude de la production de CaCO_3 par les bactéries étant nombreux, nous nous focaliserons sur ceux portant sur le domaine du génie civil. Les travaux menés dans ce domaine ont été réalisés pour différents objectifs et appliqués sur différents matériaux. Ces derniers ont été résumés dans le tableau suivant (Tableau 1-1).

Tableau 1-1 : Résumé des études menées

Support	Apport	Auteurs	Matériel biologique	Application	Type de roche (porosité)	Observations
Roche calcaire	Micro-organismes	Adolphe <i>et al.</i> (1990) Le Métayer-Levrel <i>et al.</i> (1999)	<i>Bacillus cereus</i>	Consolidation de roches ornementales	Tuffeau (40%), Saint Maximin (30%)	Consolidation des roches traitées
		Tiano <i>et al.</i> (1999)	<i>Micrococcus sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Consolidation de roches ornementales	Pietra di Lecce, calcaire bioclastique (40%)	↘ perméabilité à l'eau
		Rodriguez-Navarro <i>et al.</i> (2003) Dick <i>et al.</i> (2006)	<i>Myxococcus xanthus</i> <i>Bacillus sphaericus</i>	Consolidation de roches ornementales	Calcarenite bioclastique (24-32%) calcaire crionidal (16%) Euville,	Production de calcite, consolidation des roches, ↘ perméabilité à l'eau
		May <i>et al.</i> (2008)	<i>Pseudomonas putida</i>	Consolidation de roches ornementales	Portland à calcaire oolithique (20%)	Consolidation des roches
	Molécules d'une matrice organique	Tiano <i>et al.</i> (2006) Perito <i>et al.</i> (2014)	Extraits de la coquille de <i>Mytilus edulis</i> Extrait cellulaire de <i>Bacillus subtilis</i>	Consolidation de roches ornementales	Marbre calcitique artificiellement vieilli (Gioia, 1%), roche calcaire (Pietra di lecce, 35%) et dolomie (Pietra d'Angera, bioclastique, 18%)	Production de calcite, consolidation des roches poreuses
	Milieu de culture activateur	Jiménez-López <i>et al.</i> (2007, 2008)	Microorganismes présents sur le support	Consolidation de roches ornementales	Calcaire dégradé et calcarénite de carrière de La Escribania (24-32%)	Production de CaCO ₃ , consolidation des roches poreuses
Sol et sables	Micro-organismes	Whiffin <i>et al.</i> (2007)	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Stabilisation des sols	Sable Itterbeck (37,8%)	↗ cohésion du sable, perméabilité stable
		Abo-El-Enein <i>et al.</i> (2012)	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Stabilisation des sols	Sable issu de la région El-Wasta, Egypte	↗ cohésion du sable, ↘ perméabilité à l'eau
	Milieu de culture activateur	Ivanov & Chu (2008)	Microorganismes présents sur le support	Stabilisation des sols	Sols et sables	↗ cohésion du sable, ↘ perméabilité
Matériau cimentaire	Micro-organismes	Ramachandran <i>et al.</i> (2001) Sahoo <i>et al.</i> (2016)	<i>Bacillus pasteurii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus sphaericus</i>	Renforcer les matériaux de construction	Mortier composé de CEM I	↗ solidité de mortiers réparés, ↗ solidité du mortier contenant faible [cellules bactériennes] ↘ perméabilité
		De Muynck <i>et al.</i> (2008)	<i>Bacillus sphaericus</i>	Développer un nouveau traitement de surface	Béton/mortier composé de CEM I 52,5N (15-20%); e/c 0,5, 0,6 et 0,7	↘ perméabilité à l'eau et aux gaz
		Wiktor & Jonkers (2011)	<i>Bacillus alkalinitrilicus</i>	Développer un matériau auto-cicatrisant en environnement humide	Mortier composé de CEM I 42,5N e/c 0,5 ; 50% fines et 15% granulats légers	↘ largeur des fissures

4.2. Différents supports étudiés

4.2.1. Les roches carbonatées

Les premiers travaux développés sur la bioprécipitation ont porté sur la réparation et la consolidation des roches carbonatées des monuments historiques. Un traitement de surface a été étudié pour limiter l'infiltration de l'eau dans la pierre, par obstruction des pores, et leur consolidation par les cristaux de carbonates de calcium produits. Cette technique permet l'obtention d'une production de minéraux similaires à ceux de la roche traitée et donc, une consolidation plus efficace (De Muynck *et al.* 2010a). Différentes approches ont été développées.

4.2.1.1. Apport de bactéries capables de biominéralisation

Différents traitements menant à l'utilisation de la production de CaCO_3 par les micro-organismes ont ainsi été développés. Les traitements consistant à l'apport de micro-organismes directement sur le support sont les plus documentés. Le Métayer-Levrel *et al.* (1999) réalisent un dépôt d'une suspension bactérienne (*Bacillus cereus*), par aspersion, directement sur du tuffeau à traiter (Figure 1-12). Le but de leur étude est de développer un traitement de façade moins polluant que les traitements conventionnels. Leur traitement, réalisé dans 3 conditions différentes (laboratoire, extérieur et en enceinte de vieillissement accéléré) et analysé sur plusieurs mois a permis d'observer un impact positif des bactéries sur les roches traitées. Après quinze mois d'expérience, les chercheurs ont noté que la biocalcification a évolué de façon similaire sur chaque échantillon traité, placé en extérieur et que les échantillons traités sont moins dégradés que les non traités. Toutefois, lorsqu'une dégradation est observée sur les échantillons traités, elle se situe sur les zones où l'eau de pluie peut s'accumuler. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont plus marqués sur les échantillons placés en vieillissement accéléré, où les échantillons non traités sont dégradés, tandis que les échantillons traités ne le sont pas.

La même année, Tiano *et al.* (1999) menaient une étude similaire, en laboratoire (Figure 1-12) mais en employant deux souches bactériennes morphologiquement différentes, *Micrococcus sp.* ou *Bacillus subtilis*. L'équipe a pu noter une diminution de l'absorption en eau et la formation de structures polycristallines produites par les bactéries, sur les échantillons traités. Cependant, il n'existe aucune différence entre les échantillons traités et témoins, en ce qui concerne la cohésion de surface.

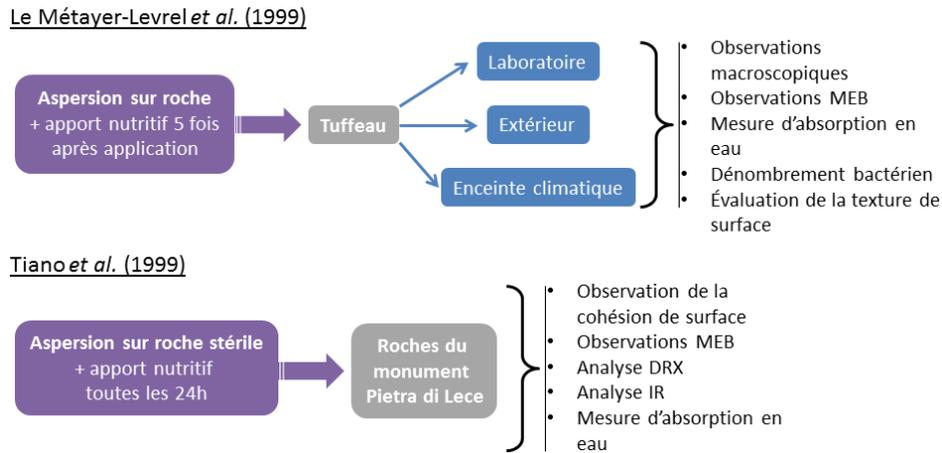


Figure 1-12: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par chaque équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris) dans différentes conditions (encadrés bleus). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage, DRX pour Diffraction des Rayons X et IR pour Infra-Rouge.

Les équipes de Rodriguez-Navarro et al. (2003) et Dick et al. (2006) ont choisi d'étudier la production de CaCO_3 , et leur impact sur des roches en immergeant les échantillons plutôt qu'en les aspergeant.

Rodriguez-Navarro et al. (2003) ont ainsi immergés leurs échantillons dans des bouillons bactériens contenant *Myxococcus xanthus* et ont observé l'impact de ce traitement sur les roches (Figure 1-13). Ils ont pu observer une augmentation de la masse des échantillons et détecter un polymorphe du CaCO_3 , la vaterite, dans les cultures. Si de la calcite s'est formée sur les échantillons traités, elle n'a pu être distinguée de celle déjà présente dans le matériau. Des bactéries enrobées de CaCO_3 ont été observées au microscope électronique à balayage (MEB) sur les échantillons traités. De plus, les pores ont été couverts par les bactéries calcifiées. Toutefois, une analyse par porosimétrie par intrusion au mercure des échantillons n'a révélé aucun changement significatif de la porosité des échantillons avant et après traitement.

Dick et al. (2006) vont suivre un protocole de traitement différent et étudier des bactéries extraites du support à traiter et leur production d'exopolysaccharides (EPS) et de CaCO_3 . Les souches isolées sont sélectionnées suivant leur faculté de production de CaCO_3 , de synthèse de l'uréase et leur production d'EPS. Les échantillons de roches sont immergés dans le bouillon bactérien contenant ces souches sélectionnées et la production de CaCO_3 est stimulée par apport d'ions calcium, en plusieurs étapes (Figure 1-13). Par ces expériences, ils ont pu déterminer que les souches avaient une production similaire d'EPS. Aussi, l'absorption en eau des échantillons diminue, mais de façon différente suivant les souches utilisées pour le traitement.

Une observation au MEB des échantillons présentant les plus fortes diminutions en eau ont montré la formation d'un dépôt de calcite plus ou moins homogène à leur surface. Bien que les résultats de cette étude soient intéressants pour préserver des roches calcaires dégradées, la mise en œuvre d'un tel traitement en trop fastidieuse sur site.

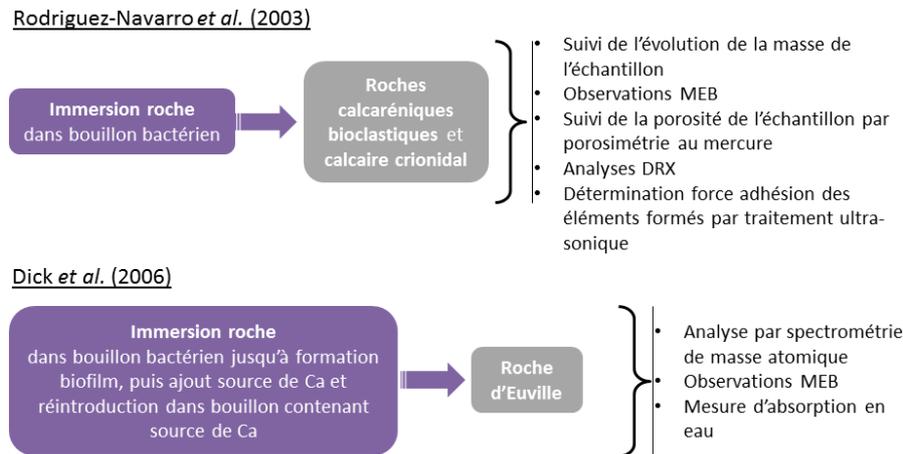


Figure 1-13: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menés par chaque équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage et DRX pour Diffraction des Rayons X.

Quel que soit le traitement employé (aspersion ou immersion), la plupart des études menées avec un apport de bactéries biocalcifiantes et de milieu de culture sur support ont montré une diminution de l'absorption des roches en eau, ce qui représente l'un des principaux objectifs de ces travaux. Cependant, l'apport de bactéries sur un support placé en environnement extérieur peut poser des problèmes de mise en œuvre ou encore un problème de dispersion des microorganismes dans l'environnement quand le traitement est rincé par la pluie. C'est pourquoi quelques études favorisent un autre mode d'action.

4.2.1.2. Application de molécules biologiques

Tiano *et al.* (2006) proposent ainsi l'emploi de molécules issues d'une matrice organique afin de favoriser la formation de nouveaux cristaux de CaCO_3 sur le support à traiter. Au cours de leur étude, ils ont comparés et sélectionnés l'action de différents éléments : des macromolécules bio-induites, des sels d'acide polyaspartique de sodium, une solution saturée de bicarbonate de sodium couplée à des nanoparticules de calcite. Les essais réalisés en laboratoire puis sur le terrain (Figure 1-14), ont montré une diminution significative de l'absorption en eau des roches sur site, alors qu'aucune évolution n'avait été observée en

laboratoire. De plus, une augmentation de la cohésion des roches traitées sur site est observée, mais pas en laboratoire. Enfin, la formation de cristaux de calcite, est observée sur les roches.

L'équipe de Perito *et al.* (2014) a obtenu des observations similaires avec une augmentation de la cohésion de surface des roches calcaires Pietra di Angera traités sur site, et pas en laboratoire. Cette équipe a préféré employer des fractions de cellules bactériennes (*B.subtilis*) pour réaliser leur traitement par aspersion sur roche, en comparant leur effet avec des traitements par aspersion de milieu ne contenant pas de fraction cellulaire. Les traitements réalisés ont mené à la formation de cristaux de calcite à la surface des roches et également à une diminution de la porosité en eau des roches traitées avec les fractions cellulaires, que ce soit en laboratoire ou sur terrain.

Ces études ont pu montrer l'efficacité de l'application de ces traitements alternatifs à l'application directe de microorganismes, mais il faudrait des études supplémentaires pour valider les résultats obtenus, qui restent différents de ceux observés en laboratoire.

Tiano *et al.* (2006) et Perito *et al.* (2014)

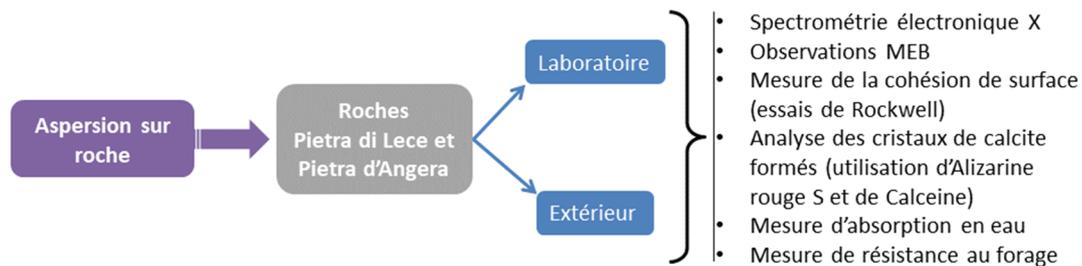


Figure 1-14: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par les équipes au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris) dans différentes conditions (encadrés bleus). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage.

4.2.1.3. Activation des bactéries capables de biominéralisation, *in situ*

Une dernière approche consiste en l'élaboration d'un milieu activant les voies métaboliques induisant la calcification par les bactéries déjà présentes sur le support (Jiménez-López *et al.* 2008; De Muynck *et al.* 2010a). Ce travail permet d'utiliser des bactéries déjà adaptées au support et aux contraintes environnementales. Les milieux développés ont montré une activation efficace des voies de production de CaCO_3 par les communautés bactériennes du

support. Cependant, malgré un renforcement de la roche, le comblement des pores n'est pas systématiquement démontré.

Ainsi, dans leur étude, Jiménez-López et al. (2008) proposent une comparaison de la production de CaCO_3 par les communautés bactériennes *in situ* avec l'apport d'un milieu inoculé par *M.xanthus*. Pour cela, ils immergent pendant trente jours des échantillons de roche, stériles ou non, dans du milieu nutritif favorisant la croissance de bactéries biocalcifiantes et dans du milieu nutritif inoculé par *M.xanthus* (Figure 1-15). Le suivi de la concentration de calcium dans les milieux de culture a montré une faible diminution de cette valeur, impliquant une production limitée de CaCO_3 par les microorganismes. Cependant, la consommation de calcium est plus importante avec les échantillons de roche non stérile immergés dans du milieu inoculé par *M.xanthus* car la production de CaCO_3 est réalisée non seulement par la souche introduite, mais aussi par les microorganismes présents sur le support. Les analyses par diffraction des rayons X (DRX) ont montré que les échantillons de roche sont formés à 95% de calcite. Cependant, après immersion dans un milieu de culture, des cristaux de vaterite sont formés. Mais, si un traitement similaire est appliqué sur ces roches avec un milieu contenant du phosphate, alors des cristaux de calcite précipitent. Cela montre que les souches bactériennes seules ne déterminent pas le polymorphe de CaCO_3 qui sera précipité, le milieu de culture agit également sur cette cristallisation au travers de la saturation initiale des éléments contenus dans la préparation. Les observations au MEB des sections transversales ont permis d'observer une production de CaCO_3 dont l'épaisseur moyenne atteint $10\mu\text{m}$ et peut aller jusqu'à $50\mu\text{m}$ suivant le milieu dans lequel la croissance a été réalisée. De plus, les tests de sonication ont montré que les échantillons de roche traitée sont plus résistants que les échantillons non traités.

Cette étude nous montre donc l'intérêt de combiner les traitements et d'en modifier les paramètres (ici, le milieu de culture) afin de favoriser la production de certains polymorphes du CaCO_3 .

Jiménez-López et al. (2008)

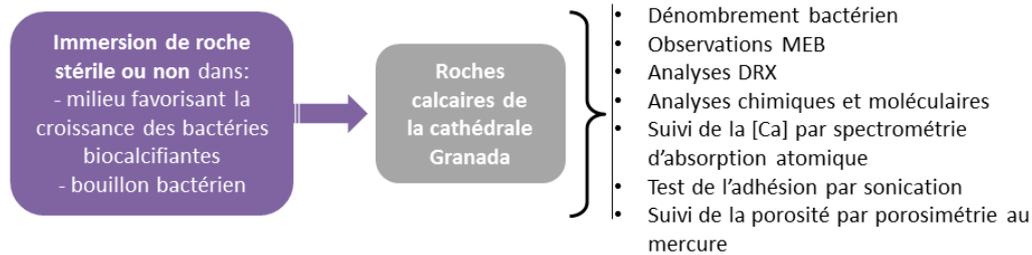


Figure 1-15: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage, DRX pour Diffraction des Rayons X et [Ca] pour concentration en calcium.

4.2.1.4. Conclusion

Toutes ces études réalisées pour développer un traitement de surface des roches calcaires pour les consolider a permis de développer des protocoles efficaces, notamment par l'action de bactéries calcifiantes. Ainsi, des entreprises comme Bioconcept® proposent d'appliquer différents traitements sur les roches ornementales pour limiter leur dégradation ou les réparer. Toutefois, des traitements alternatifs sont en développement pour utiliser les souches bactériennes calcifiantes déjà présentes sur les roches et ou des fractions organiques.

Les résultats obtenus au cours de ces études nous permettent de constater que la production de CaCO_3 par des bactéries est capable de mener à la diminution de l'absorption en eau de roches calcaires, en milieu extérieur. Cette constatation est encourageante pour le développement d'un traitement sur matériau cimentaire.

4.2.2. Les sols et sables

Les résultats obtenus au cours des études menées sur l'emploi de la biominéralisation pour la restauration et le renforcement des roches calcaires ont inspiré des travaux sur la stabilisation des sables et des sols. Dans ce but, deux techniques ont été étudiées.

4.2.2.1. Apport de micro-organismes capables de générer la formation de CaCO_3

Les équipes de Whiffin et al. (2007) et Abo-El-Enein et al. (2012) emploient *S.pasteurii* pour réaliser des recherches afin d'augmenter la cohésion du sable et en diminuer la perméabilité à l'eau. Pour cela, les deux équipes injectent du bouillon bactérien, une source de

calcium et de l'urée suivant des protocoles différents (Figure 1-16). Leurs travaux ont pu montrer que l'application d'un traitement de ce type pouvait apporter une augmentation de la résistance à la compression des sols ainsi qu'une diminution de la porosité à l'eau. Ces résultats sont liés à l'action des cristaux formés par les bactéries qui vont lier les grains entre eux. Toutefois, ce traitement nécessite encore le développement d'un système efficace d'injection car ces études ont montré que les performances du sable traité diminuaient à mesure que l'on s'éloignait de la source d'injection (Girinsky 2009). Plus on s'éloigne du point d'injection, moins il y a de cristaux formés et moins la porosité est comblée et plus la résistance de l'échantillon est faible.

Whiffin *et al.* (2007)



Abo-El-Enein *et al.* (2012)

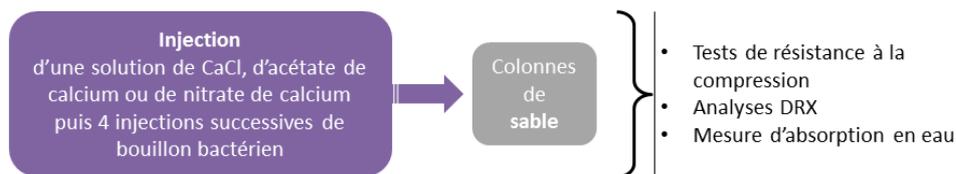


Figure 1-16: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menés par chaque équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : DRX pour Diffraction des Rayons X.

4.2.2.2. Apport de milieu favorisant la croissance de micro-organismes capables de générer la formation de CaCO₃

Ivanov & Chu (2008) résumant en un papier tous les travaux menés sur l'utilisation des microorganismes pour améliorer la cohésion des sols et diminuer leur perméabilité. Dans cette étude, ils rapportent les résultats obtenus en apportant une source de carbohydrates aux microorganismes présents dans le sol. Une source de carbone, comme des carbohydrates, est utilisée par une grande variété de microorganismes (*Caulobacter*, *Actinobacter*, *Agrobacterium*, *Cellulomonas*...) pour produire des polymères (des exopolysaccharides ou EPS) qui vont agir comme liants entre les grains composant le sol et ainsi améliorer leur cohésion et diminuer leur porosité. Cette cohésion peut alors être améliorée par apport d'une source de calcium qui stimulera la production de CaCO₃ par les microorganismes. La source de

carbone menant à la production d'EPS pouvant être issue des déchets de l'industrie, cette technique est très étudiée car peu coûteuse.

4.2.2.3. Conclusion

Ces travaux menés sur le renforcement des sols par action des microorganismes nous montrent que les équipes de chercheurs s'employant à développer des traitements utilisant la biocalcification des CaCO_3 se divisent en deux groupes : ceux qui apportent des bactéries sur les supports à traiter et ceux qui stimulent les bactéries calcifiantes déjà présentes dans l'environnement. Mais que ce soit par apport de bactéries sur le support ou apport de milieu de culture pour favoriser la production de certains éléments par les microorganismes *in situ*, nous montrons que la source de calcium impacte la production de cristaux par les bactéries productrices de CaCO_3 . De plus, la stimulation de la production d'exopolysaccharides par les microorganismes permettrait d'améliorer l'action de pontage entre les éléments du sol par les bactéries productrices de CaCO_3 . Cette production de matrice par les bactéries pourrait être intéressante dans le cadre d'une application sur granulats recyclés, en favorisant l'adhésion des souches sur le support à traiter.

Mais les roches calcaires et les sols sablonneux représentent des environnements moins agressifs que la surface de matériaux cimentaires. Aussi, en nous penchant sur les travaux déjà réalisés sur des matériaux cimentaires, il nous sera possible de mieux cerner les problématiques pouvant être rencontrées en mettant en contact des bactéries sur ces supports.

4.2.3. Les matériaux cimentaires

Les travaux réalisés sur les sables et les roches ont menés à l'étude d'une application aux matériaux cimentaires. Des recherches sont menées pour utiliser les bactéries dans le cadre de diverses applications : une incorporation directe dans le mélange constituant le béton pour produire un matériau auto-cicatrisant (Wiktor & Jonkers 2011), un dépôt en surface du béton pour diminuer sa porosité, une application sur fissures pour comblement. Or, le béton est un matériau au pH élevé (autour de 10-12), sur lequel il est difficile de faire croître des bactéries. Cependant, des travaux ont permis d'utiliser des techniques efficaces pour permettre le développement de ces dernières au contact du matériau.

4.2.3.1. Traitement de la surface de la matrice cimentaire par dépôt de souches alcalino-résistantes

Traiter les surfaces des matériaux cimentaires pour en diminuer la porosité permet d'améliorer la durabilité des matériaux en limitant l'intrusion d'agents agressifs. De Muynck et al. (2008) ont utilisé la souche *Bacillus sphaericus* ainsi qu'un mélange de bactéries uréolytiques (qui dégradent l'urée) pour traiter la surface d'échantillons de bétons et ont comparé les modifications des propriétés des échantillons avec les résultats obtenus par l'emploi de traitements conventionnels (traitements de surface et traitements d'étanchéité, (Figure 1-17). Ils ont ainsi pu observer une diminution plus importante de la perméabilité à l'eau et aux gaz des échantillons dans le cas de l'application de traitements conventionnels. Cependant, en comparant la diminution de la perméabilité entre les traitements réalisés avec des microorganismes, ils ont pu noter que les échantillons traités par *B.sphaericus* ont une perméabilité plus faible que celles des échantillons traités avec les mélanges de bactéries uréolytiques. Les analyses DRX ont montré que les microorganismes ont produits des CaCO_3 , quel que soit le traitement, les différences observées au niveau de la perméabilité à l'eau proviendraient donc du traitement lui-même : avec la culture pure, l'échantillon est immergé dans le bouillon bactérien, alors qu'avec le mélange de bactéries uréolytiques, une seule face de l'échantillon est exposée. Mais la diminution de la perméabilité similaire entre les deux traitements réalisés avec des microorganismes.

De Muynck *et al.* (2008)

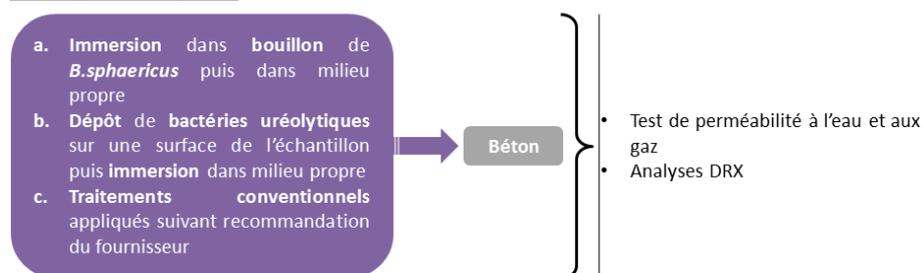


Figure 1-17 : Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : DRX pour Diffraction des Rayons X.

Cette étude nous montre que les bactéries capables de produire des CaCO_3 peuvent améliorer l'imperméabilité de matériaux cimentaires pas leur développement à la surface du support et leur production de cristaux. Mais le développement d'un traitement permettant une application homogène sur toute la surface des échantillons est nécessaire pour s'assurer d'une imperméabilité à l'eau et aux gaz similaire à celle des traitements conventionnels.

4.2.3.2. Traitement de fissures formées sur la matrice cimentaire

4.2.3.2.1. Emploi de bactéries alcalino-résistantes

Ramachandran *et al.* (2001) ont mené des travaux afin de développer une nouvelle technique pour réparer des matériaux cimentaires. Pour cela, ils ont utilisé *Sporosarcina pasteurii* pour leur travail. Ils ont donc préparé des mortiers de ciment qu'ils ont immergés dans l'eau pendant 28 jours. A la fin de cette cure, ils ont fissuré les échantillons à différentes profondeurs et ont comblé les fractures avec du sable mélangé aux bactéries. Ils ont également préparé des échantillons fissurés à une profondeur constante qu'ils ont comblés avec des mélanges de sable et bactéries à différentes concentrations ($2,6 \cdot 10^7$, $5,2 \cdot 10^7$ et $2,6 \cdot 10^8$ cellules par cm^3). Tous les échantillons traités ont ensuite été immergés pendant 28 jours dans une solution d'urée et de chlorure de calcium (Figure 1-18). La rigidité et la résistance à la compression des échantillons traités présentant des fissures de différentes profondeurs ont été déterminées et comparées à des échantillons témoins qui n'ont pas été traités avec les bactéries.

L'équipe de chercheurs a ainsi pu observer que la rigidité de ces échantillons traités avec le mélange de sable et de bactéries était plus importante de 4,8 à 9,4% que celle relevée sur les échantillons témoins. Dans le cas des échantillons fissurés à une profondeur constante, il a été observé que l'augmentation la plus importante de la résistance du matériau se faisait avec la concentration bactérienne de $5,2 \cdot 10^7$ cellules par cm^3 . Il s'avère donc que l'activité bactérienne a permis une amélioration des caractéristiques mécaniques des échantillons, au travers d'une production de cristaux observés au microscope électronique. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus en traitant les sols sablonneux avec les bactéries, car les cristaux produits par la bioprécipitation avaient également aggloméré les grains entre eux et augmenté la résistance des matériaux.

Cette technique employée pour combler les fissures a su montrer son efficacité, mais son application sur site reste difficile à cause de la nécessité de l'apport constant d'urée et d'une source de calcium en solution.

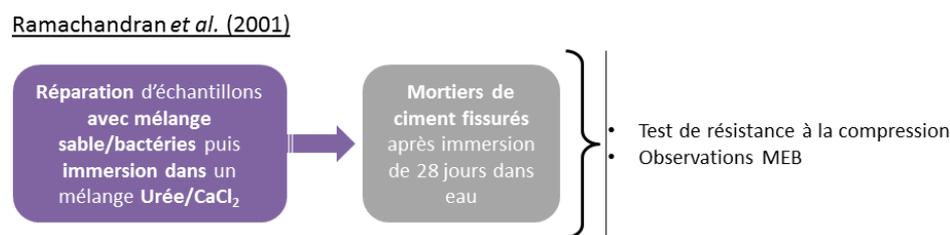


Figure 1-18: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : MEB pour Microscope Electronique à Balayage.

4.2.3.2.2. Incorporation de souches bactériennes dans une matrice protectrice

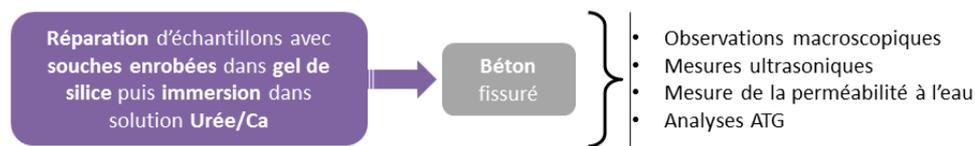
Pour protéger les bactéries du pH élevé de la matrice cimentaire, Van Tittelboom *et al.* (2010) proposent l'incorporation des souches dans un gel de silice, tandis que Bang and Ramakrishnan (2001) proposent l'utilisation d'un polymère de polyuréthane.

Pour étudier l'efficacité de leur gel de silice, Van Tittelboom *et al.* (2010) enrobent des souches pures de *Bacillus sphaericus* et appliquent le mélange sur la surface de fractures réalisées sur des échantillons de bétons (Figure 1-19). Des témoins sont réalisés avec le même traitement, contenant exclusivement des bactéries inactivées par autoclavage. Les échantillons de bétons fissurés et traités sont ensuite immergés dans une solution d'urée et de calcium pendant 3 jours puis sont séchés durant 3 jours à 28°C. Ils ont pu observer une diminution de la perméabilité à l'eau des échantillons traités, ce qui n'a pas pu être observé sur des échantillons non traités. D'ailleurs, les mesures ultrasoniques montrent que le temps de transmission diminue sur l'intégralité des échantillons traités, que ce soit au niveau des fissures ou sur une zone plus éloignée. Ces résultats indiquent que les fissures ont été comblées et cela a été visuellement observé par les chercheurs et confirmé par des analyses thermogravimétrique (ATG) qui ont détecté des CaCO₃ formés par les bactéries enrobées dans le gel de silice.

Bang et Ramakrishnan (2001) ont également testé l'efficacité de l'utilisation de leur matrice en polymère de polyuréthane (PU) dans la remédiation de fissures formées dans des matrices cimentaires. Pour cela, l'équipe a comblé des fissures artificiellement créées dans des échantillons de mortier de ciment avec de la matrice en PU renfermant différentes concentrations de *S.pasteurii* (5.10^7 , 5.10^8 et 5.10^9 cellules). Ces échantillons ont ensuite été traités avec une solution d'urée et de chlorure de calcium pendant 7 et 28 jours (Figure 1-19). Ils ont alors constaté une résistance similaire pour les échantillons témoins après une cure de 7 ou 28 jours. Cependant, les échantillons traités avec les matrices PU contenant les bactéries présentaient une résistance plus élevée que celui des témoins après 7 jours de traitement, et cette

résistance n'évoluait pratiquement pas après 28 jours de traitement. Toutefois, la résistance à la compression la plus élevée a été observée pour les échantillons traités avec la concentration en cellules dans la matrice PU la plus élevée, après 7 jours de traitement. Des observations préalables au MEB des matrices contenant des bactéries, traitées avec une solution d'urée et de CaCl_2 ont permis de constater que la production de CaCO_3 par les bactéries était toujours réalisée puisque des traces de bactéries au sein de matrices cristallines étaient observées. Mais ces observations ont aussi permis de constater que la matrice PU elle-même intervenait dans la précipitation de CaCO_3 en servant de site de nucléation pour les CaCO_3 . Par ailleurs, la précipitation de CaCO_3 a été observée sur les échantillons fissurés traités et l'équipe a noté que la formation de cristaux était particulièrement concentrée au niveau de la surface des fissures traitées.

Van Tittelboom et al. (2010)



Bang et Ramakrishnan (2001)

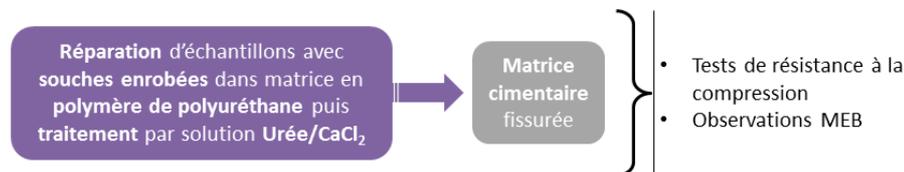


Figure 1-19: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : ATG pour Analyse Thermogravimétrique et MEB pour Microscope Electronique à Balayage.

Les bactéries employées au cours de ces études ont toutes produit des CaCO_3 au sein des matrices protectrices, ce qui montre l'efficacité de la protection assurée par ces dernières. L'autre intérêt d'une utilisation de ces matrices est qu'elles apportent des sites de nucléation supplémentaires pour favoriser le développement des CaCO_3 . Il est cependant nécessaire de connaître le comportement sur le long terme de ces matrices appliquées aux matériaux cimentaires et de déterminer jusqu'à quelle profondeur les bactéries produisent des CaCO_3 .

4.2.3.3. Incorporation des souches dans la matrice cimentaire

Une alternative au développement de nouvelles techniques pour réparer les fissures formées à la surface des matériaux cimentaire est de produire des matériaux auto-cicatrisants.

Pour cela, des méthodes sont développées afin d'incorporer des souches bactériennes capables de biocalcification, directement dans les matrices cimentaires. A cette fin, les chercheurs doivent s'assurer de la survie des souches bactérienne dans une matrice cimentaire au pH élevé.

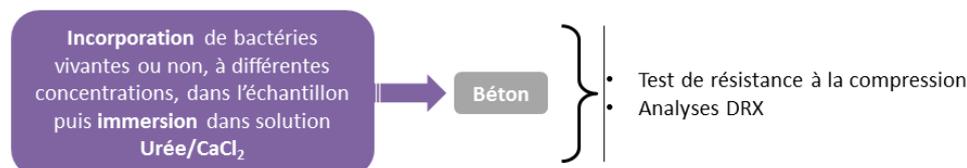
4.2.3.3.1. Emploi de bactéries alcalino et thermorésistantes

Ramachandran et al. (2001) et Sahoo et al. (2016) ont étudié des techniques afin d'incorporer des bactéries dans la matrice cimentaire afin de produire des bétons auto-cicatrisant ou présentant des résistances plus importantes.

Au cours de leur travail, Ramachandran et al. (2001) ont employé les souches alcalino-résistantes *S.pasteurii* et *P.aeruginosa*. L'équipe a alors produit des échantillons de béton (e/c 0,49 ; s/c 2,75) contenant des concentrations différentes de *S.pasteurii*, (7.10^3 , 7.10^5 et 7.10^7 cellules/mL) des échantillons contenant un mélange de *S.pasteurii* et *P.aeruginosa* à concentrations différents et des échantillons préparés avec ces mêmes mélanges, mais avec des bactéries non vivantes, afin d'observer l'action des bactéries sur les échantillons (Figure 1-20). Des échantillons témoins sans bactéries ont également été produits et tous les échantillons ont été immergés dans une solution d'urée et de chlorure de calcium pendant 7 et 28 jours. L'équipe a pu déterminer que la résistance à la compression des échantillons augmente quel que soit l'état dans lequel les bactéries ont été introduites dans l'échantillon : vivante ou morte. Toutefois, des différences sont observées en comparant l'évolution de la résistance à la compression entre les concentrations cellulaires utilisées, après 7 et 28 jours de cure. Les échantillons contenant des cellules bactériennes mortes, présentent des valeurs similaires de résistance quel que soit le temps de cure. Toutefois, la résistance des échantillons augmente lorsque leur mélange incorpore des bactéries vivantes, quel que soit le mélange, de 7 jours de cure à 28 jours de cure. Cette augmentation de la résistance est cependant plus importante pour les échantillons incorporant la souche pure de *S.pasteurii*, dont la résistance augmente de 19MPa entre 7 et 28 jours. Elle est bien plus importante que celle observée avec le témoin sans bactéries (9MPa d'augmentation) et celui contenant des bactéries mortes (3MPa). Cette observation peut s'expliquer par le fait que la faible concentration bactérienne dans la matrice cimentaire comble moins les porosités, ce qui favorise le flux des nutriments jusqu'aux bactéries qui peuvent alors produire leurs cristaux sur une plus longue période. Cependant, les analyses DRX de la matrice cimentaire ont montré que la quantité de CaCO_3 présente est similaire entre les échantillons. Cette étude a tout de même démontré que la présence de cellules bactériennes vivantes au sein d'une matrice cimentaire tendait à améliorer ses propriétés mécaniques.

Pour incorporer les bactéries dans le béton, l'équipe de Sahoo et al. (2016) a préféré utiliser une souche non seulement alcalino-résistante (capable de se développer entre pH 11,5 et 12,5) et thermorésistante (capable de se développer entre 37 et 50°C) : *B.sphaericus*. Cette caractéristique supplémentaire est importante dans le cas d'une incorporation des souches bactériennes dans le béton frais car la réaction d'hydratation du ciment est exothermique et peut atteindre les 60°C à l'intérieur du matériau (McCarter & Afshar 1988). En observant les résultats obtenus en analysant les mortiers (e/c 0,5 et s/c 6) produits avec différentes concentrations bactériennes (10^5 à 10^9 cellules/mL, Figure 1-20), les chercheurs ont constaté que le coefficient de sorption des matériaux augmente avec la concentration bactérienne. Ils constatent également que la résistance à la compression des matériaux augmente avec la concentration de bactéries introduites, mais seulement jusqu'à 10^7 cellules/mL, en atteignant une valeur de 2MPa supérieure à celle des témoins sans bactéries. Au-delà de cette concentration bactérienne, la résistance à la compression du matériau (6,10MPa à 28 jours, avec 10^9 bactéries/mL) se rapproche de celle des témoins sans bactéries (5,9MPa à 28 jours). Enfin, ils ont pu déterminer par des observations MEB et des analyses DRX que des cristaux de CaCO_3 avaient été produits par les bactéries, au cœur des matériaux, ce qui prouve la survie de ces dernières et leur implication dans les améliorations des caractéristiques des mortiers. En effet, la production de CaCO_3 a pu combler les porosités et diminuer la sorption en eau tout en augmentant la résistance à la compression.

Ramachandran et al. (2001)



Sahoo et al. (2016)

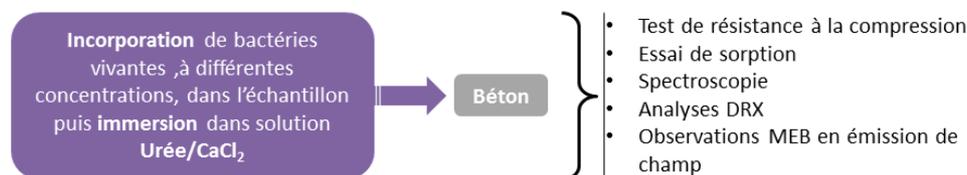


Figure 1-20: Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : DRX pour Diffraction des Rayons X et MEB pour Microscope Electronique à Balayage.

La capacité des souches à survivre à un pH basique et à des températures élevées a ainsi permis une amélioration de la résistance des matériaux grâce à la production de cristaux de CaCO_3 , qui ont pu combler la porosité de la matrice cimentaire et en augmenter la densité. Ces études montrent également l'intérêt de l'utilisation de bactéries vivantes car, au travers de leur activité, ces dernières permettent d'améliorer la qualité du matériau.

4.2.3.3.2. Incorporation de souches bactériennes dans une matrice protectrice

Wiktor and Jonkers (2011) ont préféré incorporer des spores de *Bacillus alkalinitrilicus* à une matrice époxy dans laquelle une source de calcium (de l'acétate de calcium) a été ajoutée. Ce mélange a été incorporé à des agrégats qui ont été utilisés pour produire des échantillons de béton renforcé par une barre en zinc. Après 56 jours de cure, la barre de zinc a été étirée mécaniquement jusqu'à formation de fissures (Figure 1-21). Les échantillons ont ensuite été plongés dans de l'eau et des analyses ont été régulièrement effectuées pour suivre l'évolution des fissures. Après 100 jours d'immersion, la largeur des fissures refermées des échantillons était plus importante (0,46mm) que celle observée chez les échantillons témoins (0,18mm) ne contenant pas de bactéries. La matière précipitée à la surface des fissures formées sur les échantillons contenant des bactéries a été identifiée par analyse dispersive en énergie (EDAX) comme étant du CaCO_3 . Une mesure de l'évolution de la concentration d' O_2 à la surface des échantillons a montré que cette concentration était stable pour les témoins mais diminuait avec les échantillons contenant des bactéries. La diminution de cette concentration montre que l' O_2 est consommé par les bactéries et donc qu'elles sont toujours vivantes, bien qu'incorporées dans la matrice cimentaire.

Le comblement des fissures en surface et la vivacité des bactéries incorporées dans la matrice cimentaire montrent que l'emploi de la matrice époxy pour protéger les cellules bactériennes est une technique prometteuse. Toutefois, une amélioration de la technique est nécessaire pour rendre le comblement en profondeur totalement efficace. De même, des analyses de l'évolution de la résistance à la flexion et à la compression seraient intéressantes pour évaluer l'impact de la matrice sur les propriétés mécaniques des échantillons.

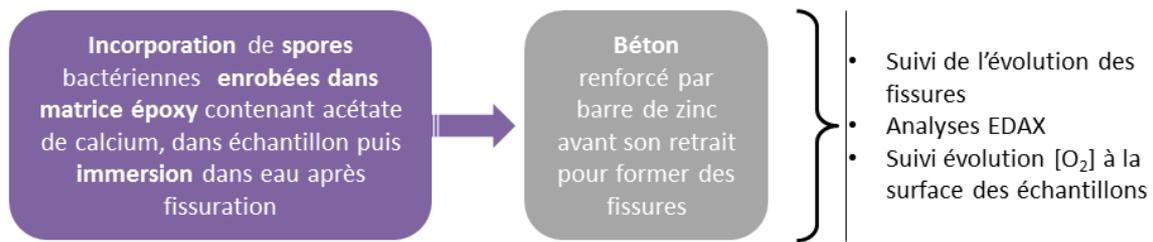
Wiktor et Jonkers (2011)

Figure 1-21 : Résumé des traitements (encadré violet) et analyses (liste sur la droite) menées par l'équipe au cours de leur étude sur les matériaux sélectionnés (encadré gris). Avec : EDAX pour analyse dispersive en énergie et [O₂] pour la concentration en dioxygène.

4.2.3.4. Conclusion

L'ensemble des études menées sur l'emploi de microorganismes pour améliorer les propriétés physiques et mécaniques de matériaux cimentaires montre que ce sujet d'étude intéresse de plus en plus la communauté scientifique. Il ressort de ces études que les bactéries ont un potentiel d'application large. Déposées à la surface du béton, elles induisent une biocalcification qui représente potentiellement une alternative aux traitements de surface conventionnels permettant d'imperméabiliser le matériau. Introduites dans la matrice cimentaire ou dans les fractures du béton, elles permettraient de développer de nouveaux traitements écologiques pour améliorer la durabilité des matériaux, toujours au travers de la biocalcification. Les résultats déjà obtenus dans ces études montrent que le domaine est prometteur, mais que les techniques efficaces d'application/d'introduction des microorganismes sur/dans le béton restent à développer afin d'optimiser l'action des bactéries employées. Il n'y a donc actuellement aucun protocole de traitement plus efficace qu'un autre, mais il y a déjà des paramètres importants auxquels il faut tenir compte. Tout d'abord, bien que l'application de bactéries vivantes sur les matériaux puisse être problématique, il n'en demeure pas moins que leur action semble plus intéressante sur la durée que l'impact de molécules bio-induites seules ou de bactéries mortes. Partant de ce fait, il faut également prendre en compte l'impact de la composition du milieu de culture sur la morphologie des cristaux bio-induits.

4.2.4. Conclusion

Les techniques développées sur les différents supports (roches carbonatées, sables et matériaux cimentaires) ont permis de mettre en évidence l'efficacité de la bioprécipitation pour

traiter ces matériaux. Il en ressort l'utilisation des mêmes protocoles, à savoir l'apport de bactéries calcifiantes ou stimulation de la flore indigène biocalcifiante par aspersion ou immersion. A noter que les matériaux cimentaires sont un support beaucoup plus agressif (pH fortement alcalin) qui nécessite d'employer des matrices protectrices ou des bactéries adaptées.

5. Objectifs de l'étude

Dans le contexte actuel, où l'environnement prend une place de plus en plus importante, la valorisation de granulats issus de la déconstruction d'ouvrage en béton est nécessaire. Cette réutilisation permet à la fois de diminuer la quantité de déchets à stocker dans les installations de stockage de déchets inertes (ISDI), de diminuer l'utilisation de granulats naturels et donc de diminuer la pression sur les carrières. De plus, l'utilisation des granulats recyclés permettrait de favoriser les circuits courts, en diminuant la distance entre la source des granulats et leur utilisation dans la mise en œuvre de béton. Cela permettrait de diminuer les émissions de gaz à effet de serre comme le CO₂ et la consommation énergétique due au transport des matériaux. A l'heure actuelle, les bétons issus de la déconstruction sont concassés pour former des granulats de béton recyclés (GBR) qui sont donc constitués des anciens granulats naturels et de mortier primaire. Ces GBR sont moins performants que les granulats naturels de par la porosité importante du mortier primaire. Cette porosité induit une moins bonne résistance mécanique et une augmentation de la rugosité. Ainsi ces GBR sont principalement utilisés dans la construction routière. Quelques pays autorisent l'utilisation de GBR pour la construction de nouveaux bâtiments mais en quantité très faible.

Afin de mieux utiliser les GBR qui offrent une véritable alternative technique, économique et environnementale, il est nécessaire d'en améliorer leur performance et notamment en diminuant leur porosité liée au mortier primaire.

La carbonatation naturelle des GBR permet de diminuer leur porosité mais ce phénomène est très lent et demande des temps de stockage importants avant utilisation ce qui n'est pas souhaitable. La précipitation des carbonates de calcium par l'intermédiaire de bactéries est un phénomène naturel. Cette bio-précipitation est déjà utilisée pour restaurer des monuments historiques en roches calcaires ou en bétons fortement carbonatés. Depuis une quinzaine d'année, cette technique se développe sur matériaux cimentaires non ou peu carbonatés afin de protéger les matériaux par une couche homogène en surface, de réparer des fissures ou également de produire des bétons auto-cicatrisants. L'objectif de notre travail est donc d'étudier la possibilité d'utiliser la biocarbonatation pour améliorer la performance des GBR.

La bioprécipitation des carbonates de calcium est principalement effectuée par des bactéries du genre *Bacillus*, dont la plus étudiée est *Sporosarcina pasteurii*. La bioprécipitation s'effectue par la voie de dégradation de l'urée grâce à une enzyme intracellulaire, l'uréase. La

dégradation de l'urée induit la formation d'ammoniac qui va basifier le milieu créant un environnement favorable à la précipitation et à la formation d'ions hydrogénocarbonate qui vont réagir avec les cations divalents, comme les ions calcium, fixés à la surface des cellules, formant ainsi des carbonates de calcium. Une autre voie est également possible, la voie de l'interconversion du CO_2 en HCO_3^- par l'anhydrase carboxylique. La littérature décrit très souvent la voie de l'uréase mais lors des expériences menées, l'urée n'est pas toujours présente pour former des carbonates de calcium aussi il apparaît important d'apprécier les rendements de ces deux voies de production. En effet, dans l'optique d'un traitement industriel des GBR, il est important de minimiser les coûts du traitement aussi si nous pouvons nous affranchir d'une molécule dans le traitement ceci permettra d'en diminuer le coût. Il nous faudra donc tester ces deux voies.

Un autre point important à souligner est que les traitements initiaux ont été développés pour des matériaux dont le pH de surface est de 7-8. Or les GBR fraîchement formés ont un pH de surface de 11-12. Le passage d'un pH 8 à 12 peut être préjudiciable pour les bactéries et pour leur production de CaCO_3 . Il est donc important de sélectionner une espèce capable de produire des CaCO_3 à pH fortement alcalin ou alors de protéger les bactéries par des matrices. La sélection d'une souche capable de se développer et de produire des CaCO_3 en milieu fortement basique semble donc nécessaire.

De plus, la mise en contact des traitements bactériens avec les matériaux cimentaires diffère d'une équipe à l'autre. Des protocoles d'immersion, d'aspersion, d'utilisation de matrice sont développés. Il nous faudra donc déterminer quel protocole est le plus adapté aux GBR.

Ces problèmes seront étudiés au cours de cette thèse et pour les régler, nous avons divisé notre travail en quatre étapes.

Nous commençons par caractériser les GBR avec lesquels nous allons travailler, afin de mieux comprendre nos matériaux et connaître leur état avant le début des traitements.

Une fois cette étape terminée, dans le chapitre 3, nous étudions des souches bactériennes à la morphologie et aux caractéristiques physiologiques différentes. Notre objectif final étant une application sur chantier, nous déterminons quelles souches bactériennes atteignent leur phase de croissance en quelques heures, les autres étant écartées de la suite de notre travail. De plus, puisque deux voies métaboliques différentes de production de CaCO_3 sont identifiées dans la littérature, nous déterminons quelle souche bactérienne est capable de réaliser la biocarbonatation au travers de ces deux voies métaboliques et nous déterminons quelle voie est

la plus productrice de CaCO_3 . Un premier protocole d'immersion des matériaux est mis en place. Une mesure du taux d'absorption en eau des GBR est réalisée et comparée au taux d'absorption en eau mesuré pour les GBR non traités.

Le chapitre 4 s'intéresse à l'amélioration des protocoles de traitement des GBR par les bactéries, différents essais sont menés en parallèle : un enrobage des GBR dans des matrices synthétiques contenant le traitement et un traitement des matériaux avec des bactéries adaptées à un pH proche de celui des GBR. A cette fin, une nouvelle étude de la bioproduction de CaCO_3 par les souches adaptées à un pH de 12 est menée. Des analyses sont également menées directement sur les GBR afin de déterminer : (1) si l'absorption en eau des matériaux a été modifiée par la bioproduction de CaCO_3 à leur surface et (2) si le dépôt formé est homogène.

Le chapitre 5 de cette étude développe un protocole de traitement des GBR pour améliorer l'homogénéité des dépôts de CaCO_3 formés à leur surface. Pour faciliter ce travail, plutôt que d'employer des GBR, nous avons produits et utilisé des disques plans de mortiers. Différents protocoles sont alors testés et l'homogénéité des dépôts formés analysée par observations au microscope électroniques à balayage, en vue du dessus et en vue de profil. Les taux d'absorption en eau des disques sont également mesurés et comparés aux taux mesurés de disques non traités. Enfin, l'eau de rinçage des disques en fin de traitement est analysée afin de déterminer la quantité de CaCO_3 potentiellement éliminée au cours des rinçages réalisés en fin de traitement des disques.

La dernière partie de cette thèse conclue l'ensemble du travail réalisé et propose des perspectives pour des recherches ultérieures.

6. Bibliographie

- Abo-El-Enein, S.A., Ali, A.H., Talkhan, F.N. & Abdel-Gawwad, H.A. (2012) Utilization of microbial induced calcite precipitation for sand consolidation and mortar crack remediation. *HBRC Journal*, **8**, 185–192.
- Achal, V. & Pan, X. (2011) Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*, **62**, 894–902.
- ADEME. (2012) *Gestion et Valorisation Des Déchets de Chantier de Construction*.
- Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J. & So, J.-S. (2016) Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, **5**, 250.
- Ann, K.Y., Moon, H.Y., Kim, Y.B. & Ryou, J. (2008) Durability of recycled aggregate concrete using pozzolanic materials. *Waste Management*, **28**, 993–999.
- Bang, S.S. & Ramakrishnan, V. (2001) Microbiologically-enhanced crack remediation (MECR). *Proceedings of the International Symposium on Industrial Application of Microbial Genomes*, pp. 3–13.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. & Perthuisot, J.-P. (1998) La carbonatogenèse bactérienne. *Colloques et séminaires - Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération*, p. Paris, France.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. & Perthuisot, J.-P. (1999) Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, **126**, 9–23.
- Corinaldesi, V. (2011) Structural concrete prepared with coarse recycled concrete aggregate: from investigation to design. *Advances in Civil Engineering*, **2011**, 6.
- De Muynck, W., Cox, K., Belie, N.D. & Verstraete, W. (2008) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, **22**, 875–885.
- De Muynck, W., De Belie, N. & Verstraete, W. (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Special Issue: BioGeoCivil Engineering*, **36**, 118–136.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S. & Mukherjee, A. (2013) Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in microbiology*, **4**, 1–13.
- Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N. & Verstraete, W. (2006) Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, **17**, 357–367.
- Dizaj, S.M., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.H., Adibkia, K. & Lotfipour, F. (2015) Calcium carbonate nanoparticles; potential in bone and tooth disorders. *Pharmaceutical Sciences*, **20**, 175.

- Etxeberria, M., Vázquez, E., Marí, A. & Barra, M. (2007) Influence of amount of recycled coarse aggregates and production process on properties of recycled aggregate concrete. *Cement and Concrete Research*, **37**, 735–742.
- Frondistou-Yannas, S. (1977) Waste concrete as aggregate for new concrete. *Journal Proceedings*, **74**, 373–376.
- Gadd, G.M. (2000) Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 271–279.
- Gadd, G.M. (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Biogeochemical processes and the role of heavy metals in the soil environment*, **122**, 109–119.
- Gadd, G.M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, **156**, 609–643.
- Girinsky, O. (2009) *Pré-Industrialisation D'un Procédé de Consolidation de Sol Par Bio-Calcifération in Situ*. Université d'Angers.
- Grabiec, A.M., Klama, J., Zawal, D. & Krupa, D. (2012) Modification of recycled concrete aggregate by calcium carbonate biodeposition. *Construction and Building Materials*, **34**, 145–150.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W. & Siciliano, S.D. (2003) Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and environmental microbiology*, **69**, 4901–4909.
- Hansen, T.C. (1986) Recycled aggregates and recycled aggregate concrete second state-of-the-art report developments 1945–1985. *Materials and Structures*, **19**, 201–246.
- Hansen, T.C. & Narud, H. (1983) Strength of recycled concrete made from crushed concrete coarse aggregate. *Concrete International*, **5**, 79–83.
- Ivanov, V. & Chu, J. (2008) Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil *in situ*. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **7**, 139–153.
- Jiménez-López, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodríguez-Navarro, C., Piñar-Larrubia, G., Rodríguez-Gallego, M. & González-Muñoz, M.T. (2008) Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **62**, 352–363.
- Journal Officiel Sénat (ed). (2014) Déblais du Grand Paris. , 1463.
- de Juan, M.S. & Gutiérrez, P.A. (2009) Study on the influence of attached mortar content on the properties of recycled concrete aggregate. *Construction and Building Materials*, **23**, 872–877.
- Kang, T., Kim, W., Kwak, Y.-K. & Hong, S.-G. (2012) The choice of recycled concrete aggregates for flexural members. *IABSE Congress Report*, **18**, 726–731.

- Krajewska, B. (2009) Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **59**, 9–21.
- van Langerak, E.P.A., Gonzalez-Gil, G., van Aelst, A., van Lier, J.B., Hamelers, H.V.M. & Lettinga, G. (1998) Effects of high calcium concentrations on the development of methanogenic sludge in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactors. *Water Research*, **32**, 1255–1263.
- Larbi, J.A., Heijnen, W.M.M., Brouwer, J.P. & Mulder, E. (2000) Preliminary laboratory investigation of thermally treated recycled concrete aggregate for general use in concrete. *Waste Management Series* (ed J.J.J.M.G. and P.J.W. G.R. Woolley), pp. 129–139. Elsevier.
- Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubière, J.-F. & Perthuisot, J.-P. (1999) Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology*, **126**, 25–34.
- Li, W., Chen, W.-S., Zhou, P.-P., Cao, L. & Yu, L.-J. (2013) Influence of initial pH on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by microbial carbonic anhydrase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **102**, 281–287.
- Li, J., Xiao, H. & Zhou, Y. (2009) Influence of coating recycled aggregate surface with pozzolanic powder on properties of recycled aggregate concrete. *Construction and Building Materials*, **23**, 1287–1291.
- Limbachiya, M.C., Leelawat, T. & Dhir, R.K. (2000) Use of recycled concrete aggregate in high-strength concrete. *Materials and Structures*, **33**, 574–580.
- McCarter, W.J. & Afshar, A.B. (1988) Monitoring the early hydration mechanisms of hydraulic cement. *Journal of Materials Science*, **23**, 488–496.
- McNeil, K. & Kang, T.H.-K. (2013) Recycled concrete aggregates: A review. *International Journal of Concrete Structures and Materials*, **7**, 61–69.
- Nixon, P.J. (1978) Recycled concrete as an aggregate for concrete—a review. *Matériaux et Construction*, **11**, 371–378.
- Otsuki, N., Miyazato, S. & Yodsudjai, W. (2003) Influence of recycled aggregate on interfacial transition zone, strength, chloride penetration and carbonation of concrete. *Journal of Materials in Civil Engineering*, **15**, 443–451.
- Ouoba, S., Cherblanc, F., Cousin, B. & Benet, J.-C. (2010) A new experimental method to determine the sorption isotherm of a liquid in a porous medium. *Environmental Science and Technology*, **44**, 5914–5919.
- Pacheco-Torgal, F., Tam, V., Labrincha, J., Ding, Y. & Brito, J. (2013) *Handbook of Recycled Concrete and Demolition Waste*. Elsevier.
- Pellerin, F.-M. (1980) La porosimétrie au mercure appliquée à l'étude géotechnique des sols et des roches. *Bull. Liaison Lab. Ponts Chauss.*, **106**, 105–116.

- Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V. & Bang, S.S. (2001) Remediation of concrete using microorganisms. *ACI Materials journal*, **98**.
- Ramanan, R., Kannan, K., Sivanesan, S.D., Mudliar, S., Kaur, S., Tripathi, A.K. & Chakrabarti, T. (2009) Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 981–987.
- Rao, A., Jha, K.N. & Misra, S. (2007) Use of aggregates from recycled construction and demolition waste in concrete. *Resources, Conservation and Recycling*, **50**, 71–81.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K. & Gonzalez-Muñoz, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2182–2193.
- Rouquerol, F. (1968) Texture des solides poreux ou divisés. *Techniques de l'Ingénieur*, p. 14.
- Sahoo, K.K., Sathyan, A.K., Kumari, C., Sarkar, P. & Davis, R. (2016) Investigation of cement mortar incorporating *Bacillus sphaericus*. *International Journal of Smart and Nano Materials*, **7**, 91–105.
- Shayan, A. & Xu, A. (2003) Performance and properties of structural concrete made with recycled concrete aggregate. *Materials Journal*, **100**, 371–380.
- Silva, R.V., Neves, R., de Brito, J. & Dhir, R.K. (2015) Carbonation behaviour of recycled aggregate concrete. *Cement and Concrete Composites*, **62**, 22–32.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. & Bang, S.S. (1999) Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1563–1571.
- Supuran, C.T. & Scozzafava, A. (2007) Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 4336–4350.
- Tai, C.Y. & Chen, F.-B. (1998) Polymorphism of CaCO₃, precipitated in a constant-composition environment. *AIChE Journal*, **44**, 1790–1798.
- Tavakoli, M. & Soroushian, P. (1996) Strengths of recycled aggregate concrete made using field-demolished concrete as aggregate. *Materials Journal*, **93**, 178–181.
- Tiano, P., Biagiotti, L. & Mastromei, G. (1999) Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, **36**, 139–145.
- Tiano, P., Cantisani, E., Sutherland, I. & Paget, J.M. (2006) Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. *Journal of Cultural Heritage*, **7**, 49–55.
- Tourney, J., Ngwenya, B.T. (2009) Bacteria extracellular polymeric substance (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism. *Chemical Geology*, **3**, 138–146.
- UNPG. Accueil > Nos activités > Comment sont-ils produits? > Le recyclage. URL http://www.unpg.fr/nos_activites/comment_sont-ils_produits___produire_des_granulats_recycles

- Van Tittelboom, K., De Belie, N., De Muynck, W. & Verstraete, W. (2010) Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research*, **40**, 157–166.
- Whiffin, V.S., van Paassen, L.A. & Harkes, M.P. (2007) Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, **24**, 417–423.
- Wiktor, V. & Jonkers, H.M. (2011) Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, **33**, 763–770.

Chapitre 2 : Matériau et Techniques

1. Introduction

Ce chapitre a pour but de présenter les GBR employés au cours de cette thèse, ainsi que les protocoles fréquemment utilisés tout au long de ces travaux. Les GBR employés pour cette étude sont issus de travaux menés par Dao (2012). Puisque ces matériaux sont utilisés 6 ans après leur mise en stockage, il est nécessaire de re-caractériser ces derniers car la carbonatation naturelle peut avoir modifié les GBR. Ainsi, des informations sur l'état initial des matériaux seront obtenues.

Dans un premier temps, les techniques expérimentales employées au cours de la thèse seront détaillées.

2. Techniques expérimentales

2.1. Mise en culture des souches bactériennes congelées

Des souches congelées à -20°C dans leur milieu optimal de croissance additionné de 20% de glycérol sont utilisées au cours de notre travail. La mise en culture est réalisée en milieu stérile. Elle débute par un prélèvement de souche congelée à l'aide d'une anse d'inoculation stérile. Le prélèvement est alors introduit dans 5mL de milieu optimal de croissance de la souche (stérile). Du milieu non inoculé est également préparé pour servir de témoin afin de vérifier l'absence de contamination des milieux. Les deux milieux sont ensuite placés en incubation à 30°C , 140 tr/min pendant 48h. Si le milieu inoculé présente une turbidité et que le milieu témoin n'en présente pas, alors l'échantillon peut être employé pour la suite des essais. L'échantillon est alors dilué au $10^{\text{ème}}$ dans 20mL d'un milieu neuf, afin de produire un volume plus important de bouillon bactérien. Ce milieu est alors placé en incubation à 30°C , 140 tr/min pendant 48h, avec un milieu témoin. Si les 20mL de milieux inoculés sont troubles et que le milieu témoin ne l'est pas, alors le bouillon bactérien peut être employé pour l'étude à mener.

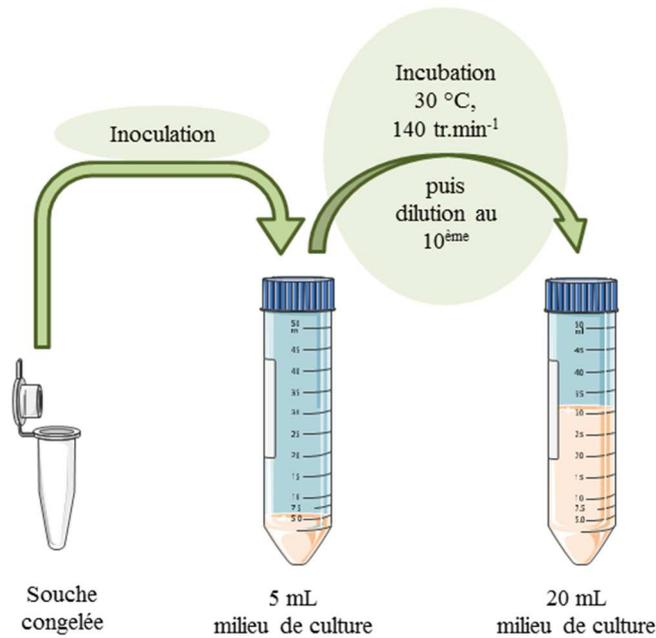


Figure 2-1 : Procédure schématisée de la mise en culture des souches bactériennes congelées

2.2. Dénombrements

2.2.1. Dénombrement bactérien sur cellule de Thoma

Afin de déterminer la concentration de bactéries introduites dans nos traitements et afin d'effectuer le suivi de l'évolution de cette concentration au cours du temps, nous réalisons des dénombrements sur cellule de Thoma. Pour faire le dénombrement bactérien, un prélèvement d'1mL de culture est versé dans 1mL de Glutaraldéhyde, un produit fixateur permettant de stopper l'évolution des bactéries. La suspension bactérienne fixée est ensuite conservée à 4°C jusqu'au comptage. Le dénombrement est réalisé après dilutions successives –dans de l'eau distillée- des échantillons préservés, jusqu'à ce que les bactéries puissent se distinguer les unes des autres sur la cellule de Thoma (Figure 2-2). La préparation diluée est alors déposée sur la cellule de sorte à remplir l'espace entre la lame et la lamelle (Figure 2-3). La préparation est laissée à plat 10 min en atmosphère humide pour que les bactéries sédimentent. La préparation est enfin observée au microscope optique (grossissement x40) et le dénombrement des bactéries est réalisé sur 8 des grands carrés du quadrillage de la cellule de Thoma.

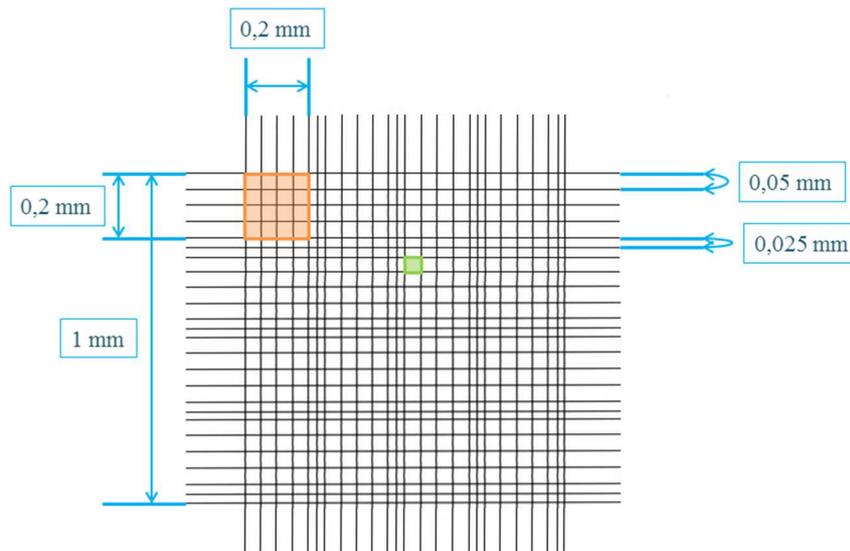


Figure 2-2: Schéma du quadrillage d'une cellule de Thoma avec les différentes dimensions qui la caractérisent (en bleu). La cellule est divisée en 16 grands carrés (orange) eux-mêmes divisés en 16 petits carrés (vert). Le dénombrement est réalisé sur 8 grands carrés (orange). Seules les bactéries chevauchant les lignes en haut et à gauche des petits carrés sont dénombrées.

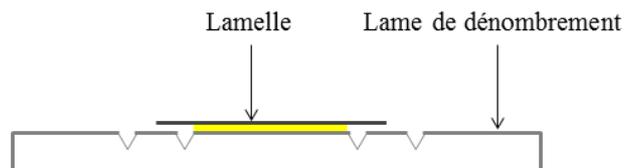


Figure 2-3 : Schéma d'une cellule de Thoma vue de profil. En jaune est représentée la zone de dépôt des échantillons.

Une fois le dénombrement terminé, il nous est possible de déterminer la concentration bactérienne par millilitre du prélèvement initial comme suit :

$$N = n_{\text{moy}} \times 16 \times d \times 10\,000$$

Avec :

- N, le nombre de bactéries par millilitre
- n_{moy} , le nombre moyen de bactéries dénombrées sur 8 grands carrés
- 16, le nombre total de carrés composant la cellule de Thoma
- d, le facteur de dilution de la préparation
- 10 000, le facteur permettant de convertir les $0,1 \text{ mm}^3$ contenus par la cellule de Thoma en millilitres

Cette technique a l'avantage de nous permettre d'obtenir la concentration cellulaire dans nos milieux, en réalisant un protocole simple et rapide qui ne nécessite pas l'utilisation d'une grande quantité de matériel. Cependant, elle ne permet pas de discriminer les cellules mortes des vivantes. De plus, pour limiter les erreurs de reproductibilité, ce type de dénombrement ne peut être réalisé que par un seul opérateur.

2.2.2. Dénombrement sur milieux gélosés

Le dénombrement bactérien peut être réalisé par la méthode des dilutions successives (Figure 2-4). En milieu stérile, dans des tubes de 2mL, 7 dilutions successives -au 10ème de la précédente- ont été effectuées dans un milieu de culture correspondant à celui de la souche étudiée. Dans le tube initial, on verse 2mL d'un bouillon bactérien. Une fois les dilutions effectuées, une aliquote de 100 μ L de chaque dilution est étalée sur trois milieux gélosés.

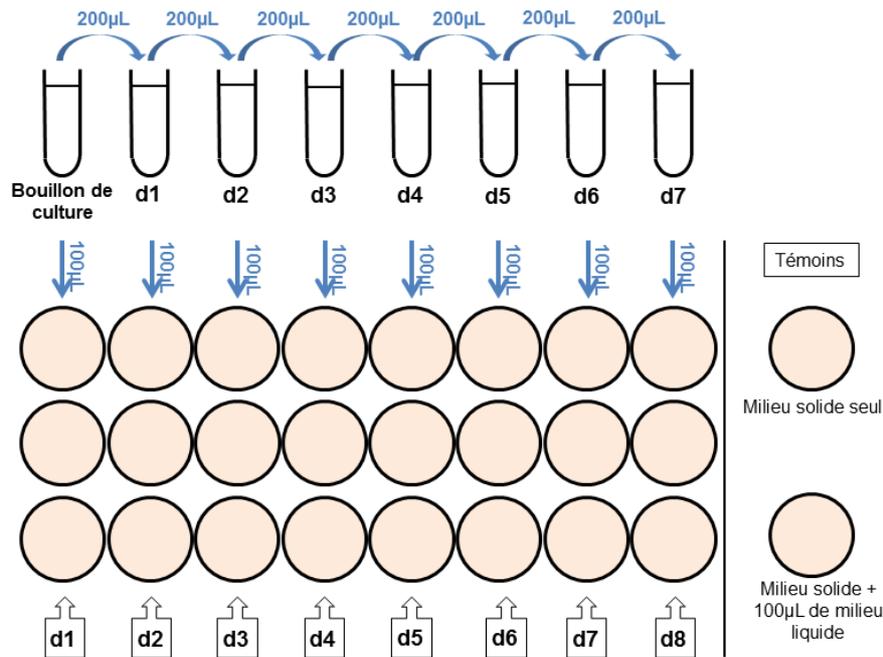


Figure 2-4 : Schéma du procédé expérimental employé pour la méthode des dilutions en série. Le premier tube de 2mL contient 2mL de bouillon de culture. Les tubes d1 à d7 contiennent 1,8mL de milieu de culture liquide. Au cours de la dilution successive, 200µL sont transvasés de tube en tube.

Les cultures sur milieux gélosés sont placées dans un incubateur à $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. On effectue alors un dénombrement pour chaque dilution. Considérant qu'une cellule bactérienne viable se développera et se multipliera pour former une colonie, il nous est possible d'estimer une valeur moyenne du nombre de cellules viables dans 1mL de bouillon de culture, soit le nombre d'Unités Formant Colonies par millilitre de bouillon (UFC/mL). Cette valeur se détermine par la sélection de deux dilutions successives présentant un développement de colonies bactériennes dont le nombre est compris entre 10 et 300. Le nombre N de bactéries présentes dans l'échantillon est calculé comme suit :

$$N = \frac{\sum c}{V (n_1 + 0,1 n_2)d}$$

Avec :

- $\sum c$, la somme des colonies comptées sur les boîtes correspondant aux deux dilutions successives ;
- V, le volume en millilitre de culture diluée versé sur le milieu gélosé (0,1mL) ;
- n1, le nombre de boîtes retenues à la première dilution ;
- n2, le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;
- d, première dilution retenue.

Cette technique a l'avantage de fournir la concentration de bactéries vivantes dans le bouillon bactérien. Mais l'inconvénient est la quantité de matériel nécessaire à sa réalisation.

2.2.3. Suivis de croissance par densité optique

Le dénombrement sur boîte de Pétri est une méthode lourde et longue à mettre en œuvre. C'est pourquoi en parallèle nous avons mesuré l'absorbance par spectrométrie à infra-rouge pour chaque dilution et la concentration cellulaire de l'échantillon initial a été estimée. Puisque chaque dilution est séparée de la précédente par un facteur dix, nous pouvons déterminer la concentration cellulaire de chaque échantillon. Une courbe d'étalonnage est tracée suivant ces valeurs d'absorbance et de concentration cellulaire, telle que $Absorbance=f([cellulaire])$. L'équation de cette droite nous permet d'estimer la concentration cellulaire à chaque absorbance mesurée au cours du suivi de croissance.

Cette technique permet in fine de réaliser des suivis de croissance de façon simple et rapide. L'inconvénient c'est que la relation entre l'absorbance et la concentration cellulaire est liée au milieu dans lequel la souche croît. C'est pourquoi elle ne peut être utilisée si un composant est modifié dans le milieu, la relation ne peut plus être utilisée.

2.2.4. Dead/Live

Le marquage des cellules bactériennes par dead/live peut nous permettre de suivre la survie des microorganismes à la surface des matériaux traités, pour certains de nos essais. Le principe du test dead/live est basé sur une double coloration par l'intermédiaire de deux fluorophores. Le SYTO9[®] après excitation à 470nm, émet une fluorescence de couleur verte à 540nm. Ce marqueur possède la capacité de diffuser dans les cellules, intègres ou non, et d'émettre de la fluorescence une fois lié à l'ADN. Le SYTO9[®] permet donc de marquer la

totalité des cellules d'un échantillon. L'Iodure de Propidium est un agent intercalant de l'ADN, une fois lié à ce dernier, il émet une fluorescence rouge à 635nm après excitation à 470nm. Ce fluorophore ne peut pénétrer dans les cellules que si les membranes sont altérées, donc seules les cellules mortes fluorescent en rouge.

Pour réaliser le dead-live, des échantillons de matrice de silice sont prélevés des boîtes de Pétri et placés sur des lames de verre prévues pour des observations au microscope optique. Puis, 100µL de glutaraldéhyde (5%) sont répartis sur chaque échantillon, puis après avoir dilué 2µl des deux fluorophores : Iodure de Propidium (PI) et SYTO9® dans 1mL d'eau distillée, 75µL de la solution diluée sont ajoutés sur les préparations, puis elles sont incubées pendant 20 minutes à l'obscurité. Les échantillons sont rincés à l'eau distillée, puis à l'isopropan-2-ol. L'observation au microscope à épifluorescence est effectuée deux minutes après le rinçage.

2.2.5. Estimation de la concentration bactérienne initialement introduite dans les traitements des matériaux

Cette estimation est réalisée pour savoir quelle quantité de bactéries a été introduite dans les traitements des matériaux. Pour cela, nous nous basons sur la courbe de croissance de la souche évoluant dans un milieu similaire à celui du traitement. Il s'avère qu'une souche bactérienne évolue de la même façon, tant qu'elle est cultivée dans un même milieu, dans les mêmes conditions (température, vitesse d'agitation...). C'est pourquoi la concentration cellulaire d'une souche, avant sa dilution au dixième dans un traitement pour les matériaux peut être déterminée. En effet, il suffit de lire sur la courbe de croissance de la souche à quelle concentration bactérienne correspond la durée d'incubation de la pré-culture et de la diviser par 10, car les pré-cultures sont toujours diluées au dixième dans les traitements.

2.3. Masses et rendements de production des CaCO₃

Afin de connaître la production de CaCO₃ par les souches bactériennes, la masse cumulée de CaCO₃ formée dans les échantillons est calculée. A partir de cette mesure, il nous est possible de calculer le rendement de production des bactéries à chacune des échéances de l'essai, mais également le rendement de production obtenu à quantité de bactéries initialement introduite.

2.3.1. Calcul des masses cumulées de CaCO₃ dans les échantillons

La masse cumulée de CaCO₃ issue des 3 contenants est déterminée en soustrayant la masse cumulée de CaCO₃ présente dans les culots des « milieux témoins » à la masse cumulée de CaCO₃ des culots issus des « milieux inoculés », déterminé suivant la relation ci-après :

$$m_{\text{cumulée CaCO}_3} = (m_{\text{cumulée inoculés}} \times \text{teneur en CaCO}_3 \text{ (inoculés)}) - (m_{\text{cumulée témoins}} \times \text{teneur en CaCO}_3 \text{ (témoins)})$$

Avec :

- $m_{\text{cumulée CaCO}_3}$, la masse cumulée de CaCO₃ dans les échantillons (mg)
- $m_{\text{cumulée inoculés}}$, la masse cumulée des résidus issus des milieux inoculés (mg)
- $m_{\text{cumulée témoins}}$, la masse cumulée des résidus issus des milieux témoins (mg)
- $\text{teneur en CaCO}_3 \text{ (inoculés)}$, la teneur en CaCO₃ dans les échantillons issus des milieux inoculés
- $\text{teneur en CaCO}_3 \text{ (témoins)}$, la teneur en CaCO₃ dans les échantillons issus des milieux témoins

2.3.2. Calcul des rendements de production de CaCO₃

En utilisant la quantité de CaCO₃ mesurée dans les échantillons et la concentration bactérienne déterminée, nous avons choisi de calculer le rendement R_{ini} de production à partir de la concentration bactérienne initialement introduite ($[\text{bactérienne}]_{\text{ini}}$) dans le milieu. Cette donnée nous permet de déterminer quelle masse de CaCO₃ une certaine quantité de bactéries introduite peut produire dans un milieu favorisant la biocalcification. Ainsi, pour chaque échéance, la relation suivante est appliquée :

$$R_{\text{ini}} = \frac{m(\text{CaCO}_3)_i - m(\text{CaCO}_3)_t}{[\text{bactérienne}]_{\text{ini}}}$$

Avec :

- R_{ini} , le rendement de production de CaCO_3 (g/bactérie);
- $m(\text{CaCO}_3)_i$, la masse de CaCO_3 mesurée dans les échantillons issus des boîtes de Pétri inoculées (g);
- $m(\text{CaCO}_3)_t$, la masse de CaCO_3 mesurée dans les échantillons issus des boîtes de Pétri témoins correspondant (g) ;
- $[\text{bactérienne}]_{ini}$, la concentration bactérienne initialement introduite.

En calculant le rendement de production de CaCO_3 par les souches à chaque échéance il est possible de suivre la production à chaque phase de croissance des souches. Pour cela, on commence par soustraire la masse de CaCO_3 cumulée à échéance X à celle obtenue à l'échéance X+1 pour obtenir la masse de CaCO_3 formée entre les deux échéances. A cette masse est soustraite la masse de l'échantillon témoin à l'échéance X+1, afin d'obtenir la masse de CaCO_3 réellement formée en présence des bactéries. Enfin, la masse obtenue est divisée par la moyenne de la concentration bactérienne entre les deux échéances. En effet, nous considérons que les bactéries les plus âgées sont liées à plus de CaCO_3 que les bactéries les plus jeunes, c'est pourquoi nous cherchons à utiliser le nombre moyen de bactéries impliqué dans la formation de la masse de CaCO_3 obtenue à échéance X+1. Ce rendement $R_{éch}$ est calculé comme suit :

$$R_{éch} = \frac{m(\text{CaCO}_3)_{X+1} - m(\text{CaCO}_3)_X}{([\text{bactérienne}]_{X+1} + [\text{bactérienne}]_X) / 2}$$

Avec :

- $R_{éch}$, le rendement de production de CaCO_3 à chaque échéance (g/bactérie);
- $m(\text{CaCO}_3)_{X+1}$, la masse cumulée de CaCO_3 mesurée dans les échantillons à l'échéance X+1 (g);
- $m(\text{CaCO}_3)_X$, la masse cumulée de CaCO_3 mesurée dans les échantillons à l'échéance X (g);
- $[\text{bactérienne}]_{X+1}$, la concentration bactérienne atteinte à l'échéance X+1 ;
- $[\text{bactérienne}]_X$, la concentration bactérienne atteinte à l'échéance X.

2.4. Quantification et qualification des CaCO_3

Les analyses ATG et DRX sont réalisées dans le but de quantifier et qualifier la masse de CaCO_3 produite par les bactéries. Les deux analyses sont complémentaires : la DRX permet d'identifier la nature des CaCO_3 formés (calcite, vaterite, aragonite... (Tai & Chen 1998)) et l'ATG permet de les quantifier.

2.4.1. Préparation des échantillons

Les échantillons prévus pour des analyses DRX ou ATG sont tous séchés au minimum 72h à 30°C. En fin de séchage, la masse des échantillons est mesurée. Si cette masse est inférieure à 180mg, alors la totalité de l'échantillon est analysée par DRX ou ATG. Sinon, un prélèvement de 180 ± 2 mg est réalisé pour l'analyse.

2.4.2. L'ATG

L'appareil utilisé pour l'essai est l'analyseur thermique Netzsh Sta 409E. L'analyse ATG est une technique pour laquelle un échantillon est soumis à une élévation constante de température ($10^\circ\text{K}/\text{min}$) s'étendant de 20°C à 1250°C. La mesure de la variation de la température est menée avec des thermocouples, et la variation de la masse de l'échantillon est suivie à l'aide d'une balance de précision. L'analyse est menée dans une chambre close dont l'atmosphère a été purgée avec de l'azote (flux de 80 mL/min), un gaz inerte permettant de prévenir toute réaction d'oxydation de l'échantillon. Durant l'analyse, des pertes de masses de l'échantillon peuvent être observées, qui sont liées à des réactions chimiques (décomposition, combustion...) ou des transformations physiques (évaporation, sublimation, désorption, dessiccation). Ces variations de masses en fonction de la température correspondent à une courbe (TG) dont la dérivée première (DTG) donne une information sur la vitesse de chaque réaction observée (Figure 2-5). L'analyse ATG est couplée à une analyse thermique différentielle (ATD) qui emploie un échantillon de référence composé de kaolin calcifié (inerte dans la gamme de températures de travail). Le principe de cette ATD est de mesurer la différence de température entre l'échantillon et le matériau de référence durant l'élévation programmée de la température.

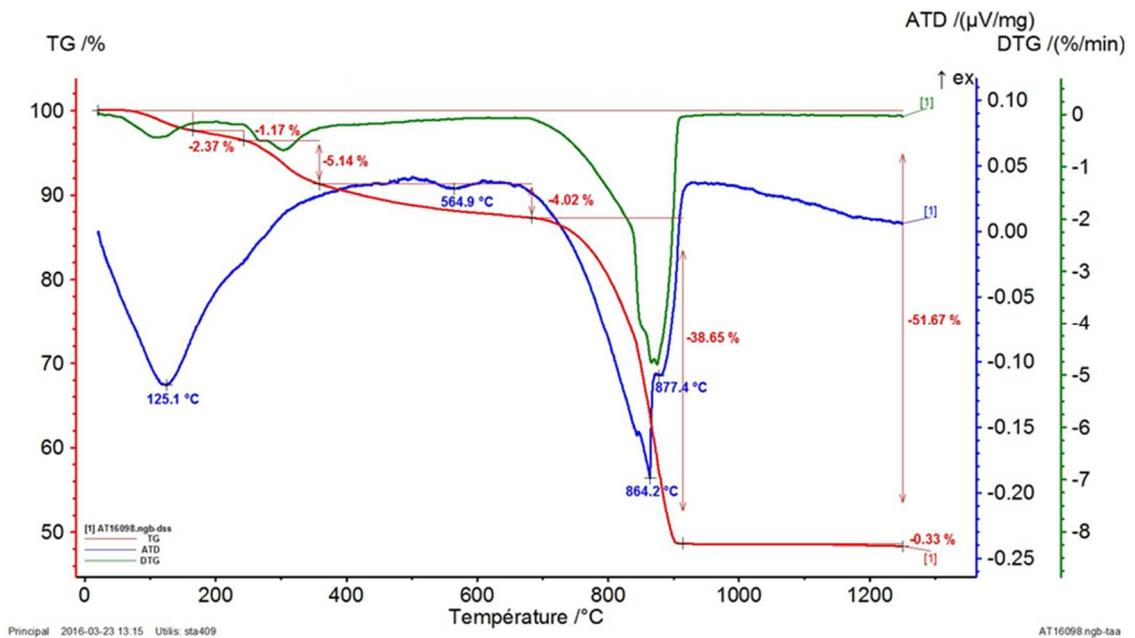


Figure 2-5: exemple de courbes obtenues en fin d'analyse ATG

Cette comparaison permet de révéler des réactions endothermiques -comme la fusion, la déshydratation, ou la décomposition- et des réactions exothermiques -telles que la cristallisation, l'oxydation, etc. (Figure 2-6).

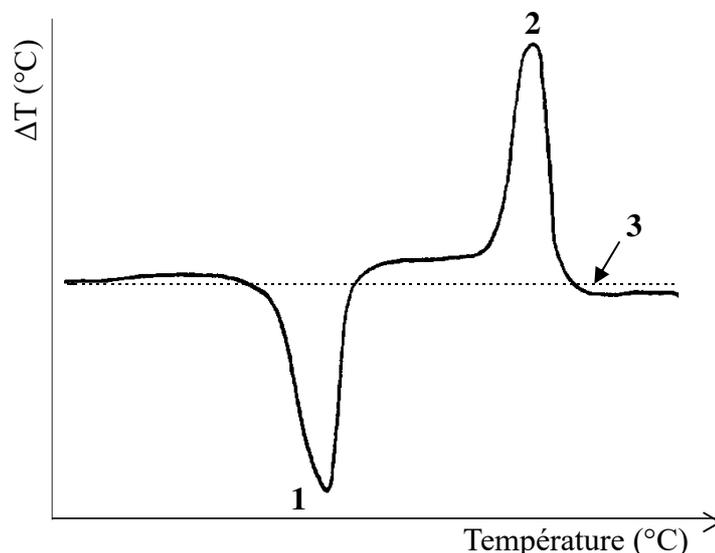


Figure 2-6: Courbe théorique type obtenue par ATD. En 1, un pic ATD lié à un phénomène endothermique, en 2, un pic ATD lié à un phénomène exothermique et en 3, la ligne de base. Le ΔT correspond à la différence de température entre l'échantillon et la référence. (Martias 2009)

Au cours des essais réalisés dans cette thèse, les analyses ATG sont réalisées sur des échantillons pour quantifier les CaCO_3 attendus comme produits par les bactéries. Pour cela, il

nous faut observer une perte de masse entre 700°C et 990°C, combinée à des pics au niveau des courbes DTG et ATD. En effet, sur cette plage de températures, des réactions de décarboxylation ont lieu qui, dans le cas de nos échantillons, sont liés à la décomposition du CaCO_3 . Ainsi, en quantifiant la perte de masse liée à la décarboxylation, on détermine la quantité de CaCO_3 initialement présente dans l'échantillon. Toutefois, il est nécessaire de confirmer la présence de CaCO_3 dans l'échantillon. C'est pourquoi une analyse DRX doit être menée en parallèle.

2.4.3. La DRX

L'appareil employé pour notre étude est un diffractomètre Philips PW 1830. La DRX est une technique permettant de déterminer la forme cristalline des carbonates de calcium produits, de déterminer la proportion de chacun dans l'échantillon et ainsi d'y confirmer leur présence. Au cours de cette thèse, nous produisons des CaCO_3 , un élément qui peut produire différents cristalites tels que la calcite ou l'aragonite, ou encore un élément moins stable, la vaterite (Tai & Chen 1998). Cette analyse est réalisée sur les échantillons secs (30°C pendant 72h) de matière récoltée à chaque échéance. Les échantillons issus des témoins sont combinés, de même que les échantillons issus des milieux inoculés. Une partie ou la totalité de ces échantillons est alors utilisée pour l'analyse. Pour cela, un faisceau de rayons X est dirigé sur l'échantillon et un détecteur analyse l'angle de diffraction des rayons X, qui est lié à l'orientation des cristaux présents dans l'échantillon. Un diffractogramme est alors tracé, présentant en abscisse les angles diffractés, et en ordonnée, l'intensité de chaque pic. Chaque élément chimique alors présent sous forme cristalline va diffracter les rayons X suivant différents angles qui leurs sont spécifiques. En comparant ces valeurs d'angles à une base de données, il est possible de retrouver la cristallite présente dans l'échantillon. Par ailleurs, plus la quantité d'une cristallite est importante dans l'échantillon et plus l'aire sous le pic principal qui lui correspond est importante.

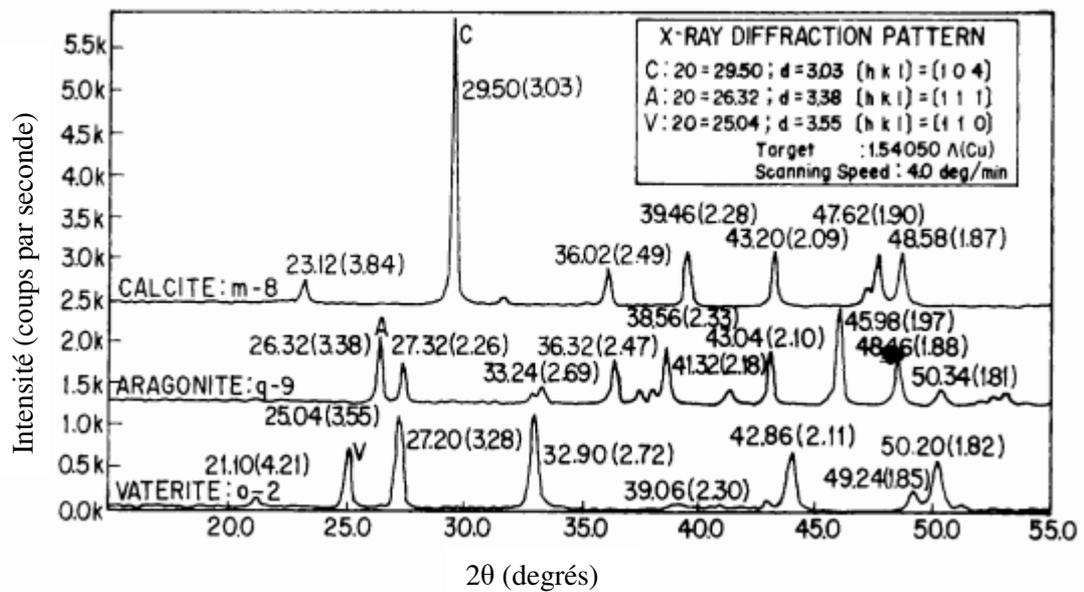


Figure 2-7 : Spectres DRX réalisés à température ambiante de poudre de calcite, de dolomite et d'aragonite. (Tai & Chen 1998)

2.5. Préparation des échantillons pour observations au MEB

Afin de déterminer si une couche composée de carbonates de calcium s'est déposée en surface des granulats traités, les échantillons sont coulés dans de la résine. Cette résine est préparée en mélangeant 25g de résine EpoFix résine (Struers) avec 3g de durcisseur EpoFix hardener (Struers). Une dizaine de grammes de GBR sont déposés dans trois moules UnoForm de 40mm de diamètre (Struers) et mis dans une enceinte de vide Epovac (Struers). Lorsque la pression est proche de 200 mbar, la résine est coulée par un tube sous vide. Une fois le moule rempli, le vide est doucement cassé et l'échantillon est étiqueté. Après 12 heures de prise de la résine, 3mm de sa partie inférieure sont sciés afin d'avoir une coupe transversale des granulats par la scie Accutom-50 (Struers). Un polissage permettant d'avoir une surface plane et lisse est réalisé par l'utilisation de la polisseuse Pedemax-S (Struers) en employant 5 draps de grains de taille décroissante.

Les étapes détaillées de polissage sont :

- Drap 1 MD Piano 220 mm : à 180N, polissage à l'eau, pendant 45secondes puis 1 minute. Entre chaque polissage du même drap, une étape de vérification du polissage, un rinçage et un séchage de l'échantillon sont réalisés.
- Drap 2 MD Piano 1200 µm : à 140N, polissage à l'eau, pendant 1min puis 2min30sec.

- Drap 3 MD Largo 9 μ m : à 140N, polissage à l'éthanol avec un spray de diamant (Struers) toutes les 30 secondes. Polissage de deux fois 2min30sec.
- Drap 4 MD Dac 3 μ m : ce polissage est identique à l'étape précédente mais le drap doit être préalablement enduit d'une graduation de pâte de diamant DP-Paste P (Struers) et le spray doit être adapté au drap de 3 μ m.
- Drap 5 MD Nap 1 μ m : à 140N, drap enduit d'une graduation de pâte de diamant DP-Paste M (Struers), polissage à l'éthanol avec un spray de diamant toutes les 30 secondes pendant 2min.

L'observation de la surface des granulats sera aussi effectuée en les collants sur un support métallique par une pâte de carbone.

Tous les échantillons sont métallisés au carbone (Leica EM CED030), puis sont observés au microscope électronique à balayage (XL 30, Philips et Quanta) en mode SE (électrons secondaires) et BSE (électrons rétrodiffusés).

3. Les granulats de béton recyclés

Le propos de cette partie est de présenter les analyses effectuées sur les GBR. Leur coefficient d'absorption en eau va être mesuré et leur porosité va être déterminée en combinant différentes techniques d'analyses par porosimétrie. Ces valeurs nous permettront d'établir des valeurs de référence pour la suite de notre travail. De plus, des analyses seront menées sur le pH des matériaux dans le but d'orienter notre sélection de microorganismes.

Les GBR utilisés au cours de ce travail sont issus d'une étude menée par Dao (2012). Le béton primaire réalisé est composé de CEM II et de granulats calcaires naturels pour résistance à la compression de 35 MPa. Sa composition est détaillée dans le tableau suivant a été gâché (Tableau 2-1) :

Tableau 2-1 : Composition en pourcentage par m³ du béton dont sont issus les granulats de béton recyclés

Composé	Granulats 10/20	Granulats 4/10	Granulats 0/4	Ciment CEMII	Superplastifiant	Eau efficace
kg/m ³	637	245	763	388	0,5	196

Les granulats employés pour ce mélange étaient du calcaire naturel concassé de Beauvillier. L'absorption en eau mesurée de ces granulats de granulométrie 4/10 et 10/20 était

respectivement de 3,17% et 3,20%, au moment de la livraison (Septembre 2008). Les bétons ont été fabriqués en 2010 pour être concassés 3 mois après leur production afin de former les GBR dont une partie a été conservée dans un Big Bag. La courbe granulométrique de ces GBR est présentée dans la figure 8. Leur granulométrie étant inférieure à 6,3mm, nous avons affaire à des sables que nous choisissons de désigner sous le terme de GBR.

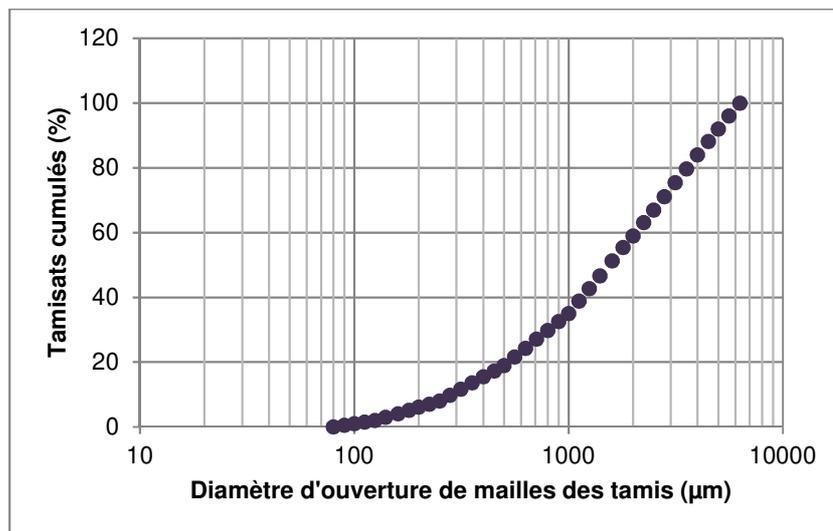


Figure 2-8: courbe granulométrique des GBR

Six ans après la production de ce sable, le matériau est stabilisé et homogène. Son absorption en eau au moment de la production était de 10%.

3.1. Analyses menées sur les GBR

3.1.1. Mesure de l'absorption en eau

La mesure du coefficient d'absorption en eau des GBR est une technique qui sera utilisée tout au long de notre étude pour déterminer l'impact des traitements qui seront développés sur nos matériaux. Cette mesure va donc nous permettre non seulement de connaître l'évolution de l'absorption en eau des GBR depuis leur fabrication, mais également d'obtenir la valeur témoin avec laquelle comparer celles que nous obtiendrons après traitement des GBR.

L'absorption en eau des GBR a été mesurée en suivant la norme NF EN 1097-6 (annexe F et FD P18-663) :

- (1) 620g de GBR sont immergés dans de l'eau pendant 24h, à température ambiante, avec duplicata (Figure 2-9),

- (2) les échantillons sont agités deux fois au cours des 24h afin d'éliminer les bulles d'air piégées au fond des contenants,
- (3) en fin d'immersion, l'eau est éliminée en veillant à maintenir les particules les plus fines dans le contenant.
- (4) Puis, les échantillons sont séchés à l'aide d'un décapeur thermique, tout en étant remués, afin de réaliser un séchage homogène. Le séchage est maintenu jusqu'à ce que les GBR atteignent un de référence dit état « saturé surface sèche ». Cet état se détermine en utilisant un cône tronqué que l'on pose sur le fond du plateau, le plus grand diamètre vers le bas, et que l'on remplit avec les GBR. Le surplus de GBR est arasé et le contenu du cône est tassé 25 fois en posant un pilon à leur surface et en le lâchant pour que la compression se fasse sous l'effet du poids. On soulève alors le moule et si le cône de GBR s'effondre sur sa périphérie, alors l'état saturé d'eau avec une surface sèche est atteint. Dans le cas contraire, le séchage est poursuivi et l'essai du cône est réitéré. La masse des GBR est alors mesurée (m_{ss})
- (5) et les échantillons sont placés à $110^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant 24h. Leur masse est de nouveau mesurée (m_s) et en la comparant à la masse m_{ss} suivant l'équation 1, il nous est possible de déterminer le coefficient d'absorption en eau des GBR.

Équation 8

$$\text{absorption (\%)} = \frac{m_{ss} - m_s}{m_s} \times 100$$



Figure 2-9 : schéma de l'essai d'absorption en eau des GBR

C'est en appliquant cette technique de mesure d'absorption en eau des GBR que la répétabilité de l'opérateur est déterminée, pour cet essai. En utilisant des GBR non traités et en réalisant l'essai 3 fois avec toujours la même masse de matériaux (700g), la répétabilité de

l'opérateur a été déterminée à 0,1%. Elle correspond à l'écart-type de la moyenne des valeurs des taux d'absorption en eau mesurés sur les GBR non traités.

3.1.2. Analyses de la distribution de la taille des pores et de la surface spécifique...

Les analyses de la porosité permettent de mesurer des diamètres de pores allant du micromètre au millimètre. Cependant, chaque technique présente des avantages et des inconvénients à son usage, c'est pourquoi nous avons décidé de combiner deux analyses : afin d'obtenir le plus d'informations complémentaires possibles.

3.1.2.1. ...par porosimétrie par intrusion au mercure.

La porosimétrie par intrusion au mercure est une analyse se réalisant sous des pressions élevées afin de faire pénétrer le mercure dans le matériau. En mesurant les variations de volume du système « mercure-solide » soumis à des pressions croissantes, il est possible de déduire la répartition des tailles de pores du solide. L'inconvénient de cette technique est que la texture de notre matériau peut être perturbée par les fortes pressions appliquées (proches de 2,5kbar). Toutefois, elle permet de mesurer une large gamme de pores allant du nanomètre à la centaine de micromètres. Le principe de la mesure se base sur la loi de Washburn :

Équation 9
$$p = \frac{2\sigma \cos\theta}{r}$$

Où :

- p représente la pression moyenne appliquée (bar)
- σ représente la tension superficielle du mercure (480 dyn.cm⁻¹ pour le mercure)
- θ représente l'angle de contact entre la surface solide et le mercure
- r représente le rayon d'un pore (Å)

Afin de réaliser cette analyse, environ 1g de GBR est prélevé, exclusivement des granulats de plus de 3 mm de diamètre pour travailler avec des éléments capables de résister aux hautes pressions appliquées, et est introduit dans l'appareil de mesure. L'analyse est réalisée sur deux échantillons, pour obtenir une valeur plus représentative. L'appareil utilisé est l'AutoPore IV 9500.

3.1.2.2. ...par analyse gravimétrique d'adsorption de vapeur d'eau (DVS)

L'analyse DVS, réalisée avec l'appareil DVS Advantage, est complémentaire de la porosimétrie au mercure. En utilisant l'eau pour déterminer la distribution majoritaire de la taille de pores, on évite de travailler avec un produit CMR comme le mercure. Par ailleurs, l'utilisation de l'eau permet d'avoir des mesures reflétant les pores réellement accessibles par les traitements qui seront appliqués à ces GBR par la suite.

Cette technique consiste à imposer au solide des paliers d'humidité relative dans une enceinte close, en mesurant l'évolution de sa masse au cours du temps. La mesure est réalisée à pression atmosphérique et à température constante (25°C), ce qui assure la non dégradation du matériau, comme cela est possible pendant une mesure par porosimétrie au mercure. L'isotherme qui découle de ces mesures permet de déterminer la distribution majoritaire de la taille des pores de l'échantillon.

Pour réaliser cette analyse, environ 200mg de GBR séchés 48h à 40°C (diamètre ≤ 3 mm) sont introduits dans la nacelle en quartz de l'appareil et les suivis automatique des isothermes d'adsorption et de désorption sont menés sur moins de 48h. Les isothermes ont été obtenues à 25°C sur une gamme d'humidité relative allant de 0 à 95%. La mesure a été réalisée 4 fois pour obtenir des valeurs représentatives.

3.1.3. Mesure du pH de surface

Le but de ce travail est de pousser des bactéries calcifiantes à se déposer à la surface des GBR. Or, le pH influence le développement des bactéries, c'est pourquoi il est nécessaire de déterminer sa valeur à la surface des matériaux.

Des GBR stockés dans des sachets hermétiques ont été employés pour cette analyse. Quelques grammes de GBR ont été placés dans 3 béchers et recouverts du volume d'eau distillée juste nécessaire pour pouvoir effectuer une mesure au plus près de leur surface. Le pH de faible volume d'eau a alors été mesuré en utilisant une électrode de surface liée à un pH-mètre portable, au plus près des GBR. La moyenne des 3 valeurs relevées correspond au pH de surface des GBR.

3.2. Résultats obtenus et discussion

La mesure de l'absorption en eau des GBR a montré que les GBR prélevés en surface du Big Bag ont une absorption de $7,2\% \pm 0,1\%$, tandis que ceux prélevés en profondeur ont une absorption de $9,1\% \pm 0,1\%$. Pour commencer, on note que l'absorption en eau des GBR a diminué durant le stockage, puisqu'ils avaient un taux d'absorption initial de 10% (Dao 2012). Ensuite, on note que les GBR de surface ont plus carbonatés que les GBR en profondeur. Il nous faudra donc vérifier les taux d'absorption des GBR qui seront employés pour nos essais, avant de les traiter. De plus, les échantillons de GBR prélevés du Big Bag (plutôt en profondeur) pour subir des traitements seront maintenus dans des sachets hermétiques pour limiter leur carbonatation ultérieure.

Les analyses de la taille des pores ont donné des résultats cohérents entre eux. Les analyses ont toutes révélé une distribution majoritaire de la taille des pores entre 2 à 5nm et entre 10 à 90nm (Figure 2-10).

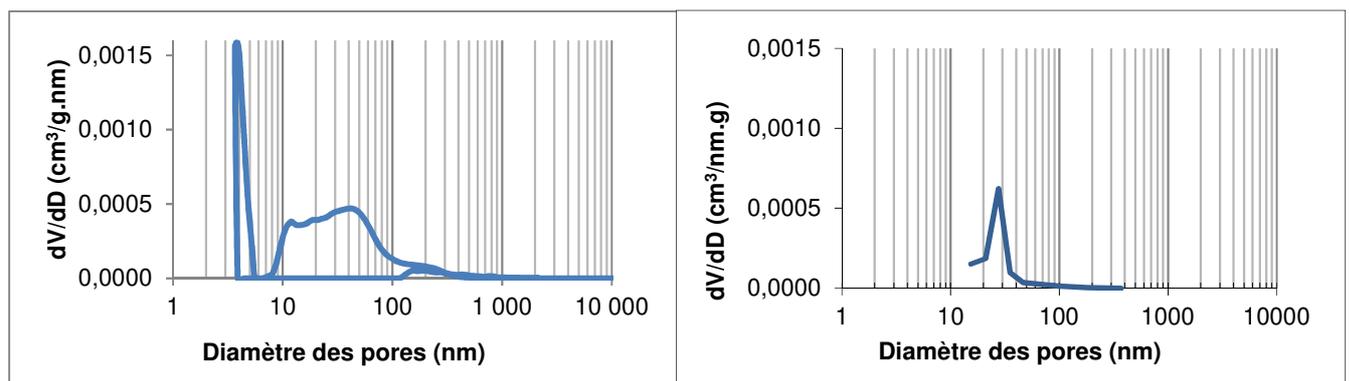


Figure 2-10 : Courbes des distributions majoritaires des tailles de pores obtenues par porosimétrie par intrusion au mercure (gauche) et par analyse DVS (droite)

Ainsi, même si les échantillons analysés par porosimétrie par intrusion au mercure et par DVS ne sont pas les mêmes (respectivement : GBR de diamètre supérieur à 3mm pour l'un et particules plus fines pour l'autre), nous retrouvons le même système poral. Cette observation n'est pas surprenante puisque ces deux types de porosités observées dans nos échantillons sont liées à la pâte de ciment enrobant les granulats naturels, et plus particulièrement aux porosités liées aux hydrates et aux pores capillaires. Aussi, même si les masses d'échantillons analysées sont faibles, par rapport au stock de GBR avec lequel nous travaillons, les résultats obtenus peuvent être considérés comme représentatifs de nos matériaux. D'autant que nous raisonnons en pourcentage de porosité totale sur l'ensemble de l'échantillon, ainsi, même si le volume total

des porosités n'est pas le même entre les deux analyses, le pourcentage qu'elles représentent reste similaire. La porosimétrie au mercure nous indique d'ailleurs que la porosité totale des GBR est d'environ 12%. Ces résultats montrent que les GBR ont majoritairement des diamètres de pores inaccessibles pour des microorganismes dont la taille est principalement de l'ordre du micromètre. Les traitements qui seront développés avec les microorganismes devront donc se concentrer sur un traitement de la surface des GBR plutôt qu'un traitement au sein même des matériaux. Aussi, nous devons nous attendre à une amélioration limitée des propriétés mécaniques des GBR ainsi traités.

La mesure du pH de surface des GBR donne une valeur moyenne de $11,9 \pm 0,1$. Cette valeur très élevée est à prendre en compte pour la sélection des microorganismes qui seront employés pour les traitements.

3.3. Conclusion

Le travail mené sur les GBR nous permet de mieux orienter notre travail sur le développement d'un traitement avec des microorganismes. L'étude par porosimétrie des GBR nous montre qu'un comblement de la porosité interne par la bioprécipitation des microorganismes sera sans doute limité, et qu'un traitement de surface est à développer. En effet, les pores des GBR ont des diamètres de l'ordre du nanomètre et de la dizaine de nanomètre, tandis que les bactéries ont des tailles de l'ordre du micromètre. Enfin, le pH de surface élevé va nous mener à sélectionner des souches alcalino-résistantes. Par ailleurs, les traitements des GBR par les souches bactériennes seront *a priori* menés à l'air libre, il nous faudra donc sélectionner des souches bactériennes également aérobies. Enfin, avant de réaliser des essais de traitement des GBR avec des souches sélectionnées, il nous faudra étudier leur production de CaCO_3 afin de paramétrer au mieux nos protocoles d'essais de mise en contact des souches avec les GBR.

4. Bibliographie

Dao, D.-T. (2012) *(Multi-)Recyclage Du Béton Hydraulique*. Ecole Centrale de Nantes.

FD P18-663. (2015) Granulats - Modalités d'application des normes NF EN d'essai sur les granulats.

Martias, C. (2009) Etude calorimétrique et dilatométrique de matériaux.

NF EN 1097-6. (2014) Essais pour déterminer les caractéristiques mécaniques et physiques des granulats - Partie 6 : détermination de la masse volumique réelle et du coefficient d'absorption d'eau.

Tai, C.Y. & Chen, F.-B. (1998) Polymorphism of CaCO_3 , precipitated in a constant-composition environment. *AIChE Journal*, **44**, 1790–1798.

Chapitre 3 : Bioprécipitation des carbonates de calcium sur GBR – Essais de faisabilité

1. Introduction

Ce chapitre décrit les essais préliminaires visant à évaluer la faisabilité de la diminution de l'absorption des GBR à un niveau équivalent à celui des granulats naturels classiquement utilisés pour les bétons (typiquement inférieure à 2%), en s'appuyant sur des résultats de la littérature.

La porosité des GBR est majoritairement de l'ordre du nano ou de la dizaine de nanomètres restant inaccessible pour des micro-organismes. Nous cherchons donc à développer une technique permettant d'obtenir un dépôt homogène de CaCO₃ à la surface des GBR (Figure 3-1).

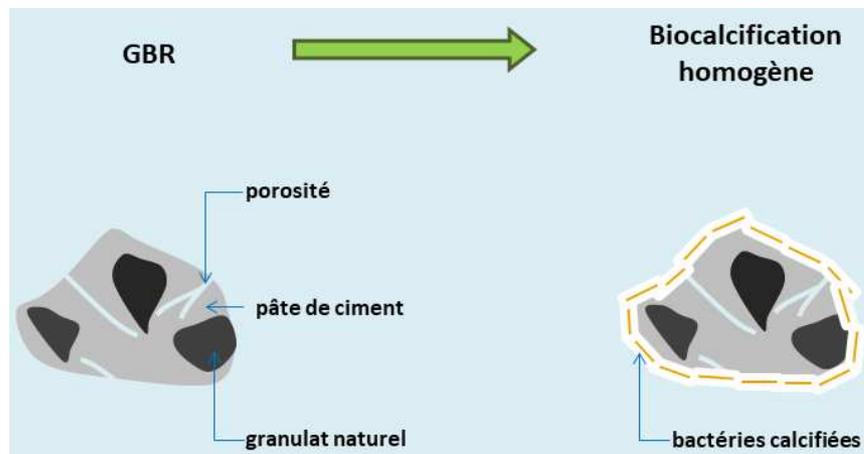
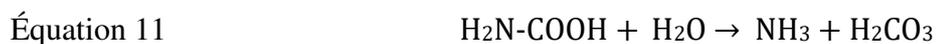
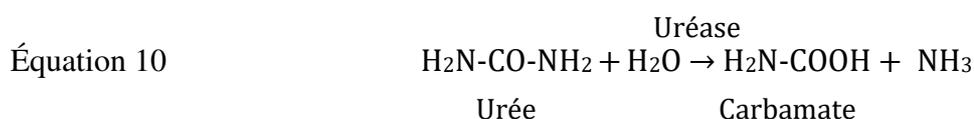


Figure 3-1 : Objectif du travail

Dans un premier temps, il est donc nécessaire de sélectionner et d'étudier des souches bactériennes employées pour traiter les GBR. Il a été vu dans le chapitre précédent que les GBR présentaient un pH de surface élevé. Nous allons donc sélectionner des souches capables de survivre à des pH alcalins tout en produisant des CaCO₃.

La production de CaCO₃ peut être réalisée selon plusieurs voies comme décrit dans le chapitre 1. La voie la plus étudiée est celle de la dégradation de l'urée (Stocks-Fischer *et al.* 1999; Okyay & Rodrigues 2014) et elle se décompose suivant les équations suivantes :

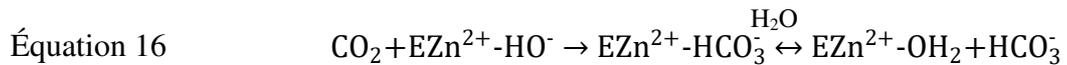




La réaction globale peut être écrite comme suit :



Une autre voie étudiée est celle de l'interconversion du CO₂ en HCO₃⁻ (Lindskog 1997; Jonkers *et al.* 2010), catalysée par l'anhydrase carbonique (EZn²⁺-HO⁻) :



Bien que les deux voies de production de carbonates soient employées dans des études sur l'utilisation de la biocarbonatation des CaCO₃ pour les matériaux de construction, peu d'entre elles comparent la production de CaCO₃ entre les deux enzymes impliquées dans ces voies métaboliques (Achal & Pan 2011). C'est pourquoi, une fois la sélection des souches réalisées, une étude de leur production de CaCO₃ en présence ou non d'urée sera réalisée, afin de déterminer si la stimulation de la voie de l'hydrolyse de l'urée est nécessaire pour avoir une biocarbonatation. Si la voie de l'interconversion est au moins aussi efficace que la voie de la dégradation de l'urée, alors nous pourrions nous passer de l'apport d'urée dans les milieux permettant ainsi de réduire les coûts au niveau industriel.

Par ailleurs, les essais seront réalisés sur plusieurs semaines pour une application sur chantier, puisqu'il s'agit de notre objectif final. Nous appliquerons ensuite nos souches productrices de CaCO₃ sur les GBR et évaluerons leurs taux d'absorption.

2. Sélection des souches bactériennes

En se basant sur la littérature (De Muynck *et al.* 2008; Tiano, Biagiotti & Mastromei 1999; De Muynck, De Belie & Verstraete 2010a; Dhimi, Reddy & Mukherjee 2013 ; voir Tableau 2, Chapitre 2), différentes souches bactériennes ont été sélectionnées. Les genres bactériens les plus employés au cours de ces études sont les *Bacillus*, et des bactéries coccoïdes comme des *Micrococcus*. C'est pourquoi nous avons décidé d'orienter la sélection de nos souches bactériennes vers ces genres bactériens. Les traitements qui seront développés en utilisant ces souches seront *a priori* employés à l'air libre, c'est pourquoi toutes ces bactéries sont de type aérobie. De plus, puisqu'elles doivent être mises en contact d'un matériau au pH alcalin, ces dernières sont toutes capables de se développer à des pH élevés (lacs et effluents alcalins). Ces souches vont nous permettre d'observer au mieux les différences d'efficacité de production de CaCO₃ entre différentes morphologies (coccoïdes et bacilles). L'emploi des bactéries à morphologies coccoïdes, qui ont des tailles inférieures à celles des bacilles, a pour avantage de proposer des surfaces spécifiques plus importantes et donc des sites de nucléations plus nombreux pour la croissance des CaCO₃. C'est aussi une des raisons pour lesquelles l'utilisation de bactéries capables de sporuler est intéressante. L'autre raison étant que la spore est une forme résistante d'une bactérie, lui permettant de survivre dans des environnements agressifs, comme le béton (Jonkers 2007). Nous allons également nous intéresser aux différences de biocalcification entre deux types de parois cellulaires (Gram positif ou négatif), qui présentent des sites de nucléation plus ou moins accessibles pour les CaCO₃ (partie 3, Chapitre 1).

Quatre souches bactériennes ont ainsi été sélectionnées : (1) *Alkalilimnicola ehrlichii* (DSM-17681), (2) *Bacillus chagannorensis* (DSM-18086), (3) *Bacillus halodurans* (DSM-497) et (4) *Micrococcus lactis* (DSM-23694) (Tableau 3-1).

Tableau 3-1 : Caractéristiques des souches bactériennes sélectionnées

Souche	<i>A.ehrlichii</i>	<i>B.chagannorensis</i>	<i>B.halodurans</i>	<i>M.lactis</i>
Coloration de Gram	Gram négatif	Gram positif	Gram positif	Gram positif
Morphologie	Bacille	Bacille	Bacille	Coccoïde
Dimensions	1,5-2,5µm x 0,3-0,5µm	0,6-0,7µm x 2,0-3,0µm	0,5-0,6µm x 3,0-4,0µm	ø 1,0µm
Gamme pH de développement	7,3 – 10,0	5,8 – 11,0	7,0 – 10,0	4,5 – 9,5
Spécificité	motile	motile	motile	non motile
Origine	Lac Mono (salé et alcalin) de Californie (Etats-Unis)	Lac alcalin de Mongolie Intérieure (Chine)	Sols	Effluents de l'industrie laitière
Sporulation	non	oui	oui	non

A.ehrlichii va nous permettre de comparer le rendement de production de CaCO₃ par des bactéries à coloration Gram négatif à celui de bactéries à coloration Gram positif telles que *B.halodurans*. En effet, les études menées sur la carbonatation biologiquement induite se portent généralement sur des bactéries à coloration Gram positif comme *Bacillus subtilis*, *Micrococcus sp.*(Tiano *et al.* 1999), *Sporosarcina pasteurii*, *Arthrobacter crystallopoietes* (Park *et al.* 2010)... Une souche à coloration Gram négatif a été étudiée dans le cadre de la conservation de roches carbonatées : *Myxococcus xanthus*. Les résultats des travaux menés sur cette souche dans le cadre de cette étude ont montré que la production de CaCO₃ par cette souche menait à une protection et un renforcement efficaces de la roche (Rodriguez-Navarro *et al.* 2003). Cependant, cette étude n'a pas comparé les résultats obtenus avec une bactérie Gram positif, c'est pourquoi il est intéressant d'intégrer *A.ehrlichii* à notre étude.

Les souches ont été cultivées dans les milieux conseillés par le fournisseur (DSMZ). Le détail de ces milieux est présenté dans le Tableau 3-2.

Tableau 3-2 : Composition des milieux de culture de chacune des souches sélectionnées

Souche	Composition du milieu de culture (pour 1L de solution)	pH	Nom attribué au milieu de culture
<i>A.ehrlichii</i>	-5,0mL de Solution SL-10 -1,0mL de Solution de vitamines -10,0mL de Solution 1M d'acétate de sodium -485mL de Mélange contenant (NH ₄) ₂ CO ₄ (0,1g), MgSO ₄ (25mg), NaCl (60g), K ₂ HPO ₄ (0,15g), KH ₂ PO ₄ (0,08g) et Tungstate (0,1mM) -500mL d'un Mélange de Na ₂ CO ₃ (10,6g) et NaHCO ₃ (4,2g)	9,8	MPA.e.
<i>B.chagannorensis</i>	NaCl (100g), Glucose (10g), Peptone (5g), Extrait de levure (5g), H ₂ HPO ₄ (1g), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,2g) et Na ₂ CO ₃ 10% (100mL)	10,0	NGPE
<i>B.halodurans</i>	Peptone (5g) et Extrait de viande (5g)	9,7	BN
<i>M.lactis</i>	Bouillon de caséine soja (30g) et Extrait de levure (3g)	7,4	BCSEL

La solution SL-10 utilisée dans le milieu de culture d'*A.ehrlichii* est composée de 10mL de HCl (25%), 1,5g de FeCl₂ x 4H₂O, 70mg de ZnCl₂, 1,0g de MnCl₂ x 4H₂O, 6mg de H₃BO₃, 190mg de CoCl₂ x 6H₂O, 2mg de CuCl₂ x 2H₂O, 24mg de NiCl₂ x 6H₂O et 36mg de Na₂MoO₄ x 2H₂O, pour 1L de préparation.

La solution de vitamines employée pour le milieu MPA.e. est composée de biotine (2,0mg), d'acide folique (2,0mg), de piridoxine-HCl (10,0mg), de thiamine-HCl x 2H₂O (5,0mg), de riboflavine (5,0mg), d'acide nicotinique (5,0mg), de D-Na-pantothénate (5,0mg), de vitamine B12 (0,1mg), d'acide p-aminobenzoïque (5,0mg) et d'acide lipoïque (5,0mg), pour 1L de préparation.

Le pH des quatre milieux de culture est ajusté avec des solutions de KOH (1 ou 4M). Le cas échéant, lorsque nous avons voulu réaliser des milieux gélosés, ils ont été faits par ajout de 25g d'Agar par litre. Les cultures bactériennes sont incubées à 30°C ± 1°C et les bouillons bactériens sont maintenus à 140tr/min. Toutes les souches sont issues de cultures préservées à -20°C dans du glycérol à 20%.

La sélection des souches étant faite, la première étape consiste à réaliser le suivi de leur croissance.

3. Etude de la croissance bactérienne

Afin de manipuler les bactéries dans des conditions optimales pour l'application que l'on vise (par exemple pour définir le temps de pré-conditionnement), il est important de déterminer leurs paramètres spécifiques de croissance comme leur temps de latence, leur temps de génération, le nombre de cellules présentent en phase stationnaire... C'est pourquoi un suivi horaire de croissance a été réalisé pour chacune des souches, dont la réalisation est décrite par la suite.

3.1. Protocoles de suivis de croissance bactérienne

Le suivi a été réalisé dans des conditions stériles, dans des Erlenmeyers de 250mL placés dans un incubateur à 30°C ± 1°C, à une agitation constante de 140tr/min. Afin de réaliser un suivi heure par heure en s'affranchissant des heures de fermeture du laboratoire, quatre cultures d'une même souche ont été initiées à des temps différents : 8h30, 11h30, 16h30 et 19h30 (Figure 3-2). Avant leur dilution au 10^{ème} dans deux milieux neufs de 150mL, les pré-cultures de :

- *A.ehrlichii* et *B.halodurans*, âgées de 48h, ont été repiquées deux fois au 10^{ème}, à partir d'une souche congelée à -20°C, dans un volume de 20mL,

- *M.lactis*, âgées de 24h, ont aussi été repiquées deux fois au 10^{ème}, à partir d'une souche congelée à -20°C, dans un volume de 20mL,

- *B.chagannorensis*, âgées de 120h, ont été repiquées une fois au 10^{ème}, à partir d'une souche congelée à -20°C, dans un volume de 20mL. Un seul repiquage suffisait car la croissance de cette souche étant lente et la quantité obtenue étant suffisante pour réaliser les essais suivants.

Les durées de pré-cultures nécessaires ont été déterminées qualitativement pour chaque souche de sorte à observer une turbidité dans les Erlenmeyer, garantissant d'une bonne croissance des bactéries dans les milieux.

Pour chaque horaire d'inoculation, un Erlenmeyer témoin contenant du milieu de culture liquide a été préparé en même temps que les deux milieux inoculés. Ce milieu témoin est employé à la fois comme blanc pour les mesures de densité optique des cultures réalisées chaque heure, et comme contrôle du déroulement de l'expérience. Si le témoin devient trouble, c'est qu'il a été contaminé et donc que les milieux inoculés le sont également. Ainsi, nous ne suivrions pas la croissance de la souche bactérienne étudiée, mais probablement celle d'une bactérie inconnue.

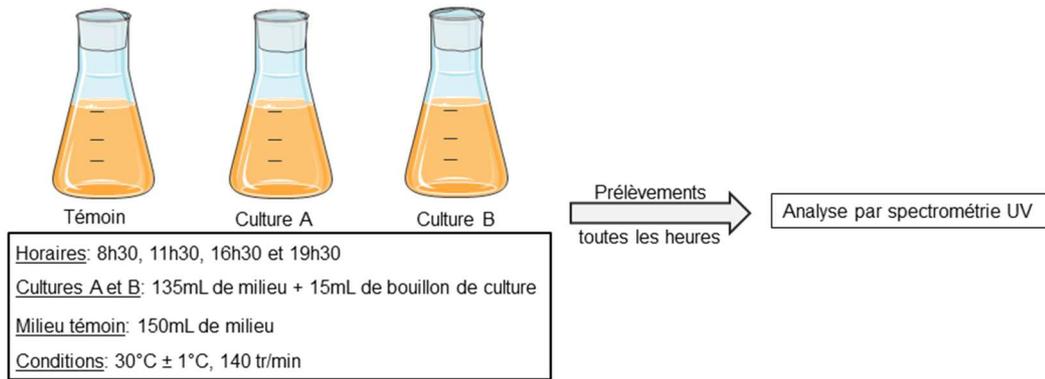


Figure 3-2 : Méthode expérimentale employée pour le suivi de la courbe de croissance de souches étudiées. A chaque prélèvement, 1mL des cultures A et B est versé dans des cuves de spectrométrie, et deux échantillons d'1mL du milieu témoin sont versés dans des cuves afin de servir de blancs.

Toutes les heures, 1mL de chaque culture (A et B) est prélevé pour analyse en spectrométrie à 600nm (*B.halodurans* et *M.lactis*), 660nm (*B.chagannorensis*) et 700nm (*A.ehrlichii*). Ces longueurs d'ondes, correspondant aux maximums d'absorbances de chaque souche, ont été déterminées durant l'essai permettant de lier l'absorbance mesurée à la concentration cellulaire en inspectant une gamme s'étendant de 600nm à 750 nm. Les absorbances mesurées à chaque échéance nous permettent d'estimer les densités cellulaires comme indiqué dans le chapitre 3 et aussi de construire des courbes de suivi de croissance.

La courbe de croissance de suivi de croissance est typiquement de la forme suivante :

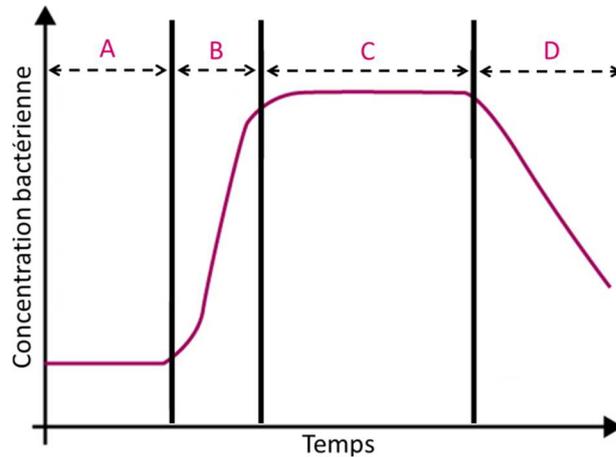


Figure 3-3: Courbe de croissance bactérienne type. A : phase de latence, B : phase exponentielle, C : phase stationnaire, D : phase de déclin

Une courbe de croissance bactérienne suit plusieurs phases :

- une phase de latence au cours de laquelle les bactéries s'adaptent à leur milieu et se préparent à la phase de croissance,
- une phase exponentielle au cours de laquelle la population bactérienne croît rapidement,
- une phase stationnaire au cours de laquelle le nombre de bactéries mortes équivaut au nombre de bactéries vivantes,
- une phase de déclin au cours de laquelle le nombre de bactéries vivantes est inférieur au nombre de bactéries mortes.

La relation mathématique sur la partie exponentielle entre la densité cellulaire initiale et la densité finale peut s'exprimer comme suit :

$$N=N_i2^n$$

Avec :

- N, la densité cellulaire finale (valeur du plateau)
- N_i, la densité cellulaire initiale (à l'issue de la période de latence)
- n, le nombre de générations

Pour pouvoir déterminer n, la formule peut être réécrite comme suit :

$$n= \frac{(\log N - \log N_i)}{\log 2}$$

La valeur n correspond au nombre de générations établi sur la durée de la phase exponentielle de la souche bactérienne étudiée. Pour obtenir le temps de génération t_G, il nous faut diviser cette durée t de la phase exponentielle par le nombre de générations n :

$$t_G = \frac{t}{n}$$

Dans le cadre de notre étude, il est *a priori* intéressant de sélectionner une souche bactérienne présentant une phase de latence courte, afin de faciliter la mise en place des essais et in fine avoir une efficacité précoce sur GBR. Par ailleurs, la croissance des cristaux de CaCO₃ semble être plus important au cours de la phase exponentielle (Castanier et al 1999, Le Métayer-Levrel & Perthuisot 1999), il est intéressant de sélectionner une souche présentant une phase exponentielle longue et un temps de génération faible.

3.2. Résultats

Les résultats obtenus pour les suivis de croissance bactérienne sont présentés dans la Figure 3-4, ainsi que dans le Tableau 3-3.

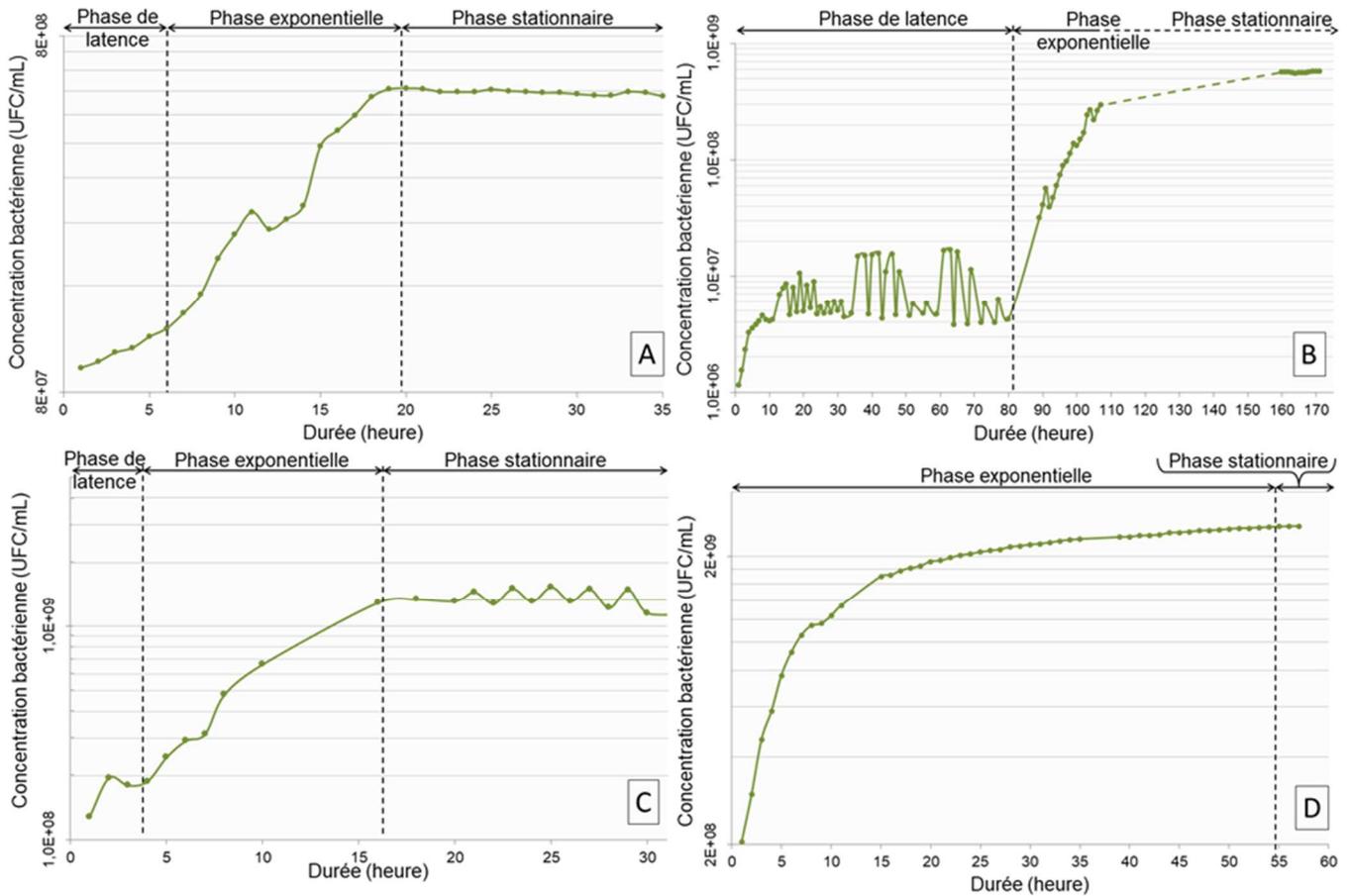


Figure 3-4 : Suivis de croissance de *A. ehrlichii* [A], *B. chagannorensis* [B], *B. halodurans* [C] et *M. lactis* [D]

Tableau 3-3 : Tableau regroupant les résultats obtenus pour chaque souche

souche	<i>A. ehrlichii</i>	<i>B. chagannorensis</i>	<i>B. halodurans</i>	<i>M. lactis</i>
temps de latence (h)	6	80	4	1
durée de la phase exponentielle (h)	13	entre 30 et 80h	13	54
concentration cellulaire estimée en début de phase exponentielle (UFC/mL)	1,2.10 ⁸	4,1.10 ⁷	1,9.10 ⁸	1,8.10 ⁸
concentration cellulaire estimée en fin de phase exponentielle (UFC/mL)	5,7.10 ⁸	5,6.10 ⁸	1,3.10 ⁹	2,3.10 ⁹
temps de génération	≈5h50min	ND	≈4h	≈14h30min

Nous pouvons observer que toutes les souches hormis *A. ehrlichii* présentent une concentration cellulaire en fin de phase exponentielle 10 fois plus importante qu'en début de phase exponentielle. Cela révèle, dans le cas de *A. ehrlichii*, un problème de dilution que nous retrouvons dans tous les bouillons bactériens préparés pour son suivi de croissance. La souche est repiquée en réalisant des dilutions au 10^{ème}, ce qui signifie que dans le milieu dans lequel elle est introduite, sa concentration doit correspondre au 10^{ème} de celle atteinte en phase stationnaire. Or, le suivi de croissance de la souche montre que la concentration bactérienne est de 1,2.10⁸ bactéries/mL au début de la phase de croissance, nous devrions donc obtenir une

concentration bactérienne en phase stationnaire de $1,2 \cdot 10^9$ bactéries/mL. Mais, nous atteignons une concentration bactérienne de $5,7 \cdot 10^8$ bactéries/mL. Il semble donc que la souche présente une croissance difficile, mais puisqu'il s'agit de la seule souche à coloration Gram négatif, nous décidons néanmoins de la conserver pour la suite de notre travail.

En ce qui concerne *B.chagannorensis*, nous notons que le temps de latence est très long, ce qui a empêché la détermination de la durée de sa phase exponentielle. Comme expliqué précédemment, nous souhaitons sélectionner des souches avec des temps de latence courts pour faciliter la mise en place de nos essais, c'est pourquoi cette souche ne sera plus employée dans la suite de notre travail.

B.halodurans, quant à elle, combine à la fois une phase de latence courte (4h), une phase exponentielle importante (13h) et un temps de génération court (≈ 4 h), ce qui fait d'elle une bonne candidate pour les essais qui suivront.

Enfin, *M.lactis* est la souche présentant la durée de phase exponentielle la plus longue (54h) et la phase de latence la plus courte (<1h). Ces caractéristiques sont très intéressantes pour notre travail, c'est pourquoi nous la conservons également pour la suite de notre étude.

3.3. Conclusion

Les résultats obtenus nous permettent finalement de conserver trois souches aux temps de latence brefs : *A.ehrlichii*, *B.halodurans* et *M.lactis*. La courbe de croissance est une première information qui permet de comparer les souches mais in fine ce qui nous intéresse ici c'est la courbe de production de CaCO₃ par les bactéries. Il est nécessaire de la mesurer directement car elle n'est probablement pas directement liée à la courbe de croissance de façon unique et cela pour au moins 2 raisons :

- Chaque type de bactérie a probablement une capacité différente à fixer les CaCO₃ par bactérie en fonction notamment de sa morphologie et de la nature de sa surface
- La production de CaCO₃ semble d'après la littérature dépendre des différentes phases de la courbe de croissance. Ainsi, d'après la littérature (Castanier *et al.* 1999; Miot 2008), plus la phase exponentielle est longue avec un temps de génération court et plus la production de cristaux peut être importante. Le but final de cette étude étant d'enrober les granulats de bétons recyclés par la bioproduction de CaCO₃, plus notre souche bactérienne produira de cristaux et plus la production sera efficace. A ce titre, bien que le temps de génération de *M.lactis* soit important, sa longue phase

exponentielle lui confère la possibilité de pouvoir former 3,7 générations pendant sa phase exponentielle ce qui la rend intéressante pour la suite du travail.

C'est pourquoi le chapitre suivant est consacré au suivi de la production de CaCO₃ par ces trois souches, qualifié et quantifié par DRX et ATG. On s'intéressera également à la forme cristalline des produits. En effet, les carbonates de calcium se présentent majoritairement sous trois formes –calcite, vaterite et aragonite- aux morphologies distinctes (Weir & Lippincott 1961; Greenwood & Earnshaw 2012), pouvant influencer l'imperméabilité de la gangue de CaCO₃ que nous souhaitons former autour des GBR. C'est pourquoi il nous est nécessaire de caractériser les cristaux bio-précipités par nos souches.

4. Production de CaCO₃

La production de CaCO₃ par les bactéries via la voie de dégradation de l'urée est la plus étudiée (Castanier *et al.* 1999; De Muynck *et al.* 2010b; Dhimi *et al.* 2013; Wei *et al.* 2015). Les études menées sur la bioprécipitation du CaCO₃ au travers de la dégradation de l'urée ont montré que la concentration d'urée idéale à apporter aux microorganismes pour qu'ils réalisent la carbonatation est de 20g/L pour les différents *Bacillus* (Stocks-Fischer *et al.* 1999; Wei *et al.* 2015). Comme vu dans la synthèse bibliographique, l'urée est une molécule que les bactéries peuvent dégrader afin de l'utiliser comme source d'azote, pour leur croissance, pour leur énergie chimique et pour leur maintien d'un microenvironnement sélectif (Girinsky 2009). Pour cela, la molécule d'urée diffuse au travers de la membrane cellulaire suivant un gradient de concentration, jusqu'au cytoplasme. Comme détaillé dans la partie bibliographie, l'hydrolyse de l'urée (H₂N-CO-NH₂) par l'enzyme uréase est alors réalisée, menant à la production d'ammoniac (NH₃) et de carbamate (H₂N-COOH) (Équation 18), permettant ainsi l'initiation de la réaction de carbonatation. Cependant, l'apport de cet élément implique une modification dans la composition du milieu de culture de nos microorganismes qui pourrait perturber leur croissance. C'est pourquoi nous devons observer leur évolution en présence d'urée avant de débiter des études sur la biocarbonatation au travers de cette voie de production.



Cette partie va donc présenter dans un premier temps la croissance des souches en contact avec l'urée et dans un second temps leur production de CaCO₃.

4.1. Croissance des souches en présence d'urée

Le travail est réalisé en utilisant les souches *A.ehrlichii*, *B.halodurans* et *M.lactis*, préservées à -20°C dans leur milieu de culture contenant du glycérol (20%). Un prélèvement de chaque souche est réalisé en milieu stérile à l'aide d'une anse d'inoculation et est introduit dans un flacon contenant 5mL de milieu de culture ainsi que 20g/L d'urée. Un flacon supplémentaire contenant 5mL de milieu de culture additionné d'urée est systématiquement préparé à titre de témoin. Les milieux MPA.e, BN et BCSEL sont préparés et stérilisés (15min, 125°C) avant d'y introduire 20g/L d'urée filtrée (Ø 0,22µm). Les milieux inoculés sont ensuite laissés en incubation (30°C, 140tr/min) pendant 48h. On s'assure que le développement bactérien a bien lieu en observant une turbidité des milieux inoculés par rapport aux milieux témoins.

Nous avons constaté que le milieu inoculé par *A.ehrlichii* est resté aussi clair que le milieu témoin alors que la turbidité des milieuxensemencés de *M.lactis* et *B.halodurans* est similaire à celle observée en l'absence d'urée. Il semble donc que la présence d'urée perturbe la souche *A.ehrlichii*, soit qu'elle empêche sa croissance, soit qu'elle rallonge sa période de latence au-delà de 48 h. Or la production de CaCO₃ par la dégradation de l'urée est une voie que nous souhaitons étudier. Nous éliminons donc *A.ehrlichii* de la suite de notre travail, puisqu'elle est incapable d'évoluer en 48 h en présence d'urée alors que la en premier lieu car c'est la voie *a priori* privilégiée dans la bibliographie. D'un autre côté, à ce stade de notre travail nous cherchons à montrer la faisabilité du traitement de GBR avec des bactéries et par manque de temps, il n'est pas possible de faire varier beaucoup de paramètres dont la nature de la bactérie. Pour des raisons pratiques de durées d'essai, nous décidons donc d'abandonner pour la suite *A.ehrlichii* et de nous concentrer sur *M.lactis* et *B.halodurans*.

4.2. Suivi de production de CaCO₃ par *B.halodurans* et *M.lactis* en présence d'urée

La production de CaCO₃ par les micro-organismes nécessite un apport de calcium ionique et d'urée favorisant la carbonatation. Il nous faut désormais déterminer quelle concentration et quelle source en ions calcium apporter au milieu. Différentes sources de calcium sont employées dans la littérature comme le chlorure de calcium (Stocks-Fischer *et al.* 1999; Okwadha & Li 2010; Tobler *et al.* 2011), l'acétate de calcium (Barabesi *et al.* 2007; Shirakawa *et al.* 2011), le lactate de calcium (Wiktor & Jonkers 2011; Stuckrath *et al.* 2014; Ducasse-Lapeyresse 2014), le nitrate de calcium ou encore l'oxyde de calcium (Achal & Pan 2011; Abo-El-Enein *et al.* 2012).

Plusieurs critères sont *a priori* à prendre en compte pour choisir la source de sel de calcium :

- la solubilité du sel : elle doit être suffisante pour que la concentration en ion calcium soit importante à proximité des bactéries. Elle n'a pas forcément besoin d'être maximale, car ces ions ont vocation à précipiter au fur et à mesure en CaCO₃ ce qui permet d'alimenter la pompe à Ca²⁺
- l'innocuité du sel sur le développement des bactéries
- le coût du sel, même si à ce stade de faisabilité du projet ce n'est pas un critère fort
- l'innocuité du sel vis-à-vis de l'usage ultérieur dans le béton.

Le tableau suivant résume le coût et la solubilité de différents sels disponibles couramment sur le marché.

	Masse molaire (g/mol)	Prix approximatif (€/t) (source alibaba.com)	Solubilité dans l'eau (g/L à 20°C)
Chlorure de calcium	110	200	745
Nitrate de calcium	164	200	1212
Acétate de calcium	158	1000	347
Lactate de calcium	218	1000	50
Formiate de calcium	130	400	170
Citrate de calcium	498	1000	0,95 (à 25°C)
Malate de calcium	172	1000	-
Gluconate de calcium	430	1000	3,3 (à 25°C)

Les GBR que nous souhaitons traiter avec les bactéries ont vocation à être recyclés dans du béton qu'il soit destiné au domaine routier ou aux bâtiments et ouvrages d'art. Or la présence potentielle d'ions chlorures issus de la décomposition du CaCl₂ n'est pas souhaitable sur les GBR traités (tout comme pour les granulats naturels d'ailleurs). En effet, dans le premier scénario d'usage, les ions chlorures pourraient diffuser vers les sols et impacter négativement la flore présente (Trombulak & Frissell 2000). Dans les deux autres cas, les ions peuvent poser des problèmes de corrosion des armatures et nuire à la durabilité des ouvrages. (Neville 1995; Hussain & Al-Gahtani 1996). Nous écartons donc dans un premier temps le CaCl₂ comme source de calcium dans notre étude.

Nous évitons également l'utilisation du Ca(NO₃)₂, car les nitrates peuvent ralentir l'activité de l'uréase bactérienne (Whiffin 2004; Abo-El-Enein *et al.* 2012).

Enfin, le CaO ne pourra être utilisé dans notre étude car cet élément est très peu soluble dans l'eau (solubilité de 1,7 g/L à 20°C). De même pour le lactate de calcium qui présente également une faible solubilité dans l'eau (50 g/L à 20°C).

A ce stade nous nous sommes donc tournés vers l'acétate de calcium qui présente une solubilité importante. Il fait certes partie des produits les plus coûteux mais ce n'est pas notre principal critère pour l'instant et en tout cas il n'est pas plus cher que le lactate, par exemple. De plus ce sel est cité fréquemment dans la littérature. Notamment, Abo-El-Enein *et al.* (2012) obtiennent un rendement de bioproduction de CaCO₃ similaire avec de l'acétate à celui obtenu dans des essais menés avec du CaCl₂.

On peut également citer les travaux menés par Boquet *et al.* (1973) et Monger *et al.* (1991) qui ont montré qu'une production de calcite était obtenue en apportant une concentration en acétate de calcium de 2,5g/L.

S'inspirant de ces derniers travaux, nous avons donc décidé d'utiliser dans un premier temps l'acétate de calcium à une concentration prise forfaitairement à 5g/L.

4.2.1. Protocole

Après une remise en culture de souches préservées dans du glycérol (20%) à -20°C, un repiquage progressif des cultures au 10^{ème}, toutes les 24h, en présence d'urée (20g/L) et à pH optimal de croissance des souches (pH 9,7 pour *B.halodurans* et pH 7,4 pour *M.lactis*) est réalisé. Une fois un volume suffisant de bouillon bactérien obtenu, la culture est repiquée dans un tube Falcon® contenant 20mL de milieu additionné de l'urée (20g/L) et de l'acétate de calcium à une concentration de 5 g/L et au pH optimal de croissance des souches (Figure 3-5). Des témoins non inoculés et des échantillons inoculés sont réalisés en triplicatas pour chaque échéance prévue. Le suivi de production est réalisé sur 1 semaine, au cours de laquelle les cultures sont incubées (30°C, 140 tr/min) dans des tubes fermés mais non scellés afin de permettre les échanges gazeux en limitant les contaminations. A chaque échéance, un prélèvement du bouillon est réalisé pour effectuer un dénombrement bactérien sur cellule de Thoma. En effet, cette technique permet un dénombrement plus rapide que par dénombrement sur gélose et la présence de CaCO₃ ne permet pas d'utiliser la densité optique.

Le milieu liquide est séparé du résidu solide par une centrifugation (3000g, 10 min, 5°C) et ce dernier est récupéré et analysé après des étapes de rinçage et séchage. Si une production de matière est constatée, une analyse DRX de l'échantillon permet de déterminer : (1) si nous sommes en présence de carbonates de calcium, (2) sous quelle forme cristalline se trouvent ces CaCO₃ et (3) en quelles proportions ils se trouvent. En combinant cette analyse à une ATG, il est possible de connaître la quantité de CaCO₃ formés dans l'échantillon.

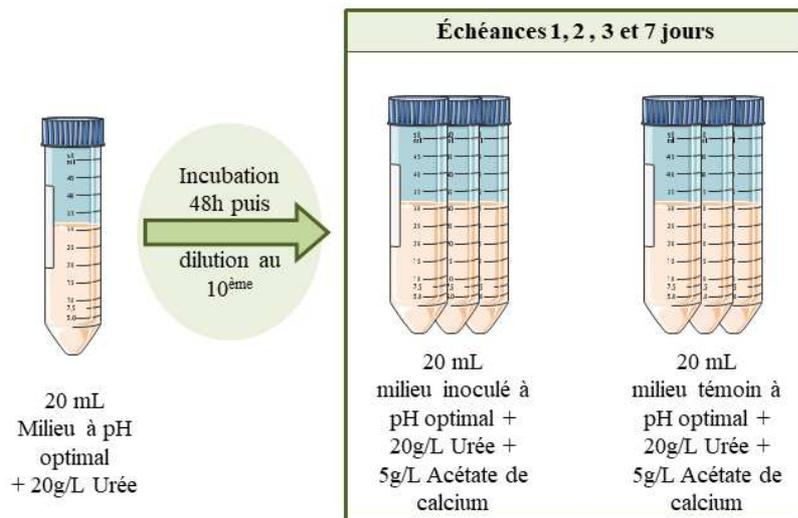


Figure 3-5: schéma du processus expérimental permettant de comparer la production de CaCO₃ par *B.halodurans* et *M.lactis* sur 1 semaine, en apportant de l'urée (20g/L) et de l'acétate de calcium (5 g/L). Les incubations sont réalisées à 30°C, 140 tr/min.

4.2.2. Résultats et discussion des productions de CaCO₃ avec 5g/L d'acétate de calcium

L'analyse ATG des culots a permis d'observer la présence de CaCO₃ pour *B.halodurans* (Figure 3-6) et pour *M.lactis* (Figure 3-7). On rappelle ici que les masses affichées (voir chapitre 2) sont celles imputables à l'activité bactérienne puis que les masses des dépôts des témoins ont été soustraites.

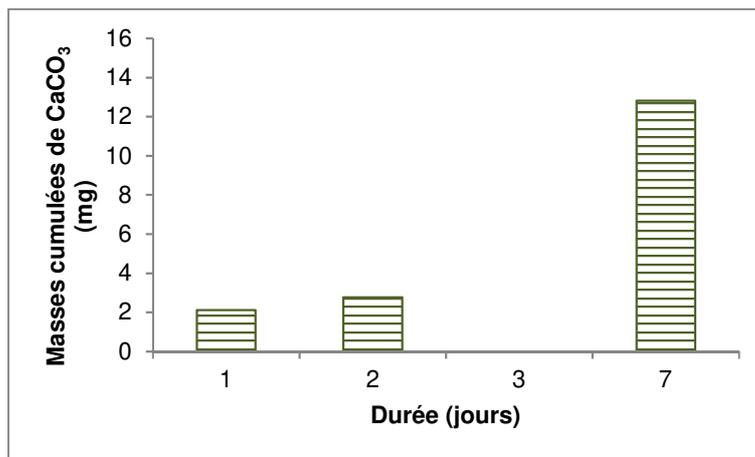


Figure 3-6 : Masses cumulées de CaCO₃ déterminées par ATG, liées à l'activité bactérienne, dans les culots des cultures de *B.halodurans*, en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 5g/L et d'urée de 20g/L

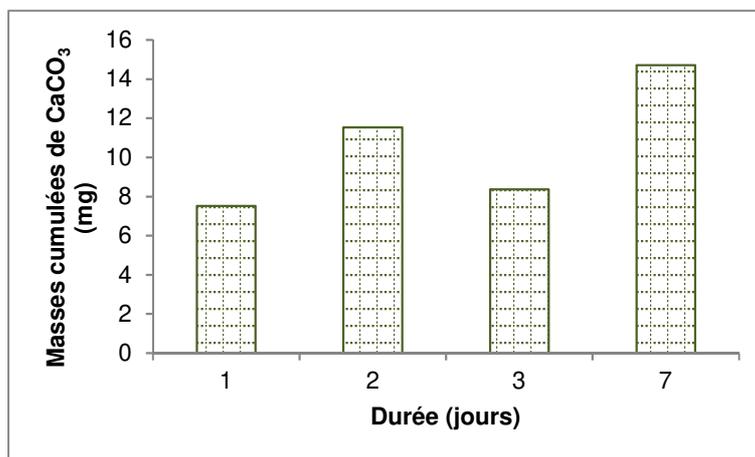


Figure 3-7 : Masses cumulées de CaCO₃, liées à l'activité bactérienne, déterminées par ATG dans des culots dans les cultures de *M.lactis*, en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 5g/L et d'urée de 20g/L.

Nous pouvons observer que les masses cumulées de CaCO₃ produites par *B.halodurans* sont faibles mais décuplent tout de même entre 2 et 7 jours d'incubation. En ce qui concerne la production par *M.lactis*, nous notons que la production à 7 jours est proche de celle obtenue

avec *B.halodurans*. Nous remarquons également que la production est visible dès le premier jour d'incubation, avec les deux souches.

Les analyses ATG effectuées sur les culots récoltés dans les échantillons témoins associés aux milieux inoculés avec *B.halodurans* n'ont révélé aucune cristallisation de CaCO₃ alors que dans les milieux témoins sans bactérie issus des essais avec *M.lactis*, une cristallisation est observée à partir de 3 jours d'incubation et atteint entre 7 et 10 mg. Il semble donc que le milieu nutritif de *M.lactis* favorise la précipitation de CaCO₃, grâce à la dissolution naturelle du CO₂ en HCO₃⁻ dans l'eau ou d'un élément du milieu de culture. Mais cela reste à confirmer.

Il n'a pas été possible de déterminer la nature des cristaux produits par DRX car l'appareil nécessite des échantillons de masse minimale de 180mg, qui n'étaient pas atteints lors des essais. Toutefois, le suivi de la croissance des souches au cours de cet essai nous permet de dire que cette faible production de CaCO₃ n'est pas liée à un manque d'activité cellulaire (Figure 3-8). En effet, la courbe de croissance des souches montre que la concentration cellulaire augmente au cours du temps pour se stabiliser entre 3 et 7 jours. Notons toutefois que les allures de courbes obtenues diffèrent de celles présentées en Figure 3-4 avec des temps de phase exponentielles de l'ordre de 3 jours pour les deux bactéries. Ceci est sans doute dû à une moins bonne oxygénation du milieu par rapport aux essais dans des Erlenmeyer, qui ralentit la croissance, et également à la présence d'urée.

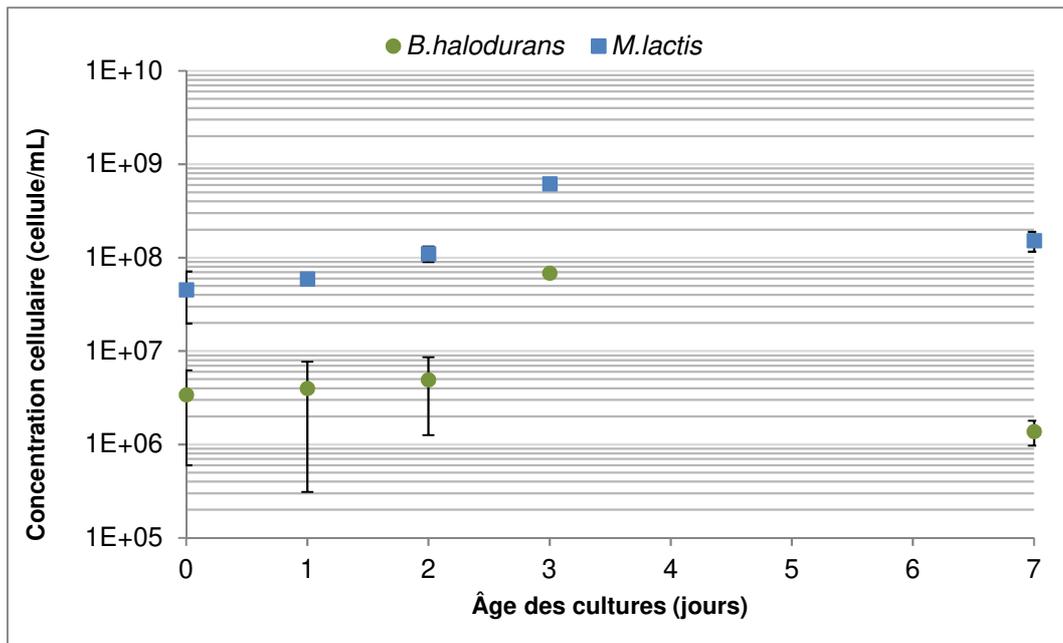


Figure 3-8 : Suivi de la concentration bactérienne de *B.halodurans* et *M.lactis* dans les milieux contenant 5g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée. (Valeurs en annexe C)

Les calculs de rendements effectués à 7 jours en se basant sur le nombre de bactéries initialement introduites dans les milieux inoculés sont de l'ordre de 62,5 pg/cellule pour *B.halodurans* et de 7,7 pg/cellule pour *M.lactis*. Ces résultats préliminaires semblent montrer que *B.halodurans* est plus efficace pour bioprécipiter le CaCO₃. Mais cela reste à nuancer de par la petite masse des échantillons analysés et le fait que les concentrations bactériennes initiales des deux souches sont très différentes.

A l'issue de ces essais nous constatons que les bactéries fonctionnent comme attendu et que l'on peut observer une bioprécipitation de CaCO₃. Toutefois, en regardant la stœchiométrie des équations de la voie par uréase (Équation 14), on constate que si les réactions sont complètes, une mole d'acétate de calcium (Ca(CH₃COO)₂) permet de produire au mieux une mole de CaCO₃. La masse molaire de l'acétate de calcium étant de 158 g/mol et celle du carbonate de calcium de 100 g/mol, on en déduit donc qu'un g d'acétate permet au mieux de produire 0,633 g de carbonate de calcium.

Dans les essais présentés ci-dessus nous avons en cumulés 60 ml de solution à 5g/L d'acétate de calcium, soit un total de 300 mg d'acétate de calcium et donc une masse de carbonate de calcium maximale attendue théorique de 190 mg.

On peut calculer le rendement du procédé ($R_{pr}(X)$) par le rapport entre la masse de CaCO₃ produite par les bactéries à une échéance X donnée ($m(\text{CaCO}_3)_X$) et cette masse maximale théorique ($m(\text{CaCO}_3)_{\text{théorique}}$).

$$R_{pr}(X) = 100 \times \frac{m(\text{CaCO}_3)_X}{m(\text{CaCO}_3)_{\text{théorique}}}$$

On obtient alors 6,7% pour *B.halodurans* et 7,7% pour *M.lactis*, à une semaine. Les deux souches ont le même rendement avec cette approche et il est très bas. Il semble donc que seule une faible quantité des ions calcium mis en solution se combinent à la surface des bactéries pour précipiter du CaCO₃.

La stœchiométrie des équations de la voie par uréase montre également que pour faire réagir une mole d'acétate de calcium (Ca(CH₃COO)₂), il faut une mole d'urée. Or la concentration de 20 g/L d'urée choisie pour le milieu bactérien correspond à une concentration de 0,3 mol/L puisque la masse de l'urée est égale à 60,1 g/mol. Pour tirer pleinement bénéfice de l'urée mise à disposition, il faudrait avoir une concentration de 0,3 mol/L soit de 47,4 g/L d'acétate de calcium.

En prenant un dosage forfaitaire de 5 g/L on voit donc que l'on ne favorisait pas la mise en contact des ions HCO₃⁻ via la dégradation de l'urée et des ions calcium provenant de l'acétate de calcium, ce qui peut être à l'origine du faible rendement du procédé.

C'est pourquoi nous avons renouvelé les essais en apportant cette fois-ci une concentration en acétate de calcium arrondie à 50g/L, qui permet de valoriser pleinement le potentiel de l'apport en urée de 20g/L.

Nous restons à ce stade sur un dosage de 20g/L d'urée alors que nous pourrions être tentés de l'augmenter pour accroître proportionnellement (d'après les équations) la production. En effet, Okwadha & Li (2010) ont démontré qu'il s'agissait de la concentration à laquelle l'activité de l'uréase était optimale. En effet, si la quantité d'urée est trop importante, on risque un rétrocontrôle de l'enzyme uréase et donc une limitation de son activité. De plus, d'après Girinsky (2009), une quantité trop importante d'ammonium limite la production de CaCO₃ en augmentant le pH qui limite le développement bactérien et donc diminuer la production de CaCO₃.

4.2.3. Résultats et discussion des productions de CaCO₃ avec 50g/L d'acétate de calcium

Le même protocole que précédemment a été employé mais en introduisant cette fois-ci 50g/L d'acétate de calcium.

Les suivis de croissances nous montrent des profils relativement plats (à la dispersion des essais près) sans phase de croissance exponentielle comme on l'avait observé sur la Figure 3-8. Les suivis de croissance de la Figure 3-9 nous montrent des profils relativement plats (à la dispersion des essais près) sans phase de croissance exponentielle comme on l'avait observé sur la Figure 3-8. Ceci s'explique sans doute par le fait qu'à t=0, la concentration en bactéries initiales pour les deux espèces avait déjà atteint la concentration à l'état stationnaire observée sur la Figure 3-8 (3,7 10⁷ bactéries/mL pour *B.halodurans* et 3.6 10⁸ bactéries/mL pour *M.lactis*).

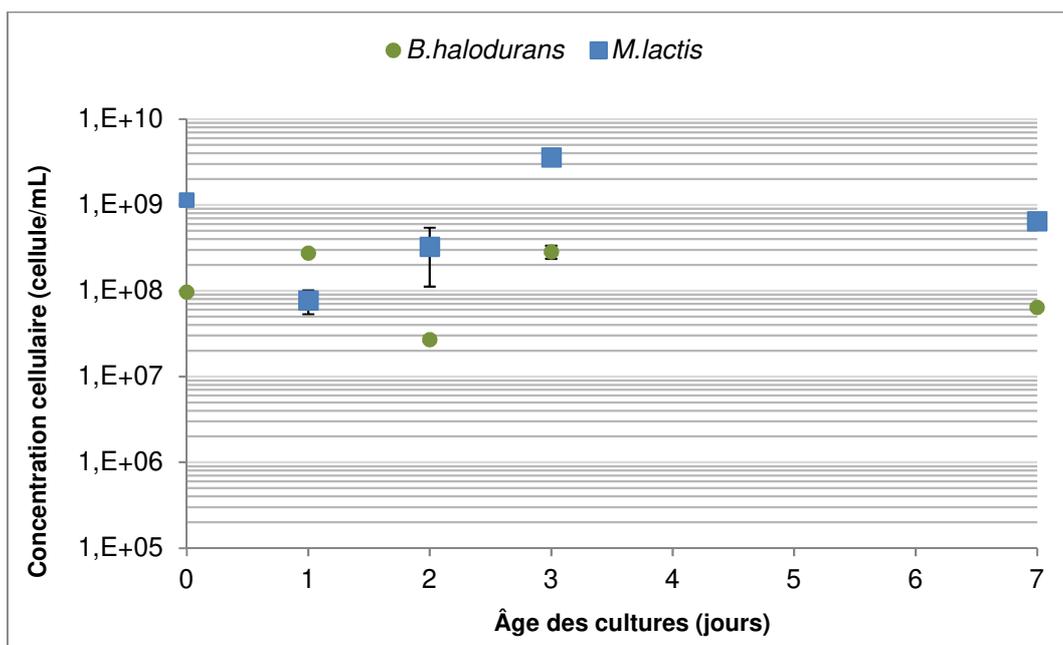


Figure 3-9 : Suivi de la concentration bactérienne de *B.halodurans* et *M.lactis* dans les milieux contiennent 50g/L d'acétate de calcium (Valeurs en annexe C).

L'analyse ATG menée sur les culots témoins, et ceux des échantillons inoculés, montre qu'avec l'essai avec *B.halodurans*, une production de CaCO₃ n'est observée qu'à 7 jours (Figure 3-10). Quant à *M.lactis*, l'analyse ATG a permis de détecter une production de CaCO₃ à partir de 2 jours d'essais (Figure 3-11).

En reprenant le même calcul que dans l'expérience précédente, la masse maximale de CaCO₃ qui été attendue était de 3000 mg (50 mg/ml x 60 ml). On constate que même si, à une semaine, on a obtenu 4 fois plus de carbonates de calcium avec *B.halodurans* et à peu près la même masse avec *M.lactis* que lors de l'essai à 5g/L d'acétate de calcium, le rendement du procédé a fortement chuté avec les deux souches (2,6 et 0,6% respectivement). Seule une très faible partie des ions calcium disponibles a donc précipité en carbonates de calcium à la surface des bactéries.

Quand on raisonne en rendement par bactérie initialement présente dans la solution on obtient également des valeurs nettement plus basses que précédemment : respectivement 8,3 et 0,2 pg/cellule. Ce critère semblerait confirmer que la souche *B.halodurans* est plus efficace mais là encore on peut se poser la question de la pertinence de ce critère étant donné que les concentrations des deux souches sont très différentes (Figure 3-9) ce qui fausse la comparaison. De même le nombre de bactéries pris en compte pour calculer le rendement n'est pas du même ordre de grandeur dans les deux expériences puisque les concentrations en bactéries initiales ont été multipliées par 10 environ (Figure 3-8 et 3-9). On ne compare donc pas l'efficacité des bactéries dans les mêmes conditions de croissance, or la littérature semble montrer que le rendement « instantané » des bactéries est dépendant de la phase de croissance (latence, croissance exponentielle ou stationnaire).

Maintenant que l'on a rééquilibré le dosage en urée et en acétate de calcium, on pourrait soupçonner un manque de bactéries pour servir de point de nucléation aux ions calcium. Mais cela ne semble pas être la cause du faible rendement, car non seulement nous avons multiplié par dix la teneur en acétate mais nous avons également multiplié par 10 les concentrations initiales des deux souches par rapport à l'expérience précédente (Figure 3-8 et 3-9).

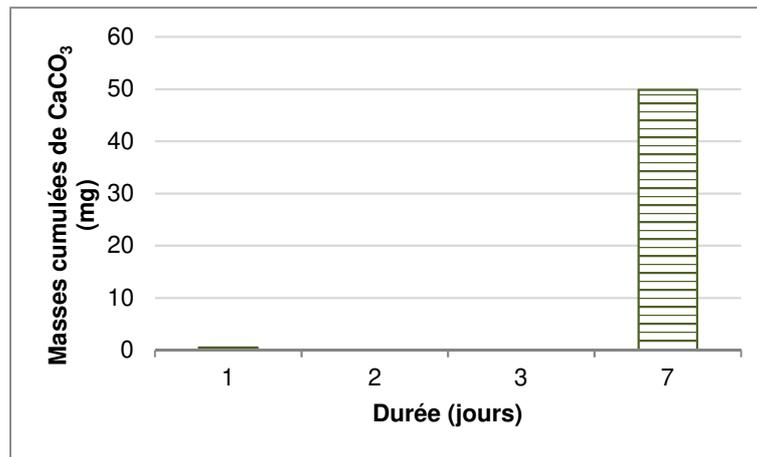


Figure 3-10 : Masses cumulées de CaCO₃, liées à l'activité bactérienne, déterminées par ATG dans les culots des cultures de *B.halodurans*, en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L et d'urée de 20g/L

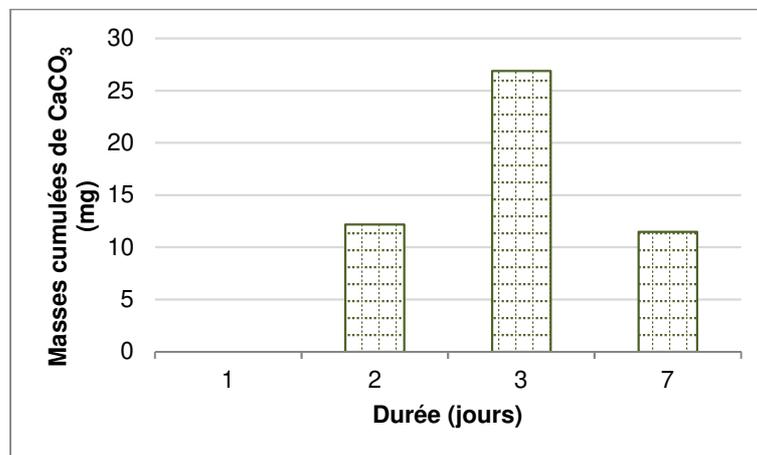


Figure 3-11 : Masses cumulées de CaCO₃, liées à l'activité bactérienne, déterminées par ATG dans des culots dans les cultures de *M.lactis*, en tube, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L et d'urée de 20g/L.

Les analyses ATG des culots issus des milieux témoins de l'essai avec *B.halodurans* ont montré qu'une précipitation de CaCO₃ était réalisée et représentait environ 14% de la masse totale de CaCO₃ obtenue dans les milieux inoculés. Les mêmes analyses menées dans les témoins de l'essai avec *M.lactis* ont révélé une formation de CaCO₃ dans les témoins représentant entre 35% (à 2 et 3 jours d'incubation) et 42% (à 7 jours d'incubation) des masses totales de CaCO₃ obtenues dans les milieux inoculés. La masse de CaCO₃ formée dans les échantillons témoins représente une masse importante par rapport à celle obtenue dans les échantillons contenant les bactéries (Tableau 3-4) ce qui peut induire des imprécisions dans le calcul des masses cumulées de CaCO₃ formées uniquement par les bactéries. Ceci explique sans doute la valeur plus basse de masse cumulée de CaCO₃ à 7 jours sur la Figure 3-11.

Tableau 3-4 : masses cumulées de CaCO₃ dans les témoins issus de l'essai réalisé avec *M.lactis* dans du milieu BCSEL pH7,4 additionné de 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée

Echéance	1 jour	2 jours	3 jours	7 jours
Masse cumulée de CaCO ₃ (mg)	29,6	19,5	33,7	31,6

Ce résultat confirme les premières observations faites dans l'expérience précédente, à savoir que le milieu de culture utilisé pour la souche *M.lactis* favorise la cristallisation de CaCO₃ en plus grandes quantités que le milieu employé pour *B.halodurans* en l'absence de bactéries.

Malgré la faible quantité de CaCO₃ récolté, une analyse DRX a permis de détecter que le dépôt obtenu à 7 jours d'incubation avec *B.halodurans* est plutôt de la vaterite. Ce résultat préliminaire est à confirmer.

4.2.4. Conclusions

Ce premier travail *in vitro* nous a permis de confirmer que comme attendu les souches *B.halodurans* et *M.lactis* sont capables de bioprécipiter du CaCO₃ en présence d'urée et que pour cela le choix de l'acétate de calcium comme source d'ions calcium était pertinent. Les résultats préliminaires semblent montrer que *B.halodurans* est plus productive que *M.lactis*. Les essais n'ont duré qu'une semaine et, bien que dispersés, ils tendent à montrer que la production n'a pas atteint son plafond en fin d'essai. Il apparaît donc intéressant de poursuivre ces essais sur une durée plus longue.

En cherchant à comparer la précipitation du CaCO₃ pour différentes bactéries et différents teneurs en acétate de calcium, on a constaté que la définition d'un rendement cumulé dans le temps en CaCO₃ unique pour chaque souche en se basant sur la teneur en bactéries initiale n'est pas aisée. En effet la teneur dans la solution modifie l'allure de la courbe de croissance et s'il est confirmé que la production instantanée de CaCO₃ dépend de la phase dans laquelle on est sur la courbe de croissance, cette teneur initiale a un impact sur la production cumulée. Ainsi pour une souche donnée le rendement dépend de la teneur en bactéries initiale.

En conséquence, pour la suite des expérimentations, il est souhaitable de maintenir cette concentration la plus constante possible. De plus la connaissance d'un rendement instantané (voir le chapitre 2) serait plus instructive.

On peut plus facilement caractériser le rendement du procédé de bio carbonatation dans son ensemble en comparant la masse de carbonate de calcium produite à la masse de carbonate de calcium théorique attendue qui se déduit en multipliant par 0,633 la masse d'acétate de calcium introduite. On a constaté que ce rendement était faible (très en dessous de 10%).

Pour expliquer ce fait dans un premier temps, nous avons réalisé que le dosage à 5g/L d'acétate sélectionné n'était pas cohérent avec celui de l'urée à 20 g/L. Nous avons ainsi choisi un dosage de 50g/L qui respectait la stœchiométrie de l'uréase, mais le rendement n'a pas été amélioré. Le nombre de bactéries ne semble pas non plus être la cause du mauvais comportement. La surface d'échange avec l'atmosphère était limitée dans les 2 expériences décrites de par la géométrie des tubes Falcon®. Il est possible que ceci soit un facteur d'influence important.

Par ailleurs, d'après Castanier *et al.* (1999) et Miot (2008), la production de CaCO₃ est initiée pendant la phase exponentielle. Nous avons pu constater que même en absence de cette phase durant les essais menés avec un apport de 50g/L d'acétate de calcium, une formation de CaCO₃ peut avoir lieu. Cependant cette production pourrait être beaucoup plus importante en présence d'une phase exponentielle de croissance. Ainsi, il nous faut donc désormais travailler dans des conditions qui favorisent plus la croissance de nos souches notamment en augmentant l'oxygénation du milieu.

Enfin, maintenant que la croissance des souches en présence d'urée est avérée, il serait également intéressant de vérifier si la bioproduction de CaCO₃ par la voie de l'interconversion est intéressante.

L'ensemble de ces remarques nous ont conduit aux essais présentés dans la partie suivante.

4.3. Comparaison des productions de CaCO₃ en présence et absence d'urée

Nous avons pu constater dans la partie précédente que la bioproduction de CaCO₃ nécessite un apport de calcium ionique à une concentration d'au moins 12 g/L (soit 0,3 mol de calcium) pour réagir avec la totalité des ions carbonates produits au travers uniquement de la voie de dégradation de l'urée dosée à 20g/L. D'après Castanier *et al.* (1999) et Miot (2008), la bioprécipitation des CaCO₃ se poursuit au cours de la phase stationnaire de croissance des souches. Par ailleurs, les expériences menées précédemment tendent à montrer que la production de CaCO₃ peut se poursuivre après 1 semaine d'incubation, nous allons donc mener ce travail sur 3 semaines.

De plus, nous allons comparer la production de CaCO₃ en présence et en absence d'urée. Achal & Pan (2011) ont déjà tenté d'observer les activités de l'uréase et l'anhydrase carbonique (AC) issues de *Bacillus sp.* sur 1 semaine. Ils ont alors démontré que l'uréase n'était pas la seule enzyme impliquée dans la production de CaCO₃ par les bactéries, mais que l'AC avait également un rôle majeur dans ce phénomène. Ils n'ont pourtant pas essayé de déterminer laquelle des deux enzymes permettait d'obtenir le rendement le plus élevé de production de CaCO₃. La connaissance de ce paramètre nous permettrait de savoir si l'apport d'urée est nécessaire pour avoir une production importante de CaCO₃ par nos bactéries.

4.3.1. Protocole de production des carbonates de calcium en présence et absence d'urée

Après une remise en culture, un repiquage progressif des cultures au 10^{ème} est réalisé toutes les 24h, en présence d'urée (pour favoriser l'activité de l'uréase) ou non et à pH optimal de croissance des souches. Une fois un volume suffisant de bouillon bactérien obtenu, la pré-culture contenant de l'urée est repiquée au 10^{ème} dans 40 mL de milieu contenant de l'urée (20g/L) et de l'acétate de calcium à 50 g/L et au pH optimal de croissance des souches (pH 9,7 pour *B.halodurans* et pH 7,4 pour *M.lactis*). La pré-culture sans urée est repiquée au 10^{ème} dans 40 mL de milieu contenant également 50g/L d'acétate de calcium afin de comparer les deux voies de production à même apport d'ions calcium.

Les cultures bactériennes en présence d'urée pourront former des CaCO₃ via l'activité de l'uréase et de l'AC, alors que celles sans urée ne pourront passer que par la voie de l'interconversion.

Des témoins non inoculés (avec ou sans urée) et des échantillons inoculés sont réalisés en triplicatas pour chaque échéance prévue. Le suivi de production est réalisé sur 3 semaines,

au cours desquelles les cultures sont incubées à 30°C, 60 tr/min. A chaque échéance (1, 2 et 3 semaines), un prélèvement du milieu est réalisé pour effectuer des dénombrements sur cellule de Thoma. Une centrifugation (3000g, 10 min, 5°C) des milieux est réalisée et le culot est récupéré -après élimination du surnageant- et analysé par DRX et ATG (Figure 3-12).

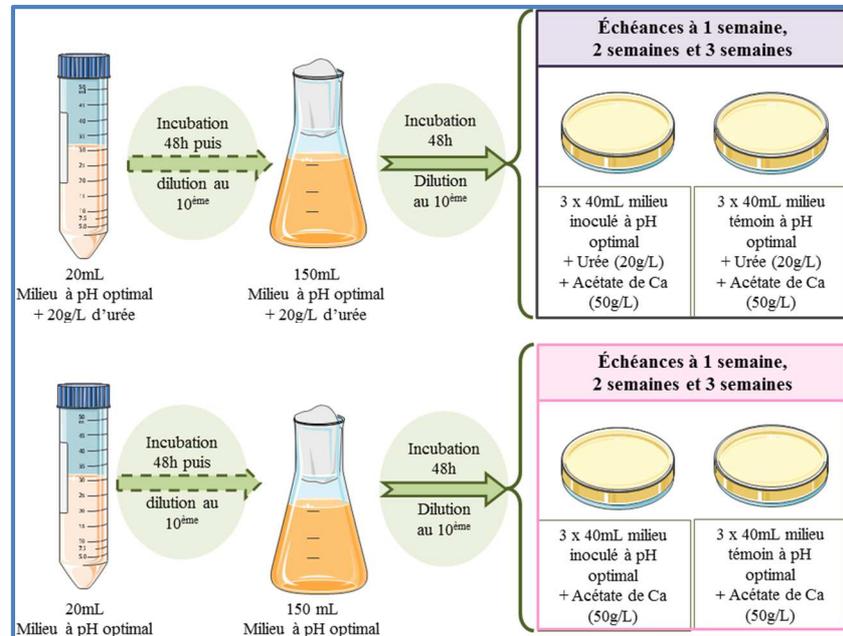


Figure 3-12: schéma du processus expérimental permettant de suivre la production de CaCO_3 par *B.halodurans* et *M.lactis* sur 3 semaines, dans des milieux contenant de l'urée ou non. Les incubations sont réalisées à 30°C, 60tr/min, pendant 48h.

Nous avons choisi d'utiliser ici des boîtes de Pétri et non des tubes Falcon[®] car l'AC interconvertit le CO_2 en HCO_3^- . Ainsi en augmentant la surface d'échange du milieu de culture avec l'air, on favorise le renouvellement du CO_2 et de l'oxygène dans la solution. On favorise alors la croissance et l'activité enzymatique (AC) en multipliant la surface d'échange avec l'air par un facteur 9. De plus, ce changement nous permet de travailler avec un volume de milieu 2 fois plus important que dans les expériences précédentes et donc potentiellement d'obtenir plus de matière pour les analyses DRX et ATG.

4.3.2. Résultats

Le suivi de l'évolution des populations bactériennes au cours du temps nous permet à la fois de vérifier si les bactéries sont toujours viables, mais également de déterminer le rendement de production à chaque échéance. Le dénombrement est réalisé par comptage sur cellule de Thoma. Nous avons pu déterminer que les populations bactériennes – *B.halodurans* (Figure 3-13) comme *M.lactis* (Figure 3-14) – croissent pendant la première semaine puis se stabilisent pendant les deux semaines suivantes. Ces évolutions sont similaires en présence et en absence d'urée. On retrouve ici des concentrations en phase stationnaire similaires à celles observées sur la figure On retrouve ici des concentrations en phase stationnaire similaires à celles observées sur la figure 3-4. La concentration est stabilisée à une semaine pour *B.halodurans* ce qui est conforme à la durée de la phase exponentielle observée sur la figure 3-4C. Par contre pour *M.lactis* la phase stationnaire semble être atteinte entre la première et la deuxième semaine ce qui est plus tardif que ce qui est observé sur la figure 3-4D.

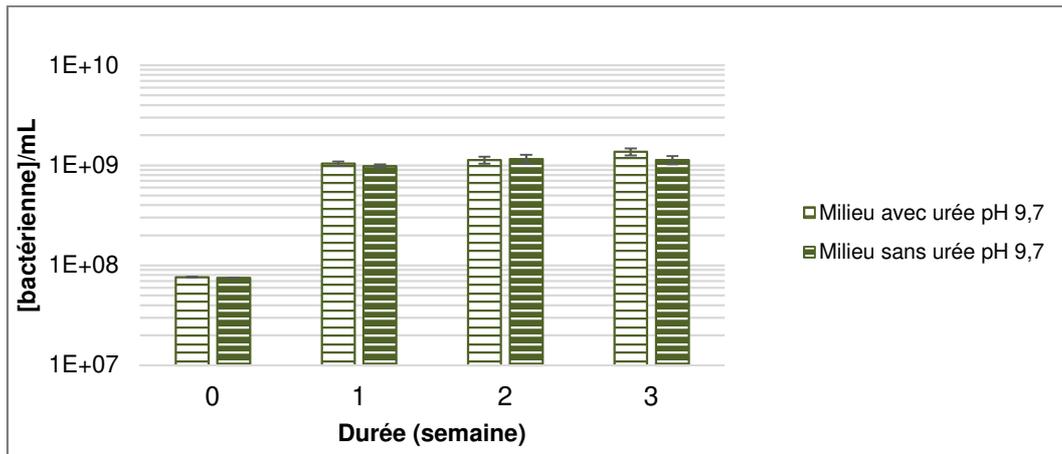


Figure 3-13 : Suivi de la concentration bactérienne (nombre de cellules/mL) au cours du temps dans les différentes conditions de production de matière par *B.halodurans*, en boîte de Pétri : avec un milieu contenant de l'urée à pH 9,7, ou non à pH 9,7.

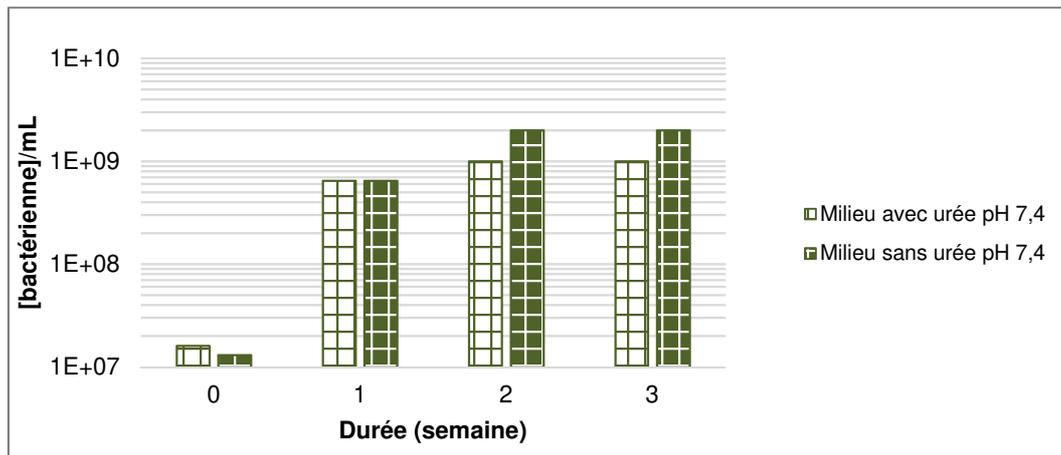


Figure 3-14 : Suivi de la concentration bactérienne (nombre de cellules/mL) au cours du temps dans les différentes conditions de production de matière par *M.lactis*, en boîte de Pétri: avec un milieu contenant de l'urée à pH 7,4, ou non à pH 7,4.

Nous avons pu démontrer que les deux populations bactériennes se développaient au cours du temps. Nous allons désormais déterminer si leur activité a mené à une bioprécipitation de CaCO₃.

Le premier constat que l'on peut faire sur les Figure 3-15 et 3-16 c'est que l'on confirme la bioprécipitation en présence d'urée mais également en l'absence d'urée, c'est-à-dire en favorisant la voie de l'interconversion. On constate même que la voie de l'interconversion seule produit plus de carbonates de calcium au bout de 3 semaines. Dans le milieu contenant de l'urée, les deux voies métaboliques peuvent *a priori* se cumuler mais il semble que l'interaction entre ces deux voies nuise à l'efficacité de la bioprécipitation.

Le deuxième constat est que la production de CaCO₃ se poursuit sur les 3 semaines pour les deux voies métaboliques sans que l'on ait l'impression qu'un plafond de production soit atteint. Cela justifie a posteriori notre choix d'étendre la durée de 1 à 3 semaines.

Le troisième constat est que bien qu'ayant doublé le volume total de solution par rapport aux expériences précédentes (3x40ml=120 ml), les masses de CaCO₃ produites ont augmenté dans une plus grande proportion. Les rendements du procédé pour les 4 protocoles sont résumés dans le Tableau 3-5 (sachant que la masse de CaCO₃ maximale théorique est égale à 3797 mg=120 ml x 50 mg/ml x 0,633). On constate effectivement que le rendement de production dans les milieux avec urée a nettement augmenté par rapport aux expériences précédentes dans les tubes Falcon® avec les mêmes dosages (20g/L d'urée et 50g/L d'acétate de calcium) puisque l'on est passé de 2,6 à 14,8% pour *B.halodurans* et de 0,6 à 12% pour *M.lactis*, alors même que la concentration initiale en bactéries est plus faible dans le cas présent. Il semble donc que

l'augmentation d'un facteur 9 de la surface de contact avec l'atmosphère soit très efficace pour améliorer le procédé probablement grâce à une meilleure diffusion du CO₂ atmosphérique dans la solution, ce qui est favorable à la voie métabolique d'interconversion (dans le cas de l'uréase seule, c'est l'urée qui fournit les carbonates). A ce phénomène de diffusion peut s'ajouter une oxydation de l'acétate restant dans les milieux, cette réaction produisant également des CO₂ qui peuvent alors favoriser la voie de l'interconversion.

Quelle que soit la voie métabolique, le rendement du procédé augmente avec le temps. Il est pratiquement le double à trois semaines avec *B.halodurans* comparé à *M.lactis*. Le rendement le plus élevé atteint 60% avec *B.halodurans* par la voie métabolique de l'interconversion, ce qui est un résultat très encourageant.

Le Tableau 3-5 résume également les rendements exprimés en pg par bactérie initialement présente dans la solution. Ici encore on voit la difficulté d'interpréter ce type de rendement car le tableau semble indiquer que les bactéries *M.lactis* précipitent plus de CaCO₃ par bactérie que les bactéries *B.halodurans* alors que nous avons trouvé le contraire dans les deux expériences précédentes avec les tubes Falcon®.

Tableau 3-5 : rendements initiaux de production de CaCO₃ par *B.halodurans* et *M.lactis* à 1 semaine et 3 semaines d'incubation, et le pourcentage qu'ils représentent par rapport au rendement optimal de production attendu (rendement du procédé)

		à 1 semaine		à 3 semaines	
		avec urée	sans urée	avec urée	sans urée
<i>B.halodurans</i>	rendement (pg/bactérie)	61,3	82,3	170,4	237,8
	rendement du procédé (%)	14,8	19,6	43,1	60,1
<i>M.lactis</i>	rendement (pg/ bactérie)	237,9	89,7	435,9	857,1
	rendement du procédé (%)	12,0	3,7	22,0	35,2

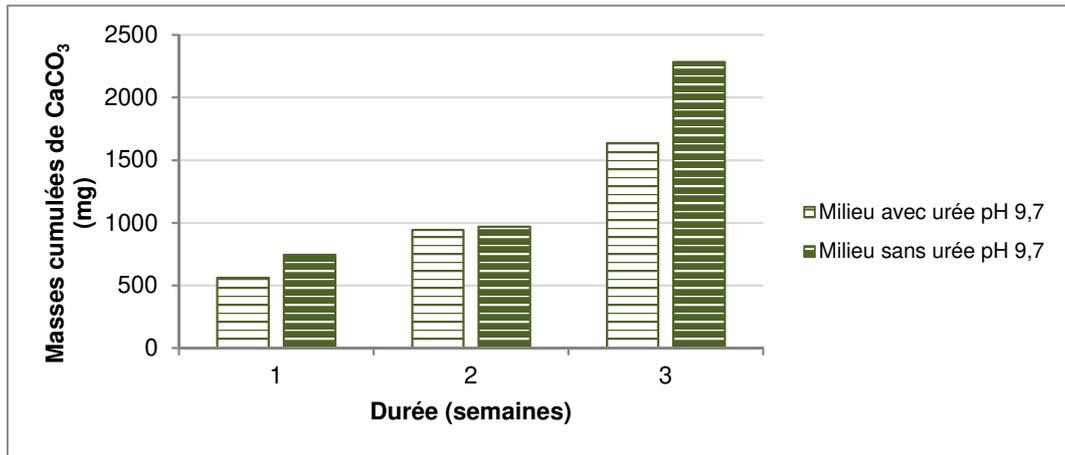


Figure 3-15 : Masses cumulées de CaCO_3 , liées à l'activité bactérienne, dans les cultures de *B. halodurans*, en boîte de Pétri, avec des milieux contenant de l'urée à une concentration de 20 g/L (barres blanches rayées de vert) ou non (barres vertes rayées de blanc), avec un apport systématique d'acétate de calcium de 50g/L

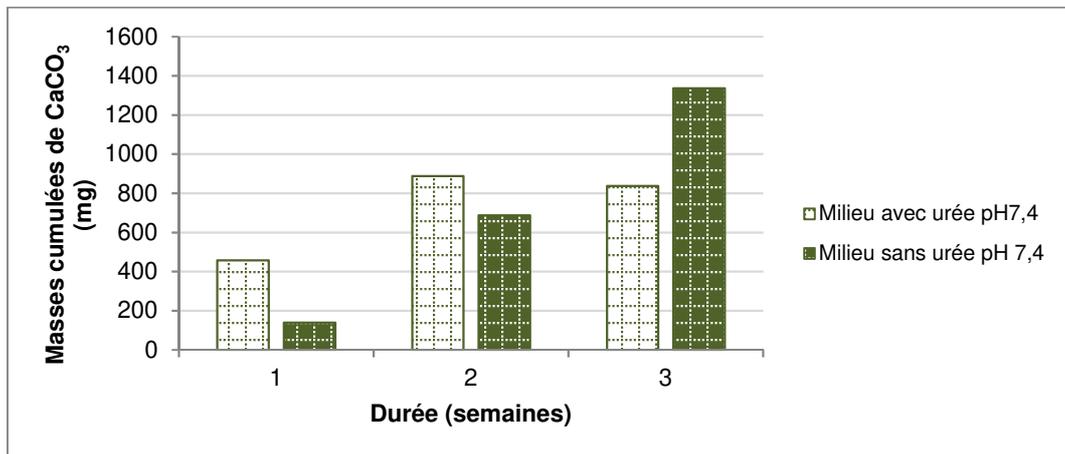


Figure 3-16 : Masses cumulées de CaCO_3 , liées à l'activité bactérienne, dans les cultures de *M. lactis*, en boîte de Pétri, avec un milieu contenant de l'urée à une concentration de 20 g/L (barres avec carrés blancs) ou non (barres avec carrés verts), avec un apport systématique d'acétate de calcium de 50g/L

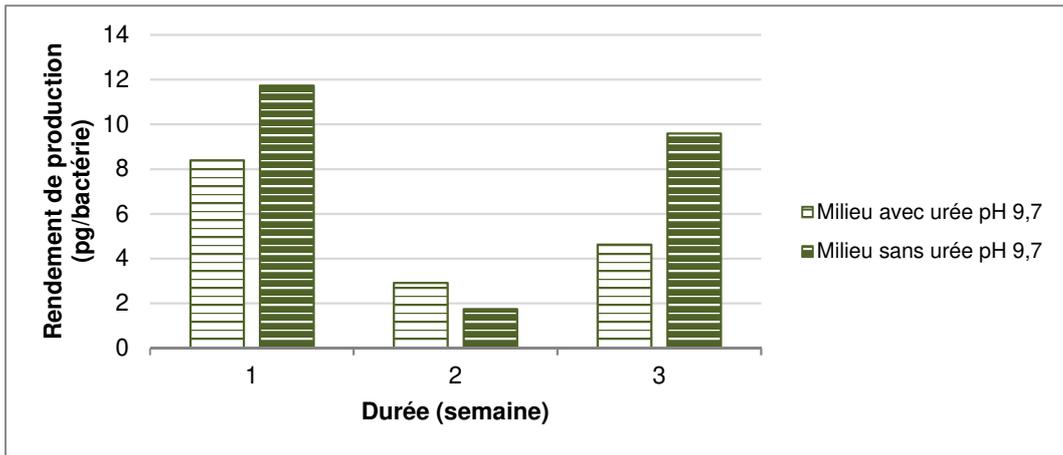


Figure 3-17 : Suivi du rendement à échéance de production de CaCO₃ par *B.halodurans* dans des milieux avec ou sans urée (20g/L) à pH 9,7, additionnés de 50g/L d'acétate de calcium.

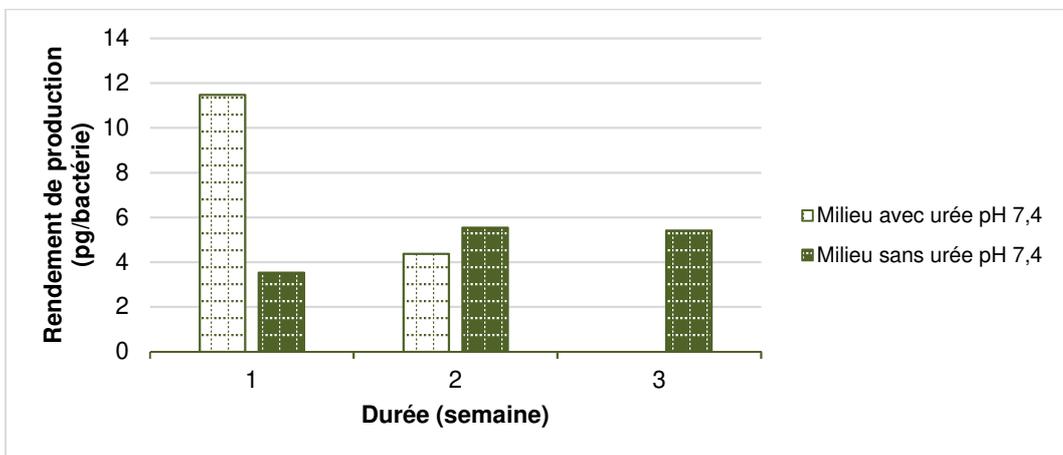


Figure 3-18 : Suivi du rendement à échéance de production de CaCO₃ par *M.lactis* dans des milieux avec ou sans urée (20g/L) à pH 7,4, additionnés de 50g/L d'acétate de calcium.

Nous avons également calculé le rendement à échéance (ou « instantané ») par bactérie (voir chapitre 2) pour voir si les bactéries fixent du CaCO₃ de façon différente au cours des différentes phases de croissance. Les résultats sont résumés sur les Figure 3-17 et 3-18. On constate qu'en présence d'urée, les bactéries semblent beaucoup plus actives en première semaine lors de la phase exponentielle et diminue fortement lors de la phase stationnaire.

Ce constat est moins évident à faire pour la voie de l'interconversion pour laquelle le rendement à échéance semble rester plus constant. Ces résultats sont à prendre avec précaution, étant donnée la dispersion sur les mesures de masses cumulées (qui baisse de façon anormale par exemple à 3 semaines en présence d'urée avec *M. lactis*) mais également l'intervalle de temps important entre les différentes mesures, qui introduisent sans aucun doute une certaine imprécision dans ce calcul de rendement.

Toutefois, bien que l'activité bactérienne ralentisse pour atteindre une phase stationnaire, la calcification peut continuer de façon abiotique dans le milieu. En effet, la biocalcification est un phénomène combiné à une calcification abiotique (Figure 3-19) (Castanier *et al.* 1999). La cristallisation étant déjà initiée au niveau des membranes bactériennes, elle peut se poursuivre grâce à la présence des carbonates produits par les bactéries et toujours présents dans le milieu. Par ailleurs, la disponibilité de protéines issues des bactéries mortes augmente avec le temps, et peut favoriser la stabilisation des cristaux de CaCO₃ en formation (Kai, Fujikawa & Miki 2002; Xie *et al.* 2005).

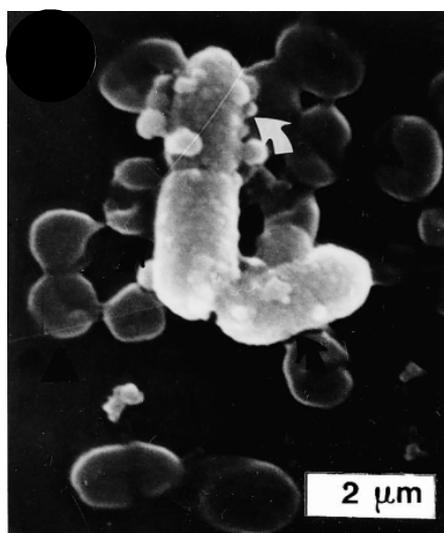


Figure 3-19 : photo au MEB de bactéries calcifiées sur lesquelles des sites de croissance cristalline de CaCO₃ réalisées de façon abiotique sont observés (flèche) (Castanier *et al.* 1999)

Le Tableau 3-6 présente la production de CaCO₃ dans les milieux témoins sans bactéries. On rappelle ici que ces masses ont été retranchées aux masses totales de CaCO₃ prélevées dans les échantillons inoculés pour ne prendre en compte que la production liée aux bactéries.

Nous constatons que le milieu BN pH 9,7 employé dans l'essai avec *B.halodurans* présente des masses cumulées de CaCO₃ relativement constantes tout au long de l'essai, que le milieu contienne ou non de l'urée. Nous remarquons également que ces masses cumulées sont proches entre les deux milieux (à l'exception de la valeur obtenue à 2 semaines dans le milieu sans urée qui semble aberrante). Cela nous montre que la formation abiotique dans le milieu témoin BN atteint un seuil dès la première semaine d'incubation qui n'est pas influencée par la présence d'urée dans le milieu.

En ce qui concerne le milieu BCSEL pH 7,4 utilisé pour l'essai avec *M.lactis*, nous constatons que la masse cumulée de CaCO₃ augmente progressivement au cours de l'essai, que le milieu contienne ou non de l'urée. Le milieu témoin BCSEL semble être composé d'éléments capables de réagir avec les ions calcium et plus le temps d'incubation est long, plus la quantité de CaCO₃ formée augmente.

Remarquons toutefois que ces masses précipitées en l'absence de bactéries sont négligeables par rapport à celles dues à la précipitation biotique (Figure 3-15 et Figure 3-16)

Tableau 3-6 : Masses cumulées en mg de CaCO₃ dans les milieux témoins des essais avec *B.halodurans* et *M.lactis*

		BN pH 9,7 + acétate de calcium (50g/L)		BCSEL pH 7,4 + acétate de calcium (50 g/L)	
		avec urée (20g/L)	sans urée	avec urée (20g/L)	sans urée
Masses cumulées de CaCO ₃ (mg)	1 semaine	50,1	54,3	0	16,5
	2 semaines	51,9	76,7	19,6	38,7
	3 semaines	58,6	52,7	60,1	46,1

4.3.3. Conclusion

Nous avons pu observer dans cette partie que la biocalcification par les souches est confirmée en présence et en absence d'urée. La production de CaCO₃ par les deux voies est relativement similaire pendant les 2 premières semaines pour *B. halodurans* et *M.lactis*. Par contre, la formation de CaCO₃ est plus importante la 3^{ème} semaine dans les milieux ne contenant pas d'urée. Ceci peut être dû à une consommation importante des molécules d'urée par les bactéries, cette hypothèse demanderait à effectuer un dosage de l'urée présent dans les milieux de culture après 2 semaines.

4.4. Conclusion sur les essais de production de CaCO₃ *in vitro*

Les essais *in vitro* réalisés dans cette partie nous ont permis de nous familiariser avec les bactéries et de vérifier que nous étions capables de bioprécipiter du CaCO₃ par la voie de l'uréase à partir des bactéries *B.halodurans* et *M.lactis* et de l'acétate de calcium que nous avons sélectionnés. Dans un second temps, les essais nous ont permis d'optimiser le ratio acétate de calcium/urée. Dans un troisième temps nous avons montré que la voie de l'interconversion était finalement plus efficace que la voie de l'uréase. Ceci est intéressant pour la suite de notre travail et les objectifs de traitement industriel de GBR car cela enlève la nécessité d'avoir un produit supplémentaire. Les mêmes essais ont montré qu'il était primordial d'avoir une surface d'échange importante avec l'atmosphère pour augmenter l'oxygénation du milieu et la diffusion du CO₂ qui va précipiter avec les ions calcium issus de l'acétate de calcium. Ceci ne devrait pas poser de problème expérimental pour la suite du travail. Nous avons également constaté que la bioprécipitation se poursuit sur au moins trois semaines *in vitro* avec des gains notables entre 1 et 3 semaines. Cela est également à prendre en compte pour la suite des essais.

Lors de l'analyse de ces essais nous avons montré la difficulté de raisonner en rendement du procédé exprimé en masse de CaCO₃ produit par bactéries initialement introduites dans la solution. Toutefois le rendement global calculé en divisant la masse de CaCO₃ produite par la masse théoriquement précipitable en CaCO₃ (proportionnelle à la masse d'acétate introduite dans la solution) semble permettre de comparer les différents traitements. Nous avons réussi à obtenir un rendement de l'ordre de 60% par la voie de l'interconversion avec *B.halodurans*. Ce résultat est très encourageant pour la suite du travail.

Enfin des calculs de rendement « instantané » par bactérie semblent montrer que chaque bactérie précipite plus de CaCO₃ en phase exponentielle que lors de la phase stationnaire, lorsque la voie de l'uréase est permise. Lorsque la voie de l'interconversion seule est choisie le rendement semble plus constant.

La partie suivante présente les essais de mise en contact de *B.halodurans* et *M.lactis* avec les GBR durant 2 semaines et l'évaluation de l'effet de ce traitement sur l'absorption en eau des granulats. Les essais ont été faits en parallèle des essais *in vitro* pour des raisons de planning et n'ont pas bénéficié de tous les apports de ces derniers.

5. Traitement des GBR

La mise en contact des GBR avec les bouillons bactériens a été faite par immersion. Ce protocole a été choisi pour cet essai préliminaire de faisabilité car sa mise en œuvre est simple, et il permet de quantifier aisément le rapport liquide/matière à traiter et donc le rapport nombre de bactéries/surface à traiter. C'est d'ailleurs un procédé qui est présenté régulièrement dans les études sur la bioprécipitation à la surface de matériaux (Jiménez-López *et al.* 2007; Wiktor & Jonkers 2011; Wang *et al.* 2017).

5.1. Protocole d'essai

Cet essai ayant été mené en parallèle des essais de production de CaCO₃ précédents pour des questions de planning, les deux souches *B.halodurans* et *M.lactis* ont été mises en contact avec les GBR testant les deux voies de biocalcification. Ainsi les GBR ont été immergés dans un milieu contenant de l'urée et un milieu dans lequel la voie de dégradation de l'urée a été inhibée. Dans son travail résumant l'état des connaissances sur l'uréase, (Krajewska 2009) nous permet de sélectionner l'acide acétohydroxamique (AHA) comme inhibiteur de l'enzyme uréase. En effet, parmi les inhibiteurs connus de l'uréase, cet acide est le moins dangereux à manipuler. Il a d'ailleurs déjà été utilisé par (Benini *et al.* 1999) pour déterminer la structure et l'action de l'uréase de *Bacillus pasteurii*, ce qui nous prouve l'efficacité de cet inhibiteur pour notre travail.

Pour commencer, une mise en culture de *B.halodurans* et *M. lactis*, dans leurs milieux contenant 20g/L d'urée, est réalisée. Pour ce travail, 25mL de bouillon bactérien âgés de 48h sont dilués dans 250mL de leurs milieux additionnés de 20g/L d'urée, avant d'être placés 48h en incubation (30°C, 140rpm).

Trois traitements sont préparés :

- 1- 2L de milieu de culture contenant 20g/L d'urée et 50g/L d'acétate de calcium, dans lequel la culture bactérienne est diluée au 10^{ème}, appelé « milieu inoculé »
- 2- 500mL de milieu de culture contenant 20g/L d'urée, 50g/L d'acétate de calcium et 376mg/L d'AHA, dans lequel la culture bactérienne est diluée au 10^{ème}, appelé « milieu AHA »
- 3- 500mL de milieu de culture contenant 20g/L d'urée et 50g/L d'acétate de calcium, appelé « milieu témoin ».

Les milieux sont maintenus 24h à température ambiante afin de nous assurer du développement des souches bactériennes puis 12 béchers par souche contenant chacun 600g de GBR sont préparés et traités comme suit :

- 1- 250mL du « milieu inoculé » sont versés dans 8 béchers
- 2- 250mL du « milieu AHA » sont versés dans 2 béchers
- 3- 250mL du « milieu témoin » sont versés dans 2 béchers

Dans ces conditions, les GBR traités sont immergés sous 1 cm de liquide.

Chaque bécher contenant du « milieu inoculé » et du « milieu AHA » contient au début de l'essai environ $7,6 \cdot 10^7$ bactéries/mL dans les milieux réalisés avec *B.halodurans*, et $1,6 \cdot 10^7$ bactéries/mL pour ceux réalisés avec *M.lactis*, ainsi que 12,5g d'acétate de calcium. Pour estimer la concentration bactérienne initialement présente dans les traitements appliqués sur GBR, nous nous sommes basés sur les suivis de croissance des souches, dans leur milieu optimal de croissance (Figure 3-4). Nous considérons que la croissance des souches est similaire à celle que l'on obtient dans leur milieu optimal de croissance malgré la présence d'urée et d'acétate de calcium dans les milieux préparés pour les traitements.

L'essai est mené sur 2 semaines à une température constante de 20°C et un taux d'humidité de 50%, avec des échéances supplémentaires à 24h, 72h et 1 semaine pour les béchers contenant du « milieu inoculé ». Les béchers sont couverts afin de limiter l'évaporation des milieux, mais en maintenant une ouverture pour que l'oxygénation puisse se faire. Chaque jour (sauf le week-end), matin et soir, les traitements sont agités afin d'aérer le milieu et favoriser le développement des bactéries. A chaque échéance, 2 béchers de chaque traitement sont préparés pour qu'une mesure du coefficient d'absorption en eau des échantillons soit réalisée (Figure 3-20).

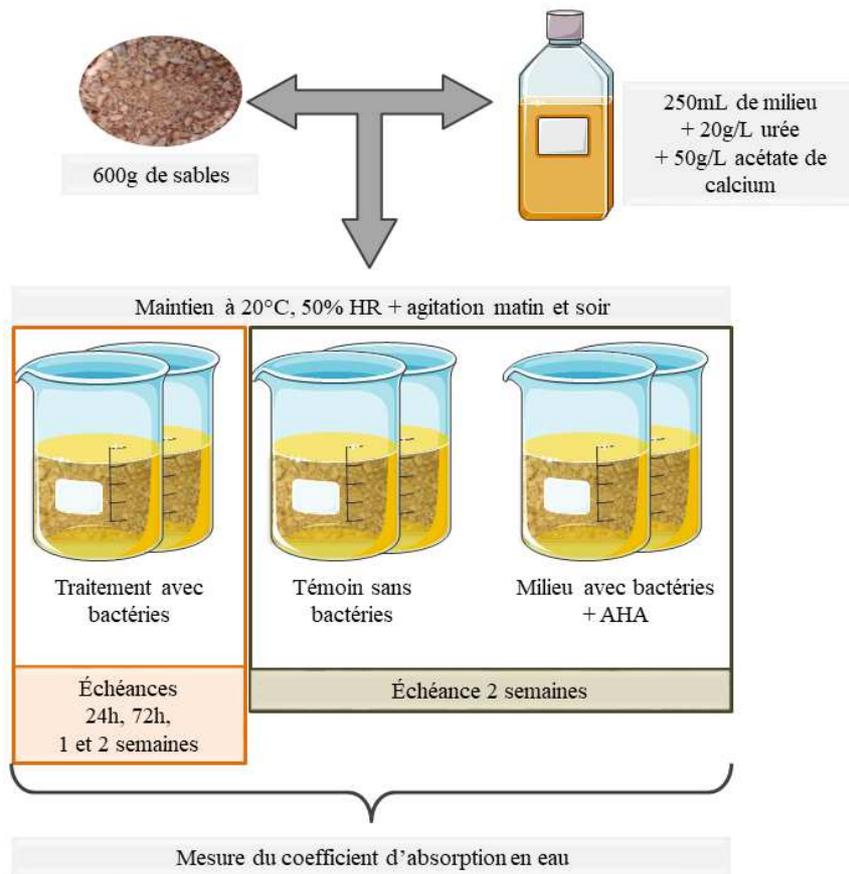


Figure 3-20 : schéma du procédé expérimental employé pour l'essai dit de « faisabilité ». HR = Humidité Relative

5.2. Résultats

Les coefficients d'absorption mesurés pour chaque l'essai avec *B.halodurans* sont présentés dans la Figure 3-21. Les valeurs minimales et maximales mesurées sur les deux échantillons prélevés pour chaque traitement et à chaque échéance prévue sont présentées sur la figure, sous forme de barre d'erreur. A ces valeurs minimales et maximales est ajoutée la marge d'erreur de l'expérimentateur.

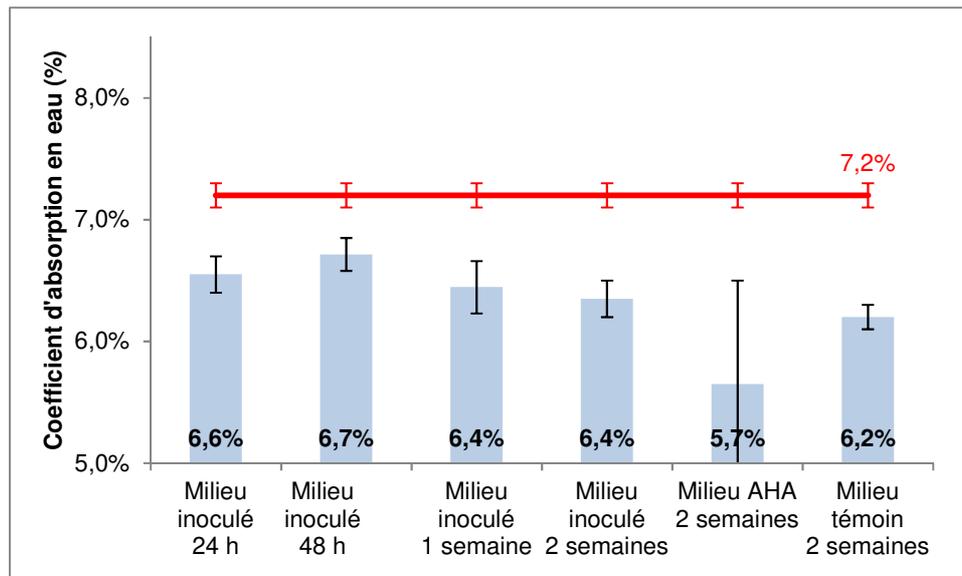


Figure 3-21: Coefficients d'absorptions en eau des GBR traités par immersion avec un milieu contenant *B.halodurans* (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée. Le coefficient d'absorption en eau des GBR non traités est marqué en rouge.

En comparant les coefficients d'absorption mesurés à celui des matériaux non traités (7,2%), nous pouvons remarquer que les coefficients ne sont que très légèrement inférieurs à celui des matériaux non traités et en tout cas très éloignés de l'objectif d'une valeur inférieure à 2% que nous nous étions fixée. Si la diminution du coefficient d'absorption en eau des GBR issus du « milieu témoin » est liée à une précipitation des CaCO₃, alors celle-ci pourrait être de type abiotique, puisque nous n'avons pas introduit de bactéries dans ce milieu. Toutefois, le milieu peut avoir été contaminé au cours de l'essai puisqu'il a été réalisé en condition non stérile, et la diminution serait alors liée à une biocarbonatation. Quoi qu'il en soit, le « milieu témoin » dans lequel sont immergés les GBR a le même impact sur le taux d'absorption en eau des matériaux que le « milieu inoculé », après 2 semaines de traitement. Il est intéressant de noter que les GBR traités avec le « milieu AHA » ont un taux d'absorption en eau similaire à ceux issus du « milieu inoculé ». Le « milieu AHA » était employé pour observer l'évolution du taux d'absorption en eau des GBR quand ils sont en contact avec des bactéries réalisant la biocarbonatation au travers de la voie de l'interconversion. Puisque les GBR traités avec les milieux inoculés et AHA ont des taux d'absorption similaires à ceux issus du milieu témoin, il est impossible de savoir si une carbonatation biotique ou abiotique est à l'origine de la diminution des taux d'absorptions. Il aurait fallu observer le profil et la surface de ces GBR traités au microscope électronique pour déterminer si un dépôt de CaCO₃ pouvait être observé et s'il y avait des cristaux différents suivant les traitements.

Les traitements des GBR menés avec *M.lactis* ont mené à des évolutions du taux d'absorption en eau différentes (Figure 3-22).

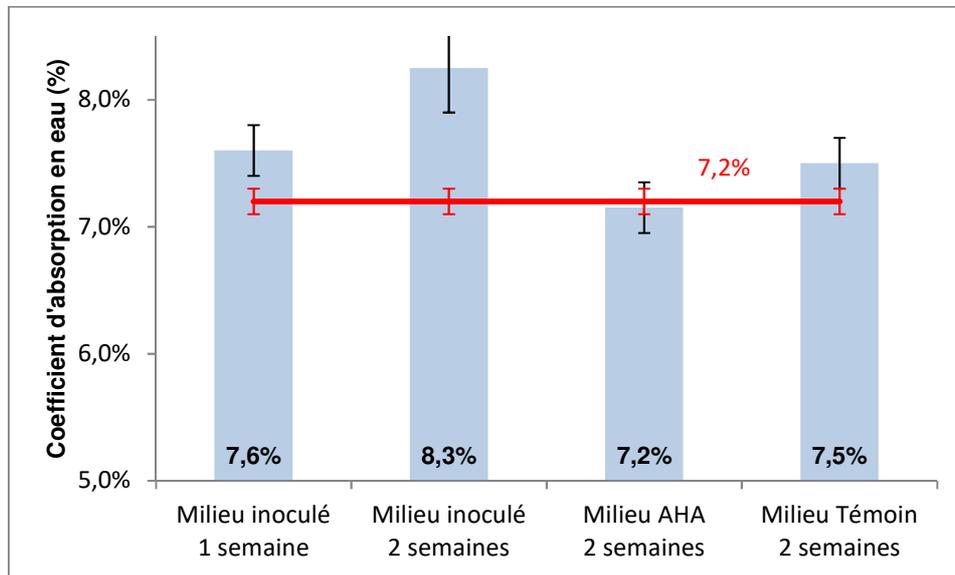


Figure 3-22 : Coefficients d'absorptions en eau des GBR traités par immersion avec un milieu contenant *M.lactis* (pH 7,4), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée. Le coefficient d'absorption en eau des GBR non traités est marqué en rouge.

Dans le cas de *M.lactis*, nous obtenons des taux d'absorptions des « milieux témoins » similaires à celui des GBR non traités. Mais nous mesurons également des taux d'absorption en eau des GBR issus du « milieu AHA » similaires à ceux des GBR non traités. Si une biocarbonatation au travers de la voie de l'interconversion a eu lieu, elle n'a eu aucun impact sur le taux d'absorption en eau des GBR. Enfin, nous mesurons des taux d'absorption en eau des GBR issus des « milieux inoculés » supérieurs à ceux des GBR non traités. Avec une différence entre les deux échéances : à 1 semaine, le taux d'absorption mesuré reste similaire à celui des GBR issus du « milieu témoin », et à 2 semaines, le taux d'absorption est supérieur à tous les autres. Ce taux d'absorption élevé obtenu à 2 semaines, dans le « milieu inoculé » peut s'expliquer par le dépôt d'un élément plus poreux que les GBR à la surface de cas derniers. Une observation de la surface des GBR aurait permis de vérifier cette hypothèse, mais cette analyse n'a pas été menée. Quoiqu'il en soit, le traitement impact négativement le taux d'absorption en eau des GBR, par ce procédé, après 2 semaines d'incubation.

5.3. Discussion

Des travaux postérieurs à nos essais ont récemment été publiés par Wang *et al.* (2017) sur l'amélioration de la qualité de GBR au travers de la bioprécipitation. Ils présentent également des traitements par immersion. L'équipe a employé la souche bactérienne *Bacillus sphaericus* et a testé 4 protocoles d'immersion sur 200g de gravillons recyclés (6.3/20 mm) :

- le premier (immersion A) consiste en l'immersion des GBR dans la culture bactérienne (âgée de 24h) contenant 3.10^8 cellules/mL pendant 24h. Puis, les GBR sont retirés de la culture bactérienne et immergés pendant 3 jours dans une solution composée d'urée (05M) et de nitrate de calcium (0,5M)
- le deuxième protocole (immersion B) est similaire au premier, mais la culture bactérienne contient une concentration cellulaire 3 fois plus importante (10^9 cellules/mL)
- le troisième protocole (immersion C) est similaire au premier, mais la solution contenant les sources d'urée et de calcium est supplémentée de 5g/L d'extrait de levure
- le dernier traitement (immersion D) consiste en la double application du premier traitement sur les GBR.

Tous les traitements ont été maintenus à $20\pm 1^\circ\text{C}$ et 60% d'humidité relative. A noter que le volume pour les immersions n'est pas indiqué dans ce papier. En mesurant le taux d'absorption en eau des GBR avant (WA24 avant) et après (WA24 après) chaque traitement, l'équipe a observé une diminution du taux d'environ 1% avec le protocole « immersion D » (Figure 3-23). Les autres traitements employés n'ont pas permis de modifier les taux d'absorption en eau des GBR.

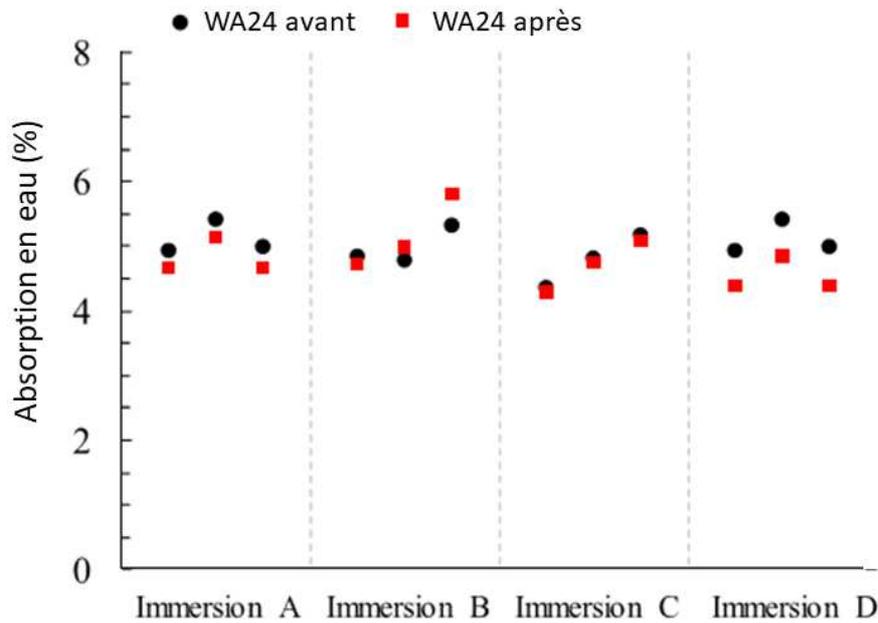


Figure 3-23: Taux d'absorption en eau de GBR avant (WA24 avant) et après (WA24 après) leurs traitements par immersion. (Wang *et al.* 2017)

Les résultats de cette étude sont cohérents avec les nôtres et montrent la nécessité de développer d'autres traitements afin de diminuer le taux d'absorption en eau des GBR de façon plus importante.

Le coefficient d'absorption en eau des GBR traités n'atteignant pas le taux recherché, nous considérons que ce traitement que nous avons développé est inefficace. L'inefficacité de ce traitement peut être due à une mortalité de la souche au contact des GBR. Mais elle peut aussi s'expliquer par le fait que ces bactéries ne se soient pas déposées à la surface des GBR, dont l'environnement est agressif, mais qu'elle soit restée dans le milieu liquide dans lequel les matériaux sont immergés. Il est également possible que la quantité de bactéries ou d'acétate de calcium présents dans le traitement soit trop faible pour que la biocarbonatation se réalise à la surface des GBR.

5.4. Conclusions

Les résultats obtenus avec ce premier essai montrent que les paramètres de ce traitement ne permettent pas d'atteindre notre objectif de diminution de l'absorption en eau des GBR pour atteindre un taux d'absorption de l'ordre de 2%. Plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour améliorer ce traitement, tels que : les modalités de mise en contact des bactéries avec les GBR, la quantité d'acétate de calcium introduite, la quantité de bactéries introduites...

6. Conclusions des essais de faisabilité

Les travaux présentés dans ce chapitre nous ont permis de sélectionner 2 souches bactériennes capables de produire des CaCO₃ : *B.halodurans* et *M.lactis*. Chaque souche peut bioprécipiter des CaCO₃ en présence ou l'absence d'urée dans leur milieu. Cependant, une mise en contact des souches avec les GBR n'a mené qu'à une faible diminution du taux d'absorption en eau des GBR en présence de *B.halodurans*, et à aucune diminution en présence de *M.lactis*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : (1) le non développement -voire la mortalité- des souches au contact des GBR, (2) un phénomène de non-adhésion des souches à la surface des GBR ou (3) une absence de production de CaCO₃ par les souches au contact des GBR.

Afin de déterminer si les souches sont capables ou non de se développer au contact des GBR, des essais de croissance des souches dans de l'eau de contact des GBR devront être menés. Aussi, une analyse de la composition de cette eau de contact sera réalisée pour savoir s'il existe des inhibiteurs de la croissance bactérienne ou de la biocalcification dans cette eau. Alors, des essais d'amélioration des protocoles de traitement des GBR pourront être menés.

7. Bibliographie

- Abo-El-Enein, S.A., Ali, A.H., Talkhan, F.N. & Abdel-Gawwad, H.A. (2012) Utilization of microbial induced calcite precipitation for sand consolidation and mortar crack remediation. *HBRC Journal*, **8**, 185–192.
- Achal, V. & Pan, X. (2011) Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*, **62**, 894–902.
- Barabesi, C., Galizzi, A., Mastromei, G., Rossi, M., Tamburini, E. & Perito, B. (2007) *Bacillus subtilis* gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization. *Journal of Bacteriology*, **189**, 228–235.
- Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson, K.S., Miletto, S., Ciurli, S. & Mangani, S. (1999) A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, **7**, 205–216.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. & Perthuisot, J.-P. (1999) Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, **126**, 9–23.
- De Muynck, W., De Belie, N. & Verstraete, W. (2010a) Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Special Issue: BioGeoCivil Engineering*, **36**, 118–136.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. & Verstraete, W. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and concrete Research*, **38**, 1005–1014.
- De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N. & Verstraete, W. (2010b) Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Special Issue: BioGeoCivil Engineering*, **36**, 99–111.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S. & Mukherjee, A. (2013) Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in microbiology*, **4**, 1–13.
- Ducasse-Lapeyresse, J. (2014) *Etude Du Potentiel D'autocicatrisation et de La Biocicatrisation de Matériaux Cimentaires Fissurés*. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Douai.
- Girinsky, O. (2009) *Pré-Industrialisation D'un Procédé de Consolidation de Sol Par Bio-Calcification in Situ*. Université d'Angers.
- Greenwood, N.N. & Earnshaw, A. (2012) *Chemistry of the Elements*, 2nd ed. Elsevier.
- Hussain, S.E. & Al-Gahtani, A.S. (1996) Chloride threshold for corrosion of reinforcement in concrete. *ACI Materials Journal*, **93**, 534–538.
- Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, C., Piñar, G., Carrillo-Rosúa, F.J., Rodríguez-Gallego, M. & Gonzalez-Muñoz, M.T. (2007) Consolidation of degraded ornamental porous

- limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*, **68**, 1929–1936.
- Jonkers, H.M. (2007) Self healing concrete: a biological approach. *Self Healing Materials: An Alternative Approach to 20 Centuries of Materials Science* (ed S. van der Zwaag), pp. 195–204. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O. & Schlangen, E. (2010) Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Special Issue: BioGeoCivil Engineering*, **36**, 230–235.
- Kai, A., Fujikawa, K. & Miki, T. (2002) Vaterite stabilization in CaCO₃ crystal growth by amino acid. *Japanese Journal of Applied Physics*, **41**, 439.
- Krajewska, B. (2009) Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **59**, 9–21.
- Lindskog, S. (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*, **74**, 1–20.
- Miot, J. (2008) *Processus Microbiens de Biominéralisation et de Détoxification Des Métaux/Métalloïdes: Oxydation Du Fer Par Des Bactéries Anaérobies Neutrophiles et Résistance Au Fer et À L'arsenic Chez Des Eucaryotes Unicellulaires de Drainages Miniers Acides*. Paris 7.
- Monger, H.C., Daugherty, L.A., Lindemann, W.C. & Liddell, C.M. (1991) Microbial precipitation of pedogenic calcite. *Geology*, **19**, 997–1000.
- Neville, A. (1995) Chloride attack of reinforced concrete: an overview. *Materials and Structures*, **28**, 63.
- Okwadha, G.D.O. & Li, J. (2010) Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, **81**, 1143–1148.
- Okyay, T.O. & Rodrigues, D.F. (2014) Optimized carbonate micro-particle production by *Sporosarcina pasteurii* using response surface methodology. *Ecological Engineering*, **62**, 168–174.
- Park, S.-J., Park, Y.-M., Chun, W.-Y., Kim, W.-J. & Ghim, S.-Y. (2010) Calcite-forming bacteria for compressive strength improvement in mortar. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**, 782–788.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K. & Gonzalez-Muñoz, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2182–2193.
- Shirakawa, M.A., Cincotto, M.A., Atencio, D., Gaylarde, C.C. & John, V.M. (2011) Effect of culture medium on biocalcification by *Pseudomonas putida*, *Lysinibacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**, 499–507.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. & Bang, S.S. (1999) Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1563–1571.

- Stuckrath, C., Serpell, R., Valenzuela, L.M. & Lopez, M. (2014) Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures. *Cement and Concrete Composites*, **50**, 10–15.
- Tiano, P., Biagiotti, L. & Mastromei, G. (1999) Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, **36**, 139–145.
- Tobler, D.J., Cuthbert, M.O., Greswell, R.B., Riley, M.S., Renshaw, J.C., Handley-Sidhu, S. & Phoenix, V.R. (2011) Comparison of rates of ureolysis between *Sporosarcina pasteurii* and an indigenous groundwater community under conditions required to precipitate large volumes of calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **75**, 3290–3301.
- Trombulak, S.C. & Frissell, C.A. (2000) Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. *Conservation biology*, **14**, 18–30.
- Wang, J., Vandevyvere, B., Vanhessche, S., Schoon, J., Boon, N. & De Belie, N. (2017) Microbial carbonate precipitation for the improvement of quality of recycled aggregates. *Journal of Cleaner Production*, **156**, 355–366.
- Wei, S., Cui, H., Jiang, Z., Liu, H., He, H. & Fang, N. (2015) Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Brazilian Journal of Microbiology*, **46**, 455–464.
- Weir, C.E. & Lippincott, E.R. (1961) Infrared studies of aragonite, calcite, and vaterite type structures in the borates, carbonates, and nitrates. *Journal of Research of the National Bureau of Standards, Section A*, **65**, 173–183.
- Whiffin, V.S. (2004) *Microbial CaCO₃ Precipitation for the Production of Biocement*. Murdoch University.
- Wiktor, V. & Jonkers, H.M. (2011) Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, **33**, 763–770.
- Xie, A.-J., Shen, Y.-H., Zhang, C.-Y., Yuan, Z.-W., Zhu, X.-M. & Yang, Y.-M. (2005) Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems. *Journal of Crystal Growth*, **285**, 436–443.

Chapitre 4 : Bioprécipitation des carbonates de calcium sur GBR – Amélioration du procédé

1. Introduction

Les résultats obtenus avec le premier essai de traitement des GBR montrent que les paramètres testés avec *B. halodurans* et *M.lactis* ne permettent pas d'atteindre notre objectif de diminution de l'absorption en eau des GBR. L'une des raisons possibles de cette absence de diminution peut être la mortalité ou l'absence de développement de bactéries au contact des GBR. C'est pourquoi nous devons nous assurer de leur survie au contact des GBR. De plus, plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour améliorer ce traitement, tels que : les modalités de mise en contact des bactéries avec les GBR, la quantité d'acétate de calcium ajoutée, la quantité de bactéries introduites...

Différents protocoles vont donc être développés dans le but de concevoir un traitement des GBR par les bactéries, applicable sur un chantier ou en usine.

Mais avant de réaliser ces essais d'amélioration des protocoles de traitement, nous allons commencer par un essai de survie des souches dans un milieu préparé avec une eau en contact des GBR. Cette étude sera combinée à une analyse de cette eau de contact pour déterminer si des éléments susceptibles d'inhiber la croissance bactérienne ou la biocalcification sont présents.

2. Adaptation des souches à l'eau de contact des GBR

La composition de l'eau de rinçage peut influencer la formation de CaCO₃ via la présence de cations pouvant réagir avec les carbonates. Elle peut également impacter le développement des bactéries. Nous allons donc dans un premier temps analyser la composition d'eau mise en contact avec les GBR puis dans un second temps, nous observerons le développement des souches *B. halodurans* et *M.lactis* en contact avec cette eau.

2.1. Analyse de l'eau de contact

Pour déterminer la composition de l'eau de contact des GBR, nous avons réalisé une analyse par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP, Ultima 2000-HORIBA Jobin Yvon). Il s'agit d'une méthode d'analyse chimique permettant de doser les éléments présents dans nos échantillons. Les éléments recherchés sont ceux présents usuellement dans le béton. Pour préparer nos échantillons d'eau de contact, nous avons immergé pendant 24h des GBR dans de l'eau distillée, à température ambiante, dans un rapport massique eau/GBR de 1:1.

L'eau de contact a ensuite été filtrée (\emptyset 0,22 μ m) et analysée. L'échantillon traité est ensuite ionisé dans une torche plasma. Les éléments présents dans l'échantillon vont émettre une lumière spécifique au cours de leur dégradation, ce qui va permettre leur identification. En comparant l'intensité de la lumière émise à celle des échantillons étalons aux concentrations connues, il est possible de déterminer la concentration de l'élément dans l'échantillon analysé.

L'analyse de l'eau de contact des GBR par la méthode ICP (Tableau 4-1) nous montre que le milieu ne contient pas d'élément pouvant *a priori* nuire au développement de microorganismes. En effet, des éléments comme le potassium ou le phosphore sont même employés par les microorganismes pour leur activité cellulaire (Epstein 2003; Richardson & Simpson 2011). Mais ces GBR ayant été produits avec des matériaux sains, il y avait peu de risques de trouver des éléments nocifs au développement de microorganismes.

Tableau 4-1 : Eléments détectés dans l'eau de contact des GBR par la méthode ICP

Eléments	Si	K	Na	S	Ca	P
Quantité (mg/kg de GBR)	0,73	12,96	0,36	4,5	0,87	0,01

Par ailleurs, cette analyse montre que la quantité de calcium disponible est de 0,87mg/kg de GBR. Les ions potassium (K⁺) et sodium (Na²⁺) détectés pourraient entrer en compétition avec les ions Ca²⁺ pour réagir avec les carbonates produits par les microorganismes. Le problème étant que les carbonates de potassium et de sodium sont des éléments très solubles dans l'eau (respectivement 1120g/L et 300g/L à 20°C) alors que les carbonates de calcium sont considérés comme insolubles. Si des carbonates de potassium ou de sodium se forment, nous obtiendrions alors un dépôt instable à la surface des GBR. Mais, si les traitements développés maintiennent les GBR traités dans un milieu liquide, alors ces produits seront dissous et les carbonates pourront réagir avec les ions calcium. Toutefois, ces ions bien que présents dans le milieu sont en faible quantité comparée à celle introduite par le biais de l'acétate de calcium (\approx 12 g/L). Ils ne devraient donc pas interférer avec la production de CaCO₃.

La composition de l'eau de contact des GBR ne semble pas présenter d'élément susceptible de nuire à la croissance des bactéries ni à la production de CaCO₃, nous allons vérifier si le développement des bactéries est maintenu en présence de cette eau.

2.2. Mise en contact avec l'eau des GBR

Des milieux de cultures ont été produits pour *B.halodurans* (BN) et *M.lactis* (BCSEL) avec cette eau de contact. Ces milieux ont été stérilisés par filtration (\varnothing 0,22 μ m) afin d'éviter de dégrader les éléments présents dans l'eau de contact des GBR par autoclavage.

Après une mise en culture des souches, 20mL de milieu sont inoculés au 10^{ème}. En parallèle, des milieux non inoculés ont été préparés afin de servir de témoins. De plus, afin de s'assurer de la bonne croissance des souches, 20 mL de milieu optimal (eau distillée à la place de l'eau de contact) ont été inoculés au 10^{ème}. Toutes les cultures sont incubées 48h à 30°C et 140 tr/min.

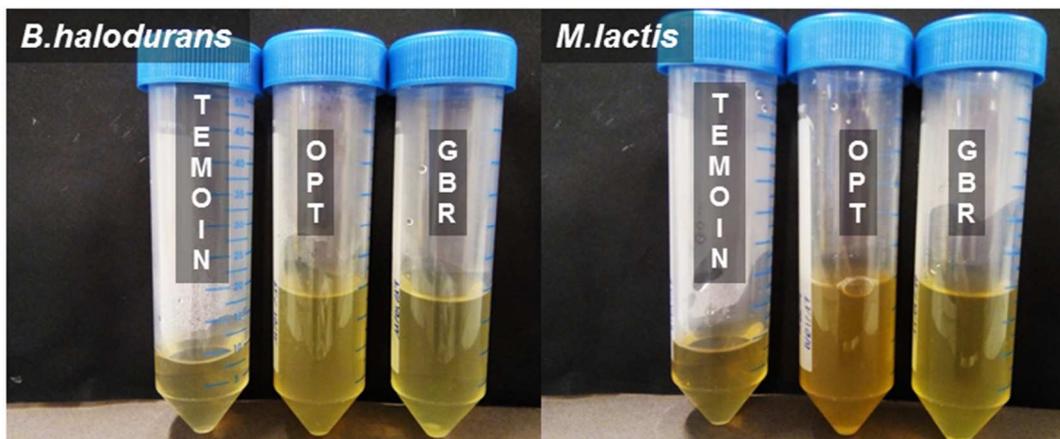


Figure 4-1 : photos des milieux des essais de survie de *B.halodurans* (gauche) et *M.lactis* (droite) dans l'eau de rinçage des GBR. TEMOIN : correspond au milieu non inoculé, OPT : correspond au milieu optimal de croissance de la souche, GBR : correspond au milieu produit avec l'eau de contact des GBR

Les observations ont révélé que les deux souches ne sont pas capables de croître dans ces milieux puisque nous avons une absence de turbidité dans les cultures (Figure 4-1) contrairement aux milieux de culture produits avec de l'eau distillée. Cette absence de développement des souches ne semble pas être due à un constituant du béton primaire mais au pH fortement alcalin du milieu (pH 12).

2.3. Conclusion

L'analyse de l'eau de contact des GBR a montré qu'aucun inhibiteur à la croissance bactérienne ou à la production de CaCO₃ ne semblait présent. Pourtant, l'introduction des bactéries dans un milieu préparé avec de l'eau de contact des GBR a mené à une absence de

développement de ces dernières. L'augmentation importante du pH du milieu dans lequel sont introduites les bactéries a pu provoquer un choc osmotique engendrant une lyse cellulaire. La différence de pH a pu entraîner également la nécessité d'une adaptation plus importante demandant une augmentation de la durée de la phase de latence. Il apparaît donc nécessaire de protéger les souches pour qu'elles puissent croître au contact des GBR. Deux solutions sont envisagées par la suite : la protection des bactéries à l'aide d'une matrice ou l'adaptation des bactéries à un pH de 12.

3. Utilisation de matrice protectrice pour traiter les GBR

Le but de ce travail est de mettre en place une matrice pour les bactéries afin de les protéger du pH fortement alcalin à la surface des GBR. Ainsi protégées, les bactéries pourront croître et réaliser leur biocalcification, à l'abri des facteurs agressifs de l'environnement. De plus, l'utilisation de ces matrices synthétiques favorisera l'adhésion des souches à la surface des GBR. Le principe de ces matrices consiste à imiter les matrices naturellement produites par les microorganismes lorsqu'ils adhèrent à un support : les biofilms. Ces biofilms présentent des propriétés intéressantes pour ce travail puisqu'au-delà du phénomène d'adhésion, ces matrices permettent de protéger les microorganismes qu'elles renferment en les isolant des éléments agressifs de l'environnement extérieur (pH, température, déshydratation...). C'est pourquoi les essais suivants ont été développés pour enrober les GBR avec des matrices synthétiques contenant la souche *B.halodurans* évoluant à son pH optimal de croissance. Les matrices employées ont été sélectionnées en s'inspirant des travaux menés par Jouenne *et al.* (1994) et Nassif *et al.* (2003), respectivement sur une matrice d'agar et une matrice composée de silice. Les deux équipes ont pu démontrer la survie des souches bactériennes, incorporées dans les matrices, face à des antibiotiques (Jouenne *et al.* 1994) ou l'absence de nutriments dans le milieu (Nassif *et al.* 2003). Ainsi, Jouenne *et al.* (1994) sont parvenus à immobiliser des cellules d'*E.coli* à des concentrations de 10⁹ à 10¹¹ ufc/g de matrice d'agar à 1% et à obtenir la survie de 10% de cette population bactérienne après une exposition de 1h à un antibiotique. Sans la protection de la matrice d'agar, aucune bactérie ne survit. Quant à Nassif *et al.* (2003), ils ont réussi à mesurer une activité métabolique sur 50% des bactéries *E.coli* encapsulées pendant 1 mois dans une matrice de silice maintenue humide, et sans nutriments. Ces matrices d'agar et

de silice pourraient donc non seulement améliorer l'adhésion des bactéries aux GBR, mais également leur survie au contact du matériau.

Afin d'amplifier l'adhésion des bactéries aux GBR, il a été choisi de travailler avec des matériaux secs pour induire un phénomène de succion lors de la mise en contact des matrices avec les GBR. D'un autre côté, des GBR pré-saturés en milieu de culture ont également été utilisés, à titre de témoins, afin de pouvoir quantifier l'impact de ce mécanisme sur l'amélioration du taux d'absorption des GBR après traitement par *B.halodurans*.

Dans un premier temps, nous allons tester la survie de *B. halodurans* incorporée dans les deux matrices (agar et silice) au contact de pH fortement alcalin. L'étude se poursuivra par la mise en contact de *B.halodurans* protégée, au contact des GBR.

3.1. Etude de la survie de *B. halodurans* dans les matrices, au contact d'un milieu fortement alcalin

L'utilisation des matrices a pour but de protéger la souche bactérienne du pH très alcalin de la surface des GBR. C'est pourquoi nous devons d'abord vérifier la survie de la souche au sein de ces matrices (agar ou silice), quand elle est placée dans un environnement au pH très élevé.

3.1.1. Essais en présence d'un milieu alcalin modèle

3.1.1.1. Production des matrices

Pour préparer la matrice d'agar, nous avons préparé 50mL de milieu BN à pH 9,7 et 10mL d'eau distillée additionnée de 1g/L d'agar. Les solutions sont autoclavées (15min, 125°C) et mélangées à chaud (plus de 60°C) en conditions stériles. Une fois que la température de la matrice atteint les 60°C, du bouillon bactérien âgé de 24h y est dilué au 10^{ème}.

Pour préparer le gel de silice (Nassif *et al.* 2003), une solution commerciale de silicates de sodium (Na₂O 10,6%-SiO₂ 26,5%) est ajustée à pH 7 par une solution d'acide chloridrique 12M (37%). Une solution commerciale de silice colloïdale (LUDOX HS-40) est aussi ajustée à pH 7 par une solution d'acide chloridrique 4M. Le gel de silice s'obtient par le mélange de ces solutions aux mêmes ratios volumiques. Pour produire la matrice de silice, sont mélangés, dans un contenant en polyéthylène, aux ratios volumiques respectifs 2/4/1 pour avoir un volume total de 60mL : (1) une solution BN à pH 9,7, supplémentée de 50g/L d'acétate de calcium et

20g/L d'urée, (2) le gel de silice et (3) de l'eau distillée. Le gel se forme en 10 secondes tout au plus (Coiffier *et al.* 2001).

3.1.1.2. Test de survie de *B.halodurans* dans la matrice d'agar, au contact d'un milieu alcalin

Pour vérifier la survie de *B.halodurans* au sein d'une matrice d'agar 0,1%, une fois au contact avec un milieu alcalin, nous avons développé un essai avec une mise en œuvre simple. Pour cela, un milieu à pH 12 est préparé et versé dans une boîte de Pétri avant d'être recouvert de la matrice d'agar 0,1% renfermant *B.halodurans*.

Pour réaliser le milieu alcalin, nous avons préparé 40mL d'eau distillée au pH ajusté à 12 par une solution de KOH (4M) et 10mL l'eau distillée contenant 20g/L d'agar pour produire un support solide. Les solutions sont autoclavées (15min, 125°C) et mélangées à chaud (plus de 60°C) en conditions stériles. En effet, l'agar n'étant pas soluble dans les solutions basiques et acides, il est nécessaire de préparer et d'autoclaver une solution contenant le gélifiant dans un autre contenant que celui du milieu basique. Toujours en conditions stériles, 20mL de ce milieu alcalin sont versés dans deux boîtes de Pétri. Une fois les préparations refroidies, 20mL de la matrice agar 0,1% contenant *B.halodurans* sont versés en conditions stériles sur les milieux alcalins dans les boîtes de Pétri.

Les préparations sont maintenues 5 jours à 30°C et le développement bactérien est observé à l'œil nu.

3.1.1.3. Test de survie de *B.halodurans* dans la matrice de silice, au contact d'un milieu alcalin

Le gel de silice est un matériau opaque qui rend les observations visuelles moins aisées avec le protocole développé avec la matrice d'agar 0,1% présenté précédemment. C'est pourquoi nous avons développé un autre protocole consistant à verser la matrice de silice contenant *B.halodurans* dans des boîtes de Pétri et à la recouvrir d'un milieu alcalin.

Pour cela, 20mL de gel de silice contenant les bactéries sont coulés dans 3 boîtes de Pétri. Après la prise du gel, 20mL d'une solution BN stérile ajustée à pH 12 avec une solution KOH (4M) sont versés sur le gel. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 8 jours et un test dead/live (chapitre 2, partie 2.2.4) est réalisé sur le gel avant que des observations au microscope à épifluorescence ne soient menées.

3.1.1.4. Résultats

Dans le cas du test de survie de *B.halodurans* au sein de la matrice d'agar au contact d'un milieu alcalin, les observations des surfaces des échantillons ont révélées un développement d'une centaine de colonies bactériennes dans chaque boîte de Pétri. Ce développement bactérien prouve que la matrice a protégé la souche de l'environnement alcalin et a permis un maintien de la croissance bactérienne.

Les observations des matrices de silice après application du dead/live (Figure 4-2) ont révélé la présence homogène de cellules marquées en vert. Ainsi, des bactéries vivantes sont toujours présentes au sein de cette matrice après 8 jours d'incubation au contact d'un milieu très alcalin. Cette observation montre l'efficacité de cette matrice à protéger la souche d'un environnement agressif.

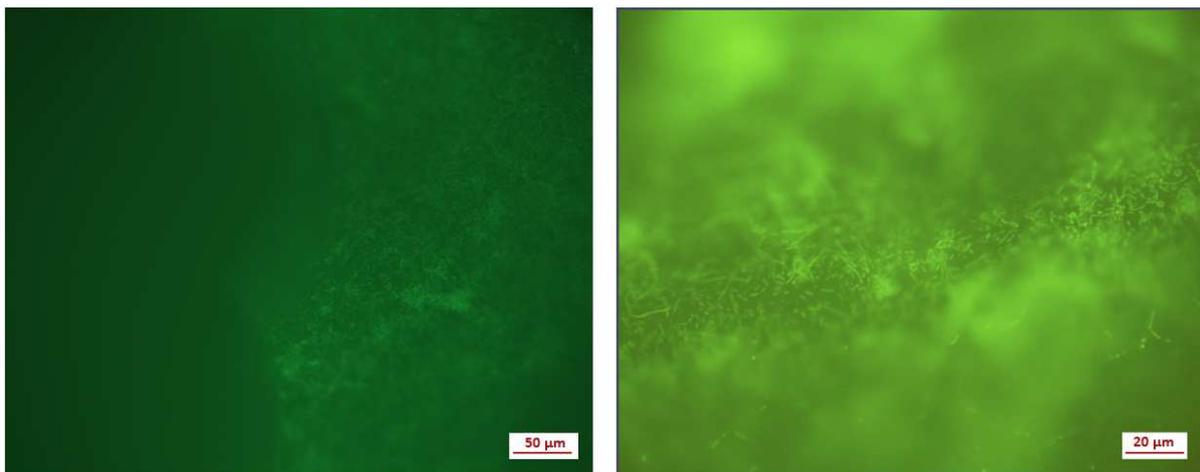


Figure 4-2 : observations au microscope optique à épifluorescence du gel de silice contenant *B.halodurans* incubé 8 jours à 30°C après coloration par le dead-live

3.1.2. Test de suivi de la survie de *B.halodurans* dans la matrice d'agar, au contact d'un mortier

Ces premiers résultats étant encourageants, nous devons maintenant confirmer l'efficacité des matrices lorsqu'elles sont mises au contact d'un matériau cimentaire.

Pour cela, des plaques de mortier de 2 x 2cm sur 2mm d'épaisseur sont recouvertes par 40µL de matrice agar 0,1% contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée et un bouillon bactérien âgé de 48h, dilué au 10^{ème}. Les plaques sont incubées à 30°C±1°C pendant 48h dans des boîtes de Pétri avec une atmosphère humide pour éviter le dessèchement de l'agar. Le test

de dead-live est alors effectué sur les tranches de mortier sur lesquelles la matrice d'agar 0,1% contenant *B.halodurans* a été étalée. Enfin, les échantillons sont observés sous un microscope à épifluorescence.

En utilisant la technique du dead/live pour tester la survie des bactéries au sein d'une matrice d'agar 0,1%, au contact de mortier, nous avons révélé une limitation à l'utilisation de cette technique de marquage cellulaire (Figure 4-3). En effet, après avoir effectué une coloration dead-live, il est observé que la matrice cimentaire fluoresce au microscope. Cela induit donc un problème pour la discrimination de la fluorescence bactérienne et celle de la matrice cimentaire. Nous ne pouvons donc pas utiliser cette méthode pour identifier les bactéries vivantes et mortes sur les tranches de mortier.

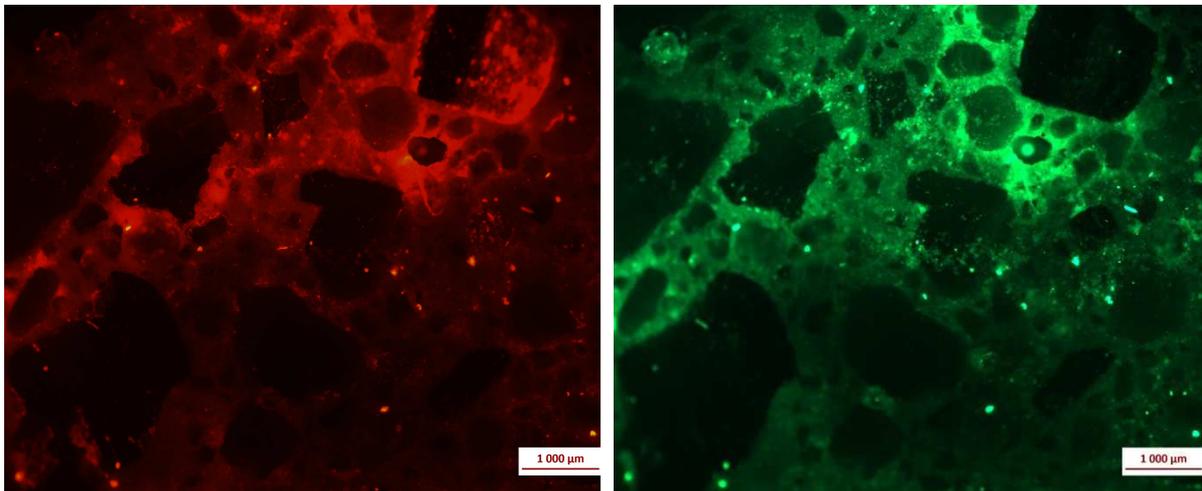


Figure 4-3 : observations au microscope optique à épifluorescence de la matrice d'agar contenant *B.halodurans* incubée 48h à 30°C au contact de mortier et après coloration par le dead-live

3.1.3. Conclusions

Ces essais ont montré que les matrices de silice et d'agar protègent *B.halodurans* de façon efficace d'un milieu modèle au pH très alcalin. Toutefois, nous n'avons pas pu confirmer cette efficacité au contact d'un mortier car la coloration par dead/live ne fonctionne pas dans ce cas. Nous allons donc tenter d'évaluer la survie des bactéries indirectement à travers leur effet sur l'absorption des GBR.

3.2. Traitement des GBR avec *B.halodurans* protégé par matrice

Les matrices silice et agar permettent de protéger *B. halodurans* d'un environnement fortement alcalin, nous allons donc utiliser ces matrices pour mettre en contact les bactéries avec les GBR.

3.2.1. Protocoles

3.2.1.1. Formulation des matrices synthétiques pour application sur GBR

Nous commençons par déterminer la quantité de matrice à ajouter pour que les GBR soient enrobés d'une fine couche de l'ordre que quelques dizaines de µm et non agglomérés les uns aux autres par le gel.

Afin de déterminer le volume de matrice à ajouter nous devons nous référer à la courbe granulométrique des GBR donnée dans le chapitre 2 (partie 3 ; Annexe B). En supposant que les grains de sable sont parfaitement sphériques, on a leur volume égale à :

$$V = \frac{\pi}{6} \times d^3$$

La surface d'une sphère est :

$$S = \pi \times d^2$$

D'où :

$$S = 6 \times \frac{V}{d_i}$$

Pour une masse (M) de matériau de densité ρ , on a :

$$V = M \times \rho$$

La fraction du tamisât (α_i) obtenue sur chaque tamis permet de déterminer le passant net pour un diamètre d_i :

$$Pn_i = \alpha_i \times d_i$$

D'où la masse $M(d_i)$ des sables de diamètre d_i est :

$$M_{d_i} = M \times \alpha_i \times d_i$$

La surface développée par grains de diamètre (d_i) devient :

$$S_i = 6 \times \frac{M \times \alpha_i \times d_i}{\rho \times d_i}$$

D'où la surface totale développée est :

$$S = \sum S_i$$

$$S = \frac{6 M}{\rho} \sum_i \frac{1}{d_i}$$

La surface totale développée est de 4 m²/kg de sable.

La quantité d'eau à apporter pour former une couche d'épaisseur k autour des granulats est :

$$Eau_{\text{absorbée}} = S \times k$$

La quantité d'eau adsorbée dépend de la porosité (p), on a donc :

$$Eau_{\text{adsorbée}} = M \times p$$

La quantité d'eau totale à apporter pour former une couche d'épaisseur k doit comprendre l'eau adsorbée et l'eau absorbée, on a donc :

$$\text{Eau} = \text{Eau}_{\text{absorbée}} + \text{Eau}_{\text{adsorbée}}$$

Nos essais sont réalisés sur 600g de GBR secs. Les GBR utilisés présentent un taux d'absorption mesurée de 8%. Cependant, les GBR ont une teneur initiale en eau de 3% environ liée à l'humidité relative. Nous avons décidé de former une couche de matrice sur les GBR de l'ordre de la dizaine de μm .

Ainsi en apportant 60mL de matrice, si la matrice est adsorbée et absorbée nous allons pouvoir former une couche homogène de 12 μm , si par contre la matrice n'est pas du tout adsorbée, la couche de matrice représentera 25 μm . L'apport de 60mL de matrice pourra donc en théorie nous permettre de former une couche de matrice comprise entre 12 et 25 μm .

3.2.2. Protocoles d'essais

Pour les deux matrices sélectionnées, le protocole détaillé ci-après est employé. Une fois les matrices produites, 620g de GBR (soit 600g de GBR secs + 3% de teneur en eau naturelle) sont mélangés à 60mL de matrice dans un flacon de 2L en PEHD. Une répartition manuelle à l'aide d'une spatule est réalisée. Les flacons sont ensuite fermés et placés horizontalement pour une agitation sous rotation continue (4tr/min) pendant 45min. Une fois le mélange terminé, 500mL de milieu BN (pH 9,7) contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée sont ajoutés pour limiter le dessèchement de la matrice. Les flacons sont ouverts et les GBR sont mélangés manuellement deux fois par jours pour oxygéner le milieu. L'AHA introduit dans l'un des traitements nous permet de voir l'impact de l'activité de l'AC seule sur la production de CaCO₃ par la bactérie.

Pour ces essais, cinq protocoles sont menés simultanément, en duplicatas, sur 620g de GBR (Tableau 4-2; Figure 4-4) :

Tableau 4-2 : Conditions des traitements des GBR avec les matrices agar ou silice.

Traitement	GBR	Matrice*	6mL de bactéries	AHA	Milieu***	Ratio Bactéries/acétate de calcium
1	Secs	60 mL	10 ⁸ bactéries/mL	-	500 mL	2,7.10 ⁷ /g
2	Pré-saturés**	60 mL	10 ⁸ bactéries/mL	-	500 mL	2,7.10 ⁷ /g
3	Secs	60 mL	10 ⁸ bactéries/mL	376 mg/L	500 mL	2,7.10 ⁷ /g
4	Secs	-	10 ⁸ bactéries/mL	-	560 mL	2,7.10 ⁷ /g
5	Secs	60 mL	-	-	500 mL	-

* : Milieu BN à pH 9,7 contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée ;

** : 450 mL de milieu BN à pH 9,7 pendant 24h

*** : Milieu BN à pH 9,7 contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée

Les essais ont été menés sur 3 semaines, avec un maintien des traitements à température ambiante. Des mesures d'absorption en eau des GBR ont été réalisées à la fin du traitement, ainsi que des observations au MEB sur les GBR traités secs, afin de voir la répartition des dépôts.

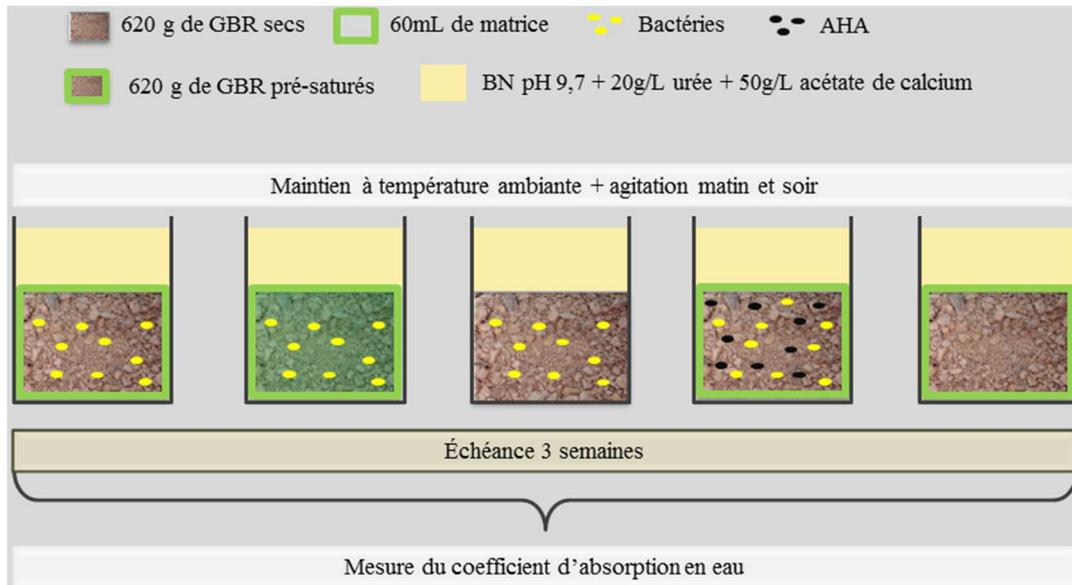


Figure 4-4 : Schéma du protocole employé pour le traitement des GBR avec des matrices synthétiques renfermant ou non des bactéries

3.2.3. Résultats obtenus et discussions

Les valeurs minimales et maximales mesurées sur les deux échantillons prélevés pour chaque traitement sont présentées sur les Figure 4-5 et Figure 4-7, sous forme de barre d'erreur.

A ces valeurs minimales et maximales est ajoutée la marge d'erreur de l'expérimentateur. La valeur du taux d'absorption avant traitement est évaluée avant chaque nouvelle expérience. Dans le cadre des GBR traités avec des matrices agar ou silice, le taux d'absorption initial est évalué à $8,0 \pm 0,3\%$.

On observe ainsi que pour les essais réalisés avec la matrice d'agar à 0,1% (Figure 4-5), les taux d'absorption en eau obtenus en fin des traitements sont similaires à ceux mesurés avant les traitements (pré-saturation ou non, uréase ou AC, présence ou absence de matrice protectrice).

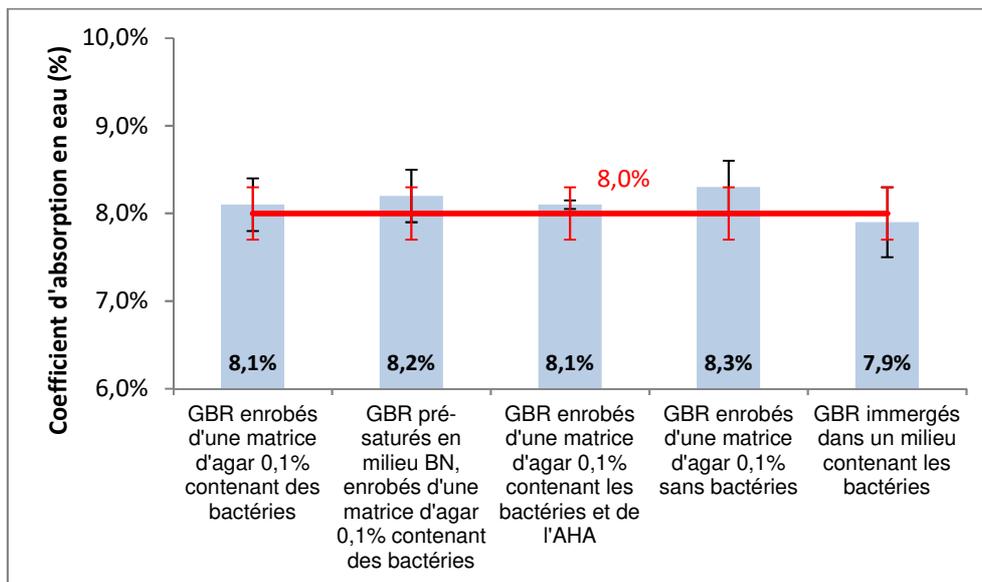


Figure 4-5 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par enrobage dans une matrice d'agar à 0,1% contenant des bactéries évoluant à leur pH optimal de croissance (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée après 3 semaines de traitement. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.

Les observations MEB des vues de profil des GBR montrent que la matrice agar 0,1% est bien déposée à leur surface (Figure 4-6). Ce dépôt se retrouve sur les GBR témoins et les GBR traités avec la matrice contenant les bactéries. On observe que ce dépôt est irrégulièrement réparti. Certaines zones ne présentent aucune matrice et *a contrario* la matrice peut atteindre plus de 20µm d'épaisseur. Il apparaît donc que la technique employée pour répartir la matrice autour des GBR ne permet pas d'obtenir un dépôt homogène de cette dernière. De plus, les observations MEB des dépôts vus de profil ne présentent pas de cristaux de CaCO₃ laissant penser à une absence de formation de carbonate de calcium quel que soit le traitement réalisé.

Les traitements avec une matrice agar semblent ne pas permettre un dépôt homogène de la matrice ce qui limite l'obtention d'une couche de CaCO₃ tout autour des GBR.

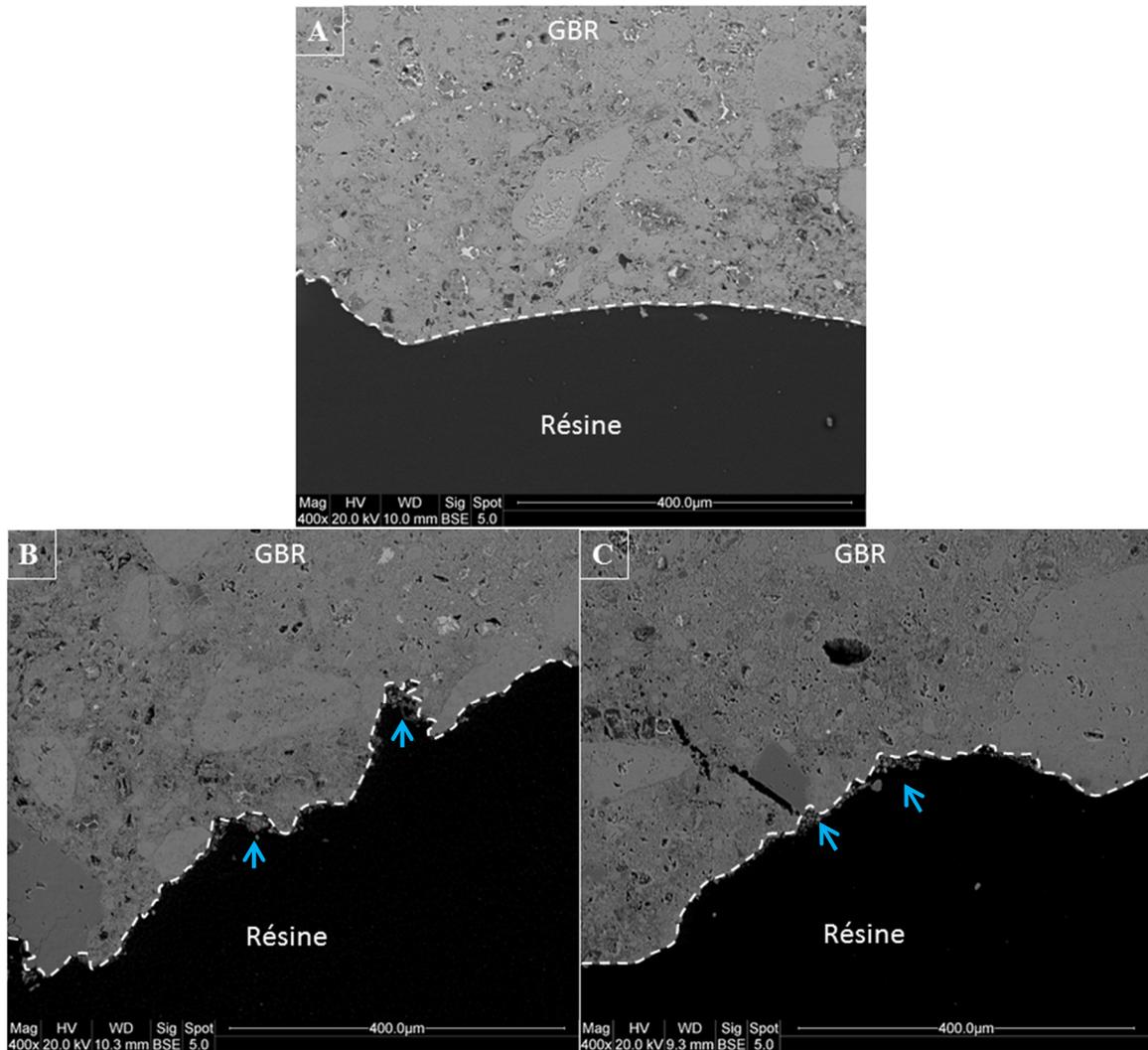


Figure 4-6 : Photos MEB de coupes transversales de GBR non traités (A), traités 3 semaines avec une matrice d'agar 0,1% en sans bactéries (B) et contenant des bactéries (C). La surface des GBR est délimitée par les pointillés et les dépôts poreux et irréguliers de matrice d'agar 0,1% sont indiqués par les flèches bleues.

En ce qui concerne les mesures des coefficients d'absorption en eau des GBR traités par la matrice de silice, celles-ci montrent des résultats différents (Figure 4-7). Nous observons que le taux d'absorption en eau des GBR sans matrice avec bactéries (6,1%) est inférieur à celui des GBR avant traitement (8,0%). Cette différence, importante, reste à nuancer, car, bien que réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que l'essai avec la matrice d'agar à 1% (Figure 4-5), le taux mesuré ici est d'environ 2% inférieur à celui obtenu dans l'essai précédent. Il semble raisonnable de penser qu'une erreur a été faite au cours de la mesure du taux d'absorption en eau des GBR sans matrice de silice. Par ailleurs, les taux d'absorption en eau

des GBR secs traités avec la matrice contenant les bactéries (7,9%) et ceux des GBR enrobés d'une matrice sans bactéries (7,6%) sont similaires à ceux des GBR avant traitement (8,0%). Il semble ainsi que ni la matrice de silice seule, ni la matrice de silice contenant les bactéries n'impacte le taux d'absorption en eau des GBR. Cependant, le taux d'absorption en eau des GBR traités avec la matrice de silice contenant des bactéries et de l'AHA (7,0%) est légèrement inférieur à celui mesuré avant traitement. Ainsi, l'inhibition de la voie de dégradation de l'urée par l'AHA pourrait avoir mené à une biocarbonatation suffisante pour diminuer le taux d'absorption en eau des GBR. Bien que cette diminution soit faible, elle permet d'ouvrir des perspectives de recherches. En modifiant la durée d'expérimentation, les conditions d'incubation ou encore les quantités de bactéries ou d'acétate de calcium apportées, il serait possible d'améliorer l'efficacité du traitement.

En observant les résultats obtenus avec les GBR pré-saturés, nous notons que le coefficient d'absorption en eau obtenu est supérieur d'environ 2% à celui mesuré avant traitement. Ce résultat s'explique par le fait que la masse saturée surface sèche de ces GBR traités est nettement plus élevée que celle des GBR avant traitement. Cette différence peut être liée à la présence de milieu BN dans la porosité avant l'application de la matrice silice. Celle-ci a pu piéger le milieu de culture induisant une masse saturée surface sèche plus importante. Cependant, la matrice n'a pas permis d'éviter l'évaporation du milieu de culture lors du séchage à $110 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 24h. Ce phénomène n'a pas été observé en présence de la matrice agar car celle-ci a une porosité plus importante (de 20 à 600 μm ; Esquirol 2013) que la matrice silice (porosité 8-30nm ; Perullini *et al.* 2015).

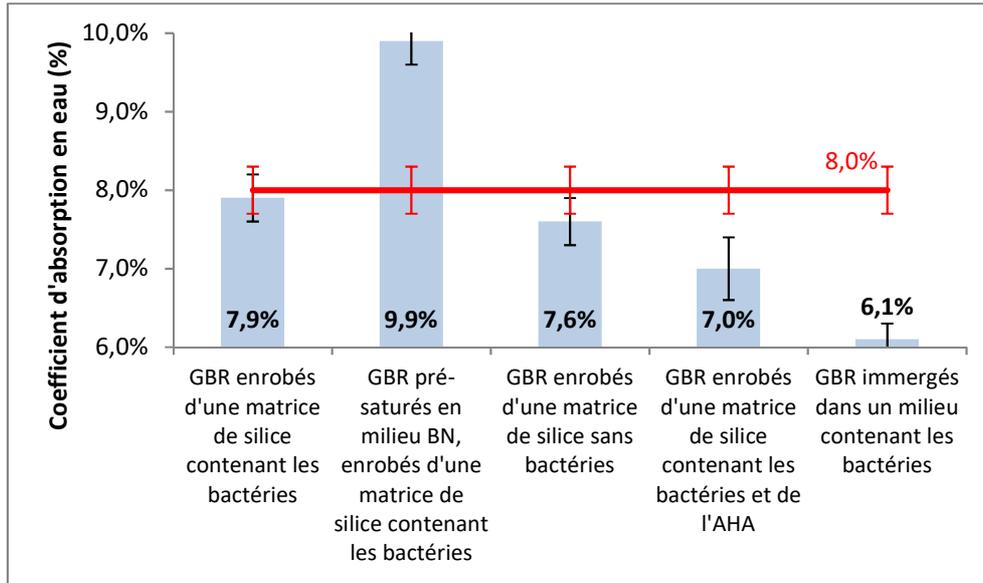


Figure 4-7 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par enrobage dans une matrice de silice contenant des bactéries évoluant à leur pH optimal de croissance (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.

Une observation au MEB des GBR traités avec la matrice de silice permet de constater la présence d'un dépôt à la surface des matériaux (Figure 4-8B et C) qui n'est pas observé sur les GBR avant traitement (Figure 4-8A). Sur ce dépôt, des bactéries calcifiées ont pu être identifiées, ce qui prouve que la matrice a favorisé l'adhésion des bactéries au support, ainsi que leur survie. On remarque également que le dépôt n'est pas homogène (Figure 4-8C), ce qui permet d'expliquer l'absence -ou la faible- diminution du taux d'absorption en eau des GBR secs enrobés de matrice de silice.

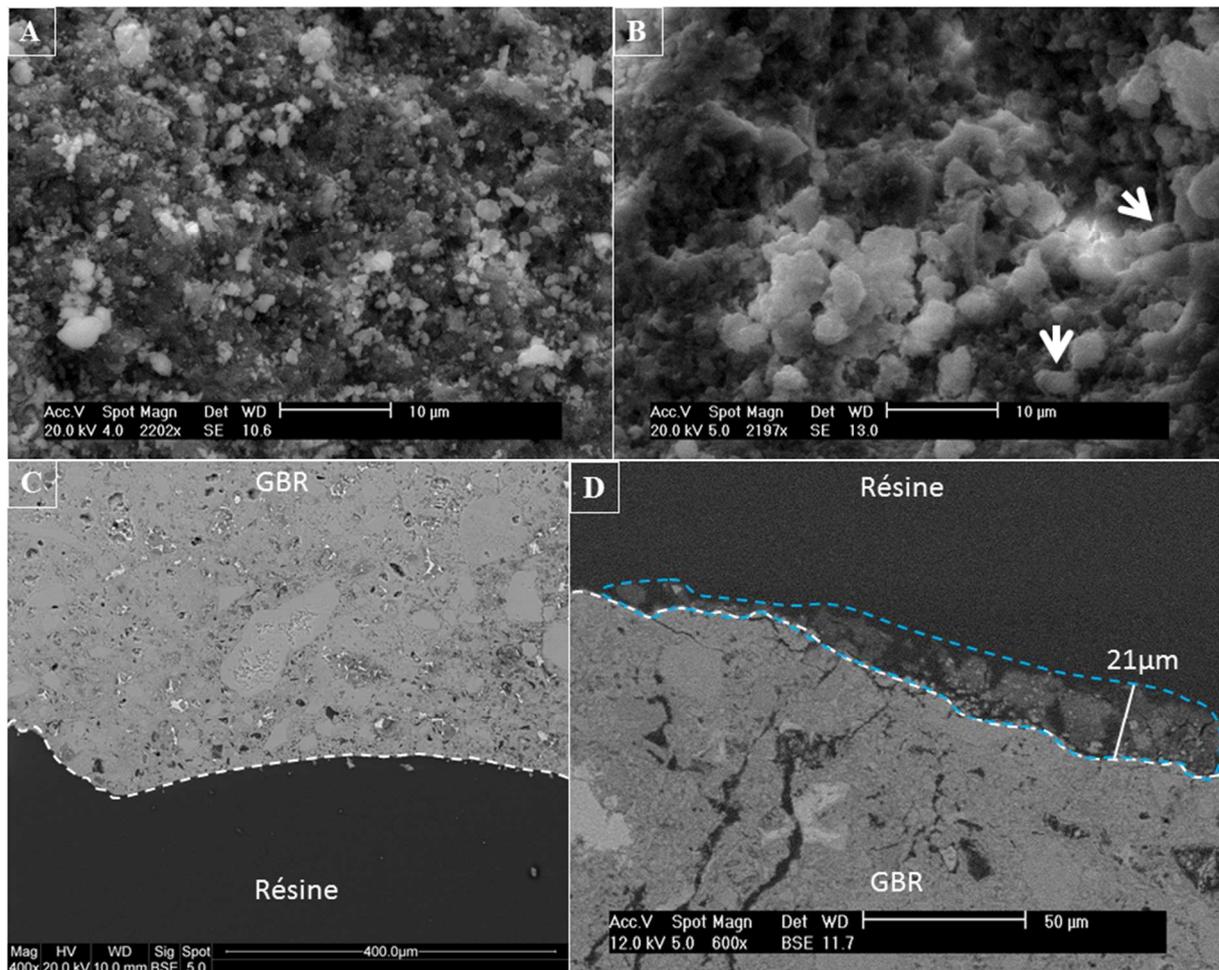


Figure 4-8 : Photos MEB des GBR non traités -vue de surface (A) et de profil (C)- et de GBR traités 3 semaines par une matrice de silice contenant des bactéries en vue de surface (B) et de profil (D). Des bactéries calcifiées sont désignées par des flèches blanches. La surface des GBR est délimitée par les pointillés, sur les vues de profil. Le dépôt poreux et irrégulier de matrice de silice est entouré de bleu et son épaisseur est indiquée en blanc.

La valeur du taux d'absorption des GBR pré-saturés, nous a permis de mettre en évidence une erreur dans notre protocole d'évaluation du taux de d'absorption des GBR après traitement. En effet, nous mesurons directement après traitement nos masses saturées surface sèche sans élimination préalable du milieu de traitement. Ce dernier peut introduire de nombreuses fines supplémentaires et dépôts non cohésifs sur nos GBR traités induisant un biais dans la mesure. De plus, jusqu'à présent, nous mesurons la masse saturée surface sèche permettant de calculer l'absorption des GBR directement à la fin du traitement. Or, avant même que le traitement ne puisse faire effet, de l'eau était entrée dans les GBR et cette façon de faire ne permettait pas vraiment d'évaluer l'efficacité du traitement. A partir de maintenant, nous avons procédé à un rinçage, puis un séchage après traitement, et enfin une resaturation pour mesurer la quantité d'eau absorbée une fois que le traitement est réellement effectif. Ce faisant,

notons toutefois que nous faisons l’hypothèse que le séchage à 110°C n’endommage pas la protection éventuellement produite par les bactéries. Ainsi nous avons remesuré nos taux d’absorptions pour les GBR traités avec de la matrice agar après rinçage à l’eau sur tamis de 50µm (Figure 4-9).

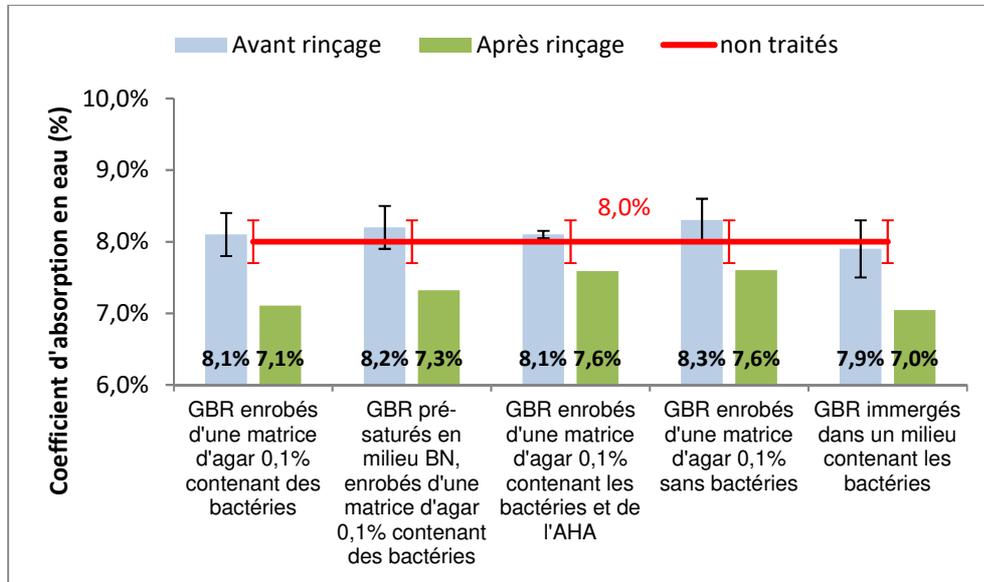


Figure 4-9 : Taux d'absorption en eau des GBR traités avec une matrice agar contenant des bactéries évoluant à leur pH optimal de croissance (pH 9,7), en présence de 50g/L d'acétate de calcium et de 20g/L d'urée, avant (barres bleues) et après rinçage (barres vertes). Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.

Ce nouveau protocole a permis de diminuer les taux d’absorption en eau des GBR de 0,4 à 1 % par rapport au coefficient mesuré chez les GBR non traités. Cette diminution correspond à une perte de matière équivalente à 1,8 à 6 g. Malgré la chute des taux d’absorption obtenue après rinçage, nous n’avons pas pu discriminer l’impact des bactéries par rapport au milieu contenant uniquement les matrices.

3.2.4. Conclusions

Les résultats ont montré que les traitements réalisés avec des matrices synthétiques (agar et silice) ne se répartissaient pas de façon homogène à la surface des GBR. Cette irrégularité dans le dépôt mène majoritairement à l'absence d'impact des traitements sur les taux d'absorptions en eau des GBR.

Ces essais réalisés avec des matrices nous ont permis de mettre en évidence une erreur dans notre protocole expérimental de mesure des taux d'absorption en eau des GBR (nécessité de rinçage et de séchage après traitement). Ce point a été corrigé dans la suite de notre travail.

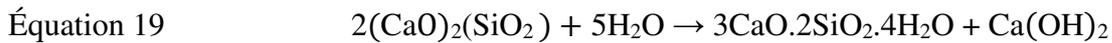
3.3. Conclusions

Les essais présentés dans cette partie ont révélé l'efficacité des matrices agar et silice à protéger les bactéries d'un environnement très alcalin, puisque leur survie a été démontrée après plusieurs jours d'incubation. Toutefois, l'application de ces matrices sur les GBR reste compliquée pour obtenir une répartition homogène sur matériaux. Cette difficulté a mené à une adhésion hétérogène des matrices aux GBR. Ainsi, le traitement des GBR par les bactéries protégées par les matrices agar ou silice n'a pas pu être efficace pour diminuer le taux d'absorption des matériaux. Quoiqu'il en soit, même si les matrices s'étaient réparties de façon homogène sur les GBR, nous n'avons aucune garantie que les bactéries qu'elles contiennent réalisent une bioprécipitation qui adhère bien à la surface des GBR. Auquel cas, si la bioprécipitation des CaCO₃ se réalise uniquement dans la matrice, alors, après rinçage des matériaux traités, la couche de CaCO₃ pourrait être éliminée par manque d'adhésion à la surface des GBR. A noter qu'à ce stade, nous n'avons pas pu faire d'observation microscopique pour évaluer ce phénomène.

Au vu des difficultés de mise en œuvre des matrices agar et silice, ainsi que de leur coût de production, nous avons étudié en parallèle une autre voie consistant à adapter *B.halodurans* à pH 12.

4. Adaptation pH 12

Les granulats de béton recyclés, présentent un pH de surface très alcalin (Chen, Tinjum & Edil 2013) notamment dû à l'hydratation du ciment et des silicates dicalcite ((CaO)₂(SiO₂) ; C2S) et tricalcite ((CaO)₃(SiO₂), C3S)(Poon, Qiao & Chan 2006; Tam *et al.* 2009) (Équation 19)). Cette réaction d'hydratation mène à la production d'hydroxyde de calcium (Ca(OH)₂), un composé considéré comme une base forte (Greenwood & Earnshaw 2012).



L'introduction de bactéries dans un milieu au pH plus élevé que celui dans lequel elles évoluent naturellement peut induire leur mort par : une déstructuration de la membrane, une dénaturation des enzymes et des protéines ou encore une ionisation des molécules nutritives impliquant une diminution de leur disponibilité pour les bactéries. C'est pourquoi il nous faut adapter nos bactéries à un pH de 12.

4.1. Sélection sur milieu gélosé

Les souches bactériennes de *B.halodurans* et *M.lactis* ont été sélectionnées sur milieu gélosé jusqu'à ce qu'elles survivent à un pH de 12. Une solution simple de sélection des clones résistants a été choisie plutôt qu'une manipulation génétique. Ainsi, les souches à adapter sont mises en culture et 100µL du bouillon bactérien sont étalés sur un milieu gélosé préparé avec un pH de 0,5 unité supérieure à celui dans lequel croît la souche (Figure 4-10). Le milieu gélosé inoculé est alors laissé en incubation pendant 48h à 30°C. Les colonies développées sont alors prélevées avant d'être introduites dans un milieu liquide préparé au même pH que celui du milieu gélosé. Cette culture liquide est ensuite placée en incubation (30°C, 140tr/min) pendant 48h, avant que 100µL ne soient étalés sur un milieu gélosé préparé avec un pH supérieur de 0,5 unité. Ces étapes alternant milieu liquide et milieu gélosé sont répétées jusqu'à atteindre un pH de 12. Les cultures sont alors préservées à -20°C dans du glycérol (20%). Cette adaptation a été réalisée avec des milieux sans urée car nous souhaitons désormais privilégier la voie de l'interconversion, qui permet une production plus efficace de CaCO₃ et une production moins onéreuse que lorsqu'elle est combinée à la voie de dégradation de l'urée.

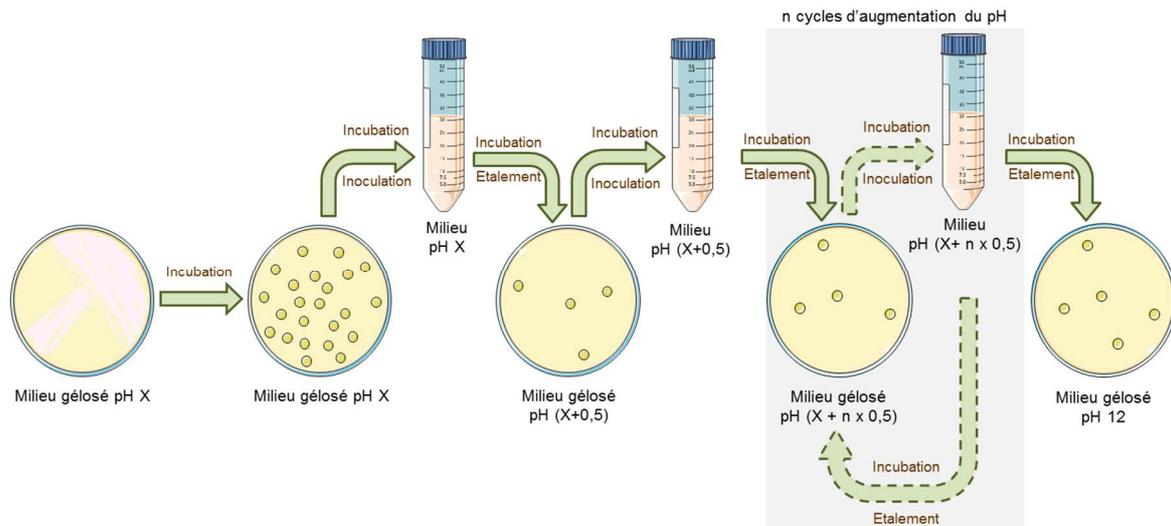


Figure 4-10 : Schéma du protocole suivi pour adapter les souches à survivre dans un pH de 12

Les souches *M.lactis* et *B.halodurans* ont pu ainsi être adaptées à un pH de 12. La sélection a été menée en utilisant les milieux gélosés sur lesquels les individus les plus résistants au pH appliqué survivaient et se développaient en colonies. Les résultats ont montré qu'un nombre plus important d'individus alcalino-résistants avaient supporté ce traitement jusqu'au pH 12, dans le cas de la culture de *B.halodurans*. Ce constat s'est traduit par la formation d'un tapis bactérien sur le milieu gélosé à pH 12 inoculé par *B.halodurans*. La capacité d'adaptation de cette souche à un environnement alcalin semble meilleure que celle de *M.lactis* dont le faible développement bactérien à pH 12 est représenté par des colonies dispersées. Pour résister aux stress environnementaux, les bactéries modifient leur paroi et la réorganise (Cotter & Hill 2003). Il s'agit d'une bicouche phospholipidique dynamique en contact direct avec le milieu extérieur, la paroi de *B.halodurans* semble donc capable de se réorganiser de façon plus efficace que celle de *M.lactis* pour supporter un pH extérieur de 12 et ainsi stabiliser la membrane, limiter les échanges ioniques,... Ceci est cohérent avec les gammes de pH dans lesquelles évoluent les 2 souches (Chapitre 3, Tableau 3-1), cette gamme étant plus étendue dans le pH basiques dans le cas de *B.halodurans*.

4.2. Conclusion

Au cours des essais d'adaptation, nous avons constaté que la souche *M.lactis* croît plus difficilement à pH 12. C'est pourquoi nous décidons de l'écartier de la suite de notre travail. Les essais suivants sont donc réalisés uniquement avec *B.halodurans*. Nous allons déterminer si *B.halodurans* est toujours capable d'induire la production de CaCO_3 à pH12 et à quel taux. De

plus, nous nous intéresserons à l'impact de l'eau de contact des GBR sur sa production de CaCO₃.

5. Rendements de production de CaCO₃ à pH 12 sans urée

Cette partie est consacrée à l'étude de la production de CaCO₃ par *B.halodurans* à pH 12

5.1. Protocoles

Les protocoles employés pour cet essai sont les mêmes que ceux utilisés dans le chapitre 3 (partie 4.3.1), pour la production de CaCO₃ à pH optimal de croissance des souches dans un milieu supplémenté de 50g/L d'acétate de calcium. Deux différences sont à préciser avec les protocoles employés ici : (1) nous employons la souche bactérienne *B.halodurans* adaptée à pH 12 et (2), dans le protocole réalisé avec l'eau de contact des GBR, les seuls témoins réalisés sont à l'échéance 3 semaine

Après une remise en culture de *B.halodurans* adaptée à pH 12, un repiquage progressif des cultures au 10^{ème} est réalisé toutes les 24h, dans un milieu BN sans urée à pH 12. Une fois un volume suffisant de bouillon bactérien obtenu, la pré-culture dans 40 mL de milieu BN pH 12 contenant de l'acétate de calcium à 50 g/L et dans 40 mL de milieu BN préparé avec de l'eau de contact des GBR, contenant 50g/L d'acétate de calcium.

Des témoins non inoculés (produits ou non avec de l'eau de contact des GBR) et des échantillons inoculés sont réalisés en triplicatas pour chaque échéance prévue. Le suivi de production est réalisé sur 3 semaines, au cours desquelles les cultures sont incubées à 30°C, 60 tr/min. A chaque échéance (1, 2 et 3 semaines), un prélèvement du milieu est réalisé pour effectuer des dénombrements sur cellule de Thoma. Une centrifugation (3000g, 10 min, 5°C) des milieux est réalisée et le culot est récupéré -après élimination du surnageant- et analysé par DRX et ATG

5.2. Résultats et discussions

Les suivis de croissance de la souche dans les deux milieux (eau distillée et eau de contact des GBR) montrent une évolution différente (Figure 4-11). Dans le milieu BN pH 12, on observe une augmentation progressive de la concentration bactérienne qui se stabilise à 2 semaines à une valeur de 2.10⁹cellules/mL. La concentration bactérienne est alors multipliée

par 67 en 2 semaines. Mais, la concentration bactérienne dans le milieu produit avec l’eau de contact des GBR évolue plus lentement, avec une concentration cellulaire stable sur les 2 premières semaines, suivie par une croissance entre 2 et 3 semaines.

Nous remarquons également que le temps de génération de la souche évoluant dans le milieu BN pH 12 produit avec de l’eau distillée semble légèrement ralenti. D’après les résultats obtenus au bout d’une semaine pour le pH 9.7 et pour 2 semaines pour le pH 12, les temps de générations passent respectivement de 48,3h à 55,4h. De plus, la valeur maximale de bactéries dans les milieux à pH 9,7 et à pH 12 est similaire de l’ordre de 10⁹ cellules/mL. Cela montre une bonne adaptation de la souche à un milieu à pH 12.

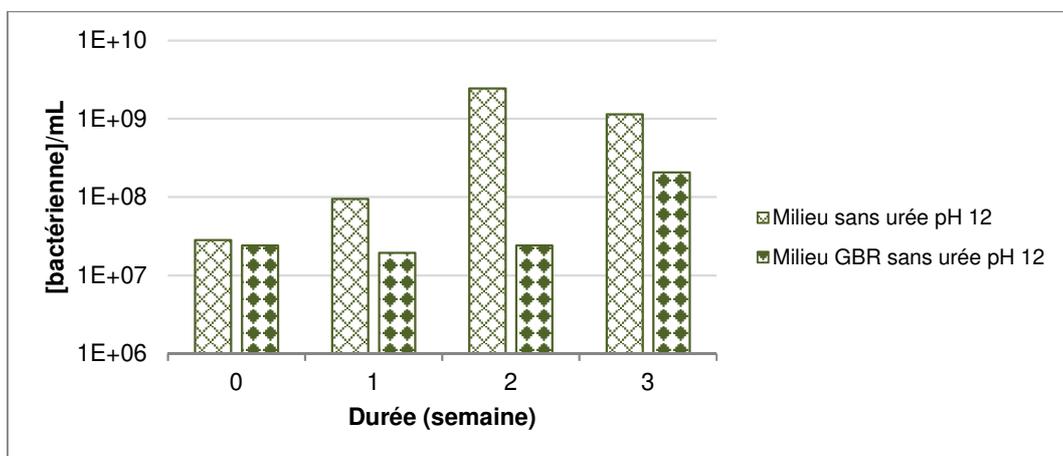


Figure 4-11: Suivi de la concentration bactérienne (nombre de cellules/mL) au cours du temps par *B.halodurans*, en boîte de Pétri, dans des milieux sans urée à pH 12 et en apportant 50g/L d’acétate de calcium, produits avec de l’eau distillée (barres blanches avec des traits croisés) ou avec de l’eau de contact des GBR (barres avec des losanges) (Annexe C).

Les masses cumulées de CaCO₃ produites par la souche évoluant dans le milieu BN pH 12 produit avec de l’eau distillée (Figure 4-12), montrent une augmentation progressive sur les 3 semaines jusqu’à atteindre environ 1420 mg. Cette masse obtenue à 3 semaines est 1,6 fois inférieure à celle obtenue par la souche évoluant à son pH optimal de croissance dans un milieu sans urée. Nous notons également que les CaCO₃ formés sont principalement de la vatérite, mais que de la calcite commence à se former dans les échantillons à 3 semaines. Nous constatons également que les masses cumulées de CaCO₃ dans les témoins restent similaires sur les 3 semaines d’incubation à 237,2mg ± 44,0mg et sont composés à plus de 70% de calcite.

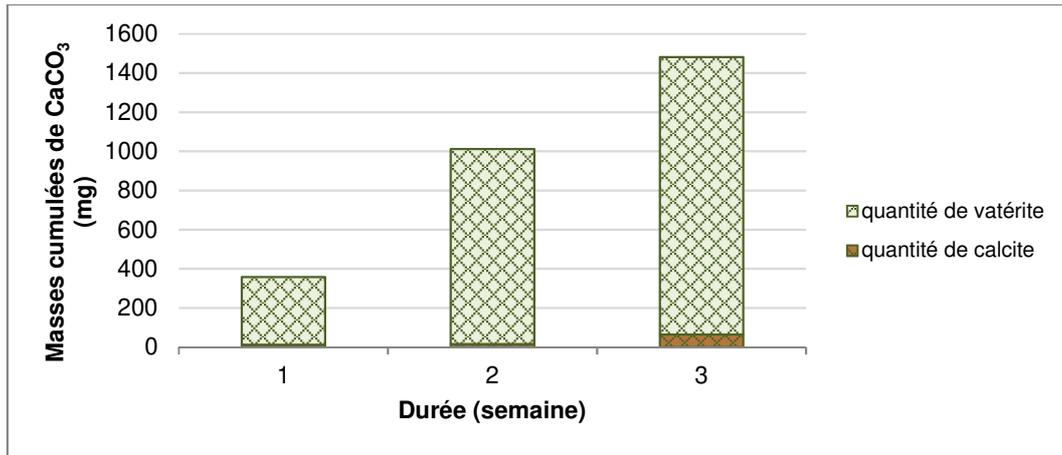


Figure 4-12 : Masses cumulées de CaCO₃ dans les cultures de *B.halodurans* à pH12, en boîte de Pétri, en favorisant la voie de l'interconversion, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L

Quant aux masses cumulées de CaCO₃ dans les milieux produits avec de l'eau de contact avec les GBR (Figure 4-13), nous notons que la masse est similaire à 1 et 2 semaines mais triple entre 2 et 3 semaines. Notons également que la production obtenue à 3 semaines dans l'eau des GBR est supérieure de 1000 mg à la production obtenue dans l'eau distillée (Figure 4-12 et Figure 4-13).

La composition cristalline évolue également au cours du temps. En effet, à 1 et 2 semaines, durant la phase stationnaire de la souche, la forme cristalline majoritaire dans les échantillons est la calcite. Tandis qu'à 3 semaines, pendant la phase de croissance, la cristallite majoritaire est la vatérite. La quantité de CaCO₃ formée au bout de la deuxième semaine est similaire à la quantité de CaCO₃ obtenue au bout d'une semaine. En même temps, nous pouvons observer que *B. halodurans* est toujours en phase stationnaire. Sa croissance n'a lieu qu'à partir de la 2^{ème} semaine, de la même façon la quantité de CaCO₃ augmente qu'à partir de la 3^{ème} semaine.

Ainsi, l'évolution de la production de carbonate de calcium au cours des 3 semaines par *B.halodurans* à pH 12 en présence de l'eau de contact des granulats, nous permet de mettre en évidence que le mécanisme de bioprécipitation est limité par la quantité de cellules présentes (mortes ou vivantes) dans le milieu. Ainsi durant la phase de latence, la population microbienne n'évolue quasiment pas. Ce sont les mêmes cellules qui sont présentes. A ce moment-là les ions calcium vont venir se fixer sur la paroi cellulaire puis la carbonatation des ions calcium va pouvoir se dérouler dans la limite d'accessibilité des sites de nucléation. La précipitation de carbonate de calcium est donc limitée par le nombre de ces sites de nucléation possible. Lors

de la croissance exponentielle, le nombre de cellules augmente, et donc également le nombre de sites de nucléation, permettant ainsi la formation de carbonate de calcium supplémentaire.

Nous n’observons pas ce mécanisme dans les autres essais car nous ne pouvons pas différencier la phase de latence de la phase exponentielle. De plus, durant la phase stationnaire la population microbienne change (le nombre de micro-organismes vivants dans le milieu reste constant, cependant le taux de natalité est similaire au taux de mortalité), permettant alors la formation de nouveaux sites de nucléation et donc la poursuite de la bioprécipitation.

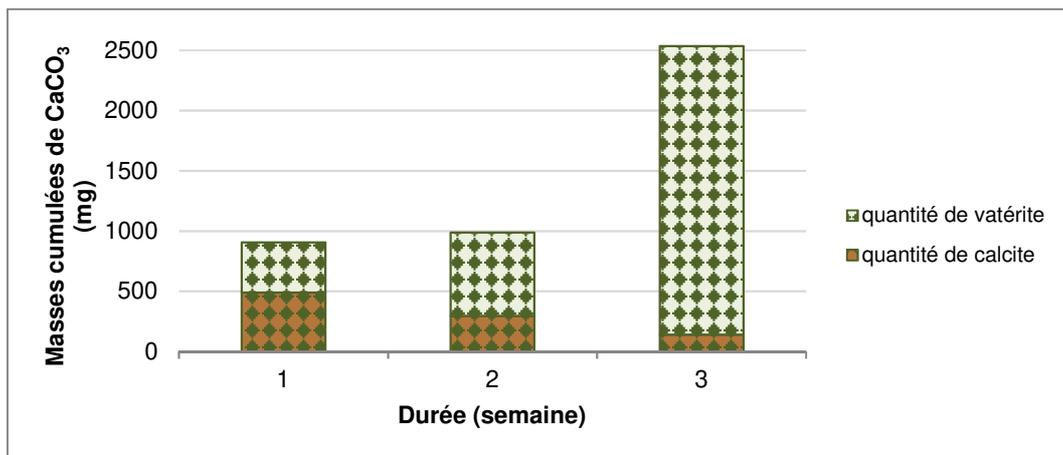


Figure 4-13 : Masses cumulées de CaCO₃ obtenues dans les cultures de *B.halodurans* à pH 12, en boîte de Pétri, avec un apport d'acétate de calcium de 50g/L, dans un milieu produit avec l'eau de contact des GBR. Attention, contrairement aux figures précédentes, la masse cumulée des témoins n'a pas été mesurée à 1 et 2 semaines. En conséquence elle n'a pas été retranchée des masses obtenues dans les milieux inoculés. Pour information la masse cumulée de CaCO₃ du témoin à 3 semaines a été mesurée égale à 116,1mg.

Ces essais nous confirment que *B.halodurans* est une souche qui favorise la formation de la vaterite. Or, d’après Lian *et al.* (2006), Barabesi *et al.* (2007) et Wei *et al.* (2015), les *Bacillus* tendent généralement à favoriser la formation de calcite. Toutefois, Rodriguez-Navarro *et al.* (2007) ont montré que la minéralisation de la vaterite par les bactéries était un phénomène que l’on retrouvait chez de nombreuses espèces. D’autant que la structure des cristaux de vaterite est non seulement stabilisée par les protéines bactériennes (Rodriguez-Navarro *et al.* 2007), mais aussi favorisée par la présence de certains acides aminés (Xie *et al.* 2005). Ainsi, la formation de vaterite est fortement favorisée par la présence de L-Lysine, un acide aminé présent dans le peptidoglycane de la paroi cellulaire des bactéries à coloration Gram positif comme *B.halodurans*. Toutefois, une étude menée par De Muynck *et al.* (2008) a montré que l’acétate de calcium lui-même influençait la cristallisation des CaCO₃ de sorte à ce que l’on obtienne de la vaterite. Cependant, cette formation importante de vaterite reste

surprenante dans un milieu à pH 12 car à ce pH, la forme majoritaire de CaCO₃ cristallisée de façon abiotique est la calcite, d'après une étude menée par Tai et Chen (1998). C'est d'ailleurs ce que nous avons pu observer dans tous nos milieux témoins, dans lesquels la forme calcite de CaCO₃ est majoritaire à ≈70%. Toutefois la présence de la forme vaterite à hauteur de 30% dans ces milieux montre que des éléments constitutifs du milieu (probablement l'extrait de levure qui contient des acides aminés) ont un rôle stabilisateur pour cette forme cristalline.

Quant au suivi du rendement initial de production par la souche évoluant dans le milieu BN pH 12 préparé avec de l'eau distillée, nous notons que les valeurs augmentent progressivement au cours du temps, tout comme le rendement du procédé (Tableau 4-3). Le rendement du procédé atteint à 3 semaines est alors inférieur à celui obtenu avec la souche évoluant à son pH optimal, sans urée (60,1% ; Tableau 3-5). Le rendement du procédé à 3 semaines en présence d'eau des GBR est similaire à celui que nous avons observé dans le milieu au pH optimal de croissance de la souche (Tableau 3-5).

Tableau 4-3 : rendements initiaux de production de CaCO₃ par *B.halodurans* sur 3 semaines d'incubation dans des milieux BN à pH 12 produits avec de l'eau distillée ou de l'eau des GBR, et le pourcentage qu'ils représentent par rapport au rendement optimal de production attendu (rendement du procédé)

		à 1 semaine	à 2 semaines	à 3 semaines
Milieu sans urée pH 12	rendement (pg/bactérie)	105,2	297,2	435,2
	rendement du procédé (%)	9,4	26,6	39,0
Milieu GBR sans urée pH 12	rendement (pg/bactérie)	-	-	840,7
	rendement du procédé (%)	-	-	63,8

5.3. Conclusion

B.halodurans est une espèce présentant un fort potentiel pour l'amélioration de GBR. En plus de résister à un pH plus élevé que celui de la gamme dans laquelle elle est naturellement capable d'évoluer, *B.halodurans* a conservé sa capacité à produire des carbonates au travers de la voie de l'interconversion du CO₂ en HCO₃⁻, tout en évoluant dans de l'eau de contact des GBR. Enfin, le temps de latence plus long de la souche évoluant dans un milieu en contact des GBR nous montre que les essais de traitement des GBR par cette dernière peuvent être menés sur des durées plus importantes.

6. Traitement des GBR avec *B.halodurans* adaptée à pH 12

Ces traitements des GBR avec *B.halodurans* adaptée à pH 12 ont été développés afin de pouvoir mettre en place un traitement moins coûteux que celui utilisé avec les matrices d'agar et de silice. L'utilisation d'une souche adaptée à un pH proche de celui de GBR nous permet ainsi de réaliser des expériences avec une mise en œuvre simplifiée tout en évitant le problème de l'absence de développement des bactéries non adaptées à un pH très alcalin.

Pour ces essais, les temps d'incubation sont prolongés et atteignent désormais les 6 semaines, puisque nous avons pu voir que la production de CaCO₃ pouvait être améliorée avec des essais de plusieurs semaines (lié à l'effet d'accumulation des CaCO₃ durant la phase stationnaire) et que *B.halodurans* voyait sa phase de latence augmenter de deux semaines lorsque son milieu de culture est à un pH de 12.

Pour commencer les essais de traitement des GBR par *B.halodurans* adaptée à pH 12, nous avons utilisé le protocole d'immersion. Toutefois, nous avons décidé d'utiliser des contenants présentant une surface d'échange avec l'air 7,5 fois plus importante que celle obtenue avec des béchers. Ainsi, le milieu sera mieux oxygéné et le renouvellement du CO₂ sera favorisé dans le milieu. Par ailleurs, afin de favoriser le dépôt des bactéries à la surface des GBR, un prétraitement de ces derniers a été envisagé en utilisant le phénomène de chimiotactisme présent chez les bactéries. Ce phénomène repose sur le principe de gradient chimique dans les milieux et permet aux bactéries capables de se mouvoir de se diriger vers les éléments nutritifs et de s'éloigner des éléments nocifs (Senesi *et al.* 2002; Ford & Harvey 2007).

6.1. Traitements par immersion

Le dépôt non homogène de CaCO₃ à la surface des GBR a été observé lors de l'utilisation de matrice agar et silice. Aussi, il est important de développer un essai permettant de favoriser le dépôt des bactéries sur le matériau. Pour ce faire, le phénomène de chimiotactisme va être employé. Ce phénomène est un moyen pour les bactéries d'étudier l'environnement dans lequel elles évoluent et de s'y mouvoir en conséquence. Nous allons essayer de favoriser l'adhésion des bactéries sur les GBR en les pré-enrobant d'acétate de calcium. Les bactéries vont peut-être venir se fixer au GBR pour consommer l'acétate.

Comme nous voulons favoriser la voie de l'interconversion à pH12 nous allons augmenter la surface d'échange permettant un meilleur renouvellement des gaz (le CO₂ pour la bioprécipitation et l'O₂ pour la croissance bactérienne). Les GBR sont donc traités dans des

bacs au lieu de béciers permettant ainsi d'augmenter la surface d'échange avec l'atmosphère d'un facteur 7,5.

6.1.1. Prétraitement des GBR

Pour tenter de favoriser le dépôt de *B.halodurans* adaptée à pH 12 sur la surface des GBR, nous avons prétraité ces derniers avec une solution saturée d'acétate de calcium.

Comme vu précédemment, la surface totale développée S par 600g de GBR est de 2,4m². Recouvrir cette surface avec 10µm d'acétate de calcium résiduel (soit 10.10⁻⁶m) nécessite un volume V₁₀ de 24 mL. Ce volume de dépôt correspond à une masse m_{acétate de calcium} d'acétate de calcium de :

$$m_{\text{acétate de calcium}} = \rho_{\text{acétate de calcium}} \times V_{10} = 1,5 \times 24 = 36\text{g}$$

Avec :

- m_{acétate de calcium} la masse d'acétate de calcium à utiliser pour enrober 600g de GBR sur une couche de 10µm (g) ;
- ρ_{acétate de calcium} la masse volumique de l'acétate de calcium (1500kg/m³, soit 1,5 g/cm³),

Pour déposer cette masse d'acétate de calcium à la surface des GBR, nous préparons une solution saturée d'acétate de calcium d'un volume minimum V_{min} de :

$$V_{\min} = \frac{m_{\text{acétate de calcium}}}{[\text{acétate de calcium}]_{\max} \times M_{\text{acétate de calcium}}} = \frac{36}{2,2 \times 158} = 0,104 \text{ L} = 104 \text{ mL}$$

Avec :

- V_{min} le volume minimum de la solution saturée en acétate de calcium (L)
- [acétate de calcium]_{max} la concentration maximale d'acétate de calcium dans de 1L d'eau pour avoir une solution saturée (2,2 mol/L) ;
- M_{acétate de calcium} la masse molaire de l'acétate de calcium (158g/mol).

Pour prétraiter les GBR avec de l'acétate de calcium, nous utilisons donc une solution de 100mL d'eau distillée contenant 36g d'acétate de calcium. Le prétraitement est mené sur 6

réplicas de 620g de GBR (600g de GBR secs + 3% de teneur en eau) placés dans des bacs puis les GBR sont laissés à sécher pendant 24h à température ambiante.

6.1.2. Traitement des GBR

A partir d'une culture de *B.halodurans* adaptée remise en culture dans 40mL de milieu BN pH 12, nous inoculons 4 x 100mL de milieu BN pH 12 répartis dans des Erlenmeyer avant de les placer 48h en incubation (30°C, 140rpm). Deux traitements sont produits :

- 1- 4 réplicas de 250mL de « milieu inoculé » constitués de 150mL de milieu BN (pH 12), 100mL de culture bactérienne et 12,5 g d'acétate de calcium.
- 2- 2 réplicas de 250mL de « milieu témoin » contenant 250mL de milieu BN à pH12 et 12,5g d'acétate de calcium.

En se basant sur la courbe de croissance de la souche évoluant à pH 12 dans un milieu BN préparé avec de l'eau distillée (Figure 4-11), on estime que chaque bac contenant du « milieu inoculé » contient à l'état initial environ 10⁸ bactéries/mL. Chaque bac contient également 36g d'acétate de calcium issus du prétraitement des GBR additionnés de 12,5g d'acétate de calcium apportés par le milieu, soit un total de 48,5g d'acétate de calcium. La quantité d'acétate de calcium a été pratiquement quadruplée par rapport au premier essai de traitement pas immersion des GBR (Chapitre 3 : 5.). A l'état initial, nous avons donc un ratio de 2.10¹⁰bactéries/g d'acétate de calcium et 600g de GBR secs.

L'essai (Figure 4-14) est mené sur 6 semaines à 30°C, 98%HR pour limiter l'évaporation du milieu. Chaque jour (sauf le week-end), matin et soir, les traitements sont agités afin d'aérer le milieu et favoriser la diffusion du CO₂.

Après 3 et 6 semaines, 2 bacs de chaque traitement sont préparés pour mesurer le taux d'absorption en eau des GBR. Ainsi les GBR sont séchés une première fois pendant 24h à 110 ± 5 °C. Puis, les GBR sont rincés 3 fois à l'eau et immergés 24h pour pouvoir réaliser la mesure de la masse saturée surface sèche des GBR traités. Puis, les échantillons sont de nouveau séchés à 110°C ± 5°C pour réaliser la mesure de la masse sèche des GBR traités.

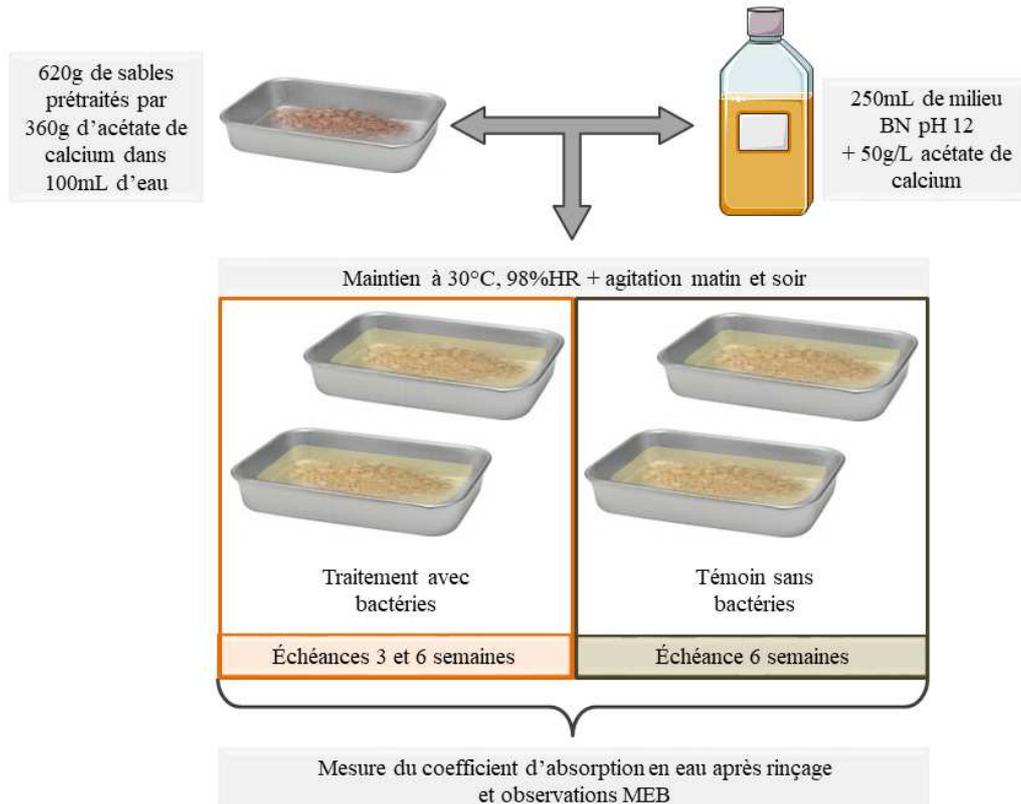


Figure 4-14 : schéma du protocole employé pour le traitement par immersion de GBR prétraités. HR = Humidité Relative.

6.1.3. Résultats des traitements des GBR

Des observations MEB (Figure 4-15) ont été réalisées avant et après rinçage des échantillons, nous permettant de mettre en évidence que le rinçage des GBR permet d'éliminer des dépôts. Ceci justifie a posteriori la nécessité d'un rinçage pour évaluer le taux d'absorption en eau des GBR (Chapitre 4 : 3.2). Ainsi, les GBR traités par le « milieu témoin » et le « milieu inoculé » pendant 6 semaines présentaient chacun des dépôts dont l'épaisseur pouvait atteindre les 160 à 200µm, avant rinçage à l'eau (Figure 4-15 B et C). Après l'étape de rinçage, aucun dépôt n'a été observé à la surface des GBR traités avec le « milieu témoin » tandis que les GBR traités avec le « milieu inoculé » pouvaient encore présenter des dépôts pouvant atteindre une épaisseur de 86µm (Figure 4-15 D et E). On note aussi que la précipitation permet de fixer des dépôts à la surface des grains mais que ceux-ci ne sont pas répartis de façon homogène..

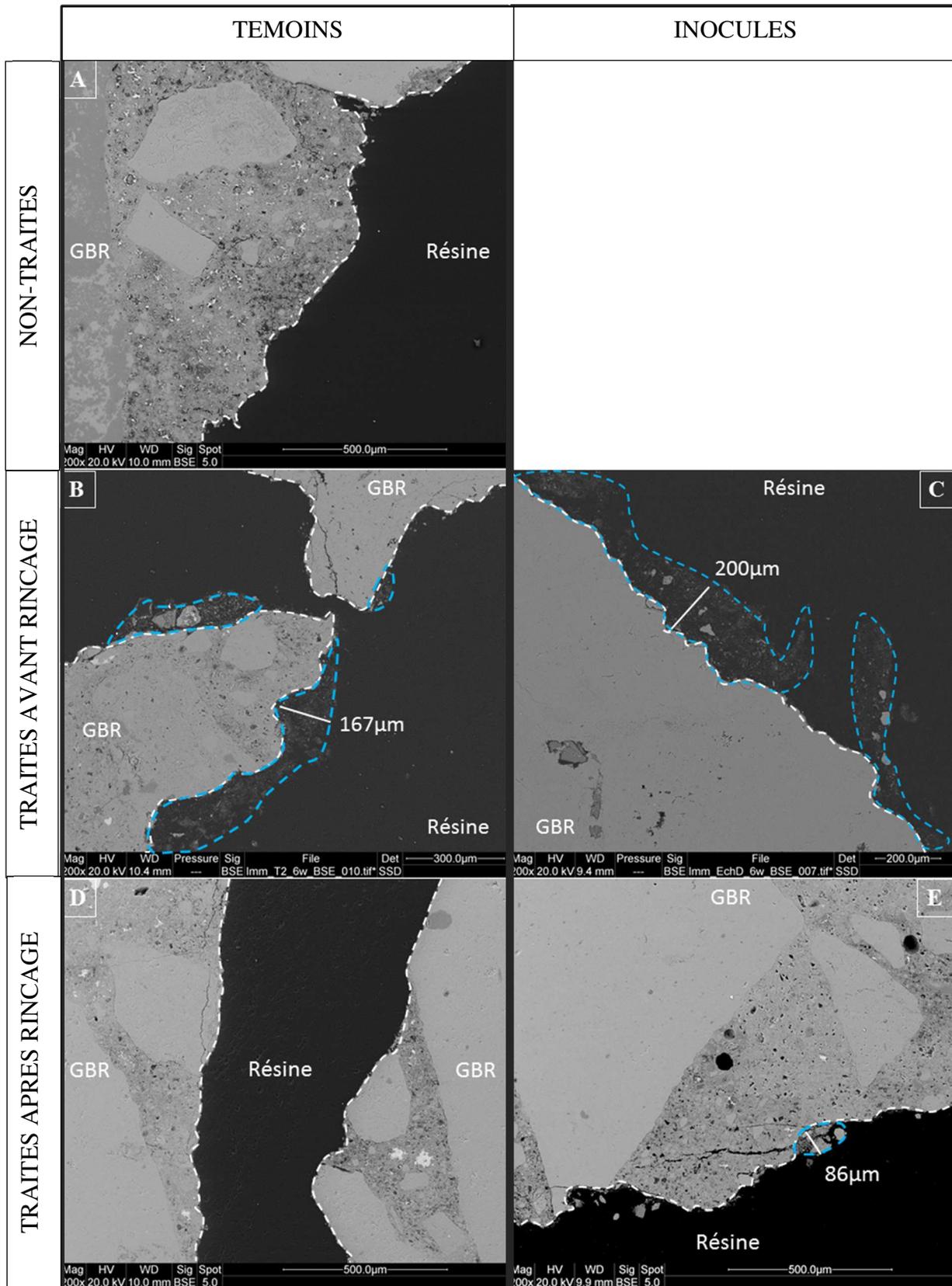


Figure 4-15 : Observations MEB des profils de GBR : non traités (A), traités par immersion pendant 6 semaines dans un « milieu témoin » à pH 12 (B), traités dans un « milieu inoculé » à pH 12 (C) contenant 4.10^8 bactéries/mL et 50g/L d'acétate de calcium, traités par immersion pendant 6 semaines dans un « milieu témoin » à pH 12, puis rincés à l'eau (D), traités dans un « milieu inoculé » à pH 12 contenant 4.10^8 bactéries/mL et 50g/L d'acétate de calcium, puis rincés (E). Les dépôts poreux et non homogènes de matière calcifiée sont cerclés de bleu, les épaisseurs sont notées en blanc et la surface des GBR est délimitée par les pointillés.

En ce qui concerne les mesures des coefficients d'absorption en eau des GBR traités après rinçage à l'eau, elles sont présentées dans la Figure 4-16. Comme pour les essais précédents, les valeurs minimales et maximales mesurées sur les deux échantillons prélevés pour chaque traitement sont présentées sur la Figure 4-16 sous forme de barre d'erreur. A ces valeurs minimales et maximales est ajoutée la marge d'erreur de l'expérimentateur. De plus, le taux d'absorption en eau des GBR avant traitement a été mesuré, car nous avons employé un nouveau lot de matériaux pour cet essai

Les coefficients d'absorption en eau des GBR traités sont inférieurs d'environ 1% à ceux obtenus avant traitement, mais sont similaires à ceux des GBR issus des « milieux témoins ». Les changements de paramètres expérimentaux appliqués pour cet essai (augmentation de la surface d'échange et prétraitement des GBR) ne permettent pas de diminuer le coefficient d'absorption en eau de manière significative entre les GBR témoins et les GBR traités avec bactéries. La production de CaCO₃ ne semble donc pas suffisante pour permettre une diminution du coefficient d'absorption en eau des GBR.

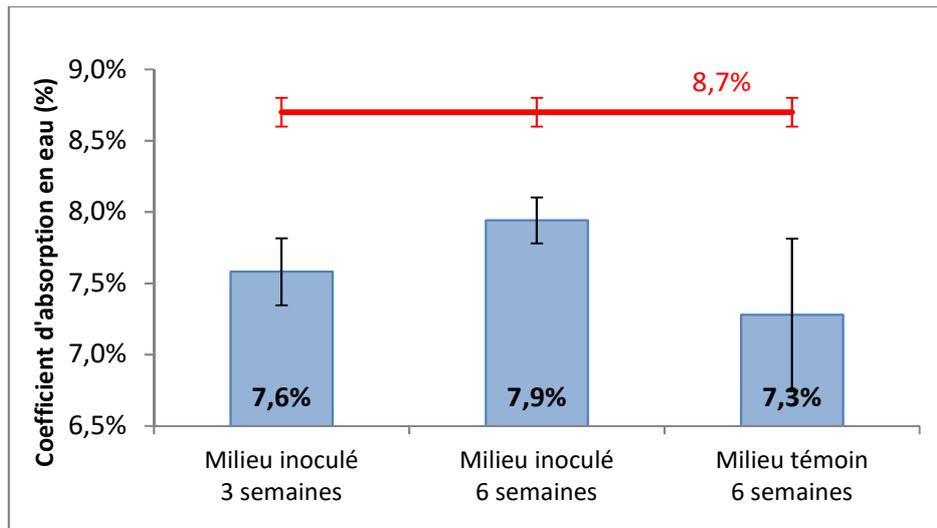


Figure 4-16: Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par immersion après rinçage. Les GBR ont été pré-enrobés d'acétate de calcium avant d'être immergés dans un milieu contenant -ou non- les bactéries (10⁸bactéries/mL) évoluant à pH 12 en présence de 50g/L d'acétate de calcium. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.

Ainsi les résultats obtenus par MEB et en mesurant le coefficient d'absorption en eau des GBR, montrent que le prétraitement et l'augmentation de la surface d'échange ne sont pas suffisamment efficaces pour d'une part, obtenir un dépôt homogène à la surface des GBR, et

d'autre part, diminuer le taux d'absorption en eau des matériaux. Le manque d'efficacité du traitement peut être lié à un apport insuffisant de source de calcium dans le milieu.

6.1.4. Protocole – Augmentation de la teneur en acétate de calcium.

En effet, si nous souhaitons former une gangue de CaCO₃ de 5-10µm à la surface de 600g de GBR, il nous faut apporter un volume de 24mL. Dans l'expérience précédente, nous avons apporté par traitement 48,5g d'acétate de calcium ce qui permet de former une gangue théorique autour des GBR de 4,6µm. Nous avons décidé d'apporter plus d'acétate de calcium, nous passons donc de 48,5g à 85,6g d'acétate de calcium ce qui nous permet de former en théorie une couche homogène à la surface des GBR de 8,6 µm. De plus, le prétraitement des GBR ne sera pas appliqué dans cet essai.

Le même traitement (Figure 4-17) que précédemment est réalisé mais sans prétraitement avec de l'acétate de calcium, c'est-à-dire que 600g de GBR sont directement immergés dans une solution de 250mL de milieu BN contenant 85,6g d'acétate de calcium avec (4.10^8 bactéries/mL) ou sans bactéries adaptées à pH12 âgées de 48h.

L'essai est mené sur 6 semaines à 30°C, 98%HR pour limiter l'évaporation du milieu, avec une échéance supplémentaire à 3 semaines pour les bacs contenant du « milieu inoculé ». Chaque jour (sauf le week-end), matin et soir, les traitements sont agités afin d'aérer le milieu et favoriser le développement des bactéries. Après 3 et 6 semaines, les GBR sont séchés à $110 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 24h puis rincés 3 fois à l'eau avant de mesurer les coefficients d'absorption.

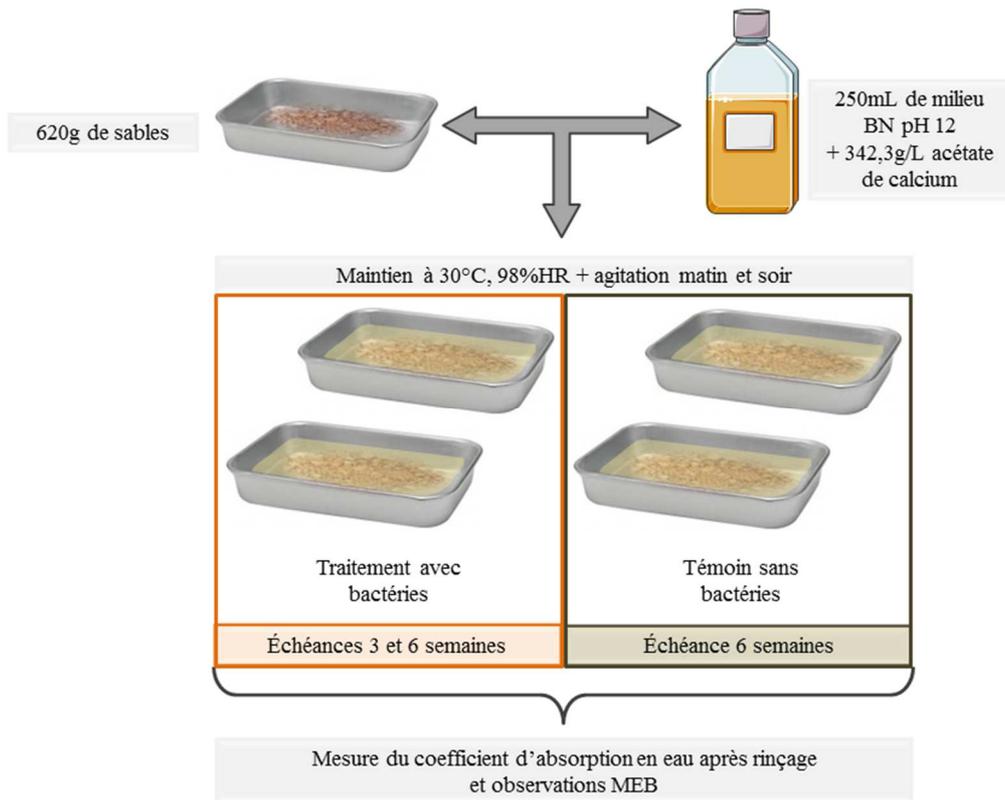


Figure 4-17 : schéma du protocole employé pour le traitement par immersion des GBR avec un milieu contenant 342,3g/L d'acétate de calcium et 4.10⁸bactéries/mL. HR = Humidité Relative.

6.1.5. Résultats de l'augmentation de la teneur en acétate de calcium

Les taux d'absorption en eau mesurés après rinçage montrent une diminution comprise entre 1 et 2% par rapport au GBR non traités. Toutefois, les taux mesurés pour les GBR issus des milieux inoculés à 6 semaines restent similaires aux taux obtenus pour les témoins.

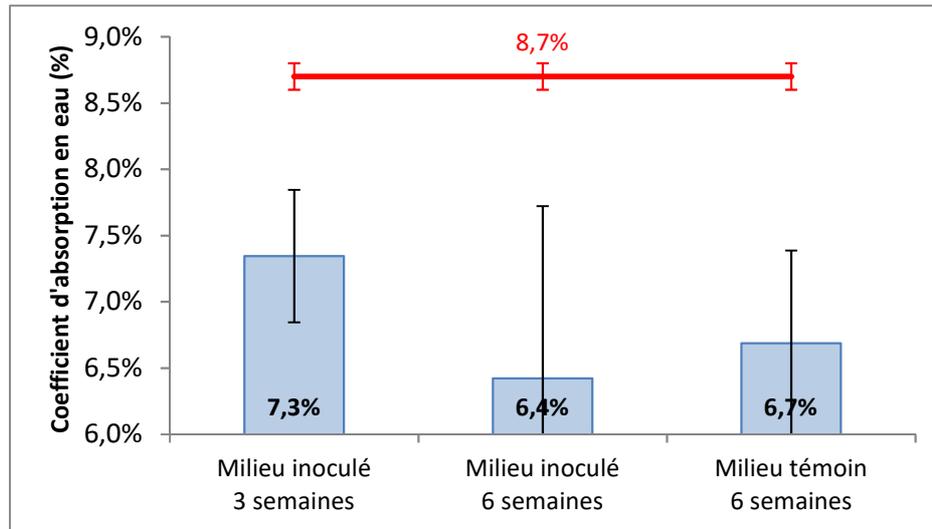


Figure 4-18 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités par immersion, après rinçage à l'eau. Les GBR ont été immergés dans un milieu contenant -ou non- les bactéries (4.10^8 bactéries/mL) évoluant à pH 12 en présence de 342,3g/L d'acétate de calcium (barres mouchetées). Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.

L'observation MEB des profils des GBR traités, après rinçage, montre que le dépôt de CaCO₃ à la surface des matériaux reste irrégulier (Figure 4-19). La faible efficacité du traitement peut s'expliquer par l'irrégularité du dépôt observé à la surface des GBR traités.

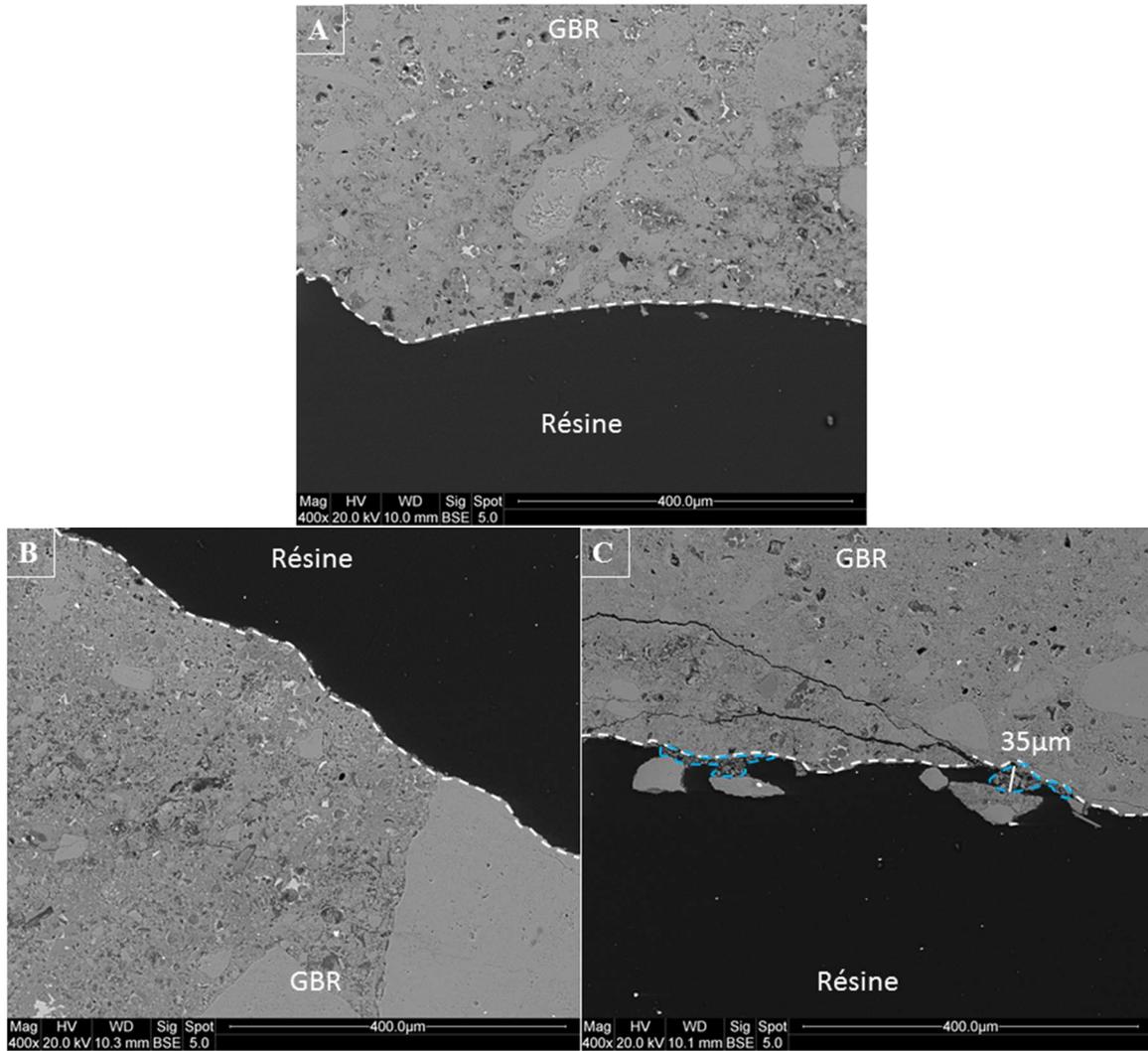


Figure 4-19 : Observations MEB des profils de GBR : non traités (A), traités par immersion pendant 6 semaines dans un « milieu témoin » à pH 12 et rincés (B), traités dans un « milieu inoculé » à pH 12 et rincés (C). Les milieux contenaient $4 \cdot 10^8$ bactéries/mL et 85,6g/L d'acétate de calcium. Les dépôts non homogènes de matière calcifiée sont cerclés de bleu, les épaisseurs sont notées en blanc et la surface des GBR est délimitée par les pointillés.

6.1.6. Conclusions sur les essais d'immersion

Le manque d'homogénéité des dépôts est un problème qui se doit d'être résolu. Nous avons essayé d'attirer les bactéries par chimiotactisme en déposant à la surface des GBR de l'acétate de calcium afin d'obtenir un dépôt plus homogène. Mais, cela s'est avéré inefficace. Il faudrait tester l'impact réel de l'acétate de calcium vis-à-vis de l'attraction des bactéries pour cet élément. De plus, d'autres molécules comme les sucres pourraient être utilisés pour favoriser

le déplacement des bactéries vers les GBR. Toutefois, les sucres ont un effet retard connu sur la prise du béton.

Bien que nous ayons augmenté la quantité d'acétate de calcium disponible pour les bactéries, nous n'avons pas noté de production plus importante de CaCO₃ à la surface des granulats. Le surnageant des traitements contient peut-être une grande quantité de CaCO₃ qu'il faudrait localiser à la surface des GBR.

La technique d'immersion bien que souvent décrite dans la littérature ne semble pas efficace dans le cas des GBR, nous allons donc développer des protocoles par aspersion pour mieux concentrer le traitement sur les GBR.

6.2. Essais par aspersion

Afin d'améliorer la répartition des traitements développés à la surface des GBR, deux protocoles basés sur l'aspersion des milieux sur les matériaux ont été développés. Deux types d'aspersion ont été menés, un premier qui consiste à asperger les GBR au début de l'expérience puis à renouveler une aspersion au bout de 3 semaines. Le deuxième type d'aspersion consiste à renouveler deux fois par semaines les aspersion pendant les 6 semaines de traitement.

Pour ces essais, les GBR ont été de nouveau prétraités afin de favoriser le dépôt des bactéries sur les matériaux. La quantité d'acétate de calcium apportée pour prétraiter les GBR doit être suffisante pour que les GBR soient enrobés d'une couche épaisse de 10µm (soit 36g).

Pour les essais à double aspersion, chaque aspersion est composée de 300mL de milieu BN à pH12 et 102,7g d'acétate de calcium. L'apport de 102,7g d'acétate de calcium nous permet en théorie de former une couche de 10µm à la surface des 600g de GBR. Les aspersion contenant les bactéries contiennent 2,3.10¹¹ bactéries afin de pouvoir convertir l'intégralité des 102,7g d'acétate de calcium. En effet, en 3 semaines, *B.halodurans* a un rendement de production de CaCO₃ de 435,2pg/cellule (Tableau 4-3). Pour consommer les 102,7g de d'acétate de calcium nécessaires à l'enrobage des granulats sur une épaisseur de 10µm, il nous faut apporter une quantité de bactéries (Q_{cellules}) de :

$$Q_{\text{cellules}} = \frac{m_{\text{CaCO}_3}}{\text{rdt}_{\text{ini. 3 semaines}}} = \frac{102,7}{435,2 \cdot 10^{-12}} = 1,4 \cdot 10^{11} \text{ cellules}$$

Avec :

- Q_{cellules} la quantité de bactéries à apporter dans les milieux pour utiliser les 102,7g d'acétate de calcium (cellules).
- m_{CaCO_3} la masse de CaCO₃ formée dans un milieu sans urée (54g) ;
- $\text{rd}_{\text{ini. 3 semaines}}$ le rendement initial de CaCO₃ par *B.halodurans* adaptée à pH 12 après 3 semaines d'incubation (435,2pg/cellule).

Au total le traitement par double aspersion amène $36 + 2 \times 102,7 = 241,4\text{g}$ d'acétate de calcium et au moins $2 \cdot 10^{11}$ bactéries le cas échéant, laissant espérer la production d'une gangue de CaCO₃ de 25 μm d'épaisseur au maximum.

La solution pour l'aspersion multiple ne représente que 100mL de milieu BN à pH12 et 34,2g d'acétate de calcium. On garde ainsi la même concentration en acétate pour la solution pulvérisée. Au total le traitement amène $36 + 12 \times 34,2\text{g} = 446,4\text{g}$ d'acétate de calcium et au moins 10^{12} bactéries le cas échéant, laissant espérer la production d'une gangue de 45 μm d'épaisseur au maximum.

A 3 et 6 semaines, 2 répliques de chaque traitement sont séchées à $110 \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ puis rincés 3 fois avant d'en mesurer le coefficient d'absorption en eau (Figure 4-20).

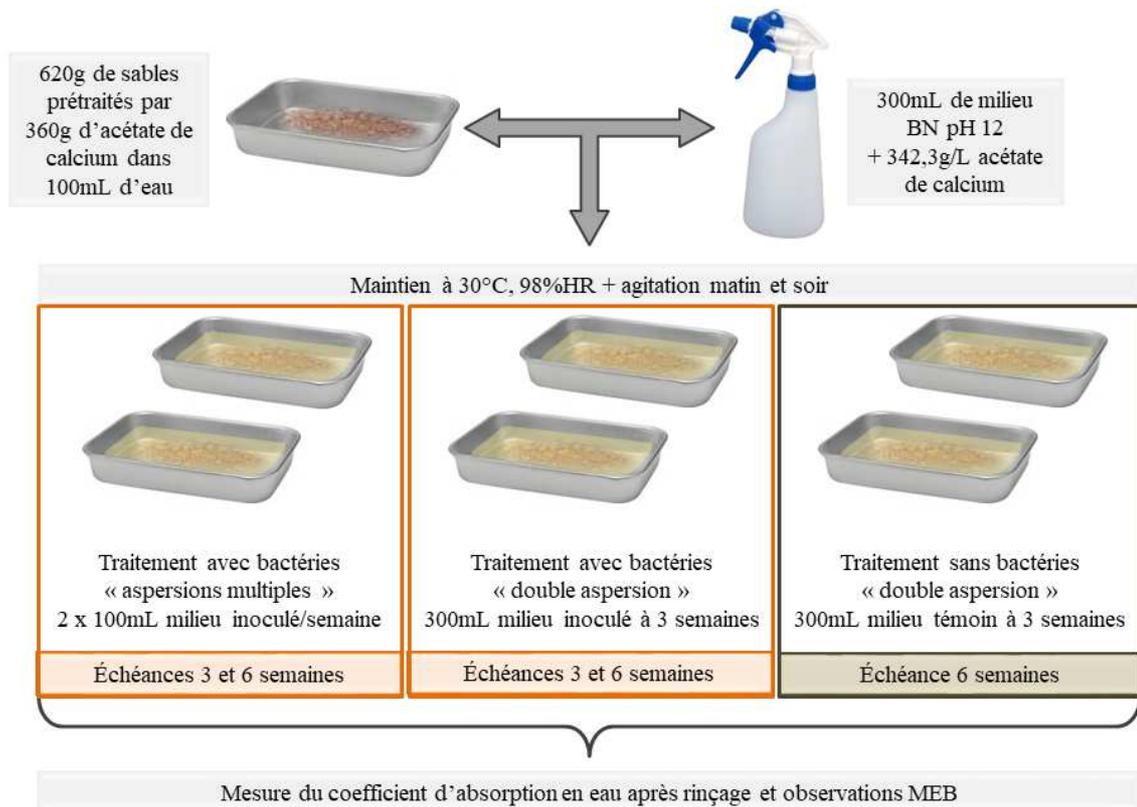


Figure 4-20 : schéma des procédés expérimentaux employés pour les essais par aspersions des GBR prétraités. HR = humidité relative.

6.2.1. Résultats

Les coefficients d'absorption en eau mesurés sont tous similaires à ceux des témoins et légèrement inférieurs à ceux des GBR avant traitement. On en déduit que l'activité bactérienne est peu efficace.

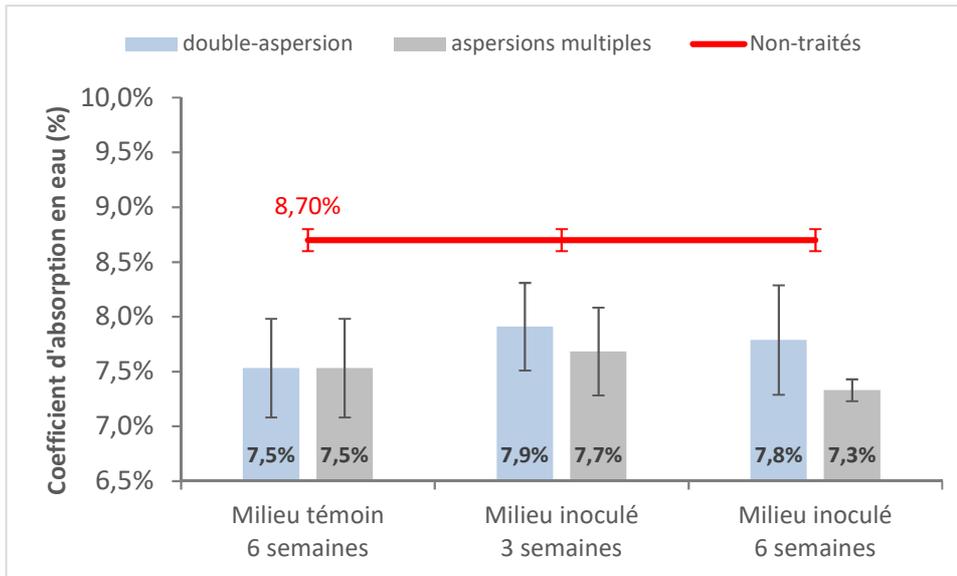


Figure 4-21 : Coefficient d'absorption en eau des GBR traités, par « double aspersion » (barres bleues) et par « aspersion multiples » (barres grises). Les GBR ont été pré-enrobés d'acétate de calcium avant d'être aspergés 2 fois en 6 semaines par un milieu contenant -ou non- les bactéries (4.10^8 bactéries/mL) évoluant à pH 12 en présence de 342,3g/L d'acétate de calcium. Le coefficient d'absorption en eau des GBR avant traitement est marqué en rouge.

Il est important d'indiquer que dans le cas du protocole d'aspersion multiples, un effet d'accumulation du traitement dans le bac s'est produit et une partie des GBR s'est retrouvée immergée. Aussi, les résultats obtenus après 6 semaines de traitement par aspersion multiples correspondent plus à ceux d'un essai d'immersion. D'ailleurs, le coefficient d'absorption en eau des GBR rincés issus du « milieu inoculé » du traitement par immersion (Figure 4-18) est similaire à celui obtenu dans cet essai par aspersion multiples. Il en ressort qu'un essai par aspersion multiples ne devrait pas être réalisé à un taux d'humidité relative de 98%, afin de laisser le traitement s'évaporer suffisamment pour éviter un phénomène d'immersion des matériaux. Toutefois, nous notons que les taux d'absorptions des GBR traités par double-aspersion et aspersion multiples restent proches entre eux, la différence entre les protocoles d'applications n'impacte donc pas les taux d'absorption des GBR traités.

Enfin, les observations MEB des profils des GBR traités et rincés (Figure 4-22) ont montré que les dépôts à la surface ont été éliminés. Des dépôts pouvant atteindre une épaisseur de 52µm ont pu être observés à la surface des GBR traités avec du « milieu inoculé » en utilisant le protocole de double aspersion, mais les surfaces sont surtout similaires à celles des témoins.

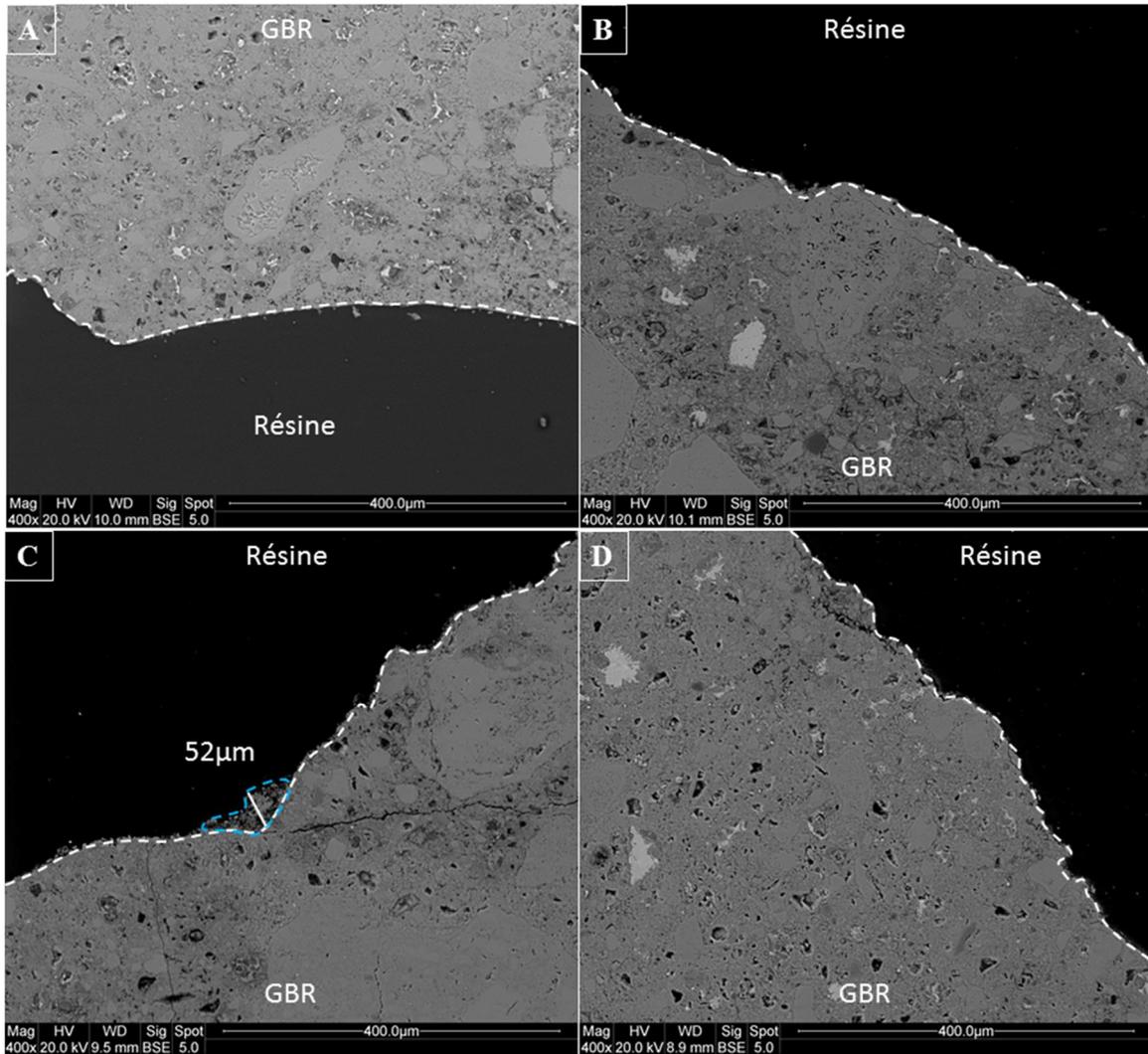


Figure 4-22: Observations MEB des profils de GBR : non traités (A), traités par du « milieu témoin » pendant 6 semaines à pH 12 et rincés (B), traités par le protocole de double-asperion avec un « milieu inoculé » à pH 12 et rincés (C) et traités par le protocole asperions multiples avec un « milieu inoculé » à pH 12 et rincés (D). Les milieux contenaient 4.10⁸bactéries/mL et 342,3g/L d'acétate de calcium. Les dépôts sont cerclés de bleu, les épaisseurs sont notées en blanc et la surface des GBR est délimitée par les pointillés.

Ces protocoles d'asperion n'ont pas permis la formation d'un dépôt stable et homogène à la surface des GBR. L'étude menée par Wang *et al.* (2017) sur l'amélioration de la qualité des GBR a aussi mené à une absence de diminution du taux d'absorption. Dans cette étude, l'équipe a aspergé les GBR avec une culture bactérienne âgée de 24h contenant 3.10⁸ cellules/mL, toutes les 8h, pendant 24h. Pour maintenir l'humidité des matériaux traités, les GBR ont été aspergés 1 fois par une solution contenant de l'urée (0,5M) et du nitrate de calcium (0,5M). Puis, les GBR ont été aspergés par cette même solution toutes les 8h, pendant 3 jours. Les taux d'absorption en eau de ces GBR ont été mesurés avant et après traitement et comparés à des GBR témoins immergés 3 jours dans la solution d'urée et de nitrate de calcium (Figure 4-23).

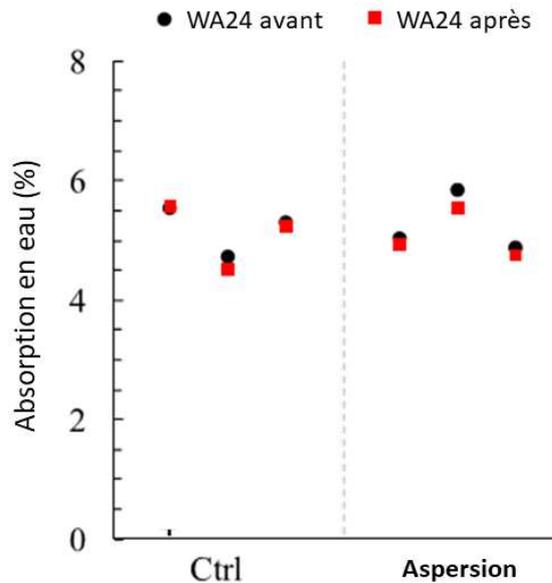


Figure 4-23 : Taux d'absorption en eau de GBR avant (WA24 avant) et après (WA24 après) leurs traitements par aspersion avec du milieu inoculé. Les taux d'absorption obtenues pour l'échantillon témoin immergé 3 jours dans une solution d'urée (0,5M) et de nitrate de calcium (0,5M) sont également présentés (Ctrl). (Wang *et al.* 2017)

L'équipe n'obtient aucune modification du taux d'absorption en eau de leurs GBR traités par aspersion alors que nous atteignons une diminution d'environ 0,7% avec les nôtres. Cette différence peut s'expliquer simplement par le fait que nous renouvelons le traitement régulièrement sur plusieurs semaines alors que leur traitement s'étale sur 3 jours. Il n'en reste pas moins que l'équipe de Wang *et al.* (2017) n'a également pas obtenu de résultat satisfaisant avec le protocole développé pour l'aspersion, ce qui reste cohérent avec notre travail.

6.3. Conclusions

Les essais par immersion et par aspersion des GBR ont montré qu'un dépôt de CaCO₃ pouvait être obtenu. Cependant, ces dépôts sont irréguliers et ne permettent pas d'atteindre une diminution du taux d'absorption des GBR jusqu'à une valeur proche de 2%.

Nous avons pu également noter les erreurs réalisées au cours du développement des protocoles de traitements des GBR et les améliorer au fur et à mesure (quantité d'acétate de calcium à introduire, quantité de bactéries à apporter au milieu). D'ailleurs, des essais ultérieurs –qui ne seront pas réalisés au cours de cette thèse– pourraient être menés en réemployant les protocoles d'aspersions des GBR, mais en laissant les bacs à une humidité relative ambiante,

ou encore en éliminant l'étape de prétraitement ou en utilisant d'autres molécules pour attirer les bactéries à la surface des GBR.

7. Conclusion

Pour améliorer les protocoles de traitement des GBR par les bactéries, nous avons travaillé étape par étape, corrigeant nos erreurs au fur et à mesure. Nous avons ainsi corrigé des erreurs méthodologiques en réalisant des mesures des taux d'absorption des GBR traités après rinçage, séchage et resaturation.

Dans le chapitre précédent, nous nous étions posé la question de la survie des bactéries au voisinage des GBR. Nous avons effectivement constaté dans le présent chapitre que le pH très alcalin des GBR induisait la mortalité des bactéries. Pour pallier cette difficulté, nous avons dans un premier temps cherché à protéger les bactéries dans des matrices synthétiques. Ceci a effectivement permis d'améliorer la survie des bactéries. Par contre, cette solution s'est avérée inefficace pour diminuer l'absorption des GBR. L'explication probable est que la répartition hétérogène des matrices, et le fait que les bactéries ne soient plus en contact direct avec la surface des GBR, n'ont pas permis une accroche homogène des produits de bioprécipitation. En parallèle, pour éviter l'usage des matrices, nous avons réussi à adapter *B.halodurans* à un pH de 12 et maintenir sa production de CaCO₃ en contact de l'eau des GBR.

A la suite, différents protocoles de mise en contact directe de la souche adaptée avec les GBR ont été testés : immersion et aspersion. Nous constatons que ces protocoles nous permettent de fixer des dépôts de bioprécipitation à la surface des GBR. Malheureusement, dans ces essais, les dépôts se répartissent de façon hétérogène, comme l'ont montré les observations au microscope électronique à balayage et les traitements se sont avérés inefficaces à réduire le taux d'absorption en eau des GBR.

A l'issue du travail effectué dans ce chapitre, des travaux restent donc à mener afin de déterminer si la souche bactérienne que nous utilisons est capable de produire une couche à la fois homogène et solide de CaCO₃ à la surface d'un matériau cimentaire. Ces questions sont essentielles à la mise en place d'un traitement efficace des GBR, tel que nous l'envisageons. Afin de simplifier les observations à mener pour répondre à ces questions, nous allons nous intéresser à travailler avec des matériaux cimentaires plans. Des essais d'immersion et d'aspersion seront menés, puisqu'ils restent simples à mettre en œuvre sur chantier. Par ailleurs,

ces derniers devraient être menés à humidité relative ambiante pour éviter une immersion des GBR par le manque d'évaporation du traitement.

Tableau 4-4 : Récapitulatif des essais réalisés sur les GBR, avec *B.halodurans*

Traitement	pH	Quantité d'urée	Quantité d'acétate de calcium	Quantité de bactéries introduites avec 1 traitement	Durée de l'essai	Remarques
<u>Immersion</u>	9,7	5g	12,5g dans 250mL	10 ¹⁰	2 semaines	Aucun impact sur le taux absorption en eau des GBR
<u>Matrice Agar 0,1%</u> <u>Immersion</u> GBR pré-saturés ou non avec du milieu BN (et rinçage)	9,7	5g	3g dans les 60mL de matrice d'agar 0,1%	6.10 ⁹	3 semaines	Dépôt poreux et non homogène Aucun impact sur le taux absorption en eau des GBR
<u>Matrice de Silice</u> <u>Immersion</u> GBR pré-saturés ou non en milieu BN (et rinçage)	9,7	5g	3g dans les 60mL de matrice de silice	6.10 ⁹	3 semaines	Dépôt poreux et non homogène Faible diminution du taux d'absorption en eau quand la voie de dégradation de l'urée est inhibée Taux d'absorption en eau des GBR pré-saturés et traités > taux d'absorption des GBR non traités
<u>Immersion</u> GBR prétraités avec de l'acétate de calcium (et rinçage)	12	0	36g dans les 100mL de prétraitement 12,5g dans 250mL	10 ⁸	6 semaines	Dépôt poreux et non homogène Aucun impact sur le taux absorption en eau des GBR, mais rinçage des GBR traités indispensable pour réaliser des mesures fiables de l'absorption en eau
<u>Immersion</u> (et rinçage)	12	0	85,6g dans 250mL	10 ⁸	6 semaines	Dépôt non homogène Faible diminution du taux d'absorption en eau
<u>Double-Aspersion</u> GBR prétraités avec de l'acétate de calcium (et rinçage)	12	0	36g dans les 100mL de prétraitement 102,7g dans les 300mL de chaque aspersion	1,2.10 ⁸	6 semaines	Dépôt non homogène Faible diminution du taux d'absorption en eau
<u>Aspersion multiple</u> GBR prétraités avec de l'acétate de calcium (et rinçage)	12	0	36g dans les 100mL de prétraitement 34,2g dans les 100mL de chaque aspersion	1,2.10 ⁸	6 semaines	Effet d'immersion des GBR à 6 semaines de traitement Dépôt non homogène Faible diminution du taux d'absorption en eau

8. Bibliographie

- Chen, J., Tinjum, J. & Edil, T. (2013) Leaching of alkaline substances and heavy metals from recycled concrete aggregate used as unbound base course. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, 81–90.
- Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O.M.M. & Livage, J. (2001) Sol–gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes. *Journal of Materials Chemistry*, **11**, 2039–2044.
- Cotter, P.D. & Hill, C. (2003) Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, 429–453.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. & Verstraete, W. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and concrete Research*, **38**, 1005–1014.
- Epstein, W. (2003) The roles and regulation of potassium in bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, pp. 293–320. Academic Press.
- Esquirol, A.-L. (2013) *Contrôle de La Morphologie D'hydrogels Poreux À Partir de Structures Polymères*. École Polytechnique de Montréal.
- Ford, R.M. & Harvey, R.W. (2007) Role of chemotaxis in the transport of bacteria through saturated porous media. *Biological processes in porous media: From the pore scale to the field*, **30**, 1608–1617.
- Greenwood, N.N. & Earnshaw, A. (2012) *Chemistry of the Elements*, 2nd ed. Elsevier.
- Jouenne, T., Tresse, O. & Junter, G.-A. (1994) Agar-entrapped bacteria as an *in vitro* model of biofilms and their susceptibility to antibiotics. *FEMS microbiology letters*, **119**, 237–242.
- Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Rager, M.-N., Bouvet, O.M.M. & Livage, J. (2003) A sol–gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *Journal of Materials Chemistry*, **13**, 203–208.
- Perullini, M., Calcabrini, M., Jobbágy, M. & Bilmes, S.A. (2015) Alginate/porous silica matrices for the encapsulation of living organisms: tunable properties for biosensors, modular bioreactors, and bioremediation devices. *Mesoporous Biomater*, **2**, 3–12.
- Poon, C.-S., Qiao, X.C. & Chan, D. (2006) The cause and influence of self-cementing properties of fine recycled concrete aggregates on the properties of unbound sub-base. *Waste Management*, **26**, 1166–1172.
- Richardson, A.E. & Simpson, R.J. (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*, **156**, 989–996.
- Rodriguez-Navarro, C., Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A., Gonzalez-Muñoz, M.T. & Rodriguez-Gallego, M. (2007) Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 1197–1213.

- Senesi, S., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Wong, A.C.L. & Ghelardi, E. (2002) Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a fliY mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*, **148**, 1785–1794.
- Tam, V.W.Y., Gao, X.F., Tam, C.M. & Ng, K.M. (2009) Physio-chemical reactions in recycle aggregate concrete. *Journal of Hazardous Materials*, **163**, 823–828.
- Wang, J., Vandevyvere, B., Vanhessche, S., Schoon, J., Boon, N. & De Belie, N. (2017) Microbial carbonate precipitation for the improvement of quality of recycled aggregates. *Journal of Cleaner Production*, **156**, 355–366.
- Xie, A.-J., Shen, Y.-H., Zhang, C.-Y., Yuan, Z.-W., Zhu, X.-M. & Yang, Y.-M. (2005) Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems. *Journal of Crystal Growth*, **285**, 436–443.

Chapitre 5 : Amélioration de l'homogénéisation du dépôt de carbonates de calcium sur mortier

1. Introduction

Les travaux menés dans le chapitre précédent ont révélé une difficulté récurrente dans le traitement des matériaux avec *B.halodurans* : la formation d'un dépôt non homogène à la surface des GBR. Il est donc désormais nécessaire de se focaliser sur le développement d'un traitement permettant d'obtenir un dépôt de biocalcification homogène à la surface des matériaux cimentaires. Afin de faciliter notre étude, les protocoles de traitements développés sont appliqués à la surface de mortiers plans. Par ce fait, non seulement l'application des traitements est facilitée, mais également l'observation des dépôts bioprécipités. Ce chapitre a donc pour objectif de présenter les protocoles développés afin d'obtenir la formation d'un dépôt homogène de biocalcification à la surface d'un mortier plan.

2. Mise en place des essais

2.1. Production des mortiers

Pour ce travail, il a été décidé de travailler avec des tranches de cylindres de mortiers. Les mortiers ont été formulés avec un ciment CEMI et du sable normalisé 0/4 (SNL), avec un rapport eau/ciment de 0,45 et sable/ciment de 3. Ces ratios ont été choisis afin d'avoir un faible ressuage du mortier. Ainsi, nous évitons la formation ultérieure de porosités à l'interface granulats-pâte de ciment engendrée par l'accumulation de l'eau dans ces zones. Par ailleurs, en choisissant de conserver un faible ressuage, nous obtenons une cure humide du matériau et nous évitons un dessèchement précoce du mortier (Josserand 2002).

Le protocole de préparation du mortier suit les indications fournies par la norme (NF EN 196-1 2016). Une fois durcies, les éprouvettes (6 cm de diamètre et 14 cm de hauteur) sont démoulées après 48h et immergées pendant 28 jours dans de l'eau. A la fin de ce traitement, elles sont sciées afin d'obtenir des disques de 2 cm de haut et 6 cm de diamètre. Une face de chaque disque est alors polie à l'eau comme décrit ci-après :

- 2 min avec un drap MD Piano 220 (68µm)
- 2 min avec un drap MD Piano 1200 (10µm)

Ce polissage permet d'obtenir une texture suffisamment fine pour réaliser des observations au microscope électronique à balayage mais sans pour autant obtenir une surface

miroir afin de rester dans un état de surface proche des GBR et faciliter l'application des traitements et l'accroche des bactéries.

De plus, afin d'être au plus proche de l'état de surface des GBR, les disques polis sont maintenus à l'air libre pendant 7 jours pour en carbonater naturellement la surface et nous permettre de travailler sur des échantillons plus stables. En effet, cette carbonatation est difficile à éviter lors de manipulation des disques, il semble donc plus raisonnable de la laisser s'installer et de toute façon cela représente bien ce qui va se passer sur les GBR qui seront soumis à l'atmosphère lors de leur concassage initial sur les sites de production. A la fin de cette cure, de l'aluminium autocollant est appliqué sur les disques de sorte à recouvrir la face non polie et les bords, en veillant à laisser l'aluminium dépasser d'un centimètre (Figure 5-1). Les traitements ne seront appliqués que sur la surface polie qui sera positionnée à l'horizontale. Le rebord en aluminium permet de retenir, le cas échéant, le bouillon de culture à la surface des disques. On vise à travers ce protocole à favoriser le dépôt par gravité des bactéries sur la surface du mortier et ainsi produire une couche de CaCO_3 plus homogène que dans les expériences précédentes. De plus, en étanchéifiant les surfaces non traitées avec l'aluminium, seule la surface permet l'échange d'eau avec l'extérieur et donc la mesure d'absorption d'eau permettra bien de mesurer l'impact du traitement.

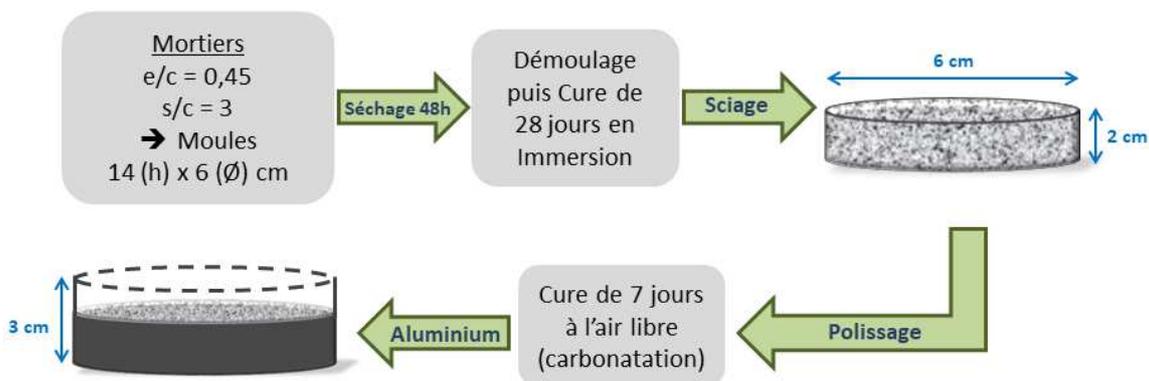


Figure 5-1 : schéma du protocole de préparation des disques de mortiers

2.2. Production et application des traitements des disques

Différents protocoles ont été développés afin d'obtenir un recouvrement homogène de la surface des disques de mortiers par au moins 10µm de CaCO₃ bioprécipités. En se basant sur les essais réalisés précédemment sur les GBR, deux grands types de traitements sont développés pour les disques. Un premier essai consiste à immerger les disques dans le milieu nutritionnel contenant les bactéries afin de comparer ces essais aux essais les plus réalisés dans le cadre des chapitres 3 et 4. Un deuxième type d'essais consiste à appliquer les bactéries et le milieu nutritionnel sur la surface des matériaux puis à stresser de façon hydrique les bactéries afin d'induire la biocarbonatation comme suggéré par Le Métayer-Levrel (1999) à l'origine du brevet de la société Calcite Bioconcept pour la restauration des monuments en pierre. Pour ces derniers essais, différentes méthodes pour déposer les bactéries à la surface des disques ont été évaluées :

- une aspersion du traitement ;
- une aspersion de matrice synthétique d'agar 0,1% contenant le traitement ;
- et un dépôt du traitement au pinceau.

Une fois les traitements effectués les disques sont incubés à 30 ± 1°C sans régulation de l'humidité relative. Les essais sont poursuivis sur six semaines car les expériences précédentes ont montré que la bio-déposition semble se poursuivre au-delà de 3 semaines.

Tous les traitements par immersion et stress hydrique ont été mis en place avec la souche *B.halodurans* adaptée à pH 12 et en suivant la production de CaCO₃ au travers de la voie de l'interconversion. A des fins de comparaisons, tous les traitements sont développés pour avoir les mêmes proportions d'acétate de calcium et de bactéries déposés à la surface des disques.

Ainsi, pour recouvrir de 100µm la surface à traiter des disques, le volume V₁₀₀ de CaCO₃ à former est de :

$$\begin{aligned} V_{100} &= \text{aire}_{\text{surface}} \times h_{\text{dépôt}} = \pi \times r_{\text{disque}}^2 \times h_{\text{dépôt}} = \pi \times (3.10^{-2})^2 \times 100.10^{-6} \\ &= 2,8.10^{-7} \text{ m}^3 \end{aligned}$$

Avec :

- V₁₀₀, le volume de CaCO₃ nécessaire pour recouvrir la surface d'un disque sur 100µm d'épaisseur (m³) ;
- aire_{surface}, l'aire de la surface d'un disque (m²) ;

- $h_{\text{dépôt}}$, la hauteur du dépôt de CaCO₃ à former (m) ;
- r_{disque} , le rayon d'un disque (3cm, soit $3 \cdot 10^{-2}$ m)

En considérant que le volume est constitué uniquement de CaCO₃, nous avons un nombre de moles dans cette couche de 100μm de :

$$n_{100} = \frac{V_{100} \times \rho_{\text{CaCO}_3}}{M(\text{CaCO}_3)} = \frac{2,8 \cdot 10^{-7} \times 2700}{100 \cdot 10^{-3}} = 7,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

Avec:

- n_{100} , le nombre de moles de CaCO₃ formant la couche de 100μm déposée à la surface du disque (mol) ;
- ρ_{CaCO_3} , la masse volumique du CaCO₃ (2700 kg.m⁻³) ;
- $M(\text{CaCO}_3)$, la masse molaire du carbonate de calcium (100 g.mol⁻¹).

A noter que l'on fait ici l'hypothèse forte que la couche de CaCO₃ est suffisamment dense pour présenter une masse volumique typique de la calcite.

Sachant qu'une mole de CaCO₃ est formée à partir d'une mole d'acétate de calcium, on peut en déduire que la quantité d'acétate de calcium à introduire dans le milieu est :

$$m_{\text{acétate de calcium}} = n_{100} \times M(\text{acétate de calcium}) = 7,6 \cdot 10^{-3} \times 158 = 1,2\text{g}$$

Avec :

- $m_{\text{acétate de calcium}}$, masse d'acétate de calcium à introduire dans le traitement pour former une couche de CaCO₃ de 100μm d'épaisseur à la surface d'un disque (g) ;
- n_{100} , le nombre de moles de CaCO₃ formant la couche de 100μm déposée à la surface du disque (mol) ;
- $M(\text{acétate de calcium})$, la masse molaire de l'acétate de calcium (158 g.mol⁻¹)

En supposant que tout le calcium apporté avec l'acétate de calcium réagisse uniquement avec les carbonates produits par la voie de l'interconversion, il faudrait apporter 1,2g d'acétate de calcium dans le traitement pour que la surface d'un disque soit recouverte par une couche de 100μm de CaCO₃.

De plus dans le chapitre 4, nous avons pu mettre en évidence que le rendement initial de production de CaCO₃ par *B.halodurans* est de 435,2 pg/bactéries en 3 semaines (Tableau 4-3). Ainsi il nous faut apporter

$$Q_{\text{cellules}} = \frac{m_{100}}{\text{rdt}_{\text{ini. 3 semaines}}} = \frac{V_{100} \times \rho_{\text{CaCO}_3}}{\text{rdt}_{\text{ini. 3 semaines}}} = \frac{2,8 \cdot 10^{-7} \times 2700 \cdot 10^3}{435,2 \cdot 10^{-12}} = 1,7 \cdot 10^9 \text{bactéries}$$

Avec :

- Q_{cellules} , la quantité de cellules à introduire pour que les 0,12g d'acétate soient consommés pour former une couche de 100µm d'épaisseur de CaCO₃ (bactéries)
- m_{100} , la masse de CaCO₃ que représentent les 10µm d'épaisseur à la surface des mortiers (g)
- ρ_{CaCO_3} , la masse volumique du CaCO₃ (2700 kg.m⁻³) ;
- V_{100} , le volume de CaCO₃ nécessaire pour recouvrir la surface d'un disque sur 100µm d'épaisseur (2,8.10⁻⁷ m³)
- $\text{rdt}_{\text{ini. 3 semaines}}$, le rendement initial de production de CaCO₃ par *B.halodurans* dans BN pH12, à 3 semaines (435,2 pg/bactéries)

Ainsi, en supposant que les bactéries utilisent la totalité de l'acétate de calcium apporté pour bioprécipiter les CaCO₃, il faudrait introduire 1,7.10⁹ cellules bactériennes pour consommer 1,2g de la source de calcium. Nous nous basons sur ce rapport quantité de bactéries/masse d'acétate de calcium pour développer nos protocoles de traitements des disques de mortier.

2.2.1. Préparation des pré-cultures bactériennes pour chaque traitement

En se basant sur la courbe de croissance de *B.halodurans* évoluant à pH 12, obtenue avec l'essai présenté sur la Figure 4-12, il est déterminé qu'après 48h de croissance, la souche atteint une concentration de 3.10⁷ cellules/mL après une dilution au 10^{ème}.

Les protocoles expérimentaux développés pour les traitements par aspersion de milieu avec ou sans agar, détaillés par la suite, nous ont mené à réévaluer légèrement la quantité de bactéries à introduire pour les 1,2g d'acétate de calcium apportés, à savoir : 2,6.10⁹ bactéries.

Ainsi, pour maintenir ce ratio quantité de bactéries/masse d'acétate de calcium à apporter, il faut :

- 1L de pré-culture âgée de 48h nécessaire pour le traitement d'un disque avec les deux protocoles d'aspersion du traitement avec ou sans agar.
- 650mL de pré-culture âgée de 48h nécessaires pour le traitement d'un disque avec les protocoles d'étalement et d'immersion.

Le travail de préparation des cultures bactériennes est réalisé en conditions stériles et suit le procédé détaillé dans la Figure 5-2, après une remise en culture de *B.halodurans* dans des tubes Falcon® contenant 8mL de milieu BN pH12.

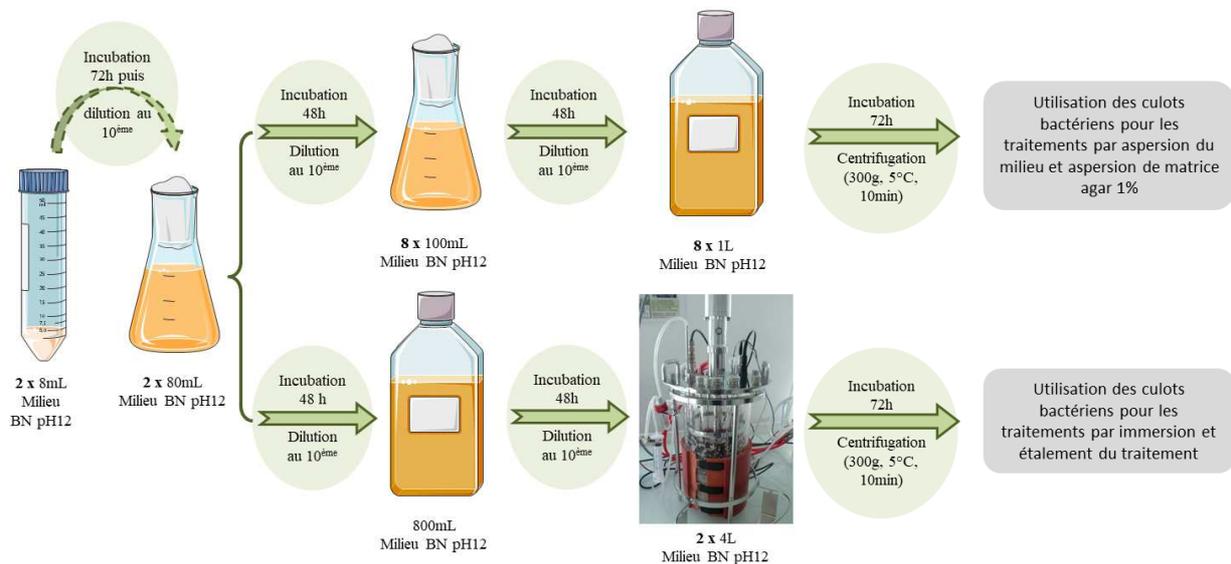


Figure 5-2: protocole de préparation des pré-cultures de *B.halodurans* pH12

2.2.2. Protocole d'immersion des disques

Pour ce traitement, 6 disques sont utilisés : 2 disques servent de témoins de l'activité bactérienne, 4 disques sont traités avec les bactéries. Les disques sont placés dans des béciers identiques, choisis pour qu'il y ait très peu d'espace entre les côtés des disques et la paroi de verre. Ainsi, le traitement est principalement réparti sur la surface exposée (Figure 5-3).

Nous avons visé une épaisseur de recouvrement par le milieu d'environ 1 cm afin de s'assurer que les disques seront toujours recouverts, tout en ayant une épaisseur de milieu

suffisamment fine pour assurer une bonne diffusion du CO₂ atmosphérique. Le calcul suivant nous montre que cela correspond à environ 40 ml de milieu par bécher.

$$\begin{aligned} V_{\text{imm.}} &= V_{\text{trait.+disque}} - V_{\text{disques}} = \pi \times r_{\text{bécher}}^2 \times h_{\text{trait.+disque}} - \pi \times r_{\text{disque}}^2 \times h_{\text{disque}} \\ &= \pi \times 3,25^2 \times 3 - \pi \times 3^2 \times 2 = 43 \text{ cm}^3 \end{aligned}$$

Avec :

- $V_{\text{imm.}}$, le volume de traitement à utiliser pour immerger les disques sous 1 cm de liquide (cm³) ;
- $V_{\text{trait.+disque}}$, le volume correspondant au disque immergé sous 1 cm de traitement, dans le bécher utilisé (cm³) ;
- V_{disque} , le volume d'un disque de mortier (cm³) ;
- $r_{\text{bécher}}$, le rayon d'un bécher utilisé pour le traitement par immersion (3,25cm) ;
- $h_{\text{trait.+disque}}$, la hauteur comprenant le disque et la couche de traitement sous laquelle il est immergé (3cm) ;
- r_{disque} , le rayon d'un disque de mortier (3cm) ;
- $h_{\text{trait.+disque}}$, la hauteur d'un disque (2cm)

Afin de maintenir le ratio quantité de bactéries/acétate de calcium à introduire pour chaque traitement, les 40mL de milieu BN pH12 contiennent $7,8 \cdot 10^9$ cellules bactériennes et 3,6 g d'acétate de calcium. Ces quantités permettent au maximum le dépôt d'une couche de 300µm de CaCO₃ d'après le calcul précédent.



Figure 5-3 : photo d'un disque de mortier (cerclé de jaune) dans un bécher (paroi intérieure cerclée de bleu)

Une fois les disques placés dans les béchers, chaque traitement de 40mL y est versé. Pour les disques témoins, 40mL de milieu BN pH12 sans bactéries mais additionnés de 3,6g

d'acétate de calcium sont versés. Tous les béchers sont ensuite maintenus à 30°C, 90% HR pour empêcher l'évaporation du traitement. Cet essai devrait permettre de mieux comprendre les résultats obtenus avec les essais d'immersion des GBR dans les traitements (Figure 5-4).

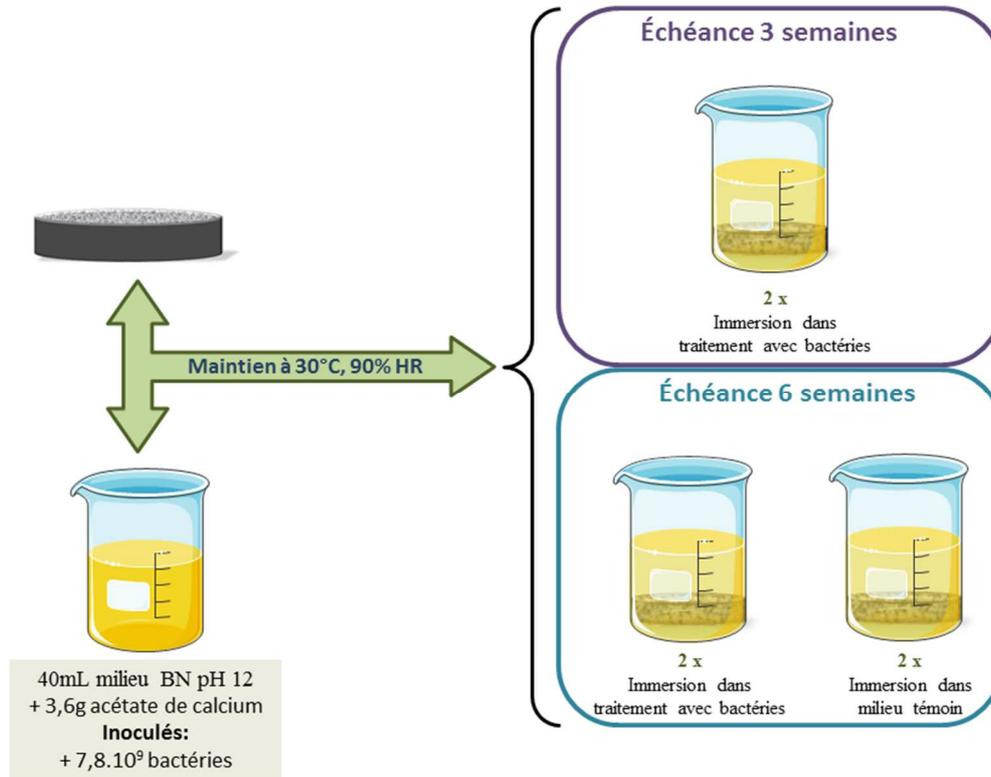


Figure 5-4 : protocole schématisé du traitement par immersion des disques dans le milieu

2.2.3. Protocoles de stress hydrique

2.2.3.1. Aspersions du traitement avec ou sans agar

Pour chaque traitement, 6 disques sont utilisés : 4 disques sont traités avec des bactéries et 2 disques sont traités sans bactéries afin de voir l'impact du milieu de culture sur les disques. Des essais préliminaires ont montré qu'avec le pulvérisateur à notre disposition, chaque aspersion représente un volume de 3 ml.

Ainsi, le traitement des disques avec des bactéries suit le protocole suivant :

1. asperger de façon homogène 3 fois la surface du disque avec 3mL de milieu BN pH 12. Chaque dépôt amène 2,6.10⁹ cellules bactériennes et, 1,2 g d'acétate de calcium et enfin, le cas échéant, 0,003 mg d'agar pour la production de matrice synthétique.

2. laisser sécher la préparation entre chaque aspersion afin de stresser les bactéries et les mener à former des CaCO₃ ;
3. renouveler l'aspersion toutes les 24h pendant 4 jours, sans ajout de bactéries. Ceci a pour objectif de raviver les cultures entre les périodes de stress.

Les disques traités sont maintenus à l'air libre et à 30°C pour faciliter la croissance bactérienne et le séchage entre chaque aspersion. Le même procédé est employé pour traiter les disques témoins, mais sans ajout de cellules bactériennes dans les traitements (Figure 5-5). Les disques traités sont incubés pendant 6 semaines.

L'ensemble des aspersion devrait permettre de bio-déposer au maximum une couche de 700 µm de CaCO₃.

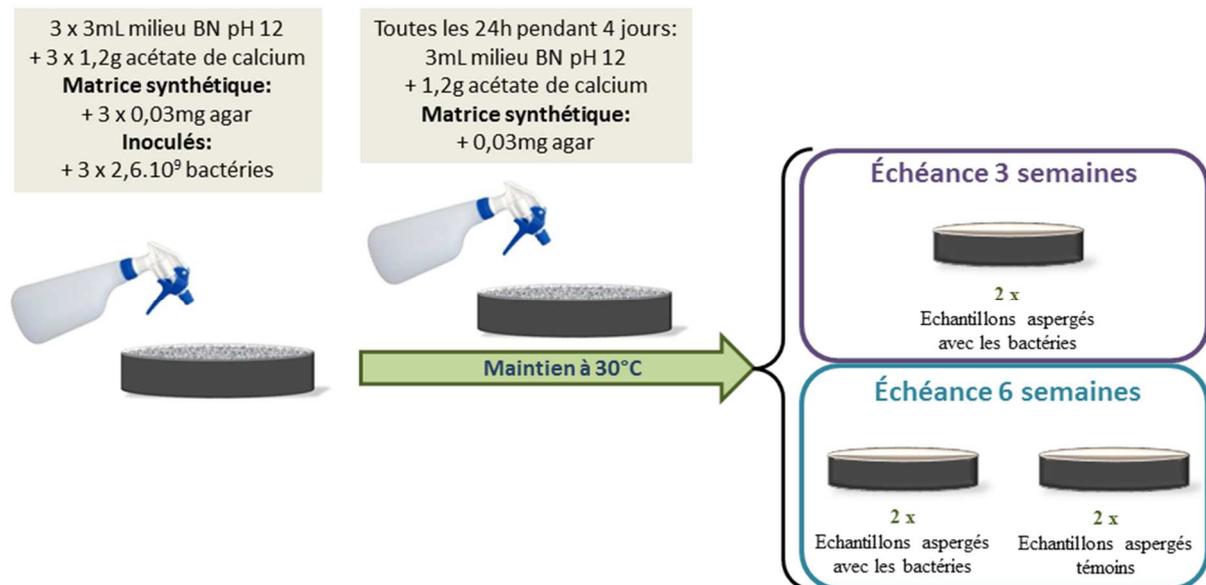


Figure 5-5 : protocole schématisé des traitements par aspersion du milieu et aspersion de matrice synthétique d'agar 0,1% contenant le milieu

2.2.3.2. Détermination des quantités nécessaires pour le protocole d'étalement du traitement à la surface des disques

Pour ce traitement, 6 disques sont utilisés : 2 disques servent de témoins de l'impact du milieu sur les disques, 4 disques sont traités avec les bactéries. Le travail commence par la présaturation du pinceau avec un culot bactérien. Cette étape permet d'avoir une quantité constante de bactéries étalées à la surface des disques traités. L'intérêt attendu de l'utilisation d'un pinceau est d'obtenir un meilleur ancrage initial des bactéries à la surface du mortier grâce à l'action mécanique des poils. Pour cet essai les suspensions bactériennes ont été centrifugées

(3000g, 10min, 5°C) et le culot récupéré devait être mélangé directement avec l'acétate de calcium pour être appliqué avec le pinceau.

Afin d'étaler les mêmes quantités de bactéries et d'acétate de calcium que celles pulvérisées au premier jour de traitement par aspersion, il était prévu d'étaler en une fois les 3 x 2,6.10⁹ bactéries, soit 7,8.10⁹ bactéries, mélangées à 3 x 1,2 g d'acétate de calcium, soit 3,6 g. Or, il s'est avéré impossible de diluer l'ensemble des 3,6g d'acétate de calcium dans le culot bactérien et seuls 1,2g ont été dilués avant que la préparation ne soit répartie de façon homogène à la surface du disque. Les 2,4g manquants seront ajoutés par aspersion comme expliqué plus loin.

Pour les disques témoins, un volume d'eau distillée équivalent à celui des bactéries (3mL) est appliqué à la surface des disques et 1,2g d'acétate de calcium sont étalés à la surface avec un pinceau pré-saturé avec la même solution que celle appliquée sur le disque.

Les disques traités sont ensuite aspergés 6 fois par jour pendant 4 jours avec 3mL de milieu BN à pH 12 additionnés de 1,2g d'acétate de calcium. Dans cet essai, le nombre d'aspersions est plus important afin de compenser la quantité d'acétate de calcium qui n'a pas pu être étalée initialement (Figure 5-6). Les disques sont maintenus à 30°C pendant 6 semaines pour faciliter la croissance bactérienne et l'assèchement des surfaces traitées.

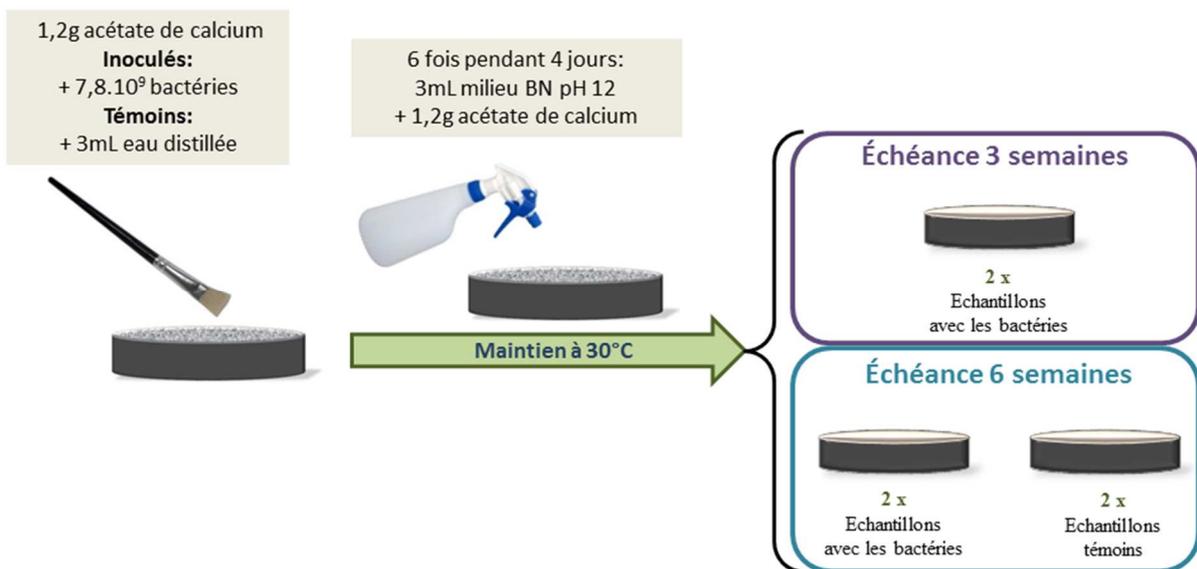


Figure 5-6 : protocole schématisé du traitement par étalement du milieu

L'ensemble du protocole devrait permettre de bio-déposer au maximum une couche de 700 µm de CaCO₃.

2.3. Analyses menées

2.3.1. Rinçage des disques et analyse de l'eau de rinçage

A chaque échéance, les disques sont rincés à l'eau distillée afin d'éliminer tout élément n'adhérant pas à la surface des disques. L'eau de rinçage est récupérée puis maintenue à 30°C jusqu'à évaporation totale. La matière en fin séchage est pesée et est ensuite analysée par ATG pour connaître la quantité de CaCO₃ qui pourrait avoir été rincée. Une analyse DRX est également menée afin de connaître la nature des CaCO₃ potentiellement rincés.

2.3.2. Mesure de l'absorption en eau des disques et observations MEB

Une fois les disques rincés, ils sont maintenus à 60°C pendant 2 semaines jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Puis les échantillons sont métallisés et analysés au MEB pour observer le dépôt en surface. Une fois les observations terminées, les disques sont pesés pour obtenir la valeur de leur masse sèche (m_s). Les disques sont ensuite immergés dans de l'eau pendant 48h et la valeur de la masse saturée surface sèche (m_{sss}) est déterminée. Pour cela, la surface traitée de chaque disque est essuyée avec un essuie-tout jusqu'à ce qu'elle devienne mate, puis l'échantillon est pesé. Les valeurs des deux masses sont ensuite comparées comme suit, afin d'obtenir le pourcentage d'absorption des disques :

$$\text{absorption (\%)} = \frac{m_{sss} - m_s}{m_s} \times 100$$

Nous avons vérifié que la métallisation ne modifiait pas le taux d'absorption, ce qui nous a permis de faire des absorptions au MEB de façon préliminaire. Les valeurs obtenues sont comparées à celle mesurée pour des disques non traités (5%). Une fois les pourcentages d'absorption en eau des disques obtenus, ces derniers sont séchés de nouveau à 60°C pendant 2 semaines puis coupés en deux. Une nouvelle observation des échantillons, de profil cette fois ci, est alors réalisée pour déterminer l'épaisseur du dépôt et analyser son homogénéité.

3. Résultats et discussion

Une observation visuelle des essais menés par immersion des disques a révélé une contamination entre 3 et 6 semaines de traitements, par des microchampignons. Ceux-ci sont probablement issus de l'air ambiant, on peut donc penser à une contamination par *Aspergillus sp.* Ces microorganismes ont recouvert la surface des milieux liquides (Figure 5-7), empêchant tout échange gazeux entre le traitement et le milieu extérieur. La présence de ces microchampignons peut avoir mené à un déséquilibre du ratio établi en début de traitement, par la consommation des éléments nutritifs présents dans le milieu. Cependant, ces microchampignons peuvent avoir mené à la production de CaCO₃, comme il a déjà pu être constaté dans des travaux menés par Monger *et al.* (1991) ou encore Bindschedler *et al.* (2016). En effet, ces deux études s'accordent sur le fait que les microchampignons peuvent biominéraliser des CaCO₃, et dans les cas présentés, sous forme de calcite. Cependant, l'étude la plus récente montre que le mécanisme de biocarbonatation liée aux microchampignons reste inconnu, car peu étudiée.

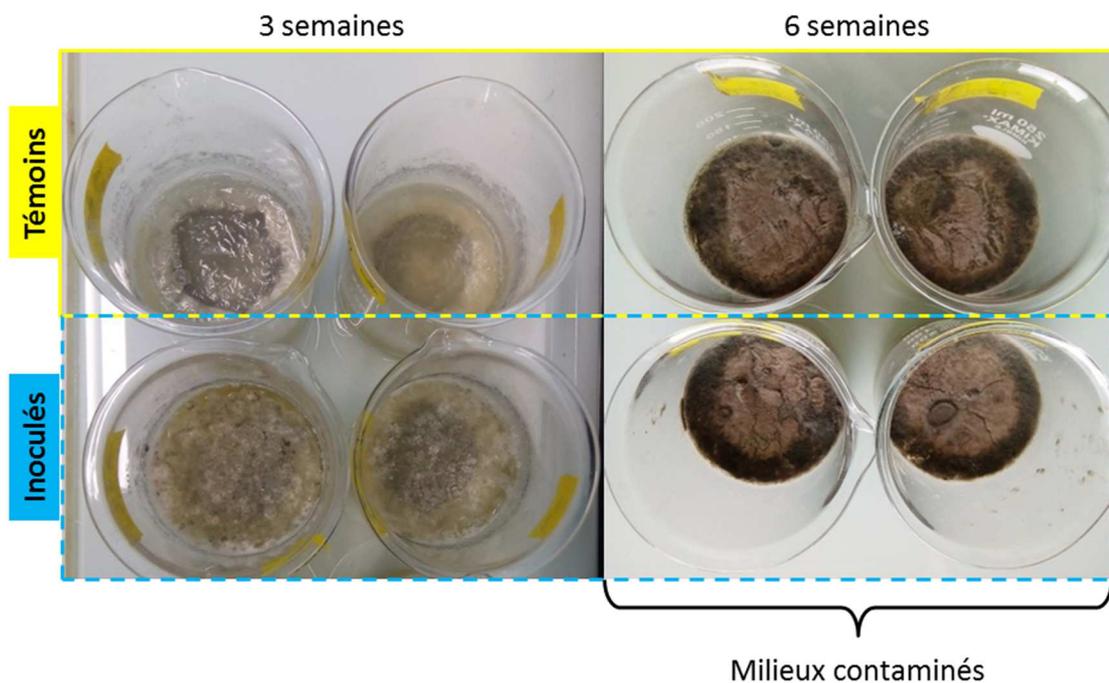


Figure 5-7 : évolution des disques traités par immersion, au cours du temps.

Une observation visuelle des disques traités (Annexe D) par aspersion du milieu, aspersion de matrice synthétique (agar 0,1%) et étalement, permet de constater qu'une fois les

traitements appliqués, l'état de surface reste inchangé. De plus, aucune contamination par des micro-organismes n'a été observée sur ces échantillons.

En réalisant les rinçages en fin d'échéances (Figure 5-8), il a été noté que les dépôts observés sur les traitements par aspersion et par étalement du milieu se dissolvaient systématiquement, même sur les échantillons témoins. Mais, en ce qui concerne les disques traités par la matrice synthétique d'agar 0,1%, le dépôt persistait sur les échantillons traités avec des bactéries, et s'éliminait sur les disques témoins. On peut supposer que la présence des bactéries a permis de favoriser l'adhésion de la matrice à la surface des matériaux. Cependant, après séchage des disques à 60°C pendant 2 semaines, il a été observé une déstructuration du dépôt. Ainsi, plutôt que d'être stabilisé par les bactéries, ce serait plutôt l'humidité piégée dans la structure qui aurait permis à cette dernière de maintenir son adhésion au support durant le rinçage. Puisque ce dépôt n'adhère pas à la surface, il a été éliminé pour pouvoir réaliser les observations des échantillons au MEB.

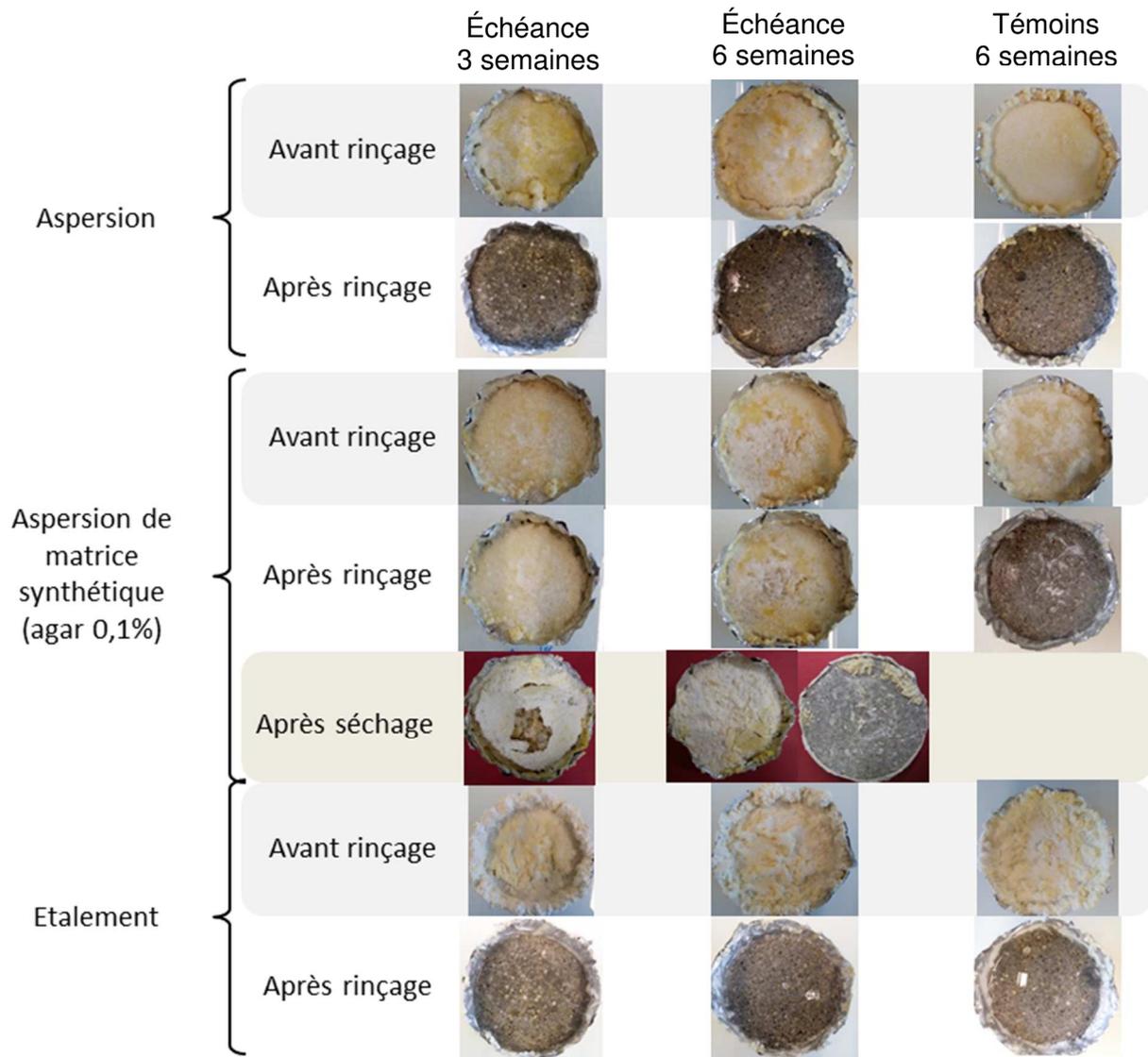


Figure 5-8 : Etats de surface des disques traités, à chaque échéance, avant et après rinçage des surfaces à l'eau distillée

En observant les surfaces des disques au MEB, il est possible de constater un dépôt non homogène de matière sur toutes les surfaces traitées. Par ailleurs, aucun de ces dépôts ne ressemble à la surface carbonatée d'un disque non traité.

En observant les surfaces des échantillons traités par immersion, on note la présence d'hyphes de microchampignons sur la surface des échantillons témoins (Figure 5-9 C). En observant les surfaces des échantillons immergés dans des milieux contenant des bactéries, il a été noté la présence de cristaux creux en forme de polygone, ainsi que d'amas éparpillés de formes « globulaires » à la surface des matériaux, après 3 semaines d'incubation (Figure 5-9 D et E). Ces derniers cristaux étaient toutefois plus nombreux sur les échantillons immergés pendant 6 semaines (Figure 5-9 F). Ces amas « globulaires » observés sont tous similaires et

sont formés de sphères imbriquées les unes dans les autres. Il est impossible de déterminer si ces formations sont uniquement liées à l'activité des bactéries au vu de la contamination des témoins.

Toutefois, les observations à 3 semaines permettent de comprendre que par cette répartition hétérogène des dépôts, laissant à nu une grande surface des disques, ces traitements par immersion ne permettent pas d'obtenir un recouvrement homogène des matériaux. Ces observations sont à recouper avec la faible efficacité des traitements par immersions des GBR pour diminuer leur pourcentage d'absorption en eau. Dans un traitement par immersion, les souches bactériennes ne semblent pas réaliser la biocarbonatation à la surface des matériaux, mais plutôt dans le milieu liquide. A noter en plus qu'une croûte d'acétate de calcium s'est formée à la surface des préparations (Figure 5-7) et que cela a pu gêner les échanges gazeux.

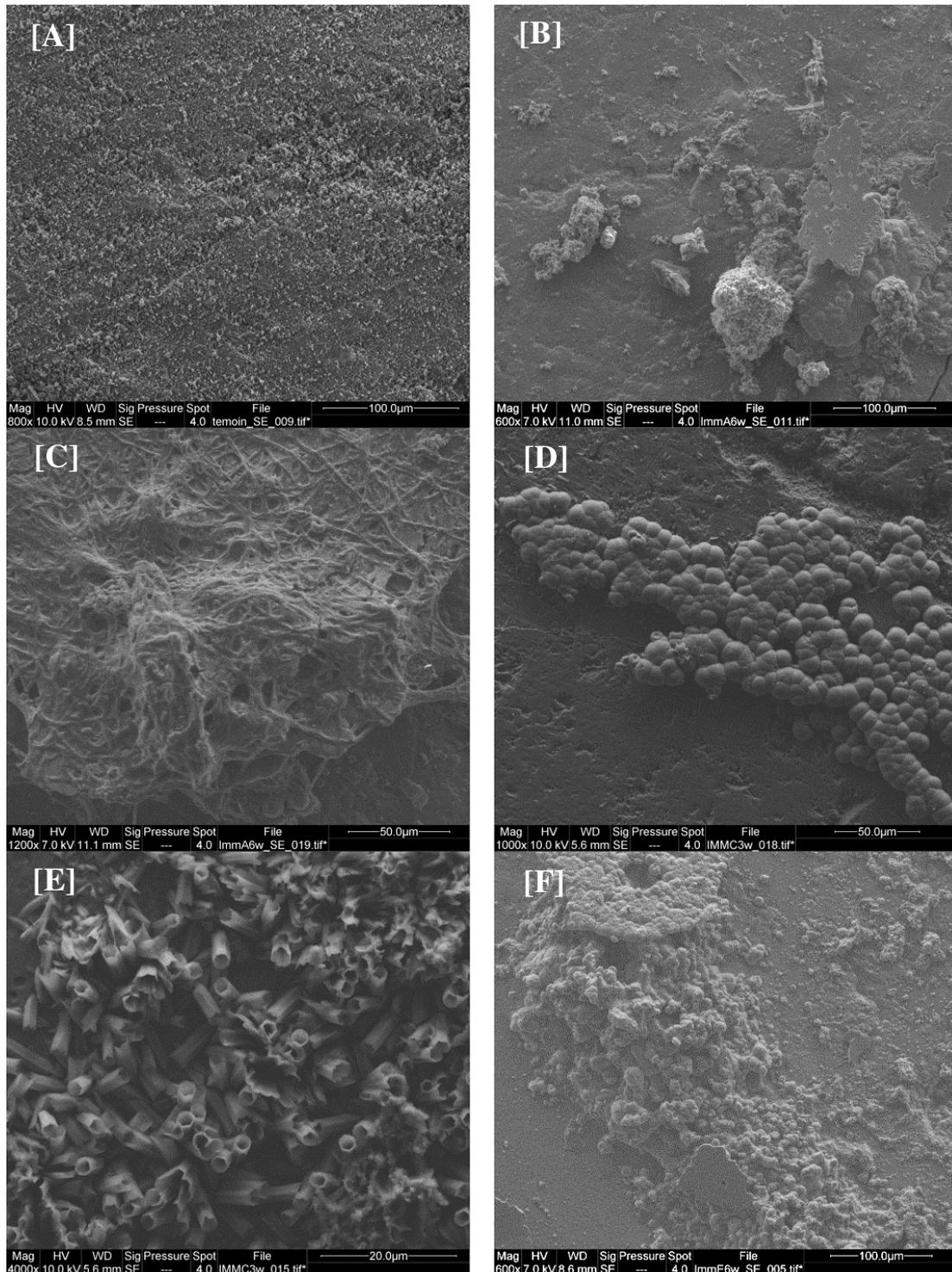


Figure 5-9 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par immersion (B et C), des disques traités 3 semaines par immersion avec des bactéries (D et E), des disques traités 6 semaines par immersion avec des bactéries (F).

Une étude menée par De Muynck *et al.* (2008b) sur l'amélioration de la durabilité de matériaux cimentaire en utilisant la bioprécipitation des CaCO_3 au travers de la voie de l'urée a obtenu des résultats similaires. Pour cette étude, l'équipe a utilisé des cubes (10mm de côté)

de mortier produit avec du CEMI. Le traitement employé est composé d'un milieu nutritionnel (3g/L BN, 2,12g/L de NaHCO₃, 10g/L de chlorure d'ammonium et 10g/L d'urée) contenant de l'acétate de calcium à une concentration de 26g/L.

Pour le traitement, De Muynck *et al.* (2008b) ont immergé pendant 24h les cubes de mortier dans un bouillon bactérien de *B.sphaericus* à une concentration de 10⁷ bactéries/mL, en veillant à les recouvrir avec 10mm de liquide. Puis, les cubes ont été séchés à l'aide d'un essuie-tout et immergés dans le traitement pendant 3 jours avant d'être séchés pendant 1 semaine à température ambiante. L'équipe a alors observé la surface des cubes traités au MEB et les a comparées à celles d'échantillons non traités après les avoir métallisés à l'or (Figure 5-10).

De Muynck *et al.* (2008b) ont ainsi pu observer les mêmes cristaux « globulaires » que nous obtenons à la surface des disques incubés 3 semaines au contact des bactéries. Mais l'article ne fait pas référence à des cristaux polygonaux et creux, dont l'origine et la nature nous sont inconnues (Figure 5-9E). Il semble cependant que la répartition de leur dépôt soit également hétérogène, puisque sur certaines zones de l'échantillon traité, nous observons un état de surface similaire à celui de l'échantillon non traité. Il semble que la répartition hétérogène de la bioprécipitation formée sur un matériau cimentaire traité par immersion subsiste, que le matériau soit plan ou non.

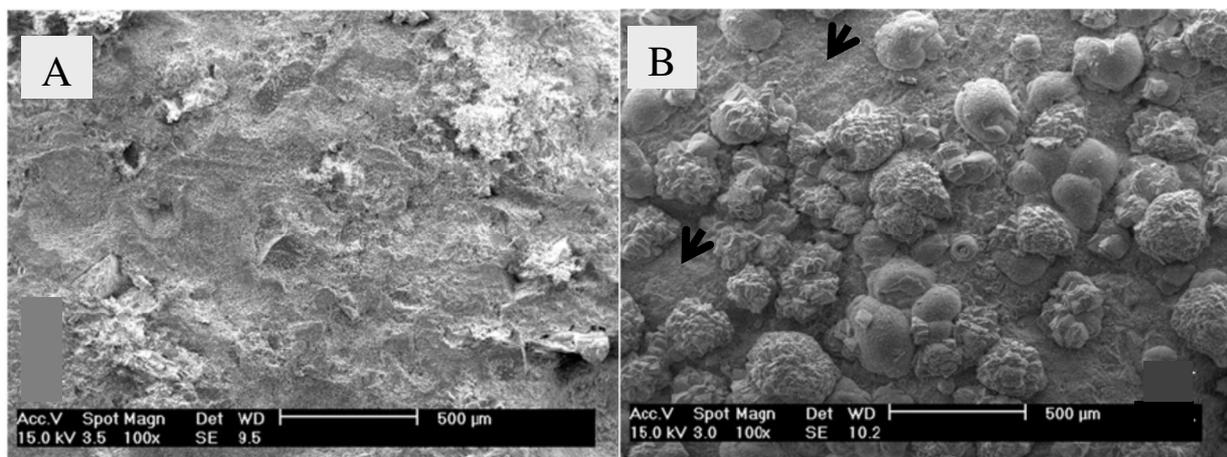


Figure 5-10 : photos MEB des surfaces des échantillons non traités (A) et des échantillons traités par immersion dans le bouillon bactérien de *B.sphaericus* (10⁷ bactéries/mL) avant séchage et immersion dans le milieu contenant la source de calcium (26g/L) pendant 3 jours (B). Les flèches noires désignent les zones sur lesquelles aucun dépôt n'est observé. (d'après De Muynck *et al.* (2008b))

En observant les surfaces des échantillons issus du traitement par aspersion, on note que malgré la dissolution du dépôt pendant le rinçage, une couche de matière s'est maintenue à la surface des échantillons, à chaque échéance (Figure 5-11).

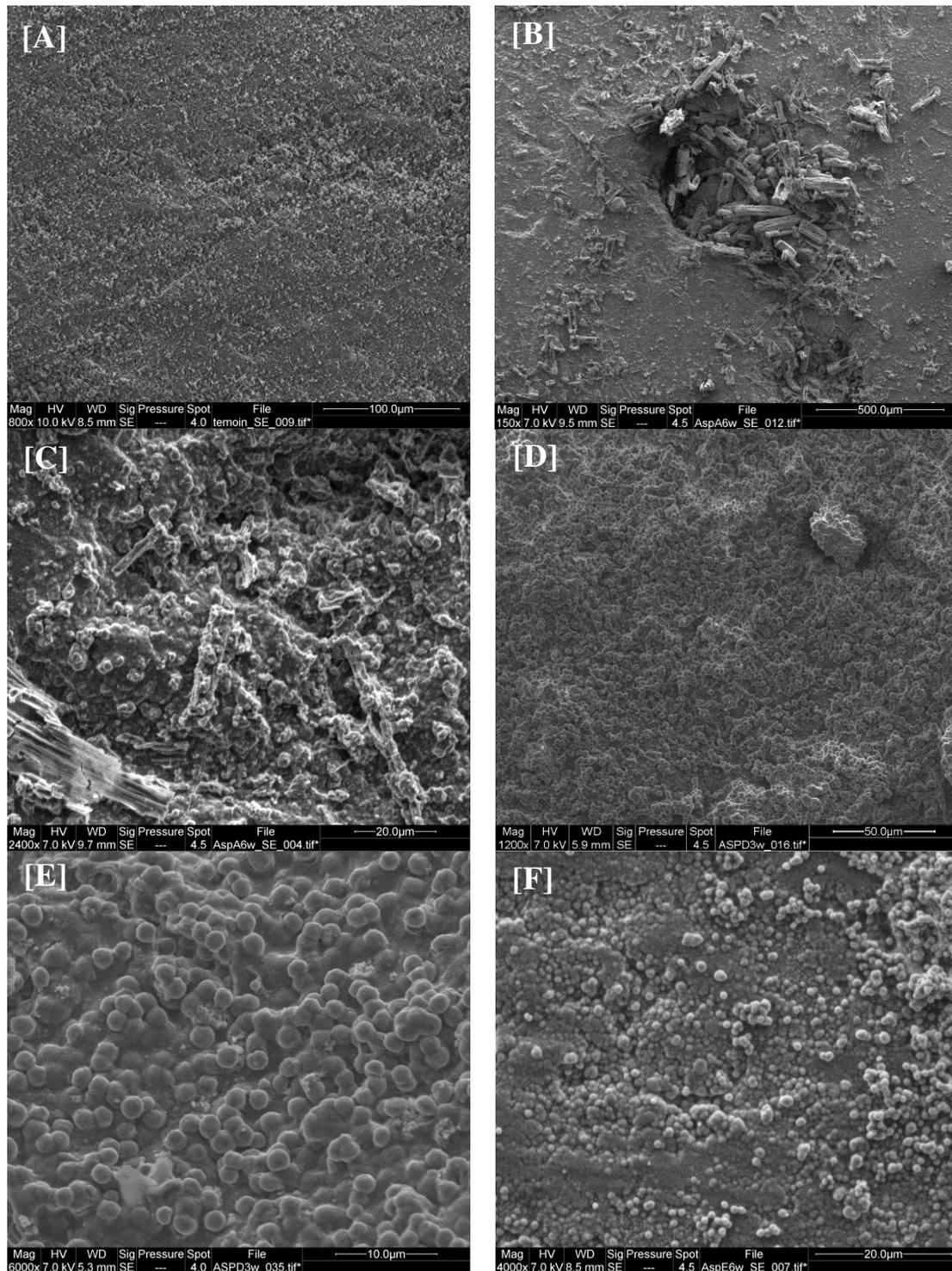


Figure 5-11 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par aspersion (B et C), des disques traités 3 semaines par aspersion avec des bactéries (D), des disques traités 6 semaines par aspersion avec des bactéries (E et F).

On observe également que les surfaces des échantillons traités avec des bactéries sont différentes de celles des témoins. Sur ces derniers sont observées des formes cristallines allongées, ainsi que des sphères piégées dans une matrice (Figure 5-11 B et C). En observant

les dépôts sur les échantillons traités 3 semaines en présence de bactéries (Figure 5-11 D), on remarque que la surface est recouverte de sphères d'environ 10 µm de diamètre, semblant fusionner les unes aux autres à certains endroits. A 6 semaines de traitement (Figure 5-11 E et F), ces sphères semblent piégées dans une matrice recouvrant la surface de l'échantillon. C'est en observant le dépôt obtenu à 3 semaines que l'on devine comment est formé le dépôt observé à l'échéance 6 semaines (Figure 5-12).

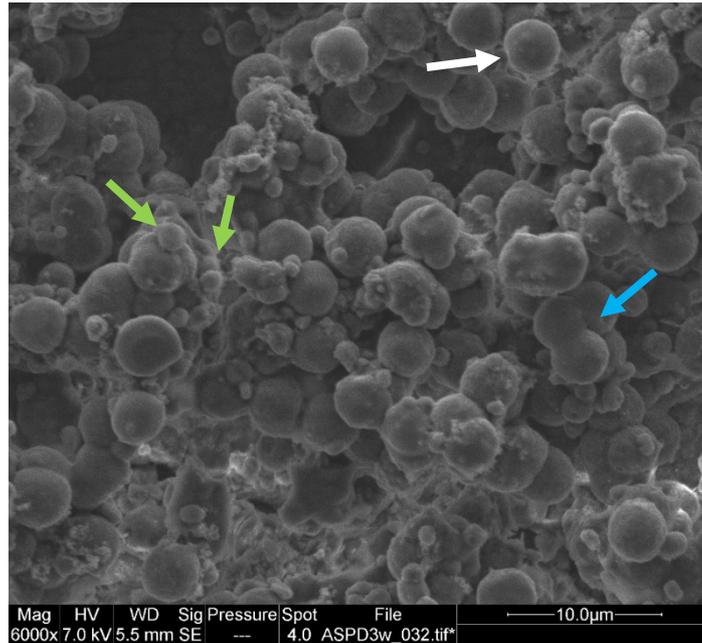


Figure 5-12 : image MEB de la surface d'un disque traité par aspersion en présence de bactéries, à l'échéance 3 semaines. La flèche blanche indique une sphère bien définie, la flèche bleue indique des sphères qui fusionnent et la flèche verte indique des excroissances sur les sphères.

Nous pouvons ainsi noter qu'à la surface des échantillons âgés de 3 semaines, les sphères formées fusionnent entre elles, menant probablement à la formation de la matrice observée à 6 semaines. Sur plusieurs sphères sont observées des excroissances qui semblent mener à la formation de nouveaux cristaux sphériques. Il semble donc que les cristaux servent de site de nucléation à de nouveaux cristaux, qui fusionnent par la suite pour former un empilement ressemblant à une matrice après 6 semaines d'incubation. Cette « cristallisation en chaîne » permet d'obtenir un recouvrement de la surface des disques, mais sur différentes épaisseurs, et non homogène (Figure 5-11 E). Ces cristaux sphériques ont également été observés par De Muynck *et al.* (2008a) sur les mortiers qu'ils ont traités par immersion dans des milieux contenant *B.sphaericus* et saturés en acétate de calcium (Figure 5-13). Nos résultats sont cohérents avec leurs observations. La forme cristalline sphérique observée est

caractéristique de la vaterite. Ceci sera vérifié analytiquement plus loin (voir figure 5.23) sur l'eau de rinçage des disques.

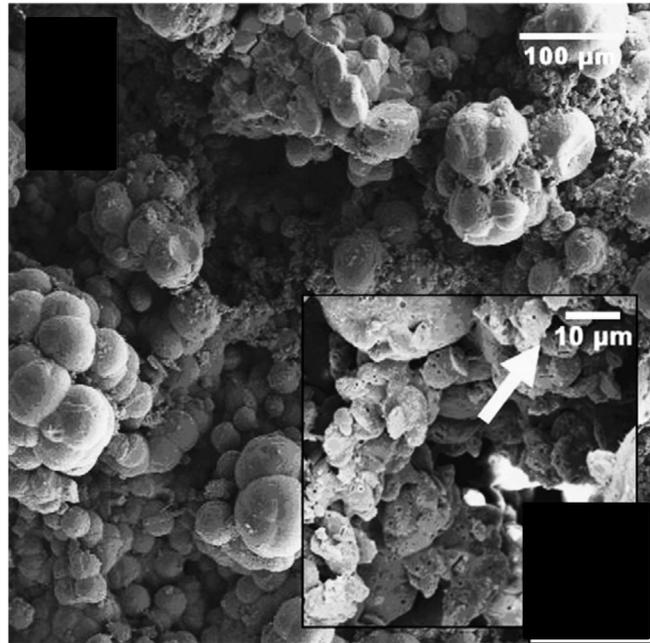


Figure 5-13 : images MEB des surfaces de mortiers traités par immersion dans un milieu BN (10g/L) contenant *B.sphaericus* et de l'acétate de calcium (36g/L). La flèche indique la présence de bactéries calcifiées. (De Muynek *et al.* 2008a)

Ces cristaux sphériques considérés comme étant de la vaterite ont également été observés à la surface des échantillons traités par aspersion de matrice synthétique d'agar 0,1%. Mais dans le cas de ce traitement, les sphères sont aussi observées à la surface des échantillons témoins, au sein de formations semblables à des biofilms bactériens (Figure 5-14 C). Ces formations tendent à montrer que les échantillons témoins des traitements par aspersion de matrice synthétique (agar 0,1%) ont été contaminés par une souche bactérienne, probablement issue de la surface du disque, qui n'est ni stérilisé avant traitement, ni incubé en conditions stériles.

Quoi qu'il en soit, il est intéressant de noter que la répartition du dépôt issu du traitement inoculé, après 3 semaines d'incubation, est si peu homogène que certaines zones du matériau sont dénudées (Figure 5-14 D). Mais le dépôt est étendu à toute la surface de l'échantillon après 6 semaines d'incubation. On note qu'au sein de ces dépôts subsistent des formes allongées et denses que nous estimons être des fragments de matrice d'agar 0,1% (Figure 5-14 E et F).

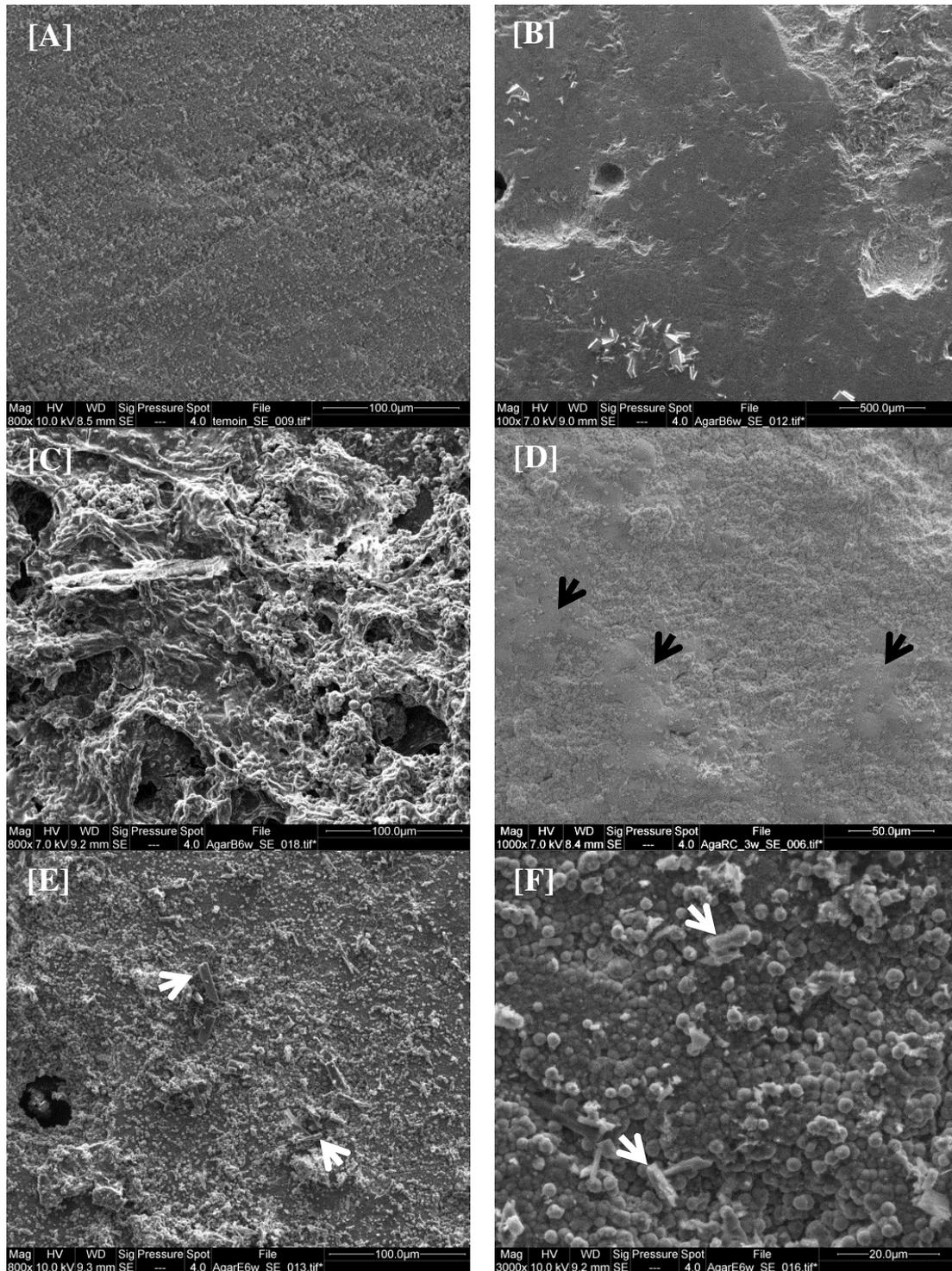


Figure 5-14 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par matrice d'agar 0,1% (B et C), des disques traités 3 semaines par la matrice agar 0,1% contenant des bactéries (D), des disques traités 6 semaines par la matrice agar 0,1% contenant des bactéries (E et F). Les flèches noires désignent les zones sur lesquelles aucun dépôt n'est observé. Les flèches blanches désignent des résidus de matrice ou de l'acétate de calcium.

Ces cristaux considérés comme étant de la vaterite sont de nouveau observés avec les traitements par étalement. Dans ce cas, les témoins ne présentent pas de trace de contamination. La surface de ces derniers se distingue de celle des échantillons traités avec des bactéries, car

elle présente une matrice dans laquelle des cristaux sont piégés (Figure 5-15 B et C). Ces cristaux ne peuvent pas être de la calcite, de la vaterite ou de l'aragonite, dont les formes cristallines sont définies, à la température et au pH auxquels nous travaillons.

Les échantillons traités avec des bactéries et incubés pendant 3 semaines présentent quant à eux des formes sphériques sur leur surface, mais de façon peu homogène, au point de laisser le matériau dénudé sur certaines zones (Figure 5-15 D). Sur ces échantillons, nous pouvons également observer des lignes droites qui correspondent sans doute aux traces laissées par les poils du pinceau employé pour l'étalement.

Ces traces laissent le matériau à nu, mais après 6 semaines d'incubation (Figure 5-15 E), elles ont tendance à disparaître. Sur certaines zones, une matrice est observée, qui se fissure sous l'effet de la dessiccation. Mais les craquelures de cette dernière ne révèlent aucune forme cristalline distincte. Autre remarque importante, dans le cas de ce traitement, les aspérités semblent en partie comblées. Sur ces images MEB, nous n'avons pas le moyen de déterminer sur quelle profondeur, mais les formes cristallines sphériques sont bien distinctes dans ces zones (Figure 5-15 E et F). Il se pourrait que le traitement étalé ait été piégé dans ces aspérités et que le biocalcification y soit plus importante.

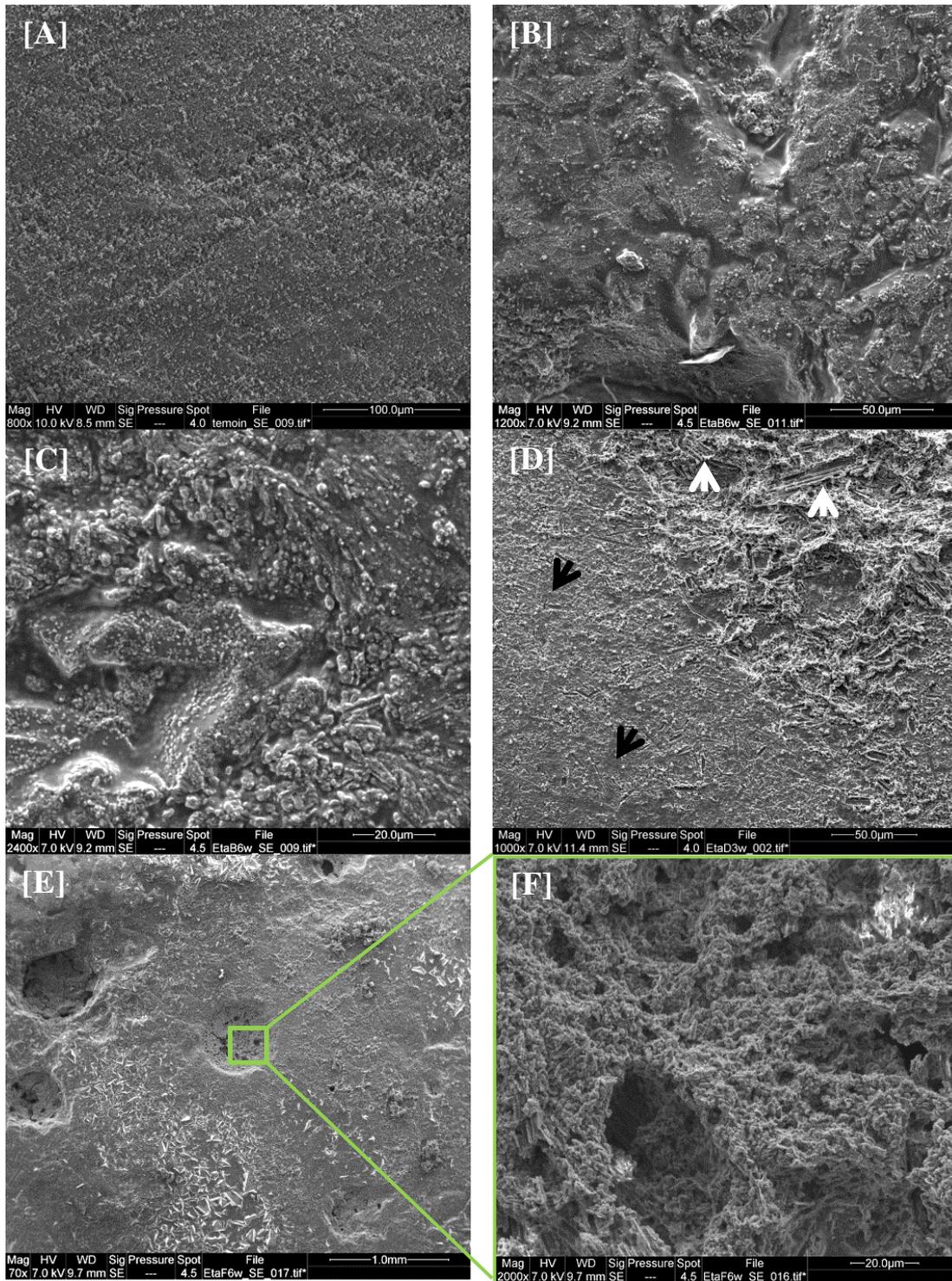


Figure 5-15 : photos MEB des surfaces d'un disque non traité (A), des témoins à 6 semaines du traitement par étalement (B et C), des disques traités 3 semaines par étalement avec des bactéries (D), des disques traités 6 semaines par étalement avec des bactéries (E et F). Les flèches noires désignent les zones sur lesquelles aucun dépôt n'est observé, les flèches blanches désignent l'empreinte des poils du pinceau.

Il ressort des observations des surfaces des échantillons traités que les meilleures répartitions des dépôts s'obtiennent après 6 semaines d'incubation. Les traitements par

étalement et par aspersion du milieu sont ceux qui permettent d'obtenir les meilleurs recouvrements. Le traitement par aspersion de matrice synthétique (agar 0,1%) semble également mener à ce type de conclusion, mais l'observation de bio-production à la surface des disques issus des milieux témoins ne nous permet pas de savoir si le dépôt observé dans les milieux inoculés est lié à l'activité de *B.halodurans* ou d'un contaminant. Or, notre objectif est de développer un protocole de traitement en utilisant *B.halodurans*, il nous faut donc connaître l'impact de la souche sur le dépôt et pas celle d'un contaminant.

En observant les vues de profil des matériaux traités, il est possible de mieux apprécier l'homogénéité des dépôts, ainsi que leurs épaisseurs. Nos protocoles ont été développés dans le but d'obtenir une épaisseur théorique de biocalcification maximale de 700µm.

En observant les profils des dépôts issus des traitements par aspersion sans agar, nous notons que les épaisseurs des dépôts produits dans les milieux contenant des bactéries sont loin d'atteindre l'épaisseur attendue (Figure 5-16). Par ailleurs, le dépôt observé à la surface des témoins ne dépasse pas les 15µm sur la coupe observée. Cette différence montre l'impact de l'apport des bactéries sur l'épaisseur du dépôt de CaCO₃ formé. Aussi, sur la trentaine de micromètres d'épaisseur que peuvent atteindre les dépôts de biocalcification, une dizaine de micromètre est issu de l'action du milieu sans bactéries.

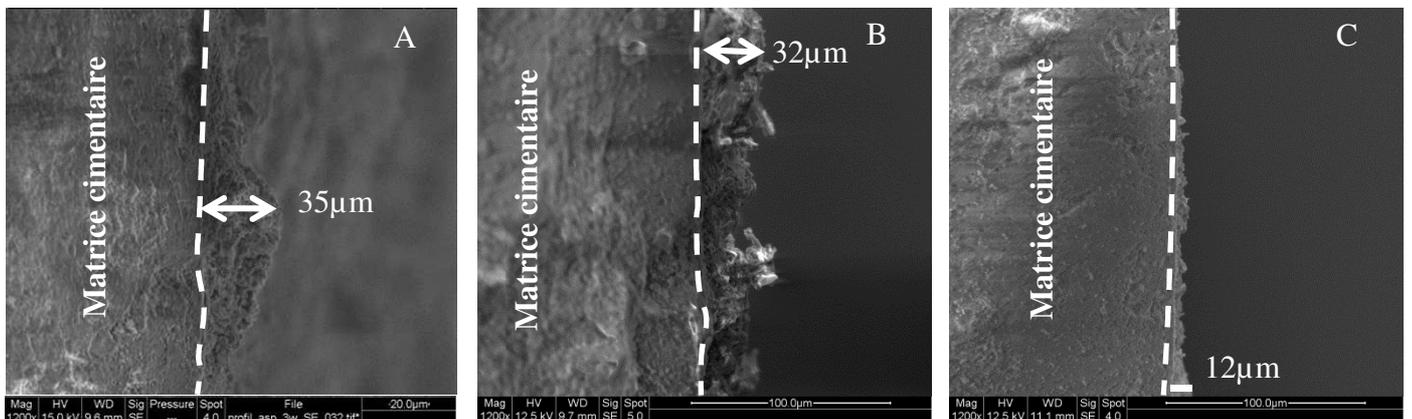


Figure 5-16 : photos MEB des vues de profils des disques traités par aspersion et *B. halodurans* pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.

Il est intéressant de noter que la vue de profil permet de bien observer l'agrégation des cristaux sphériques sur l'épaisseur du dépôt, dès 3 semaines d'incubation (Figure 5-17).

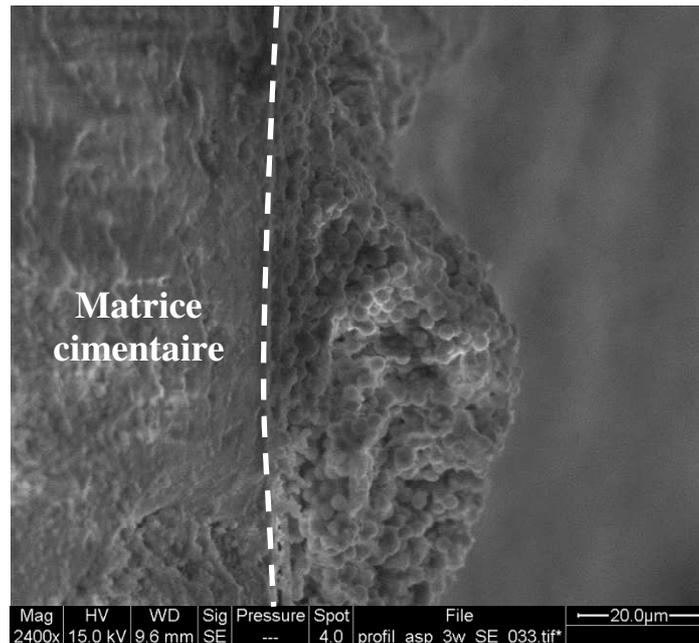


Figure 5-17 : photo MEB d'une vue de profil d'un disque traité par aspersion et *B. halodurans* pendant 3 semaines, sur laquelle l'agglomération de cristaux en forme de sphères se distingue. La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.

L'équipe de Park *et al.* (2012) obtient des épaisseurs 10 fois plus importantes de bioprécipitation avec la fermeture de fissures de 300µm de largeur sur des coulis de ciment Portland, après 5 jours de traitement (Figure 5-18). Pour cela, l'équipe traite les fissures formées artificiellement avec 100µL de milieu B4 (15g/L d'acétate de calcium, 4g/L d'extrait de levure et 5g/L de glucose) inoculé ou non avec *B.subtilis*, en renouvelant l'application toutes les 24h pendant 3 jours. Dans ces conditions, la production de CaCO₃ se réalise par la voie de l'interconversion, tout comme pour nos essais. Le protocole employé pour les traitements des fissures se rapproche de celui utilisé pour l'aspersion de milieu sur les disques, mais l'équipe de Park *et al.* (2012) ne rince pas les dépôts formés, en fin d'essai. Or, nous avons pu observer avec nos échantillons qu'une part importante du dépôt observé en fin d'incubation est éliminée au cours du rinçage à l'eau (Figure 5-8). Aussi, ce dépôt observé au niveau des fissures est potentiellement instable, contrairement à celui que nous observons sur les disques traités et rincés. D'autant que nous avons également observés des dépôts de près de 250µm d'épaisseur sur les GBR traités par aspersion et incubés pendant 3 semaines (avec 138,7g d'acétate de calcium pour 10¹¹ bactéries, qui donne un ratio acétate de calcium/bactéries assez proche de celui que nous avons adopté : 8,4g/7,8.10⁹bactéries), avant leur rinçage à l'eau. Or, après rinçage de ces matériaux, nous avons observé des dépôts certes très hétérogènes mais pouvant atteindre 52µm d'épaisseur.

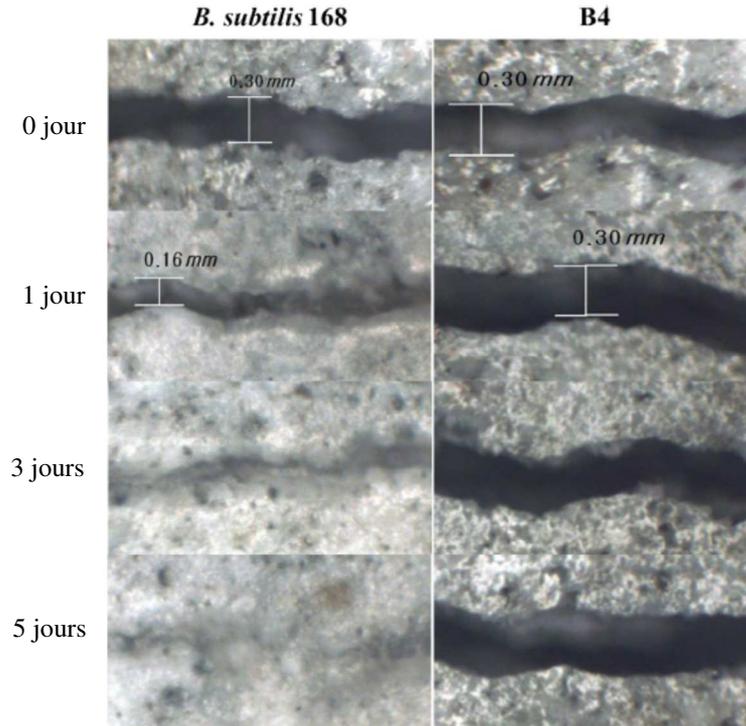


Figure 5-18: évolution des fissures traitées par un milieu B4 inoculé par *B.subtilis* ou du milieu B4 stérile. Traitement par dépôt de 100µL de milieu inoculé ou non directement sur la fissure, renouvelé toutes les 24h pendant 3 jours. Les échantillons sont incubés à 30°C. (Park *et al.* 2012)

Nous notons également que les traitements par dépôt de matrice d'agar à 0,1% permettent d'atteindre 30µm d'épaisseur de biocalcification, sur les zones où les amas sont les plus épais (Figure 5-19).

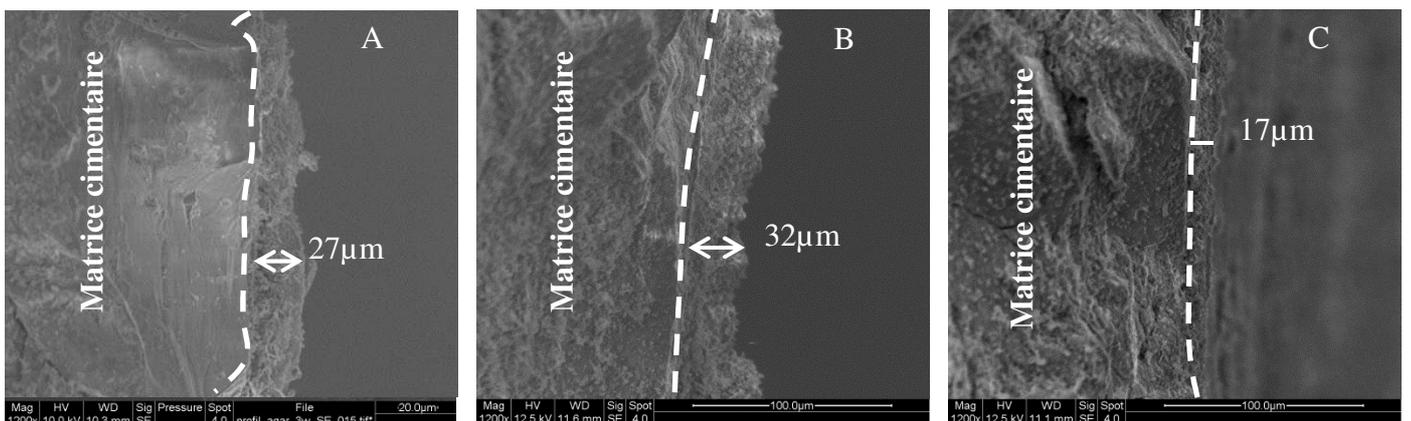


Figure 5-19 : photos MEB des vues de profils des disques traités par la matrice d'agar 0,1% contenant *B. halodurans* pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.

En traitant les GBR avec la matrice d'agar 0,1% contenant des bactéries, de l'urée (20g/L) et de l'acétate de calcium (50g/L), on notait à 3 semaines d'incubation à température ambiante, un dépôt très hétérogène, pouvant faire plus de 20µm d'épaisseur (Figure 4-6). Nous sommes parvenus avec cet essai sur disques à obtenir un dépôt qui recouvre mieux le matériau, mais qui doit encore être amélioré pour assurer un recouvrement homogène.

Les vues de profils ont permis de révéler une contamination des disques traités par étalement, par des microchampignons, puisque nous y avons observé des hyphes sur un échantillon incubé 6 semaines (Figure 5-20 B). Ces contaminations ne sont pas surprenantes, puisque les traitements sont réalisés à l'air libre.

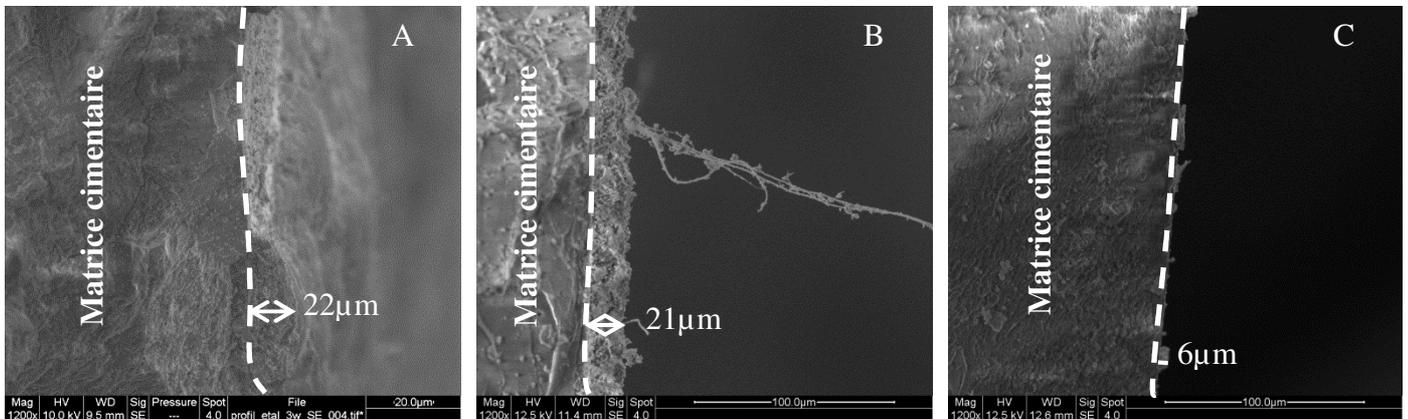


Figure 5-20 : photos MEB des vues de profils des disques traités par étalement et *B. halodurans* pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.

Enfin, les observations des profils des échantillons traités par immersion ont révélé des épaisseurs de dépôts proches des 30µm dans l'échantillon témoin. Cela tend à montrer que l'action des microchampignons pourrait avoir permis une production de CaCO₃ suffisante pour atteindre l'épaisseur attendue sur un échantillon traité avec *B.halodurans*. Bien que cette production puisse être liée à l'activité de *B.halodurans*, toujours présente dans les milieux, cette observation ouvre des perspectives de recherche sur l'emploi de microchampignons dans la production de CaCO₃ sur des matériaux cimentaires. D'ailleurs, une étude menée par Luo *et al.* (2017) a déjà montré l'efficacité du microchampignon *Trichoderma reesei* à bioprécipiter de la calcite au niveau de ses hyphes, tout en croissant à la surface de mortiers normalisés.

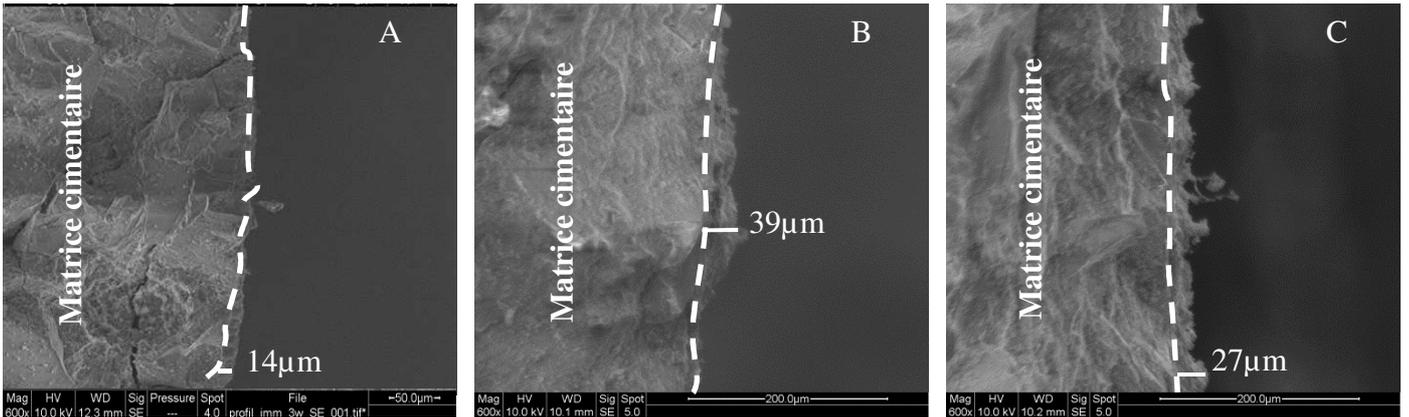


Figure 5-21: photos MEB des vues de profils des disques traités par immersion dans un milieu contenant *B. halodurans* pendant 3 semaines (A), 6 semaines (B) et des témoins traités sans bactéries (C). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du disque.

L'équipe de De Muynck *et al.* (2008b), qui a également traité des échantillons de mortiers par immersion dans le milieu de traitement, pendant 3 jours, a observé des épaisseurs de dépôts supérieures aux nôtres (Figure 5-22). L'équipe a pourtant estimé que la couche de CaCO₃ formée par bioprécipitation à la surface des mortiers devrait avoir une épaisseur comprise entre 35 et 50µm. Mais nous pouvons voir qu'à la surface de l'échantillon inoculé, le dépôt formé peut atteindre une épaisseur de 70µm (Figure 5-22 B), ce qui confirme les difficultés d'obtention d'un dépôt homogène à la surface de matériaux cimentaires, quand ils sont traités par immersion.

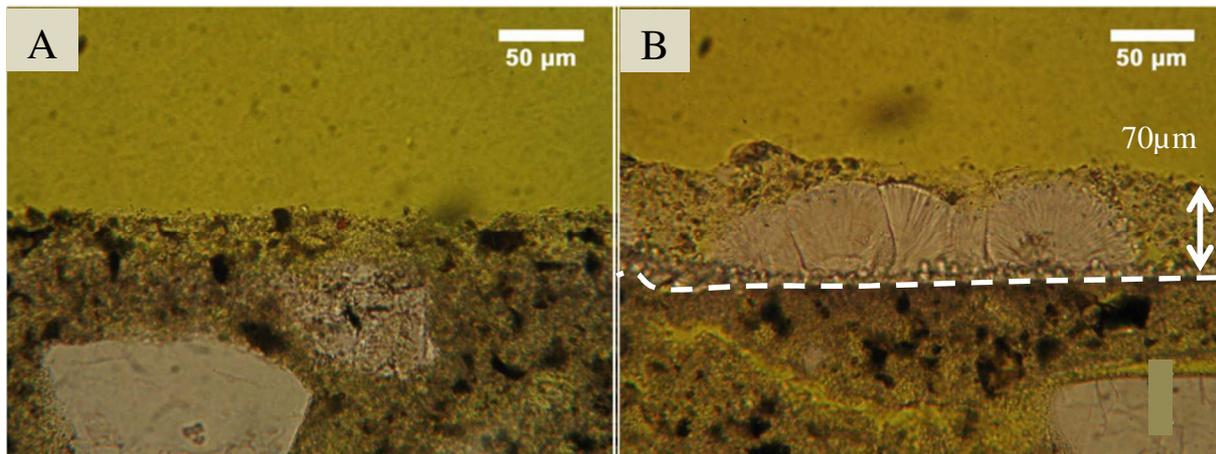


Figure 5-22 : photos au microscope optique des vues de profils des échantillons de mortier non traités (A) ou traités par immersion dans du bouillon bactérien de *B.sphaericus* (10⁷ bactéries/mL) avant séchage et immersion dans le milieu contenant la source de calcium (26g/L) pendant 3 jours (B). La ligne blanche en pointillés délimite la surface du mortier. (d'après De Muynck *et al.* (2008b))

L'analyse des résidus issus du séchage des eaux de rinçage des disques (Figure 5-23) a permis de détecter la présence de vatérite, qui peut avoir en partie adhéré à la surface des disques, expliquant la présence de cristaux sphériques à leurs surfaces.

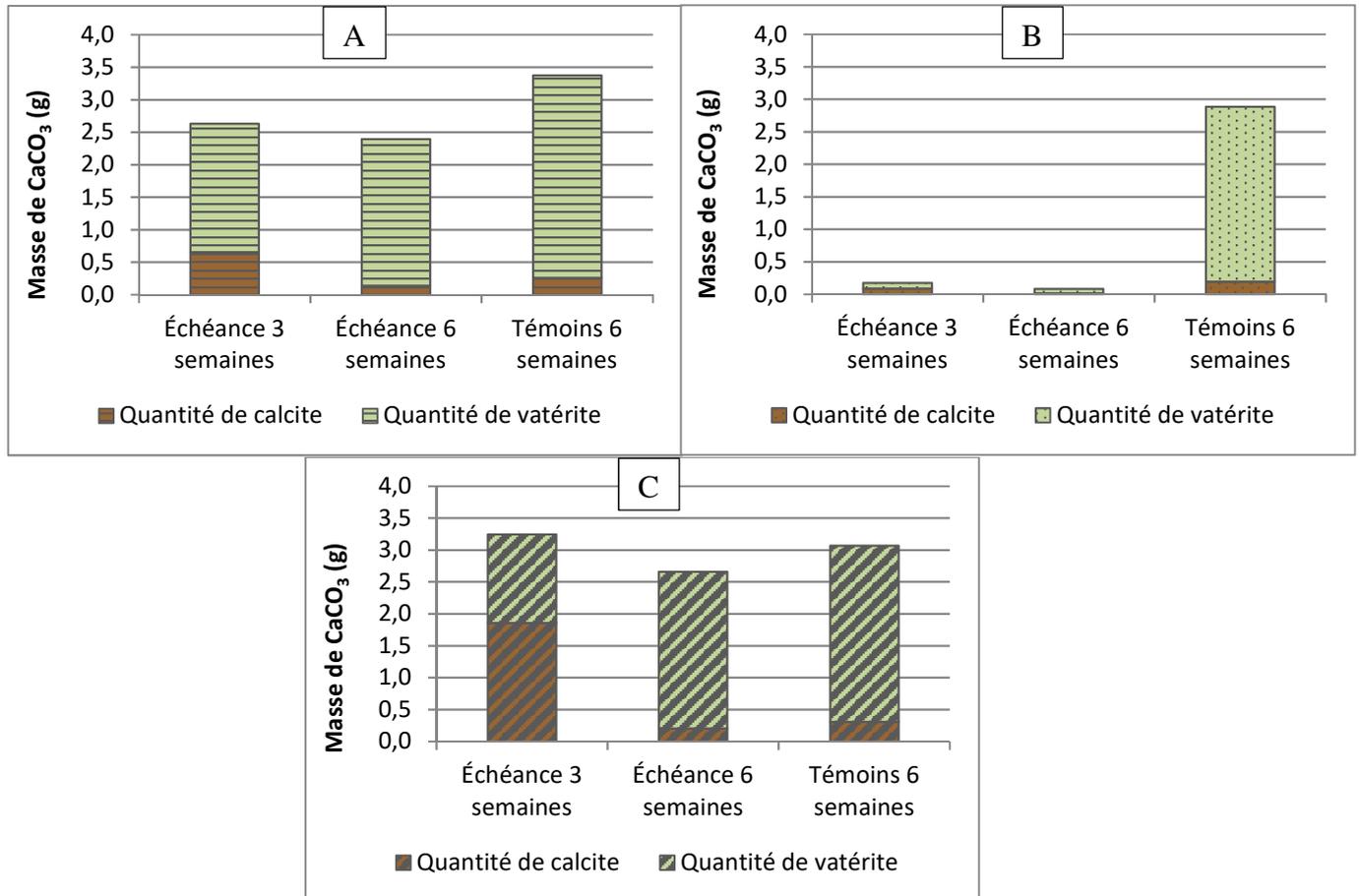


Figure 5-23 : graphiques présentant les masses de CaCO₃ après évaporation des eaux de rinçage des échantillons issus du traitement par aspersion (A), par aspersion de matrice synthétique en agar 0,1% (B) et par étalement du milieu (C). Les proportions de calcite dans les échantillons sont présentées en marron, celles de vatérite en vert.

Si la totalité des ions calcium issus de la décomposition des 8,4g d'acétate de calcium apportés ont réagi avec les carbonates produits, alors nous devrions obtenir une formation de :

$$m_{\text{CaCO}_3 \text{ formable}} = n_{\text{acétate de calcium}} \times M(\text{CaCO}_3) = \frac{m_{\text{acétate de calcium}}}{M(\text{acétate de calcium})} \times M(\text{CaCO}_3)$$

$$= \frac{8,4}{158} \times 100 = 5,3\text{g}$$

Avec :

- $m_{\text{CaCO}_3 \text{ formable}}$, la masse de CaCO_3 formable en introduisant 8,4g d'acétate de calcium dans le milieu (g) ;
- $n_{\text{acétate de calcium}}$, le nombre de moles d'acétate de calcium dans une masse de 8,4g (mol)
- $m_{\text{acétate de calcium}}$, la masse d'acétate de calcium introduite dans le traitement (8,4g) ;
- $M(\text{CaCO}_3)$, la masse molaire du CaCO_3 (100 g/mol) ;
- $M(\text{acétate de calcium})$, la masse molaire de l'acétate de calcium (158 g/mol).

Ainsi, avec la masse d'acétate de calcium introduite dans les traitements, nous devrions pouvoir produire 5,3 g de CaCO_3 . Nous pouvons constater que cette valeur n'est jamais atteinte dans les trois traitements présentés. Hormis pour les échantillons issus des eaux de rinçage des disques traités par la matrice d'agar contenant des bactéries (Figure 5-23 B), nous notons qu'entre 30 et 40% de la masse de CaCO_3 formable semble de retrouver dans les eaux de rinçage des disques. Mais nous n'avons pas déterminé la proportion d'acétate de calcium non dissout, présent dans ces résidus et qui pourrait être plus élevée que celle des CaCO_3 formés et rincés. Il pourrait être intéressant de peser les disques avant et après traitement pour connaître la masse réelle de dépôt formé à la surface des échantillons, comme proposé par l'équipe de De Muynck *et al.* (2008b). Cette dernière a ainsi pu déterminer que 50% de la masse de CaCO_3 formable s'est déposée à la surface de ses échantillons de mortiers immergés dans les traitements. Toutefois, il faut s'assurer qu'une telle mesure est suffisamment précise pour obtenir des résultats pertinents (problème de définition précise de l'état sec des matériaux cimentaires qui peut masquer les variations de masse réelles).

Les masses de CaCO_3 présentes dans les milieux issus des traitements par immersion n'ont pas pu être analysés car la matière sèche récoltée pour l'analyse ATG réagissait violemment aux températures élevées. En effet, la matière qui cristallisait au cours de l'analyse ATG était expansive et nuisait à l'analyse. Cette réaction étant similaire à celle observée lorsque l'acétate de calcium est séché, nous considérons donc que la matière issue des milieux des traitements par immersion est principalement composée d'acétate de calcium.

Enfin, la Figure 5-24, résume les mesures d'absorption obtenues.

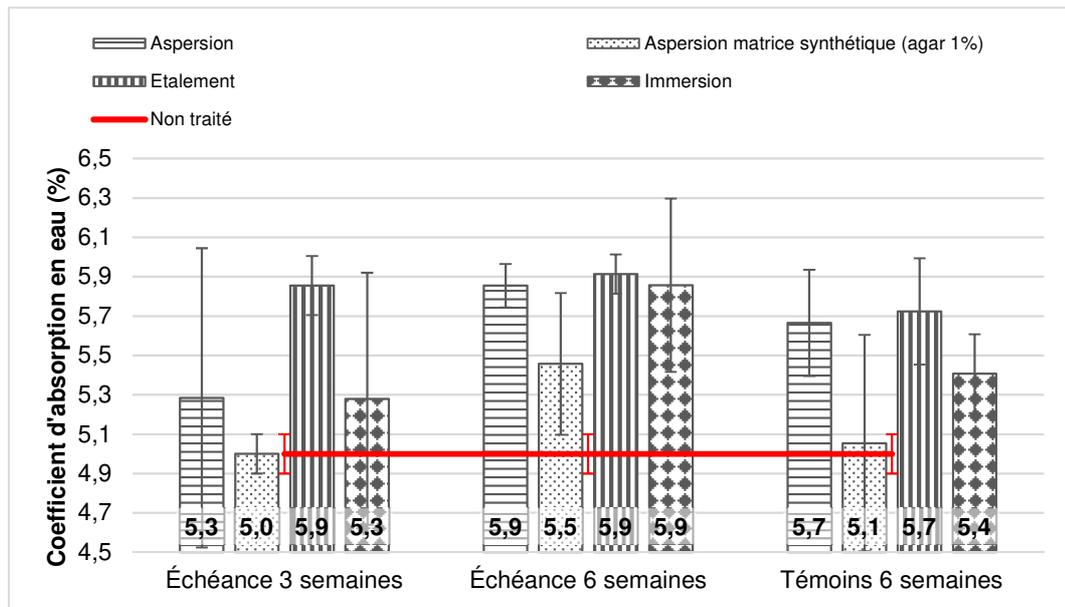


Figure 5-24 : taux d'absorption en eau mesurés des disques traités par aspersion (barres rayées horizontalement), par aspersion de matrice d'agar 0,1% (barre avec des points), par étalement (barres rayées verticalement) et par immersion (barres avec des carrés). Chaque barre d'erreur indiquée sur les histogrammes correspond aux valeurs minimales et maximales calculées. Le taux d'absorption en eau de disques non traités est indiqué en rouge.

De façon globale, on observe que les traitements n'ont pas diminué le taux d'absorption en eau des disques, mais on plutôt tendance à les augmenter. On remarque d'ailleurs que les témoins à 6 semaines ont une absorption en eau supérieure à celle des disques non traités. Aussi, à 6 semaines d'incubation, l'absorption en eau des matériaux semble systématiquement plus importante qu'à 3 semaines, pour les traitements réalisés avec des bactéries.

L'augmentation des taux d'absorption peut s'expliquer par une valeur de la masse dite « saturée surface sèche » des disques traités plus importante que celle mesurée pour les disques non traités. Cette différence de masse peut être liée à plusieurs phénomènes :

- (1) le dépôt de CaCO₃ observé à la surface des disques, qui aurait piégé de l'eau pendant l'immersion. A ce propos, on voit sur la figure 5.17 par exemple, que la texture de la couche bioprécipitée semble plus poreuse que la matrice cimentaire elle-même ;
- (2) le milieu de culture pouvant toujours adhérer au disque et piéger également de l'eau ;
- (3) le piégeage de l'eau au niveau de la jonction disques/aluminium autocollant favorisée pour les échantillons traités par un risque de dépôt dans cette jonction.

Une mesure de la masse sèche des disques avant leur traitement aurait pu être comparée à la masse sèche des disques traités et nous fournir une information sur la masse de dépôt présente sur les matériaux. La masse de dépôt mesurée nous aurait permis de savoir si le dépôt présent

sur les disques peut effectivement expliquer cette différence de masse dite « saturée surface sèche » entre les échantillons traités et non traités.

Park *et al.* (2012) semblent avoir obtenus des résultats plus encourageants. Ils ont travaillé avec *B.subtilis* et *B.cereus*, deux souches capables de réaliser la biocarbonatation et *E.coli*, une souche qui ne réalise pas la biocarbonatation et est donc employée comme contrôle négatif dans cette étude. Pour mesurer l'impact de la biocarbonatation de chaque souche sur le taux d'absorption des échantillons plans de coulis de ciment Portland employées pour cet essai, ils ont utilisé un protocole d'immersion. Pour ce faire, ils ont plongé les échantillons, préalablement stérilisés sous UV, dans les bouillons bactériens contenant 15g/L d'acétate de calcium et pas d'urée. Ainsi, toute production de CaCO₃ est liée à l'action de l'AC par la voie de l'interconversion. Après 3 jours d'incubation à 30°C en agitant les contenants à 50tr/min, ils mesurent les taux d'absorption en eau des coulis de ciment traités. Pour cet essai, des coulis de ciment traités uniquement avec le milieu de culture stérile ont servi de témoin. Ainsi, en fin d'incubation, l'équipe a mesuré la masse dite « saturée surface sèche » des échantillons, avant de les laisser sécher 24h à 65°C et de mesurer leur masse sèche pour déterminer leur taux d'absorption en eau. Ils observent alors :

- (1) une diminution du taux d'absorption en eau des échantillons traités avec *E.coli* (contrôle négatif) et *B.cereus* de 1,2 et 1,1% respectivement, par rapport au témoin traité avec le milieu seul ;
- (2) une diminution du taux d'absorption en eau des échantillons traités par *B.subtilis* de 2,8%, par rapport au témoin traité avec le milieu seul.

Témoin sans bactéries	26.08 ± 0.14
<i>E. coli</i> K12	24.91 ± 0.27
<i>B. cereus</i> KCTC3624	24.94 ± 0.24
<i>B. subtilis</i> 168	23.98 ± 0.97

Figure 5-25: Taux d'absorption des coulis de ciment Portland traités par immersion pendant 3 jours (30°C, 50 tr/min) dans des milieux inoculés par *E.coli*, *B.cereus* ou *B.subtilis*, ou un milieu B4 stérile (Témoin sans bactéries). Le milieu de culture est du milieu B4 composé de 15g/L d'acétate de calcium, 4g/L d'extrait de levure et 5g/L de glucose. (Park *et al.* 2012)

Toutefois, ces résultats sont sujets à caution car comme nous l'avons expliqué au chapitre 4, la méthode de mesure de l'absorption adoptée par les auteurs n'est pas pertinente et

fausse sans doute les comparaisons. On note également que les diminutions d'absorption observées après traitement sont très modérées.

4. Conclusion

Les travaux réalisés sur les disques de béton ont permis d'observer plus facilement la production de la couche de CaCO₃ en surface que lors des essais précédents sur GBR.

Les observations ont été faites après traitement et rinçage des surfaces. On constate tout d'abord qu'une partie importante des dépôts est évacuée par ce rinçage et que cette étape est importante pour vraiment caractériser les performances du matériau cimentaire traité.

Un deuxième constat est que le recouvrement de la surface des disques par le dépôt de CaCO₃ n'est pas complet mais qu'il continue à s'améliorer entre 3 et 6 semaines d'incubation. On serait donc tenté de prolonger l'incubation mais il faut garder en tête que l'objectif visé avec le traitement bactérien est d'accélérer la carbonatation de la surface par rapport au processus naturel aérien.

Des observations en coupe, nous ont permis de constater que l'on obtenait des épaisseurs typiques de dépôt de l'ordre de quelques dizaines de microns avec les protocoles sélectionnés, ce qui peut correspondre à 5 à 10% de ce que l'on attendait avec les doses d'acétate de calcium introduites dans le traitement.

Parmi tous les protocoles développés, celui de l'aspersion retient notre attention de par ses résultats encourageants. Non seulement il s'agit du seul traitement sur lequel aucune contamination n'a été observée, mais il s'agit également d'un traitement facile à mettre en œuvre, qui a permis d'obtenir la formation d'une couche de CaCO₃ dès 3 semaines d'incubation.

Malgré l'observation de cette couche de dépôt, nous n'avons pu mettre en évidence de diminution de l'absorption des disques de mortier par les différents traitements bactériens étudiés. Nous avons même *a contrario* plutôt observé une légère augmentation de cette absorption. Deux explications principales pourraient être avancées à ce stade : un recouvrement incomplet de la surface des disques par le dépôt, mais également une perméabilité importante de cette couche. En effet les observations au microscope ont mis en évidence une structure en forme d'assemblage de sphères qui semble moins dense que la pâte cimentaire. Il serait souhaitable de vérifier ce dernier point en caractérisant l'absorption ou la perméabilité du dépôt lui-même.

Les essais de traitement par immersion ont été contaminés par des microchampignons probablement de type *Aspergillus sp.*. L'observation des échantillons témoins sans bactérie incubés 6 semaines ont montré la présence de dépôts de CaCO₃ qui pourraient être imputables à ces microchampignons. Ce point qui a été observé par ailleurs dans la littérature permet d'ouvrir des perspectives de recherche dans le domaine de la biocarbonatation de CaCO₃ par des microchampignons pour améliorer des matériaux cimentaires. Cette voie a pour l'instant été très peu étudiée.

Quant aux traitements par aspersion de matrice d'agar à 0,1%, la formation d'un dépôt de CaCO₃ à la surface des disques témoins probablement issue de l'activité des bactéries déjà présentes à la surface des matériaux, a permis de révéler l'intérêt de stimuler directement le microbiote présent pour réaliser la biocarbonatation. En effet, ces microorganismes ont su coloniser des milieux à pH élevé sans avoir à subir des étapes d'adaptation.

D'un point de vue méthodologique, la formation du dépôt de CaCO₃ pourrait être suivie en mesurant la masse des échantillons avant et après leur traitement. En combinant la masse obtenue avec les masses de CaCO₃ que l'on récupérerait dans l'eau de rinçage des échantillons, nous aurions une idée plus précise de la quantité de CaCO₃ formée et présente à la surface des échantillons. Cependant, il faut être attentif à vérifier la précision de ce genre de mesure.

5. Bibliographie

- Bindschedler, S., Cailleau, G. & Verrecchia, E. (2016) Role of fungi in the biomineralization of calcite. *Minerals*, **6**, 41.
- De Muynck, W., Cox, K., Belie, N.D. & Verstraete, W. (2008a) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, **22**, 875–885.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. & Verstraete, W. (2008b) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research*, **38**, 1005–1014.
- Josserand, L. (2002) *Ressuage Des Bétons Hydrauliques*. Ecole des Ponts ParisTech.
- Luo, J., Chen, X., Crump, J., Davies, D.G., Zhou, G., Zhang, N. & Jin, C. (2017) Screening of fungi for self-healing of concrete cracks. *arXiv preprint arXiv:1708.01337*.
- Monger, H.C., Daugherty, L.A., Lindemann, W.C. & Liddell, C.M. (1991) Microbial precipitation of pedogenic calcite. *Geology*, **19**, 997–1000.
- NF EN 196-1. (2016) Méthodes d'essais des ciments - Partie 1 : détermination des résistances.
- Park, S.-J., Park, J.-M., Kim, W.-J. & Ghim, S.-Y. (2012) Application of *Bacillus subtilis* 168 as a multifunctional agent for improvement of the durability of cement mortar. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 1568–1574.

Conclusion générale

L'objectif principal de cette thèse était de développer un protocole permettant d'accélérer la carbonatation des GBR en utilisant des bactéries capables de produire des carbonates de calcium. A cette fin, nous souhaitons développer un traitement capable de mener à une bioproduction homogène de CaCO_3 à la surface des GBR. Pour cela, nous devons à la fois sélectionner des souches bactériennes capables de produire des CaCO_3 , mais également mesurer l'impact de leur bioproduction sur le taux d'absorption en eau des GBR afin d'atteindre un taux proche de ceux des granulats naturels utilisés pour le béton, soit de l'ordre de 2%.

L'étude bibliographique a permis de mettre en avant 2 voies de production des CaCO_3 par les souches bactériennes : la voie de dégradation de l'urée et la voie de l'interconversion du CO_2 atmosphérique en HCO_3^- . Cette étude a également mis en évidence les difficultés des chercheurs, travaillant sur l'emploi de la bioproduction de CaCO_3 au contact de matériaux cimentaires, à maintenir les souches bactériennes en vie à cause des pH très élevés de ces milieux. C'est pourquoi nous avons étudié les GBR utilisés pour notre étude, avant de commencer les développements de protocoles de traitement de ces derniers par des bactéries.

Notre étude a donc commencé par caractériser les GBR utilisés pour notre travail. Ces derniers ont été produits en 2010 à partir d'un béton formulé en laboratoire, nous permettant de travailler avec un matériau non pollué, stable et homogène. Les analyses réalisées sur ces GBR ont montré que leur taux d'absorption en eau est différent suivant leur profondeur de stockage dans le Big Bag duquel ils ont été prélevés, indiquant que la carbonatation naturelle atmosphérique des GBR est plus avancée en surface qu'en profondeur. Ainsi, pour chaque lot de GBR utilisés dans les traitements qui ont suivis, les taux d'absorption en eau des matériaux non traités ont été mesurés. Les analyses de la distribution de la taille moyenne des pores ont révélé que les porosités accessibles ont un diamètre de l'ordre du nanomètre et de la dizaine de nanomètre. Dès lors, il était évident que les bactéries -dont des dimensions sont de l'ordre du micromètre- qui seraient employées pour les traitements ne pourraient pas pénétrer ces porosités et produire des CaCO_3 dans la porosité des GBR, mais plutôt à leur surface. Par ailleurs, la mesure du pH de surface des GBR utilisés pour notre travail a montré l'alcalinité résiduelle élevée du matériau avec un pH de surface proche de 12. Ainsi, nous nous devons de sélectionner des souches bactériennes capables de survivre à des pH très élevés, tout en maintenant une production de CaCO_3 .

Cette première étude a donc été suivie par une sélection de souches bactériennes capables de se développer en milieu alcalin et de façon aérobie car les GBR seraient *a priori* traités en milieu extérieur. Pour réaliser la sélection des souches bactériennes, nous nous sommes inspirés des travaux déjà réalisés sur l'emploi de bactéries capables de produire des CaCO_3 au contact de matériaux cimentaires. Nous avons également choisi ces souches pour pouvoir comparer l'impact de leur morphologie et de leur membrane sur la production de CaCO_3 . L'étude de la croissance *in vitro* de ces bactéries nous a permis d'affiner la sélection des souches. Pour faciliter la suite de notre travail, nous avons orienté notre choix vers des souches présentant des temps de latence de quelques heures, et capables de produire des CaCO_3 au travers de la voie de dégradation de l'urée, qui est la plus citée dans la littérature. Nous avons ainsi sélectionné 2 souches bactériennes: *Bacillus halodurans* et *Micrococcus lactis*.

Une étude de leur rendement de production de CaCO_3 a alors été menée *in vitro*. Parmi toutes les sources de calcium disponibles pour alimenter les bactéries nous avons choisi une seule source pour limiter le nombre d'essais : l'acétate de calcium. Au cours de cette étude, nous avons modifié différents paramètres afin d'améliorer les rendements de production de CaCO_3 de chacune des souches. Ainsi, nous avons calculé la concentration nécessaire d'acétate de calcium (notre source de calcium) à introduire dans les milieux pour qu'1 mole d'urée mène à la formation d'1 mole de CaCO_3 . Nous avons également montré qu'une phase de croissance bactérienne dynamique est nécessaire à la formation de CaCO_3 , et que cette formation se poursuit au cours de la phase stationnaire de la souche. Aussi, il est nécessaire de favoriser l'oxygénation des milieux de cultures pour que les bactéries croissent, et également pour renouveler le CO_2 dans les cultures pour favoriser la voie de production de CaCO_3 au travers de la voie de l'interconversion. De plus, les essais pouvaient être menés sur plusieurs semaines, afin de profiter de la phase stationnaire des souches pour prolonger la biocarbonatation. Au cours de ces essais nous avons constaté que la voie d'interconversion, c'est-à-dire la biocarbonatation en l'absence d'urée, permettait d'obtenir les productions maximales de CaCO_3 par les bactéries. C'est ainsi que nous avons réussi *in vitro* à convertir jusqu'à 60% de l'acétate de calcium introduit en CaCO_3 . A noter qu'à ce stade toutes les études ont été menées au pH optimal de croissance des bactéries (entre 7,4 et 9,7).

Sur la base de ces résultats très encourageants, notre étude s'est poursuivie par une immersion des GBR dans les traitements développés avec chacune des souches sélectionnées. Ces traitements ont malheureusement mené à une faible diminution du taux d'absorption en eau des GBR en présence de *B.halodurans* et à aucune diminution en présence de *M.lactis*.

L'analyse de l'eau de contact des GBR n'a fait apparaître aucun inhibiteur connu et pourtant une étude de la croissance a montré que les souches ne se développaient pas dans cette eau. Ce constat a finalement été imputé au pH proche de 12 de cette eau et expliquait *a priori* les mauvais résultats sur les GBR.

La suite du travail s'est donc focalisé à contourner cette difficulté.

C'est pourquoi nous avons commencé par développer un protocole de traitement des GBR en protégeant les souches de l'environnement agressif généré par le matériau, en les enrobant dans des matrices synthétiques. Cet essai ne nous a pas permis d'atteindre notre objectif de diminution du taux d'absorption en eau des GBR.

La deuxième tentative a consisté à adapter *in vitro* les bactéries à un pH proche de 12, préalablement à leur mise en contact. Seule la souche *B.halodurans* a réussi à s'adapter à ce milieu au pH très élevé tout en conservant un bon rendement de production de CaCO_3 dans ce milieu et également dans un milieu produit avec l'eau de contact des GBR.

A la suite de ce travail important d'adaptation, nous avons testé différents protocoles de mise en contact des GBR avec la souche adaptée par immersion mais également par aspersion. Les GBR traités ont été observés au MEB afin de mieux comprendre et caractériser le processus de biodéposition de CaCO_3 sur les GBR. Ces essais ont permis de :

- (1) confirmer une formation de CaCO_3 à la surface des GBR traités à des échéances de 3 semaines,
- (2) corriger des erreurs méthodologiques concernant l'évaluation de l'absorption d'eau des granulats traités. En effet un rinçage et une dessiccation après traitement sont nécessaires pour faire des mesures fiables et pertinentes.
- (3) modifier les quantités d'acétate de calcium à introduire dans les milieux et les concentrations bactériennes, pour obtenir les éléments nécessaires pour une production d'un dépôt de CaCO_3 d'une certaine épaisseur autour des GBR.

Malheureusement, une fois encore aucune diminution notable de l'absorption n'a pu être mise en évidence. Cette fois-ci la croissance des bactéries n'a pas été mise en question mais les observations au MEB suggèrent que le dépôt de la couche de CaCO_3 produite par les bactéries se répartit de façon hétérogène sur la surface des GBR, ne permettant pas une imperméabilisation des granulats. Des recherches récentes publiées par d'autres équipes au moment de la fin de cette thèse se sont heurtées à la même difficulté sans pour l'instant la résoudre.

C'est pourquoi nous avons mené une dernière étude ayant pour but d'améliorer l'homogénéité des dépôts formés à la surface des matériaux traités. Pour faciliter la répartition des traitements et l'observation des dépôts formés, nous avons utilisé des disques plans de mortier et non plus des GBR. Quatre traitements différents ont été testés sur ces derniers en calculant la quantité nécessaire d'acétate de calcium et de bactéries à introduire dans les milieux pour avoir une certaine épaisseur de dépôt de CaCO_3 formée à leur surface. Nous avons pu observer que les traitements développés ont tous permis d'obtenir un dépôt de CaCO_3 à la surface des disques. Cependant, le traitement par immersion a conduit au dépôt de CaCO_3 le moins homogène tandis que le traitement par aspersion multiples était celui qui permettait d'obtenir le meilleur recouvrement des surfaces des disques, dès 3 semaines de traitements. Ce travail nous a ainsi permis de mettre en évidence l'importance du stress hydrique dans la production de CaCO_3 . Le maintien des matériaux traités à une humidité relative supérieure à l'humidité relative ambiante est dès lors déconseillé.

Les travaux réalisés tout au long de cette thèse représentent une première étape encourageante pour des études ultérieures. Nous sommes parvenus à sélectionner une souche bactérienne capable de produire des CaCO_3 à un pH de 12 et de maintenir cette production au contact des GBR. Différents protocoles de traitement des matériaux ont été étudiés et des erreurs méthodologiques ont été corrigées. Des dépôts de CaCO_3 ont pu être observés à la surface des matériaux traités pendant les taux d'absorption en eau obtenus après traitement n'ont pas été modifiés de façon notable et ce probablement à cause de l'hétérogénéité des dépôts formés. Bien que les essais réalisés sur disques aient révélé un meilleur recouvrement des surfaces traitées en utilisant le protocole d'aspersion, le dépôt formé n'est pas encore suffisamment homogène pour le rendre efficace. C'est pourquoi des travaux sont encore à mener pour améliorer l'homogénéité des dépôts de CaCO_3 à la surface des matériaux traités. Pour aider à suivre le rendement de production de CaCO_3 à la surface des matériaux formés, une mesure de la masse sèche des matériaux avant et après traitement est à envisager, afin de la comparer à la masse qu'il est possible de former en fonction de la quantité d'acétate de calcium et de bactéries introduites. De même il serait souhaitable d'évaluer les propriétés de façon plus précise de la couche de CaCO_3 formée et en particulier sa porosité. Enfin si un procédé de mise en contact s'avérait finalement efficace, il serait intéressant de travailler avec une source de calcium bon marché issue des déchets de l'industrie agroalimentaire, par exemple, pour diminuer les coûts du traitement.

Annexes

Annexe A : Coloration de Gram

Les bactéries présentent deux types de parois différents, ces derniers pouvant se distinguer au travers d'une coloration développée par le chercheur qui lui donna son nom : la coloration de Gram. Inventée en 1884, cette coloration se déroule en plusieurs étapes prenant en compte les différences entre les propriétés des parois des deux groupes de bactéries considérés. Le procédé débute, après fixation d'un frottis bactérien sur lame de microscope, par une mise en contact avec un colorant : le cristal violet. S'en suit un mordantage par solution iodo-iodurée (le lugol) qui va favoriser la coloration du cytoplasme par le colorant. Le frottis est ensuite soumis à une différenciation par l'éthanol. Sous l'action de la solution, les bactéries dont la paroi est imperméable à l'alcool, vont rester violettes, et seront désignées par la suite comme « bactéries à coloration Gram positif » ou « bactéries Gam + ». Quant aux bactéries qui se décolorent sous l'action de l'alcool, elles seront désignées comme « bactéries à coloration Gram négatif » ou « bactéries Gram - ». Pour mieux distinguer les deux types bactériens présents dans le frottis, une deuxième coloration est appliquée : de la fushine ou de la safranine. Cette dernière coloration accentuera le contraste entre les types bactériens, distinguant les bactéries Gram +, en violet, des bactéries Gram -, en rose.

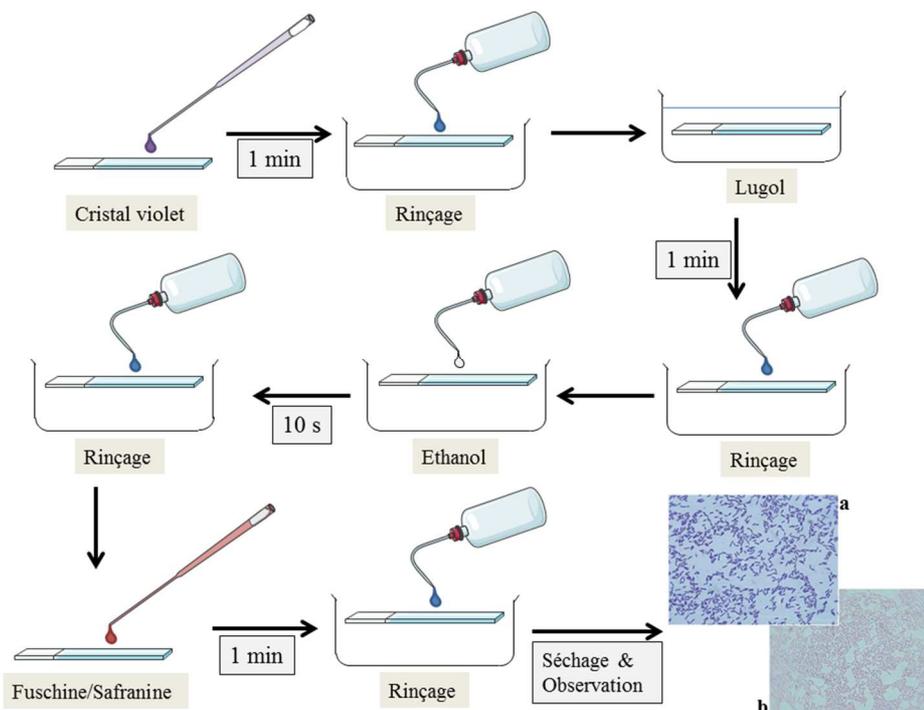


Figure 0-1: Schéma du protocole de coloration de Gram ; a=la souche *Staphylococcus aureus* à coloration Gram positive (violette), b= la souche *Escherichia coli* à coloration Gram négative (rose) (Turgeon 2015)

Annexe B : Granularité d'un sable 0/6,3

Tableau : caractéristiques de sable 0/6,3 déterminées suivant les normes NF EN 12620+A1 (2008) et NF EN 933-1 (2012).

Diamètre en μm	% Passant	Passant net $\alpha(d)$ en %	S_{tot} (m^2) pour 600g de sable
80	0	0,5	0,102479244
90	0,5	0,5	0,091660222
100	1	0,5	0,08216619
112	1,5	0,5	0,073491674
125	2	1	0,131465904
140	3	1,1	0,127820594
160	4,1	1,1	0,112727168
180	5,2	0,9	0,0824942
200	6,1	0,9	0,073949571
224	7	1	0,073491674
250	8	1,8	0,118319313
280	9,8	1,9	0,111263179
315	11,7	1,9	0,098813505
355	13,6	1,9	0,087688287
400	15,5	1,8	0,073785055
450	17,3	1,7	0,062328951
500	19	2,6	0,085452837
560	21,6	2,7	0,079055417
630	24,3	2,8	0,072809951
710	27,1	2,7	0,062304835
800	29,8	2,8	0,057388376
900	32,6	2,4	0,043996907
1 000	35	3,9	0,064089628
1 120	38,9	3,8	0,055853672
1 250	42,7	4	0,052586361
1 400	46,7	4,6	0,053452248
1 600	51,3	4,1	0,04201649
1 800	55,4	3,6	0,03299768
2 000	59	4,1	0,033688138
2 240	63,1	3,9	0,028661753
2 500	67	4,1	0,02695051
2 800	71,1	4,3	0,025180614
3 150	75,4	4,3	0,022363056
3 550	79,7	4,3	0,019845244
4 000	84	4,2	0,017216513
4 500	88,2	3,8	0,013932354
5 000	92	4	0,01314659
5 600	96	4	0,011711914
6 300	100		

Annexe C : Récapitulatif des concentrations bactériennes obtenues dans nos essais de bioproduction de CaCO₃

Tableau 1 : évolution de la concentration de *B.halodurans* dans des milieux contenant 5g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée, dans des tubes Falcon®

Échéance	0 jour	1 jour	2 jours	3 jours	7 jours
Concentration bactérienne (bactéries/mL)	3,4E+06	4,0E+06	4,9E+06	6,8E+07	1,4E+06

Tableau 2 : évolution de la concentration de *M.lactis* dans des milieux contenant 5g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée, dans des tubes Falcon®

Échéance	0 jour	1 jour	2 jours	3 jours	7 jours
Concentration bactérienne (bactéries/mL)	4,5E+07	5,9E+07	1,1E+08	6,2E+08	1,5E+08

Tableau 3 : évolution de la concentration de *B.halodurans* dans des milieux contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée, dans des tubes Falcon®

Échéance	0 jour	1 jour	2 jours	3 jours	7 jours
Concentration bactérienne (bactéries/mL)	7,6E+07	2,7E+08	2,7E+07	2,8E+08	2,7E+08

Tableau 4 : évolution de la concentration de *M.lactis* dans des milieux contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée, dans des tubes Falcon®

Échéance	0 jour	1 jour	2 jours	3 jours	7 jours
Concentration bactérienne (bactéries/mL)	8,3E+08	7,7E+07	3,3E+08	3,6E+09	6,5E+08

Tableau 5 : évolution de la concentration de *B.halodurans* dans des milieux contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée, dans des boîtes de Pétri

Échéance		0 semaine	1 semaine	2 semaines	3 semaines
Milieu avec urée	Concentration bactérienne (bactéries/mL)	7,6E+07	1,0E+09	1,1E+09	1,4E+09
Milieu sans urée	Concentration bactérienne (bactéries/mL)	7,5E+07	9,8E+08	1,2E+09	1,1E+09

Tableau 6 : évolution de la concentration de *M.lactis* dans des milieux contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée, dans des boîtes de Pétri

Échéance		0 semaine	1 semaine	2 semaines	3 semaines
Milieu avec urée	Concentration bactérienne (bactéries/mL)	1,6E+07	6,5E+08	1,0E+09	1,0E+09
Milieu sans urée	Concentration bactérienne (bactéries/mL)	1,3E+07	6,5E+08	2,0E+09	2,0E+09

Tableau 7 : évolution de la concentration de *B.halodurans* dans des milieux à pH 12 contenant 50g/L d'acétate de calcium et 20g/L d'urée, dans des boîtes de Pétri

	Échéance	0 semaine	1 semaine	2 semaines	3 semaines
Milieu sans urée	Concentration bactérienne (bactéries/mL)	2,84E+07	9,52E+07	2,45E+09	1,14E+09
Milieu GBR sans urée	Concentration bactérienne (bactéries/mL)	2,40E+07	1,95E+07	2,40E+07	2,08E+08

Annexe D : Evolution de la surface des disques traités au cours du temps

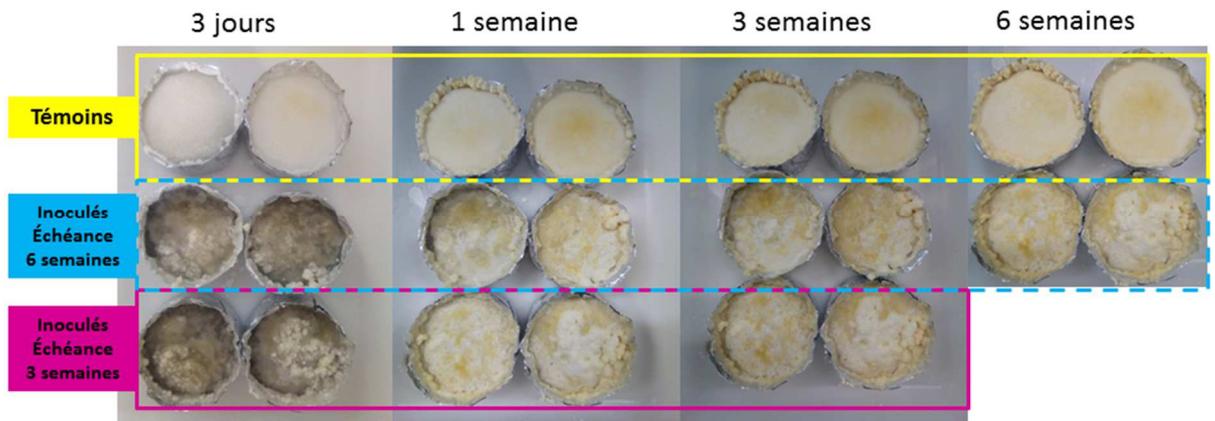


Figure 0-2 : évolution des disques traités par l'aspersion de milieu, au cours du temps.

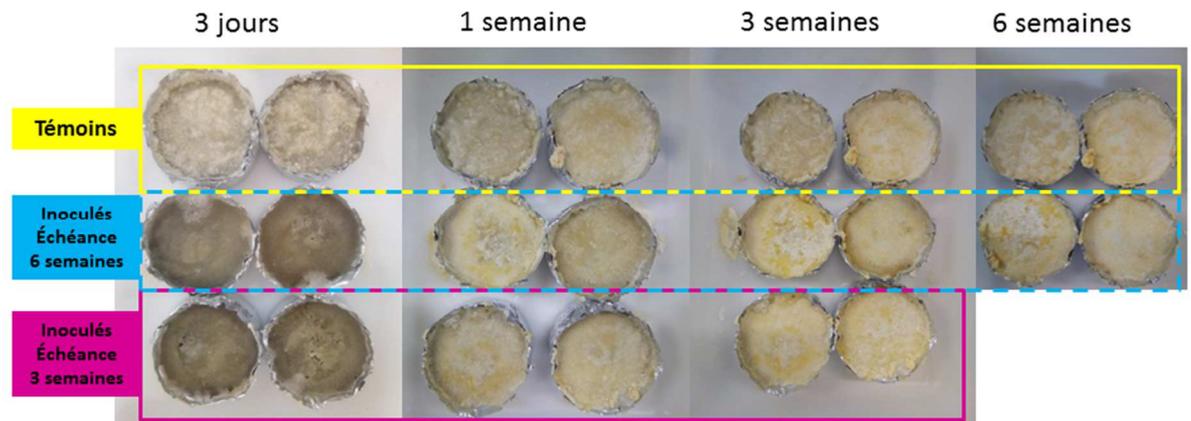


Figure 0-3: évolution des disques traités par l'aspersion de matrice synthétique (agar 0,1%), au cours du temps.

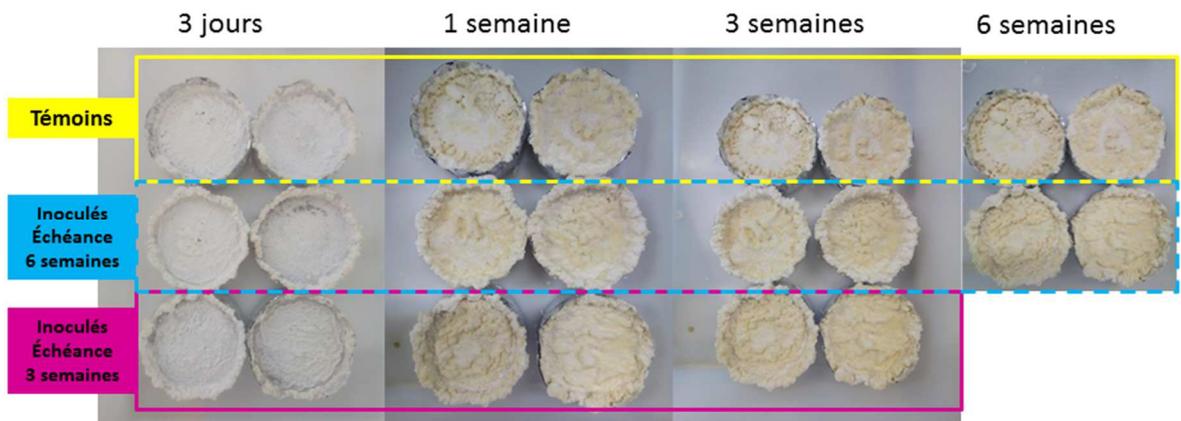


Figure 0-4 : évolution des disques traités par l'étalement de milieu, au cours du temps.