



HAL
open science

Amélioration de granulats de béton recyclé par bioprécipitation

Heriberto Martinez Hernandez

► **To cite this version:**

Heriberto Martinez Hernandez. Amélioration de granulats de béton recyclé par bioprécipitation. Génie civil. École centrale de Nantes, 2022. Français. NNT : 2022ECDN0009 . tel-03717537

HAL Id: tel-03717537

<https://theses.hal.science/tel-03717537v1>

Submitted on 8 Jul 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'ÉCOLE CENTRALE DE NANTES

ÉCOLE DOCTORALE N° 602

Sciences pour l'Ingénieur

Spécialité : Génie Civil

Par

Heriberto MARTINEZ HERNANDEZ

Amélioration de granulats de béton recyclé par bioprécipitation

Thèse présentée et soutenue à l'Université Gustave. Eiffel, Campus de Nantes, le 10 MARS 2022

Unité de recherche : Département MATériaux et Structures, Université Gustave Eiffel, Campus de Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Richard GAGNE Professeur, Université de Sherbrooke, Canada
Eric GARCIA-DIAZ Professeur, IMT Mines, Alès

Composition du Jury :

Président : Mathieu SPERANDIO Professeur des universités, INSA de Toulouse

Examineurs : Sophie SABLE Maître de conférences HDR, Université de La Rochelle
 Benoit HILLOULIN Maître de conférences, École Centrale de Nantes

Dir. de thèse : Ferhat HAMMOUM Directeur de recherche, Université Gustave Eiffel, Campus de Nantes

Co-encadrants : Thierry SEDRAN Ingénieur des TPE, Université Gustave Eiffel, Campus de Nantes
 Marielle GUEGUEN Chargée de recherche, Université Gustave Eiffel, Marne la Vallée

Amélioration de granulats de béton recyclé par bioprécipitation

Résumé :

Les granulats de béton recyclé (GBR) contiennent, de par leur origine, de la pâte de ciment résiduelle qui leur confère une forte porosité et des performances modérées. La porosité conduit à une absorption d'eau forte. C'est une difficulté importante sur le plan industriel car elle complique l'ajustement de l'eau dans les bétons qui permet de maîtriser leur ouvrabilité en production. Le processus de fabrication des GBR conduit à avoir plus de pâte dans les particules les plus fines et donc plus d'absorption. En conséquence, si aujourd'hui l'industrie recycle relativement bien les gravillons de GBR dans les bétons, elle utilise peu les sables de GBR, du fait de leur plus grande porosité. Or, lors de la fabrication des GBR, on obtient environ 50 % de sables et 50 % de gravillons. En conséquence, la porosité des sables de GBR est un frein à l'économie circulaire du béton.

Un certain nombre de techniques ont été proposées pour éliminer ou améliorer la pâte de ciment résiduelle mais elles posent des problèmes de coût. La carbonatation naturelle des GBR par le CO₂ atmosphérique contribue à diminuer leur absorption d'eau en obstruant leur porosité, mais c'est une réaction qui dure plusieurs mois. Des recherches sont en cours pour faire de la carbonatation accélérée (en concentrant le CO₂ par exemple) à l'échelle industrielle. Le présent travail explore une idée alternative qui consiste à former en quelques jours, à l'aide de bactéries biocalcifiantes, une gangue de CaCO₃ autour des GBR et surtout de la partie sableuse, afin de limiter l'accès de l'eau à leur porosité.

Dans un premier temps, des bactéries candidates non pathogènes ont été identifiées, sélectionnées, adaptées au milieu alcalin des GBR, puis nous avons vérifié leur aptitude à produire du CaCO₃. Dans un second temps, nous avons déterminé les conditions qui favorisent une croissance des bactéries et une production de CaCO₃ homogènes sur la surface de milieux gélosés modèles. L'homogénéité est en effet une condition sine qua non pour obtenir une bonne étanchéité à l'eau. Nous avons ainsi confirmé l'intérêt de sélectionner des bactéries capables de produire du biofilm. Enfin, les procédés développés ont été appliqués à des disques de mortier modèles facilitant les observations visuelles. Les résultats préliminaires confirment qu'il est possible de faire baisser l'absorption de ces mortiers de façon notable à l'échéance d'un mois.

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats encourageants sur sable de GBR.

Mots clés : béton, recyclage, sable de béton recyclé, biocarbonatation, absorption d'eau

Martinez Heriberto

Improvement of recycled concrete aggregates by bioprecipitation

Abstract:

Recycled concrete aggregates (RCA) contain, due to their origin, residual cement paste which gives them high porosity and moderate performance. The porosity leads to a strong water absorption. This is a major difficulty on the industrial level because it complicates the adjustment of water in concrete batches, which allows to control their workability in production. The RCA manufacturing process results in having more paste in the finer particles and therefore more absorption. As a result, while the industry today recycles coarse RCA into concrete relatively well, it uses small amounts of RCA sand because of their greater porosity. Yet, during the manufacture of RCA, about 50% sand and 50% coarse aggregates are obtained. Consequently, the porosity of RCA sand hinders the circular economy of concrete.

Several techniques have been proposed for removing or improving the residual cement paste, but they are expensive. The natural carbonation of RCA by atmospheric CO₂ helps with decreasing their water absorption by obstructing their porosity, but this is a several month reactions. Research is ongoing to make accelerated carbonation (by concentrating CO₂, for example) on an industrial scale. The present work explores an alternative idea, which consists in forming in a few days, using biocalcifying bacteria, a matrix of CaCO₃ around the RCA and especially the sand part, in order to limit the access of water to their porosity.

First, candidate non-pathogenic bacteria were identified, selected, adapted to the alkaline medium of RCA, then we checked their ability to produce CaCO₃. In a second step, we determined the conditions, which favor uniform bacterial colonization and production of CaCO₃ on the surface of model agar media. Homogeneity is indeed mandatory to obtain good water tightness. We thus confirmed the value of selecting bacteria capable of producing biofilm. Finally, the methods developed were applied to model mortar disks facilitating visual observations. Preliminary results confirm that it is possible to significantly lower the absorption of these mortars within one month.

Further work is needed to confirm these encouraging results on sand part of RCA

Keywords: concrete, recycling, recycled concrete sand, biocarbonation, water absorption

Remerciements

D'abord, je voudrais remercier Ferhat Hammoum, Thierry Sedran, Marielle Guéguen-Minerbe et Yoan Pechaud de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet multidisciplinaire. Je remercie votre suivi, votre support moral en temps difficiles, et votre encadrement. Je remercie aussi Dominique Grizeau et Mathieu Sperandio d'avoir suivi l'avancée de cette investigation, ainsi que mon développement professionnel en tant que doctorant.

Je tiens à remercier tous ceux avec qui j'ai travaillé au laboratoire : Issam Nour, pour son soutien moral et pour son aide dans la réalisation des différentes expériences, Fadila Idjer, pour sa disponibilité et pour son assistance dans la mise en place des différentes manipulations, Julien Vincent pour son soutien dans la réalisation des analyses XRD et ATG, Tony Pons qui était toujours disponible pour discuter et résoudre tout doute, ainsi que sa disponibilité pour réaliser des observations au MEB, Sandrine Moscardelli et Béatrice Desrues, qui m'ont apporté un soutien technique lorsque j'en avais besoin, Mickaël Saillio, pour son soutien dans l'interprétation des données et pour sa pédagogie lors des explications, et de manière générale, je tiens à remercier toute l'équipe de CPDM pour son accueil, et soutien.

Un grand merci à tous ceux que j'ai rencontrés pendant mon séjour au laboratoire, Raphaël Pellet, mon collègue avec qui j'ai partagé un bureau et dont les conversations ont été enrichissantes, Lucy Travailleur et Mehdi Mejdi, qui m'ont accueilli à bras ouverts à mon arrivée au laboratoire, Julie Lewi et Amélie Arnault pour leur camaraderie et leur positivité, Lara Alam avec qui j'ai partagé le bureau pendant mes derniers mois au laboratoire et que je remercie pour sa camaraderie et son soutien, Marie Sereng pour sa camaraderie et pour sa disponibilité à répondre toutes mes questions sur le béton.

Et enfin, je remercie à ma famille au Mexique (Martinez) et en France (Baille), pour leur soutien inconditionnel à tout moment depuis mon arrivé en France. Je remercie spécialement à mon épouse Estelle Martinez, pour son amour, sa compréhension et son aide, au cours de ces trois années de thèse.

Table des matières

Introduction	27
1. Références	31
Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique	33
1. La production des granulats de béton recyclé (GBR)	34
2. Propriétés physiques de GBR	35
2.1. Morphologie et texture des GBR	35
2.2. Distribution granulométrique	36
2.3. Porosité et absorption d'eau	36
2.4. Propriétés mécaniques	40
2.5. Propriétés chimiques	41
2.6. Contaminants dans les GBR	41
2.7. Conséquences sur la formulation des bétons incorporant des GBR	42
3. Amélioration de la qualité des GBR	43
3.1. Traitement thermique, mécanique et chimique	43
3.2. Carbonatation	45
3.2.1. Carbonate de calcium	45
3.2.2. Carbonatation du béton	46
3.2.3. Carbonatation accélérée	47
4. La bioprécipitation	49
4.1.1. Rôle des sites de nucléation de la paroi cellulaire dans la bioprécipitation	50
4.2. Influence des paramètres environnementaux	51
4.2.1. Humidité relative :	51
4.2.2. Le pH	52
4.2.3. Moteur d'alcalinité	52
4.2.4. La température	53
4.3. Conclusion	54
5. Biofilm	55

5.1.	Formation du biofilm bactérien -----	55
5.1.1.	Adhésion-----	56
5.1.2.	Colonisation-----	57
5.1.3.	Maturation -----	57
5.1.4.	Dispersion -----	57
5.2.	Formation d'un biofilm uniforme -----	58
5.3.	Formation de CaCO ₃ à travers du Biofilm -----	59
5.4.	Conclusion -----	59
6.	Application de la bioprécipitation -----	61
6.1.	Application sur les matériaux cimentaires, roches et sables-----	61
6.2.	Bioprécipitation sure de gravillons recyclés (GBR)-----	66
7.	Conclusion de la bibliographie et plan de travail -----	71
8.	Références -----	74
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes -----		89
1.	Milieu de culture-----	90
1.1.	Milieu nutritif à pH 11 -----	90
1.2.	Milieu MSgg (Minimum Salts glycerol-glutamate) à pH 11 -----	90
1.3.	Milieu nutritif-MSgg pH 11 -----	91
2.	Milieu gélosé -----	91
3.	Coloration Gram -----	92
4.	Mise en culture et dénombrement des microorganismes. -----	92
4.1.	Mise en culture -----	92
4.2.	Conservation des souches bactériennes à -20°C -----	93
4.3.	Dénombrement sur milieu gélosé -----	93
5.	Développement bactérien-----	94
5.1.	Suivi de la croissance bactérienne par densité optique -----	94
5.2.	Par analyse d'image sur Gélose-----	96
5.2.1.	Mise en place d'un mini studio-----	96
5.2.2.	Analyse d'image, logiciel Image J : estimation de la taille des colonies et recouvrement de la biomasse -----	97

6.	Analyse qualitative et quantitative du CaCO ₃ bioprécipité	99
6.1.	Analyse qualitative	99
6.1.1.	Microscopie RAMAN	99
6.1.2.	Diffraction des rayons X (DRX)	101
6.2.	Quantification du CaCO ₃ par Analyse Thermogravimétrique (ATG)	102
6.3.	Calcul du rendement de formation du CaCO ₃	104
7.	Mortiers	105
7.1.	Fabrication des mortiers	105
7.2.	Observations des mortiers au MEB	105
8.	Références	105

Chapitre 3 : Isolement, sélection et identification de microorganismes présents à la surface de gravillon de béton recyclé 107

1.	Étude génomique de la capacité de <i>B. halodurans</i> à former un biofilm	108
1.1.	Méthodologie spécifique	109
1.2.	Résultat	109
1.3.	Discussion et conclusion	110
2.	Isolement de souches bactériennes	110
2.1.	Méthodologie spécifique	111
2.2.	Résultats	112
2.3.	Discussion	114
3.	Croissance à pH alcalin en milieu nutritif	116
3.1.	Méthodologie spécifique	116
3.2.	Résultats	116
3.3.	Discussion et conclusion	118
4.	Capacité à former un biofilm sur milieu MSgg	119
4.1.	Méthodologie spécifique	120
4.2.	Résultats et discussion	120
4.3.	Conclusion	123
5.	Identification de trois souches	124
5.1.	Observation microscopique et coloration Gram	124

5.1.1.	Résultats et discussion -----	124
5.1.2.	Conclusion-----	127
5.2.	Identification phylogénétique -----	127
5.2.1.	Résultats et discussion -----	128
6.	Développement en suspension et gélose nutritive.-----	130
6.1.	Développement en suspension-----	131
6.1.1.	Résultats-----	131
6.1.2.	Discussion et conclusion-----	132
6.2.	Développement sur gélose : Cinétique de croissance sur culture nutritive, MSgg et nutritive-MSgg-----	133
6.2.1.	Méthodologie spécifique -----	133
6.2.2.	Résultats et discussion -----	134
6.2.3.	Conclusion-----	136
6.3.	Cinétique de croissance sur gélose, modifiée-----	137
6.3.1.	Méthodologie spécifique -----	137
6.3.2.	Résultats et discussion -----	137
6.3.3.	Conclusion-----	141
7.	Conclusion du Chapitre-----	141
8.	Références -----	142
Chapitre 4 : Essais de bioprécipitation ; production de CaCO ₃ -----		149
1.	Production de CaCO ₃ en milieu liquide -----	150
1.1.	Matériels et Méthodes spécifiques-----	150
1.2.	Résultats-----	150
1.3.	Discussion et conclusion -----	150
2.	Production de CaCO ₃ sur gélose-----	152
2.1.	Création d'un protocole d'extraction de CaCO ₃ -----	152
2.2.	Production de CaCO ₃ sur gélose nutritive à pH 11-----	153
2.2.1.	Matériels et Méthodes spécifiques -----	154
2.2.2.	Résultats-----	155
2.2.3.	Discussion et conclusion-----	164
2.3.	Production de CaCO ₃ sur gélose nutritive-MSgg -----	166

2.3.1.	Matériels et méthodes spécifiques -----	166
2.3.2.	Discussion et conclusion-----	176
3.	Conclusion du Chapitre -----	178
4.	Références -----	179
Chapitre 5 : Suivi de la formation de CaCO ₃ -----		181
1.	Cartographie de CaCO ₃ de B.H par épifluorescence -----	183
1.1.	Matériels et méthodes spécifiques-----	183
1.2.	Résultats et discussion-----	183
1.3.	Conclusion -----	188
2.	Évaluation de l'efficacité de la cartographie de CaCO ₃ par épifluorescence ----	189
2.1.	Matériels et méthodes spécifiques-----	189
2.2.	Résultats et discussion-----	190
2.3.	Conclusion -----	194
3.	Application d'un marqueur fluorescent pour suivre la précipitation de CaCO ₃ -	195
3.1.	Matériels et méthodes spécifiques-----	196
3.2.	Résultats et discussion-----	196
3.3.	Conclusion -----	199
4.	Marquage des CaCO ₃ avec une faible concentration de calcéine-----	200
4.1.	Matériels et méthodes spécifiques-----	200
4.2.	Résultats et discussion-----	201
4.3.	Conclusion -----	203
5.	Conclusion du chapitre-----	204
6.	Références -----	205
Chapitre 6 : Optimisation des méthodologies de la bioprécipitation sur gélose-----		207
1.	Amélioration du processus d'extraction-----	208
2.	Capacité de bioprécipitation par un tapis de biomasse établi-----	209
2.1.	Méthodologie spécifique-----	210
2.2.	Résultats et discussion-----	211
2.3.	Conclusion -----	215

3.	Cinétique de production de CaCO ₃ par un tapis de biomasse installé-----	216
3.1.	Méthodologie spécifique-----	216
3.2.	Résultats-----	216
3.3.	Discussion et conclusion -----	219
4.	Effet de la concentration d'acétate de calcium sur la quantité de CaCO ₃ précipité 220	
4.1.	Méthodologie spécifique-----	221
4.2.	Résultats et discussion-----	221
5.	Conclusions du chapitre -----	224
6.	Références -----	226
Chapitre 7 : Application de la biocarbonatation à la surface de mortier modèle -----		227
1.	Développement d'un biofilm à la surface des mortiers -----	228
1.1.	Test de survie –immersion des mortiers avant inoculation -----	228
1.1.1.	Matériel et Méthodes spécifiques -----	228
1.1.2.	Résultats -----	230
1.1.3.	Discussion et conclusion -----	236
1.2.	Ensemencement répété de B.H sur mortier-----	237
1.2.1.	Matériel et Méthodes spécifiques -----	237
1.2.2.	Résultats -----	238
1.3.	Optimisation de la technique d'inoculation de B.H sur les mortiers -----	241
1.3.1.	Matériel et Méthodes spécifiques -----	241
1.3.2.	Résultats -----	242
1.3.3.	Discussion et conclusion -----	244
2.	Précipitation de CaCO ₃ à la surface des mortiers -----	244
2.1.	Essai préliminaire d'une couche de carbonate de calcium sur mortier-----	244
2.1.1.	Matériel et Méthodes spécifiques -----	245
2.1.2.	Résultats -----	246
2.1.3.	Conclusion-----	250
2.2.	Essai d'application de multicouches de CaCO ₃ sur gélose -----	250
2.2.1.	Matériel et Méthodes spécifiques -----	250
2.2.2.	Résultats et discussion -----	251

2.3.	Estimation de l'efficacité du traitement de bioprécipitation sur mortier modèle ----	252
2.3.1.	Matériel et Méthodes spécifiques -----	252
2.3.1.1.	Disques de mortier résinés pour l'analyse d'absorption d'eau -----	252
2.3.1.2.	Application du traitement de bioprécipitation -----	255
2.3.2.	Résultats et discussion -----	257
2.3.3.	Conclusion-----	268
3.	Conclusions du chapitre -----	269
4.	Références -----	271
	Conclusion générale et Perspectives -----	273
1.	Références -----	280
	Annexes -----	281

Liste des annexes

Annexe A : Analyse Thermogravimétrique de l'acétate de calcium seul et de la gélose nutritive seule.....	282
Annexe B : Séquences génétiques des protéines TAS A et TAP A de la bactérie <i>Bacillus subtilis</i> str. 168.....	284
Annexe C: Séquences de ARN ribosomique 16S des bactéries B.H (A2-3), A1-5 et B1-6 ..	285
Annexe D: diagrammes DVS de CaCO ₃ bioprécipité B.H de la pâte de ciment CEM I.....	288
Annexe E :Sommaire des inoculations par manipulation	290

Liste des figures

Figure 1. Granulat de béton recyclé, schéma extrait de [10].	35
Figure 2. GBR avant et après le traitement avec 33 % HCl. Extrait et modifié de [19]	36
Figure 3. Densité en condition saturée surface sèche de SBR comparée à celle de sables naturels. Extrait et modifié de [7].	40
Figure 4. Principales morphologies de CaCO_3 .	45
Figure 5. Membrane cellulaire des bactéries Gram + et Gram -, attirant des ions calcium. Modifié de [74].	51
Figure 6. Prédominance acide-base des espèces $\text{H}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$, $\text{HCO}_3^-_{(\text{aq})}$ et $\text{CO}_3^{2-}_{(\text{aq})}$, modifié de [10].	52
Figure 7. Saturation des ions, causée par la présence de la couche de limite hydrodynamique. Figure modifiée de [80].	53
Figure 8. Support formateur de biofilm utilisé dans des bioréacteurs à lit fluidisé pour le traitement d'eaux résiduelles [84].	55
Figure 9. Formation d'un biofilm microbien. Image originale modifiée, extraite de [88]	56
Figure 10. Illustration de la formation de CaCO_3 à travers la matrice d'EPS. Extrait et modifié de [114].	59
Figure 11. Précipitation de CaCO_3 dans les pores et les microfissures de gravillons recyclés, avant et après d'être traités par bioprécipitation. Modifiée de [132].	66
Figure 12. Schéma de la microplaque utilisée pour effectuer la lecture de la densité optique à 600 nm.	95
Figure 13. Mini Studio pour la prise de photographies	97
Figure 14. Obtention de la taille des cellules bactériennes avec le logiciel Image J.	98
Figure 15. Comptage des unités formatrices de colonies sur gélose avec le logiciel Image J.	99
Figure 16. Spectres RAMAN de référence de la calcite (C), de la vaterite (V) et de l'aragonite (A).	100
Figure 17. Spectre RAMAN de référence de l'acétate de calcium (CA).	101

Figure 18. Diffractogramme montrant les pics d'intensité représentatifs de la calcite, la vatérite et l'aragonite. [9] modifié par Medevielle M. [10].....	102
Figure 19. Graphique obtenu lors des analyses quantitatives de CaCO ₃ produit par bioprécipitation.....	104
Figure 20. Biofilm produit par <i>B. subtilis</i> str 18 dans un milieu MSgg (Minimum Salts glycérol-glutamate) d'après [2]	108
Figure 21. Résumé des étapes de recherche des séquences des protéines TAS A et TAP A de <i>B. subtilis</i> dans le génome de <i>B. halodurans</i> , à l'aide des outils NCBI.	109
Figure 22. Techniques utilisées pour l'isolement du microbiote présent à la surface des GBR.	112
Figure 23. Boîtes de Petri correspondant aux trois techniques d'isolement utilisées de l'échantillon GBR-A. A) Technique (1) de contact direct. B) Boîte correspondant à la technique (2) de lavage et de distribution. C) Boîte de Petri correspondant à la technique (3) d'isolement par « streak ».	113
Figure 24. Boîtes de Petri correspondant aux trois techniques d'isolement utilisées de l'échantillon GBR-B. A) Technique (1) de contact direct. B) Boîte correspondant à la technique (2) de lavage et de distribution. C) Boîte de Petri correspondant à la technique (3) d'isolement par « streak ».	114
Figure 25. Formation de floccs lors de la croissance des microorganismes A1-5, A2-3 et B3-6 dans de bouillon nutritif à pH 11.....	118
Figure 26. A) Répartition de l'inoculation des différentes bactéries à la surface de la gélose MSgg B) Répartition du consortium bactérien (composé de A1-5, A2-3, B1-6 et <i>B. halodurans</i> C-125) à la surface de la gélose MSgg.....	120
Figure 27. Développement de A1-5, A2-3 et B1-6, <i>B. halodurans</i> C-125 et du consortium, sur le milieu MSgg après 10 j d'incubation à 30 °C ± 1.	122
Figure 28. Biofilm formé par <i>B. subtilis</i> . A- croissance de la souche sur une gélose avec 5 g·L ⁻¹ de peptone, et B- croissance de la souche en présence de 0.25 g·L ⁻¹ [25].....	122
Figure 29. Observations microscopiques des souches, A1-5, A2-3 et B1-6 après 4 jours d'incubation dans BN à pH 11 et la coloration Gram.	125

Figure 30. Morphologie des bactéries, bacille et coccobacille [33].....	126
Figure 31. Développement de B.H sur les milieux géloses nutritives, MSgg et nutritive-MSgg.	135
Figure 32. Pourcentage approximatif de la couverture de surface des géloses par la biomasse de B.H.	136
Figure 33. Développement de B.H sur les géloses nutritive, MSgg et nutritive-MSgg.....	139
Figure 34. Pourcentage de la couverture de surface des géloses nutritives et nutritives-MSgg par la biomasse.	140
Figure 35. Gélose nutritive liquéfiée contenant de l'acétate de calcium après autoclavage et solution d'acétate de calcium après autoclavage.....	153
Figure 36. Processus d'inoculation des géloses nutritives avec B.H.	155
Figure 37. Géloses nutritives à pH 11 témoin avec et sans acétate de calcium après 17 jours d'incubation à 30°C.....	156
Figure 38. Cinétique de bioprécipitation des géloses des conditions 1 (ensemencé avec la dilution 10^{-3} ; $48 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) et 2 (ensemencée avec la dilution 10^{-4} ; $4.8 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$), montrant le développement de la biomasse et des formations de CaCO_3 pendant 17 jours d'incubation à 30°C.....	157
Figure 39. Photographies microscopiques de la surface des géloses des deux conditions. ...	161
Figure 40. Photographie des cristaux produits par B.H extraits par autoclavage au 17ème jour d'incubation.....	162
Figure 41. Résultats DRX des cristaux produits par B.H dans la gélose nutritive.....	163
Figure 42. Quantité de carbonates produits par condition en fonction du temps pour la condition 1 ($48 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) et pour la condition 2 ($4.8 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$).....	164
Figure 43. Méthodologie cinétique de bioprécipitation sur Gélose nutritive-MSgg.....	167
Figure 44. Géloses nutritives-MSgg, contrôles.	168
Figure 45. Cinétique de bioprécipitation des géloses nutritives-MSgg des conditions 1 (65 $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) et 2 ($6.5 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$), montrant le développement de la biomasse et des formations de CaCO_3 pendant 17 jours d'incubation à 30°C..	169

Figure 46. Observation de la biomasse présente à la surface des géloses nutritive-MSgg aux 3e et 17e jours	170
Figure 47. Cristaux formés dans les géloses nutritives –MSgg des conditions 1 et 2	174
Figure 48. Diffractogrammes des échantillons extraits des géloses des conditions 1 et 2.....	175
Figure 49. Quantité de carbonates produits par condition en fonction du temps pour la condition 1 (65 UFC. cm ⁻²) et pour la condition 2 (6.5 UFC. cm ⁻²).....	176
Figure 50. (A et B) Observation microscopique polarisée et lumineuse de CaCO ₃ ; produit par <i>Geobacillus thermoglucosidaseus</i> . (C à E) Image microscopique de fluorescence de cristaux excités à (C) 480 ±20 nm, (D) 365 ±5 nm, et (E) 545 ±15 nm [2].....	182
Figure 51. Gélose A avec B.H seule (A), observée avec les filtres UV, DAPI (B), GFP (C) et AF 456 (D).	184
Figure 52. Observations microscopiques 10 X de la gélose inoculée avec B.H et 1 ml d'une solution d'acétate de calcium (50 g · L ⁻¹). Photographie lumière blanche (A), DAPI (B), GFP (C) et AF 546 (D).	186
Figure 53. Analyse RAMAN des précipitants de la gélose B.	187
Figure 54. Images MEB de la biomasse (A et B), et d'un cristal précipité à la surface de la gélose (C et D).....	188
Figure 55. Colonie de B.H observé en lumière blanche et par épifluorescence avec le filtre GFP.	192
Figure 56. Zone de la gélose analysée par microscopie RAMAN, vue en lumière blanche et avec le filtre GFP.....	193
Figure 57. Molécule de fluorexon ou calcéine.	195
Figure 58. Précipités formés à partir de l'interaction de B.H avec une solution d'acétate de calcium avec de la calcéine.	197
Figure 59. (A) Observation de la fluorescence des cristaux avec la calcéine à l'extérieur de la gélose et (B) observation de la surface de la gélose où le colorant violet de gentiane a été placé.	198
Figure 60. Analyse RAMAN des précipités formés en présence de calcéine.....	199

Figure 61. Colonie de B.H observé en lumière blanche et par épifluorescence avec le filtre GFP.	202
Figure 62. Étapes de la première méthodologie d'extraction et de la deuxième méthodologie d'extraction améliorée, diminuant le risque de perte de CaCO ₃	209
Figure 63. Les colonies carbonatées après 15 jours d'incubation avec 0,026 g.cm ⁻² d'acétate de calcium.	210
Figure 64. Taux de recouvrement moyen de la gélose après 3 jours d'incubation	212
Figure 65. Suivi photographique de la bioprécipitation de CaCO ₃ par B.H à différentes concentrations cellulaires, en présence d'acétate de calcium (0.026 g.cm ⁻²)	214
Figure 66. Quantité de CaCO ₃ produit par condition après 15 jours d'incubation avec 0,026g cm-2 d'acétate de calcium.	215
Figure 67. Suivi photographique de la cinétique de la bioprécipitation de B.H avec 0.026 g.cm- ² d'acétate de calcium.....	218
Figure 68. Quantité moyenne de CaCO ₃ produit et Rp au cours de l'incubation à 30°C.	219
Figure 69. Suivi photographique de la bioprécipitation sur gélose nutritive à différentes quantités d'acétate de calcium par cm ²	222
Figure 70. Quantité moyenne de CaCO ₃ produit par condition, avec Rp et la masse idéale formable de CaCO ₃	223
Figure 71. Protocole de formation de biofilm à la surface des échantillons de mortiers.	229
Figure 72. Suivi macroscopique et microscopique des mortiers préconditionnés par immersion dans du bouillon nutritif (condition A). La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.	231
Figure 73. Suivi macroscopique et microscopique des mortiers préconditionnés par ajout de 3 mL de bouillon nutritif (condition B). La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.	232
Figure 74. Mortiers préconditionnés par immersion dans du bouillon nutritif (condition A) traités avec du colorant violet de gentiane.	234

Figure 75. Mortiers préconditionnés par ajout de 3 mL de bouillon nutritif (condition B) traités avec du colorant violet de gentiane.	235
Figure 76. Suivi photographique de la rétention d'humidité. Les photos ont été prises 6 minutes après avoir la sortie des mortiers de l'incubateur. La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.....	240
Figure 77. Suivi photographique de la rétention d'humidité d'un des mortiers des conditions A, B et C. La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm	243
Figure 78. Comparaison de la surface d'un mortier non traité et de celle du mortier A traité avec B.H et de l'acétate de calcium.	246
Figure 79. Images MEB à différentes amplitudes de la surface du mortier A, avant et après avoir été lavée avec de l'eau distillée et une brosse à dents.....	249
Figure 80. Quantité de CaCO ₃ produite en moyenne par gelose de 13,5 cm de diamètre, lors des 4 traitements de bioprécipitation. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type observé sur les 4 triplicats respectivement.	252
Figure 81. Couche de résine appliquée sur différentes surfaces du mortier. Observé au microscope optique 5X.....	254
Figure 82. Rétention d'humidité des mortiers X5 (avant d'ajouter l'acétate de calcium dans le 1e cycle) et Y5 (avant d'ajouter l'acétate de calcium dans le 2e cycle). La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.	258
Figure 83. Photographies à 6 minutes des mortiers témoins des conditions X et Y, après l'application du 1e et du 2e cycle de traitement. La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.....	259
Figure 84. Photographie des mortiers X5 (issue de 1 cycle de traitement) et Y5 (issue de 2 cycles de traitement), avant et après le lavage de leurs surfaces.....	260
Figure 85. Photographies des mortiers X5 (issue de 1 cycle de traitement) et Y5 (issue de 2 cycles de traitement), prises avec le microscope optique (5X) avant et après le lavage de leur surface.	261

Figure 86. Photographies latérales des mortiers X5 (issue de 1 cycle de traitement) et Y5 (issue de 2 cycles de traitement), prises avec le MEB. La ligne pointillée délimite la surface du mortier et la couche de CaCO ₃ précipitée.	262
Figure 87. Quantité d'eau absorbée sur l'ensemble des disques en fonction de l'épaisseur des disques.	263
Figure 88. Résultats d'absorption moyenne avant et après traitement (données du Tableau 18). Les barres d'erreur représentent l'écart type (en + et en -)	266

Liste des tableaux

Tableau 1. Méthodes utilisées pour mesurer l'absorption d'eau du SBR, extrait et modifié de [7].	38
Tableau 2. Composition chimique du SBR des différentes analyses expérimentales.	41
Tableau 3. Techniques employées pour améliorer la qualité des GBR.	44
Tableau 4. Études dans lesquelles l'analyse ou l'application de la bioprécipitation sur différents matériaux de construction est réalisée.	62
Tableau 5. Application de la bioprécipitation sur des gravillons recyclés.	67
Tableau 6. Composition du milieu MSgg pour la préparation de 1 L de milieu.	91
Tableau 7. Dilution de la suspension mère utilisée pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage.	95
Tableau 8. Liste des microorganismes isolés par type d'échantillon, technique d'isolement et ensemencement sur boîte de Petri.	115
Tableau 9. Suivi de croissance des microorganismes isolés à partir du GBR- A et GBR-B aux différents pH.	117
Tableau 10. Taille moyenne des bactéries à pH11.	126
Tableau 11. Valeurs acquises à partir de l'analyse du développement de B.H en suspension à pH 11.	131
Tableau 12. Résumé des résultats des analyses qualitatives et quantitatives de précipitation de CaCO ₃ par B.H sur les milieux nutritives et nutritives-MSgg.	178
Tableau 13. Quantité de cellules bactériennes, inoculées par cm ² dans chaque condition.	211
Tableau 14. Concentration cellulaire ajoutée à la surface des mortiers en 4 échéances.	238
Tableau 15. Résultats obtenus par l'opérateur 1 avant tout traitement des disques de mortiers de 60 mm de diamètre. M ₁ est la masse du disque sec avec seulement la tranche résinée, M ₂ est la masse du disque entièrement résiné sec, h est la hauteur du disque et M _m la masse du disque seul sec (hors résine), M ₃ est la masse du disque entièrement résiné saturé surface sèche.	263

Tableau 16. Résultats obtenus par l'opérateur 1 après traitement des disques de mortiers de 60 mm de diamètre. M_m est la masse du disque seul sec (hors résine), h est la hauteur du disque, M_2 est la masse du disque entièrement résiné sec et M_3 est la masse du disque entièrement résiné saturé surface sèche 264

Tableau 17. Résultats obtenus par l'opérateur 2 après traitement des disques de mortiers de 60 mm de diamètre. M_m est la masse du disque seul sec (hors résine), h est la hauteur du disque, M_2 est la masse du disque entièrement résiné sec et M_3 est la masse du disque entièrement résiné saturé surface sèche 265

Tableau 18. Synthèse des absorptions moyennes suivant les conditions 265

Introduction

Le béton fait partie des substances les plus consommées au monde avec une production d'environ 25 gigatonnes par an [1]. En tant que brique de base du développement humain, divers problèmes écologiques lui sont attribués: (i) lors de sa production où d'énormes quantités de CO₂ sont générées [2] du fait de l'utilisation du ciment qui représente environ 6% des émissions mondiales de CO₂ [3], et (ii) après son utilisation lors de son enfouissement dans des centres de stockages de déchets inertes induisant une perturbation et une occupation des sols [4]. L'industrie de la construction et de la démolition produit 46 % de la quantité totale des déchets produits en Europe, ce qui représente 820 millions de tonnes de résidus dont environ 85 % correspondent aux matériaux à base de béton, céramiques et maçonnerie [5],[6]. L'énorme quantité de déchets produite par cette industrie est une préoccupation importante pour la logistique et l'occupation de sols [5].

Pour diminuer ces effets, il faut passer d'une économie linéaire à une économie circulaire basée sur le concept des « 3 R (recycler, réutiliser et récupérer) » en considérant les déchets comme une source des produits lucratifs.

Les déchets inertes à base du béton peuvent ainsi être utilisés pour produire après tri, concassage et criblage des granulats de béton recyclé (GBR). Ces granulats sont, en général, utilisés dans les structures routières comme matériau lié ou non lié. Toutefois, dans l'objectif d'améliorer la circularité du béton, de valoriser de façon plus noble les GBR et de rapprocher la ressource (les sites de démolition urbains) des sites de construction, on cherche à développer depuis quelque temps le recyclage des GBR dans la fabrication de nouveaux bétons, en remplacement plus ou moins important des granulats naturels. En témoigne, par exemple, le récent Projet National Recybéton qui s'est déroulé de 2012 à 2018 (<https://www.pnrecybeton.fr/>) dont l'objectif principal était de fournir des éléments scientifiques et techniques et proposer des recommandations [7], pour augmenter les taux de recyclage autorisés dans la norme béton EN 206/CN.

Les GBR sont par essence composés des granulats naturels et de la pâte de ciment du béton d'origine. La pâte de ciment étant nettement plus poreuse que les granulats naturels, les GBR présentent généralement des absorptions plus fortes, une texture plus rugueuse et des performances mécaniques plus faibles que les granulats naturels. Ainsi le recyclage conduit, si rien n'est changé dans la formulation, à diminuer l'ouvrabilité, les performances mécaniques et la durabilité des bétons. Toutefois, comme le montrent les résultats du PN Recybéton [7], il est

possible de faire des bétons répondant aux spécifications d'ouvrabilité de résistance et de durabilité en modifiant la formulation pour des taux de recyclage allant jusqu'à 100% de l'ensemble des granulats naturels (sable et gravillons). Mais plus le taux de recyclage est important plus la teneur en ciment du béton doit être augmentée, réduisant de fait l'intérêt du recyclage. Un équilibre économique et environnemental doit alors être trouvé et conduit souvent à un taux de recyclage intermédiaire.

La présence de pâte de ciment est donc le principal frein technique au recyclage des granulats de béton recyclé. On constate par ailleurs que le concassage et le criblage conduisent à une augmentation notable de la teneur en pâte lorsque la taille des grains diminue [8]. Ainsi les sables de béton recyclé (SBR) contiennent plus de pâte que les gravillons de béton. C'est la raison pour laquelle, dans la pratique, ce sont essentiellement les gravillons qui sont recyclés dans les bétons et que les SBR ont un débouché très limité dans les bétons.

Dans ce contexte, différentes techniques chimiques, mécaniques et biotechnologiques ont été étudiées ou sont en cours d'expérimentation pour éliminer cette couche ou au moins en diminuer la porosité.

Parmi elles, la carbonatation naturelle, qui consiste en une fixation du dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique par les ions calcium (Ca^{2+}) de la pâte des GBR, est l'une des plus attractives. Cette interaction permet la formation de carbonate de calcium (CaCO_3), minéral qui peut boucher les pores de gravillons et ainsi diminuer leurs porosités. Malheureusement, ce processus est lent (de quelques mois à plusieurs années) et présente des problèmes logistiques pour le transport et le stockage de gravillons, générant ainsi des problèmes de rentabilité. C'est pourquoi des approches permettant de réaliser une carbonatation accélérée efficace et rentable sont développées.

Une façon d'accélérer la carbonatation naturelle consiste à exposer les granulats à des pressions entre 1 et 1.5 bar, et à des concentrations de 3% en dioxyde du carbone (CO_2)[9]. Cette technique a donné des résultats encourageants au niveau laboratoire mais sa faisabilité industrielle reste à prouver [10]. Ainsi dans le projet national FastCarb (<https://fastcarb.fr/>), on cherche à capter le CO_2 issu de la fabrication des ciments pour carbonater de façon accélérée les gravillons recyclés. Ceci permettrait non seulement de faciliter le recyclage de GBR mais également de diminuer l'impact CO_2 de la filière-ciment et donc celle du béton.

Afin d'explorer de nouvelles solutions pour améliorer la qualité des gravillons de façon rentable, efficace et efficiente, la présente étude propose d'étudier la « biocarbonatation » comme alternative. Ce procédé utilise des microorganismes pour précipiter du CaCO_3 . L'objectif est donc de traiter la surface des GBR pour former une gangue de CaCO_3 autour des GBR afin de diminuer leur porosité. Cette technologie est déjà utilisée pour la fabrication de bétons auto cicatrisants [11] et pour la restauration des monuments [12]. Elle pourrait offrir une alternative écologique aux traitements chimiques, thermiques et mécaniques, polluants et consommateurs d'énergie, déjà existants sur le marché.

Dans une étude précédente de notre équipe [13], différentes souches bactériennes ont été analysées et sélectionnées en fonction de leur capacité à produire des CaCO_3 , à pH alcalin. Ces bactéries avaient en commun la capacité de produire de carbonates de calcium par la voie de dégradation de l'urée, qui est la voie de bioprécipitation des CaCO_3 la plus étudiée dans la littérature. *Bacillus halodurans* C-125 a été sélectionnée dans cette étude [13] et a démontré sa capacité à croître et à précipiter du CaCO_3 à la surface de GBR. Malgré le potentiel de cette bactérie, les essais réalisés n'ont pas donné les résultats espérés. Une précipitation hétérogène à la surface des GBR a été obtenue, ce qui n'a pas permis de réduire leur porosité. Toutefois les premiers résultats encourageants de cette étude ont ouvert la voie à des pistes d'améliorations qui vont être explorées dans le cadre de ce travail.

On cherchera à appliquer la bioprécipitation en particulier à des sables de béton recyclé (SBR) qui aujourd'hui posent l'essentiel des problèmes de recyclage dans les bétons.

1. Références

- [1] A. Petek Gursel, E. Masanet, A. Horvath, and A. Stadel, “Life-cycle inventory analysis of concrete production: A critical review,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 51, pp. 38–48, 2014, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2014.03.005.
- [2] K. P. MEHTA, “Reducing the Environmental Impact of Concrete,” 2001, doi: 10.1016/S1351-4210(05)70693-4.
- [3] S. László, “Energy consumption and CO2 emissions from the world cement industry. Report,” Spain, 2003. Accessed: Jan. 04, 2022. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/profile/Ignacio_Hidalgo/publication/265031685_E.
- [4] I. B. Topçu and N. F. Günçan, “Using waste concrete as aggregate,” *Cem. Concr. Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 1385–1390, 1995, doi: 10.1016/0008-8846(95)00131-U.
- [5] J. L. Gálvez-Martos, D. Styles, H. Schoenberger, and B. Zeschmar-Lahl, “Construction and demolition waste best management practice in Europe,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 136, no. April, pp. 166–178, 2018, doi: 10.1016/j.resconrec.2018.04.016.
- [6] “Eurostat - Data Explorer.” https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=env_wasgen&lang=en (accessed Dec. 02, 2019).
- [7] IREX, “Recommandations RECYBETON. Comment recycler le béton dans le béton,” p. 74, 2018, [Online]. Available: https://www.pnrecybeton.fr/wp-content/uploads/2018/11/RECYBETON_Recommandations_2018-11-26.pdf.
- [8] D.-T. Dao, “(Multi-) recyclage du béton hydraulique, Ph.D. dissertation,” École centrale de Nantes, 2012.
- [9] M. Sereng, “Amélioration des propriétés des granulats recyclés par stockage de CO2 : étude de la faisabilité pré-industrielle, Ph.D. dissertation, MAST,” Université Paris-Est, 2020.
- [10] F. Mathematik, A. Schmidt, B. Michael, and M. Wolff, “A note on limitations of the use of accelerated concrete-carbonation tests for service-life predictions,” Bremen, 2003. [Online]. Available: <https://www.math.uni-bremen.de/zetem/cms/media.php/262/report0504.pdf>.
- [11] K. Pappupreethi, R. Ammakunnoth, and P. Magudeaswaran, “Bacterial concrete: A review,” *Int. J. Civ. Eng. Technol.*, vol. 8, no. 2, pp. 588–594, 2017, doi: IJCIET_08_02_061.
- [12] N. K. Dhama, M. Sudhakara Reddy, and A. Mukherjee, “Application of calcifying bacteria for

Introduction

remediation of stones and cultural heritages,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. JUN, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00304.

- [13] M. Medevielle, “Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé, Ph.D. dissertation, MAST,” Université Bretagne Loire, 2017.

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

Dans un premier temps, cette synthèse bibliographique compile des informations sur la fabrication, la composition et les propriétés des granulats de béton recyclés (GBR) afin de comprendre l'origine de leur plus faible qualité que les granulats naturels. On y aborde ensuite les différentes techniques utilisées pour améliorer la qualité des GBR, avec leurs avantages et leurs inconvénients. Dans un dernier temps on présente l'intérêt potentiel de la bioprécipitation comme une technique alternative, on analyse ses enjeux, comment elle est appliquée et on décrit les microorganismes qui l'accomplissent.

1. La production des granulats de béton recyclé (GBR)

Globalement les déchets de la Construction & Démolition sont constitués de grandes quantités de matériaux inertes [1]. Selon les enquêtes nationales SOeS de 2014, en France, les déchets des bâtiments sont de l'ordre de 46 millions de tonnes [2].

La quantité de déchets à base de béton est d'environ 17 millions de tonnes [2]. Afin d'éviter leur stockage dans des dépôts sauvages comme l'indique le point 33 de la feuille de route économique circulaire (Frec) [3], ces déchets pourraient être recyclés sous forme de granulats.

Les granulats de béton recyclé sont fabriqués sur des plateformes fixes ou mobiles qui transforment les matériaux inertes des chantiers de déconstruction [4]. Le recyclage de tels matériaux commence avec un tri sur le chantier de déconstruction pour s'assurer que seuls les matériaux valorisables sont inclus dans le processus de recyclage. Cette action est réalisée en fonction de l'ancienneté de l'ouvrage, car certains composants ne peuvent pas être utilisés pour former des gravillons recyclés comme le plâtre, le bois....

Les plateformes permettent d'obtenir différentes classes granulaires : gravillons et sables. Les procédés de fabrication des granulats recyclés varient en fonction des plateformes de recyclage. Généralement les opérations comprennent une phase d'extraction des éléments métalliques par des aimants, des systèmes de tri pour l'élimination de contaminants légers (bois, plastique, etc), concassage/criblage et floculation des argiles [5], [6]. La complexité de la plateforme de fabrication dépend de la réglementation de chaque pays ou région. L'élimination des contaminants est importante, car ces derniers peuvent nuire à la qualité du béton dans lequel

les granulats de béton seront recyclés. Une attention particulière doit être portée aux sables de béton recyclé (SBR), car le processus a tendance à y accumuler les contaminants.

2. Propriétés physiques de GBR

Comme le montre la Figure 1 à l'échelle macro, le granulat SBR peut être considéré comme un matériau à deux phases : le granulat naturel et la pâte de ciment résiduelle. À l'échelle micro, une troisième phase lui est attribuée, étant l'interface entre le granulat naturel et la pâte résiduelle [7]. Plus précisément, ces interfaces affectent le concassage et ainsi les propriétés physiques du GBR telles que (i) la forme des granulats et leur texture (ii) la distribution granulométrique et (iii) l'absorption de l'eau [8], [9].

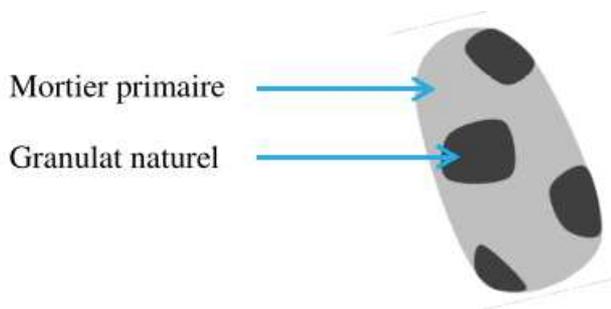


Figure 1. Granulat de béton recyclé, schéma extrait de [10].

Parce que la pâte de ciment est en général plus poreuse et moins résistante que le granulat naturel, elle modifie les propriétés des granulats recyclés. Et comme la proportion de pâte augmente en général quand la taille des GBR diminue [11], l'effet est plus marqué sur les sables de béton recyclé que sur les gravillons, notamment en ce qui concerne la densité, la porosité ou le taux d'absorption en eau [7], [12]–[14]. Les conséquences néfastes sur les propriétés des bétons dans lesquels ils sont ensuite recyclés sont logiquement plus marquées avec les sables.

C'est la norme NF EN 12620+A1 [15] qui définit les termes relatifs aux granulats pour la fabrication du béton. Les sections suivantes décrivent certaines propriétés des GBR.

2.1. Morphologie et texture des GBR

À ce jour, aucune étude n'a été réalisée pour comparer la rugosité des granulats SBR à celle des granulats naturels. Toutefois, en raison de la pâte de mortier résiduelle, il peut-être suggéré que la rugosité du SBR est supérieure à celle du sable [16]. Si la rugosité dépend alors de la pâte résiduelle, elle dicte également la morphologie des gravillons. On constate

indirectement que la pâte de ciment résiduelle donne un côté frottant aux granulats recyclés qui se traduit par des valeurs faibles de compacités en particulier des sables recyclés [11]. Une conséquence bien connue de ce fait est que la demande en eau des bétons contenant des GBR augmente avec le taux de recyclage [17].

A ce sujet, la morphologie des gravillons recyclés pourrait donc être modifiée par la mise en œuvre de techniques visant à éliminer la pâte mortier résiduel.

Si de multiples procédés de broyage et d'attaques chimiques sont appliqués à la surface de gravillons recyclés, leur morphologie peut changer vers une forme sphérique, plus allongée [18], [19] (Figure 2). Ce qui peut contribuer à améliorer leur distribution granulométrique.



Figure 2. GBR avant et après le traitement avec 33 % HCl. Extrait et modifié de [19]

2.2. Distribution granulométrique

La granulométrie décrit la distribution des tailles des granulats. Ce paramètre est d'une grande importance, car l'ouvrabilité du béton en dépend. Sur ce dernier point, il a été démontré qu'en utilisant une bonne distribution granulométrique, il est possible de réduire le ciment ajouté de 50% et les émissions de CO₂ de 25% [20].

Il est important de noter que la distribution granulométrique de gravillons recyclés est fortement liée au type de béton recyclé et au type de broyage effectué [7].

2.3. Porosité et absorption d'eau

Les granulats, de façon générale, présentent une certaine porosité qui est accessible par l'eau. L'absorption d'eau quantifie la masse d'eau qui peut pénétrer dans cette porosité rapportée à la masse sèche du granulat. La masse d'eau absorbée est mesurée en faisant la différence entre la masse à l'état saturé surface sèche [7][21], [22], et la masse sèche. La norme EN 1097-6 :2013 [23] précise le mode opératoire pour évaluer cette grandeur.

La connaissance de cette valeur est indispensable pour calculer l'eau efficace d'un béton. L'eau efficace est l'eau totale contenue dans une formule de béton réduite de l'eau absorbée par les granulats. C'est donc l'eau réellement disponible pour la pâte de ciment. C'est l'eau efficace, et non l'eau totale, qui pilote l'ouvrabilité du béton. C'est également l'eau efficace qui est prise en compte pour l'évaluation de la résistance des bétons [24], et dans les critères de durabilité du tableau de la norme béton EN 206/CN [25].

La pâte de ciment présente une porosité nettement plus importante que les granulats naturels. De par leur nature composite, il en découle que les GBR ont une absorption en général sensiblement plus élevée que les granulats naturels. De plus, comme la proportion de pâte augmente quand la taille des grains diminue, les SBR présentent une absorption plus élevée que les gravillons de béton recyclé. C'est ainsi que l'absorption des gravillons de béton recyclé est typiquement dans la gamme 2.6 – 6.2 %, alors que celle des SBR est plutôt dans la gamme des 6.3-8.6% [26].

Il est donc particulièrement important de prendre en compte l'absorption des GBR lorsque l'on formule un béton avec des granulats recyclés. À titre d'illustration, pour un béton contenant 1500 kg/m³ de GBR d'absorption moyenne de 6%, l'eau absorbée représente 90 l/m³ alors que l'eau efficace visée est typiquement entre 160 et 180 l/m³.

Si l'absorption d'eau est relativement constante ou modérée, il est donc assez facile d'anticiper l'eau qu'il est nécessaire d'ajouter à un mélange de béton en fonction de l'état d'humidité réelle du granulat en écrivant l'équation (1):

$$E_{\text{eff}} = E_{\text{aj}} + E_{\text{g}} - E_{\text{abs}}$$

1

Où :

E_{eff} est la quantité d'eau efficace en L. m⁻³

E_{aj} est la quantité eau ajoutée en L. m⁻³

E_{g} est la quantité eau amenée par les granulats en L. m⁻³ . Cette valeur est en général mesurée par des sondes en temps réel sur les centrales à béton.

E_{abs} est la quantité d'eau absorbée par les granulats en L. m⁻³

Cependant lorsque l'absorption est élevée et fluctuante on voit qu'elle peut introduire des biais dans ce calcul et générer des fluctuations d'ouvrabilité des bétons à l'échelle

industrielle. Ce problème est particulièrement marqué avec les SBR puisqu'ils contiennent de fortes proportions de pâte résiduelle et que cette dernière peut être de nature variable en fonction des bétons d'origine. C'est une des principales raisons pour lesquelles les SBR sont dans la pratique peu recyclés [17].

À noter une difficulté supplémentaire pour les SBR : la détermination de leur absorption d'eau est difficile en raison de la présence de particules fines (<250 µm) de pâte de ciment résiduelle, car celles-ci ont tendance à former des agglomérats rendant difficile l'identification de l'état de saturation surface sèche lors de la mesure. Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'absorption d'eau du SBR, mais aucune d'entre elles n'est acceptée de manière générale (Tableau 1)[7].

Tableau 1. Méthodes utilisées pour mesurer l'absorption d'eau du SBR, extrait et modifié de [7].

Méthode	Taille Fraction des agrégats de béton recyclés	Poids de l'échantillon [kg]	Test durée [h]	Référence
Combiné : méthode d'essai du pycnomètre et méthode de pesée hydrostatique	Grossier (4/10 and 6.3/20 mm)	/	240	[9]
Méthode pycnométrique et balance hydrostatique avec utilisation d'hexamétaphosphate de sodium pour disperser les particules et éviter l'occlusion de l'air	Fine (0/4 mm)	/	24	[14]
Méthode de pesage hydrostatique (granulats de béton recyclés)	Grandes (5 20 mm)	/	144	[21]
(a) Méthode du panier en fil de fer ; (b) Méthode du pycnomètre ; l'air chaud est utilisé pour évaporer l'humidité de surface et pour atteindre l'état de SSD des agrégats. Immersion	Grandes et petites (/)	(a) Pour la méthode du panier ; 7 – 15 (dimensions supérieures 45 – 63 mm) (b) Pour la méthode du pycnomètre ; 1 – 5 (dimensions	-	[23]

		supérieures 8 – 31.5 mm)		
Immersion	Grandes et petites (/)	/	24	[27]
Saturation et séchage ; les agrégats sont séchés progressivement avec différentes feuilles de papier absorbant coloré.	Grandes et petites (/)	/	24	IFSTTAR N°7 [28]
Évaluation en temps réel de l'absorption d'eau (RAWA)	Grandes (5/40 mm)	2	144	[29]
Un essai accéléré basé sur l'utilisation d'un analyseur d'humidité électronique	Fine (0.063/4 mm)	0.025	0.5	[30]
Méthode de centrifugation ; Méthode de la fiole jaugée	Fine (Various fractions in range 0.16/4.75 mm)	1.1 ± 0.01 0.3 ± 0.01	/	[31]
Mesure de la valeur d'absorption d'eau du fRCA en pâte plutôt qu'en eau pure	Fine (1.18/2.36 mm)	0.1 ± 0.001	24	[32]
Méthode de conductivité électrique	Fine (0/4.75 mm)	2.5	24	[33]

2.4.5 Densité

De la même façon, la présence de pâte cimentaire qui présente une densité plus faible que celle des granulats recyclés conduit à abaisser la densité des GBR dans une gamme de l'ordre de 2,1 à 2,3 alors que celle des granulats naturels se trouve plutôt dans la gamme 2,5 à 2,7. Comme pour la porosité, cet effet est plus marqué pour les SBR qui contiennent en général plus de pâte que les gravillons de béton recyclés.

À titre d'exemple Nedeljković.al. [7], présentent une analyse de différentes études comparant la densité en condition saturée surface sèche de sables naturels avec des SBR. Ils concluent que la densité des SBR est plus faible (en moyenne $2,295 \text{ kg/m}^3$ contre $2,637 \text{ kg/m}^3$ pour les sables naturels), (Figure 3).

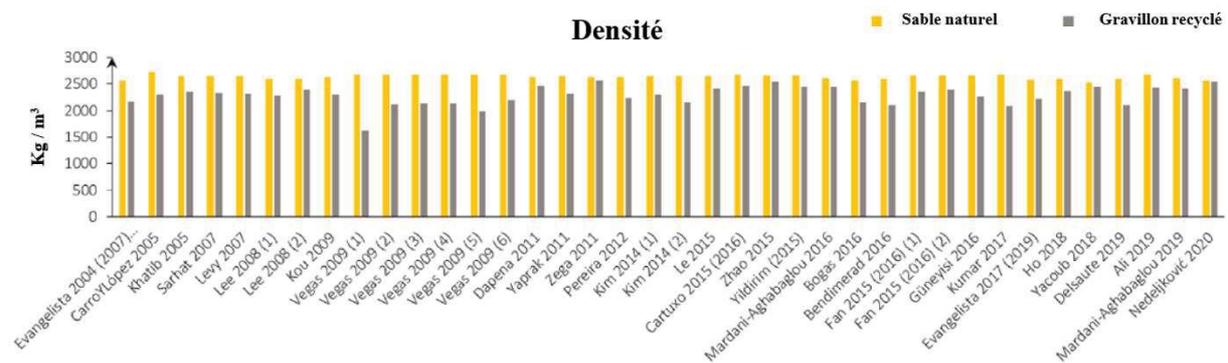


Figure 3. Densité en condition saturée surface sèche de SBR comparée à celle de sables naturels. Extrait et modifié de [7].

Cet effet sur la densité ne pose pas de problème particulier, au contraire il permet d’alléger le béton dans lequel les GBR sont introduits, ce qui pourrait être intégré dans les Eurocodes [34], [35]. Il faut par contre, bien le prendre en compte lorsque l’on effectue le bilan volumétrique du béton (une masse de GBR représentant un volume plus élevé que la même masse de granulats naturels) lors de la formulation d’un béton avec recyclés.

2.4. Propriétés mécaniques

Les bétons dont sont issus les granulats recyclés ont une résistance mécanique classiquement comprise entre 15 et 50 MPa, même si des valeurs plus élevées peuvent être observées quand des bétons modernes sont recyclés. Ces valeurs sont à comparer avec celle des granulats naturels qui sont en général largement supérieurs à 50 MPa (valeurs mesurables dans la roche mère pour les granulats concassés).

Les GBR ont donc des performances mécaniques en général plus faibles que les granulats recyclés. Cela se traduit donc par des valeurs de Los Angeles (NF EN 1097-2, [36]) et de Micro Deval (NF EN 1097-1, [37]) plus élevées [11].

De la même façon, le module élastique de la pâte de ciment est en général nettement plus faible que celui des granulats naturels. En conséquence les GBR ont un module élastique plus faible que celui des granulats naturels [11].

Il découle de ces constats que lorsqu’un volume de granulats naturels est remplacé dans un béton par le même volume de GBR, sa résistance à la compression décroît ainsi que son module élastique. Cette tendance est d’autant plus forte que le taux de remplacement des granulats naturels est important. Elle est également plus prononcée lorsque l’on utilise des SBR qui contiennent en général plus de pâte que les gravillons de béton recyclé [11][17][35].

2.5. Propriétés chimiques

Peu d'études décrivent la composition chimique des GBR (Tableau 2 ;[34_37]), cependant, elles soulignent qu'elles dépendent de la composition initiale du béton recyclé. Parmi ces études, il est indiqué que la composition chimique est principalement influencée par la taille des particules et non par leur origine géographique [38].

Tableau 2. Composition chimique du SBR des différentes analyses expérimentales.

Auteurs	Sable et fraction analysée	Composition chimique
Angulo et al. [38]	Déchets de Construction Gravier, sable $\leq 37 \mu\text{m}$	SiO ₂ (48.0–84.2%), Al ₂ O ₃ (5.0–17.2%), CaO (2.4–13.9%)
Bianchini et al. [39]	(0.125–0.075 mm; <0.075 mm) Déchets de Construction	SiO ₂ 39.9%, Al ₂ O ₃ 68.3%, Fe ₂ O ₃ 3.7% et CaO 20.76%
Sicakova et al. [40]	Déchets de Construction SBR $\leq 125 \mu\text{m}$	SiO ₂ 31.1%, Al ₂ O ₃ 8.7%, Fe ₂ O ₃ 2.7%, CaO 12.4% autres éléments 45.1%.
Lotfi and Rem [41]	Déchets de Construction CEM III SBR $\leq 125 \mu\text{m}$	SiO ₂ 41.2%, Al ₂ O ₃ 6.4%, Fe ₂ O ₃ 3.0% et CaO 35.2%

2.6. Contaminants dans les GBR

Les contaminants des GBR peuvent être séparés en deux familles : physiques et chimiques. Les contaminants physiques tels que le verre, les métaux et les plastiques peuvent être retirés avant ou après le processus de fabrication, par l'utilisation d'outils technologiques tels que des machines automatisées [7]. La norme EN 933-11, [42] permet d'évaluer la teneur résiduelle de ces contaminants ce qui permet de définir des classes de composition dans la norme EN 12620+A1, [15].

Les contaminants chimiques, font partie de la structure des granulats SBR, ce sont les chlorure (Cl⁻, effet :risque de corrosion du métal du béton armé), le sulfate (SO₄²⁻, effet : attaque interne au sulfate) et les alcalins solubles (effet, :réaction alcali silice des agrégats).

En France, les normes NF EN 206/CN/2014 [25](en particulier la partie NA 5.1.3), EN 12620+A1 [15] et NF P 18-545/2011 [43], indiquent les contraintes particulières imposées aux

GBR. Un seuil maximum de sulfates solubles dans l'eau est ainsi fixé. Une caractérisation des chlorures solubles dans l'acide est également requise mais aucun seuil n'est imposé [44]. À noter que le PN Recybéton recommande de mesurer plutôt les chlorures solubles dans l'eau [43].

2.7. Conséquences sur la formulation des bétons incorporant des GBR

Outre les propriétés de durabilité, les deux principales propriétés d'usage des bétons sont leur ouvrabilité et leur résistance à la compression.

L'ouvrabilité est la capacité du béton à s'écouler. Il est important de maîtriser cette propriété pour assurer un bon remplissage des coffrages et une qualité uniforme de mise en œuvre. Elle est généralement mesurée par l'essai d'affaissement (NF EN 12350-2, [45]) autrement dit l'essai au cône d'Abrams. Le béton frais est déposé dans un cône tronqué métallique. Ce dernier est soulevé et on mesure la hauteur de l'affaissement du béton. Plus le béton est fluide, plus la hauteur d'affaissement est importante.

La résistance à la compression mesure la contrainte (effort par unité de surface) que le béton peut supporter. Elle se mesure à l'aide d'une presse, en général sur des cylindres de béton (NF EN 12390-3, [46]).

Comme résumé dans Sedran(2018) [17], l'aspect concassé et la texture rugueuse des GBR leur confèrent une faible aptitude à se compacter. Les conséquences bien connues sur l'ouvrabilité des formules de bétons incorporant des GBR sont les suivantes :

- L'augmentation de la demande en eau du béton (i.e. l'eau efficace nécessaire pour atteindre l'affaissement visé) augmente généralement avec le taux de recyclage ;
- Les SBR ont un effet négatif plus important que les gravillons de béton recyclé sur la demande en eau du béton. En outre, cet effet est fortement dépendant de l'origine du SBR.

À cela s'ajoute le fait que l'état hydrique des GBR au moment d'être introduits dans le malaxeur a une influence sur l'ouvrabilité du béton, même si l'eau efficace est maintenue constante. En effet la saturation des GBR n'est pas instantanée et peut prendre 7 jours [13][47]. Ainsi, si un GBR est utilisé sec, on ajoutera plus d'eau au total pour compenser son absorption. Cette eau n'étant pas absorbée instantanément, cela conduira à avoir un excès d'eau dans la pâte qui diminuera au fil du temps. Cela peut conduire à avoir un excès d'affaissement

initialement suivi d'une perte progressive d'affaissement. C'est pourquoi il est en général préférable de travailler avec des GBR présaturés.

Sur l'aspect mécanique l'augmentation du taux de recyclage, sans toucher au reste de la formule du béton (c'est-à-dire l'eau efficace et le ciment) a en général pour conséquences [17]:

- Une diminution de la résistance en compression du béton et de son module élastique, du fait des plus faibles performances mécaniques et du plus faible module des GBR, comparativement aux granulats naturels
- Comme les SBR contiennent une plus grande quantité de pâte résiduelle, leur effet néfaste est plus conséquent que celui des gravillons de béton recyclé.

Des modèles mécaniques prenant en compte l'introduction des GBR dans les bétons et traduisant les constats précédents sont proposés dans diverses publications et conduiront à terme à modifier les Eurocodes [35] [48], [49].

Sedran conclut que lors de la substitution des granulats naturels par des GBR, la morphologie et la rugosité des GBR conduit à augmenter l'eau efficace ou la dose de plastifiant/superplastifiant pour maintenir l'affaissement, tandis que leurs moindres propriétés mécaniques imposent généralement de diminuer le rapport Eau efficace/Ciment pour maintenir la résistance à la compression du béton [17]. Enfin, la demande en ciment augmente de façon non linéaire avec le taux de recyclage, pour un affaissement et une résistance donnée. Cet effet est négligeable pour les faibles taux de recyclage, mais il devient important pour les forts taux de recyclage notamment de SBR. C'est pourquoi, parmi d'autres raisons, le taux de recyclage est généralement limité dans les règlements (en général, interdiction d'utiliser les sables de GBR et limitation du taux maximum de gravillons de GBR à 30 %).

3. Amélioration de la qualité des GBR

3.1. Traitement thermique, mécanique et chimique

Comme indiqué dans la section précédente, la porosité du mortier résiduel diminue la performance des granulats recyclés. Afin d'augmenter la qualité des granulats, ceux-ci peuvent être soumis à des méthodologies thermiques, mécaniques ou chimiques, visant à éliminer la couche de mortier résiduelle. Un résumé des études analysant l'utilité de ces techniques pour le traitement des graviers recyclés est présenté dans le Tableau 3. Bien que ces techniques soient capables d'éliminer une quantité importante de mortier résiduel, elles consomment beaucoup

d'énergie, ce qui entraîne une augmentation des coûts, les rendant non rentables à grande échelle. De plus, des contaminants peuvent être générés et les propriétés des granulats peuvent être encore plus endommagées (fissuration par exemple). C'est pourquoi d'autres alternatives à ces traitements sont aujourd'hui analysées, telles que la carbonatation naturelle, la carbonatation accélérée ou la biocarbonatation.

Tableau 3. Techniques employées pour améliorer la qualité des GBR.

Technique	Efficacité	Contraintes	Référence
Thermique	À températures supérieures à 700 °C, seulement 2 % de la couche de ciment/mortier résiduelle restent collés au granulat naturel.	À températures supérieures à 500 °C, les propriétés des GBR peuvent être réduites [50]. Génération des composants polluants issus de la combustion	[51]
Thermique par micro-ondes	L'absorption d'eau a été réduite de 33% et la densité apparente a augmenté de 3,8%.	La pâte de ciment résiduelle qui restait collée à la surface du granulat recyclé était fissurée et affaiblie. Cette technique est associée aux inconvénients du temps nécessaire pour effectuer le traitement, à la faiblesse du granulat recyclé et à l'énergie consommée.	[52]
Mécanique	La couche résiduelle est éliminée par la collision des billes métalliques. La quantité éliminée semble être en relation avec le nombre des étapes de broyages réalisés.	Cette technique peut diminuer les caractéristiques du GBR par la formation de microfissures.	[53]
Chimique Attaque Acide fort	L'absorption d'eau des granulats a diminué de 7 % à 12 %. L'utilisation des granulats traités entraîne une augmentation d'entre 25 % et 29 % de la résistance à la compression par rapport au béton avec les granulats non traités.	La quantité de sulfates et de chlorure peut augmenter chez les GBR, ce qui peut compromettre la durabilité. La production de solutions acides polluants.	[54]
Chimique Concentration	La porosité a diminué de 2 %	La production de solutions acides polluants.	[50]

Acide faible	L'absorption d'eau des granulats a diminué de 9.5 %.
---------------------	--

3.2. Carbonatation

La carbonatation est un phénomène physico-chimique au cours duquel le CO_2 , en conditions d'humidité supérieures à 70 % et de forte alcalinité, forme des ions carbonate (CO_3^-). Ceux-ci réagissent avec d'autres ions présents dans l'environnement comme le Ca^{2+} , précipitant en forme de minéraux, tels que le carbonate de calcium (CaCO_3).

3.2.1. Carbonate de calcium

Ce composé est présent dans les coquilles des animaux marins, le squelette des animaux vertébrés, le marbre, les roches calcaires... Il se présente généralement sous forme de poudre, sans couleur ni odeur. Il peut être extrait par la décomposition du calcaire, la synthèse chimique ou la synthèse biologique [55].

Le poids moléculaire du CaCO_3 est de $100,087 \pm 0,006 \text{ g} \cdot \text{mole}^{-1}$, son pKa est de 9 et sa solubilité dans l'eau à 20°C est de 14 mg/L [55]. Ce minéral est présent sous trois formes cristallines : la calcite (en forme de cube), la vatérite (structure de transition pour la formation de la calcite) et l'aragonite (en forme d'aiguille) [56] (Figure 4). Elle possède également trois formes d'anhydride : le CaCO_3 amorphe (ACC), le monohydrocalcite ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et l'ikaite ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La technique de la diffraction des rayons X (DRX) est couramment utilisée pour déterminer la morphologie du CaCO_3 mais ne permet de détecter que les formes cristallines

Thermodynamiquement, la calcite est plus stable que la vatérite [57]. Le point de fusion des formes cristallines est à 825°C .

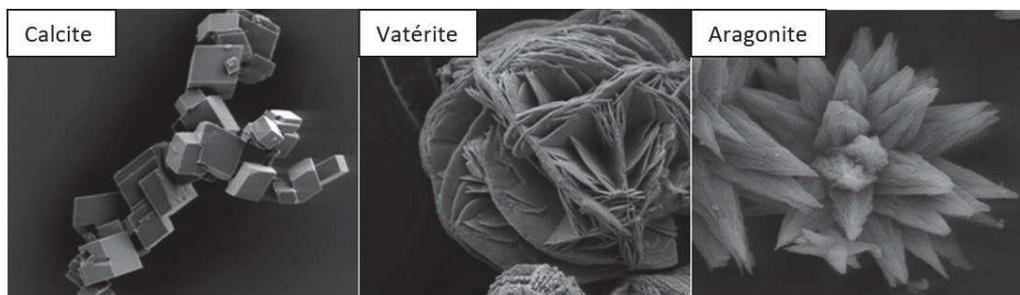


Figure 4. Principales morphologies de CaCO_3 .

3.2.2. Carbonatation du béton

La carbonatation sur le béton peut entraîner un effet positif et un effet négatif. L'effet positif est que les produits de la carbonatation bouchent les pores et les fissures, réduisant la porosité et l'absorption. L'effet négatif est qu'en se propageant, elle conduit à abaisser le pH. Dans ce cas si la carbonatation atteint la zone des armatures, celles-ci sont dépassivées et la corrosion, liée aux ions chlorures notamment, peut s'initier conduisant à des phénomènes de gonflement et d'éclatement en surface des bétons voire, dans le cas extrême, à la ruine de l'ouvrage. Pour un ouvrage en service les deux effets sont donc en concurrence, par contre, lorsque le béton est déconstruit, seul l'intérêt positif persiste. Théoriquement, les composés hydratés et non hydratés du béton peuvent être carbonatés, en supposant que MgO forme $MgCO_3$, Na_2O forme Na_2CO_3 , K_2O forme K_2CO_3 et CaO (sauf $CaSO_4$) forme $CaCO_3$ [58].

Pour la formation de $CaCO_3$ à la surface du béton, il est supposé que la portlandite ou hydroxyde de calcium $Ca(OH)_2$ est le composé qui réagit le plus facilement avec le CO_2 dissous [59]. La formation de $CaCO_3$ par ce moyen peut être divisée en trois phases [60]. La première consiste en la dissolution du $Ca(OH)_2$, la deuxième consiste en l'absorption du CO_2 et la formation d'ions CO_3 et la dernière consiste en la réaction chimique des ions CO_3^{2-} et Ca^{2+} , pour la formation et la précipitation du $CaCO_3$ [61].

La carbonatation entraîne une diminution du pH du béton en raison de la transformation du $Ca(OH)_2$ en $CaCO_3$. Parfois, le pH du béton carbonaté peut même être inférieur à 9. La durée de la carbonatation dépend du rayon de diffusion des ions Ca^{2+} et du CO_2 . Il a été observé que lorsque la diffusion du CO_2 est supérieure à celle des ions Ca^{2+} , une couche protectrice de $CaCO_3$ se forme sur la portlandite et ralentit la vitesse de carbonatation. Lorsque la diffusion des ions Ca^{2+} est supérieure, des carbonates se forment à la surface de la phase de silicate de calcium hydraté (CSH), scellant les pores du béton [61] et diminuant ainsi la porosité.

La précipitation de $CaCO_3$ peut améliorer les propriétés physiques du béton. Chang et al. [62] ont réalisé une étude comparative en utilisant de cylindres de béton (10 cm x 20 cm, fabriqués avec de sable de rivière, de pierre concassée, de ciment Portland ordinaire de type I) avec trois ratios différents de w/c (0,4, 0,5 et 0,6). Ils ont comparé les caractéristiques mécaniques des bétons, après avoir été carbonatés dans 3 environnements différents ; a) La concentration de CO_2 de 50 %, à 23 ± 1 °C ; et humidité relative de 70 %, b) concentration de CO_2 de 0,03%, température ambiante et humidité relative comprises entre 70% et 90%, et c)

carbonatation à haute pression 15 atm, concentration de CO₂ de 100 %, à 23±1 °C, et humidité relative de 70 %. Leurs résultats ont indiqué que la profondeur de la carbonatation a été comprise entre 0.54 et 1.2 cm, celle-ci a entraîné une augmentation de la dureté locale, de la résistance de l'adhésion pâte-granulat, de la résistance à la traction, de la résistance à la compression, du module élastique et de la charge de cisaillement critique par unité de longueur. Compte tenu de la possibilité d'une augmentation des propriétés mécaniques du béton après sa carbonatation et du fait que ce processus peut capturer le CO₂ atmosphérique, des études ont été réalisées ces dernières années afin d'accélérer la carbonatation et contribuer en même temps à une diminution du CO₂ dans l'environnement [59].

3.2.3. Carbonatation accélérée

Sur la base d'études [63]–[65], qui indiquent que, dans le cadre d'un processus de carbonatation contrôlé, les propriétés mécaniques du béton et du GBR peuvent être améliorées, et que le CO₂ atmosphérique pourrait être capturé, réduisant l'effet de gaz serre, des études dans lesquelles de grandes concentrations de CO₂ pour être transformées en CaCO₃ sont mises en œuvre dans ce qui est connu sous le nom de "carbonatation accélérée".

Le phénomène naturel de carbonatation est lent, car il dépend largement de la concentration de CO₂ présente dans l'atmosphère, qui est normalement de l'ordre de 0,3% [58]. Un fait intéressant relevé par une étude récente [66], montre que l'augmentation de la concentration de CO₂ libérée par les activités industrielles dans certaines villes accélère le processus de carbonatation de leurs bâtiments.

Le stockage du CO₂ est aussi réalisé sur les GBR pour augmenter leur performance. Par exemple, Zhang et al. [67], a comparé les caractéristiques mécaniques de GBR carbonatés à celle des GBR non carbonatés et celles d'agrégats naturels. Ils ont utilisé deux types de GBR, GBR de gravier (GBR-G) et GBR de pierre concassé (GBR-C). Une portion des deux types de granulats a été carbonatée dans une chambre à 20 °C, avec une concentration de CO₂ de 20 % et une humidité relative de 60 %. Suite à la carbonatation des GBR, ils ont constaté que les GBR non carbonatés avaient une densité apparente inférieure à celle des agrégats naturels de 6,3 % (GBR-G) et 7,8 % (GBR-C), chute qui était limitée à 1,9 % (GBR-G) et 2,6 % (GBR-C) pour les GBR carbonatés. L'absorption d'eau des GBR carbonatée a également été réduite pour les GBR carbonatés de 8.06 % à 5.8 % pour les GBR-G et de 8.7% à 6.7 % pour les GBR-C.

Ils concluent que ces résultats sont dus à la formation de CaCO_3 dans la pâte de ciment/mortier résiduelle qui recouvre le GBR en scellant les pores et en augmentant ses propriétés.

Zhao et al. ont mené une étude comparant la présence de portlandite, la porosité, la densité et l'absorption d'eau des GBR [68]. Pour cette étude, ils ont utilisé deux types de GBR. Le premier type a été fabriqué par eux-mêmes avec du ciment Portland (CEMI) obtenant un GBR de moins de 5 mm. Le deuxième type de GBR d'une taille inférieure à 5 mm a été acheté, étant obtenu par un procédé industriel. Dans leur procédé expérimental, ils n'ont procédé qu'à la carbonatation des GBR qu'ils ont fabriqués, dans un environnement composé de CO_2 à 100%, à 20°C et à 75% d'humidité relative, pendant une période de 2 semaines. Dans leur analyse, ils comparent les GBR fabriqués par eux-mêmes, carbonatés et non carbonatés, ainsi que les GBR achetés. À travers une analyse thermogravimétrique, ils ont observé que la quantité de portlandite présente dans les GBR carbonatés était inférieure à la quantité présente dans les GBR non carbonatés et industriels, démontrant la conversion de la portlandite en CaCO_3 . La densité des GBR traités a également augmenté par rapport aux autres GBR parce que le CaCO_3 est plus dense que la portlandite. En conclusion, ils soutiennent la mise en œuvre de la carbonatation accélérée, parce qu'elle contribue à la réduction de la porosité des GBR et à la diminution de leur absorption d'eau, ce qui améliore leur performance et donc, leur usage dans le secteur de la construction.

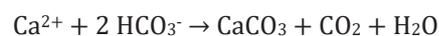
Ainsi, dans le projet national FastCarb (<https://fastcarb.fr>), on cherche à capter directement le CO_2 de fours de cimenterie pour carbonater de façon accélérée les gravillons recyclés. Cette technique nécessite encore de la mise au point pour être mature. L'efficacité de la fixation du CO_2 peut être limitée par le manque de pureté des fumées de cimenterie et par le degré de carbonatation naturelle des GBR, car il peut limiter la diffusion du CO_2 , limitant ainsi la carbonatation. Il a également été démontré que si les granulats recyclés ont une faible teneur en hydrates, moins de CO_2 sera stocké [26].

En plus de la carbonatation naturelle et accélérée, le CaCO_3 peut être formé par l'activité biologique. Ce sujet a attiré l'attention de scientifiques dans différents domaines, dont le génie civil, car c'est un processus naturel et compatible avec l'environnement [69], [70]. La bioprécipitation, et ses mécanismes sont décrits dans la section suivante.

4. La bioprécipitation

Le phénomène de précipitation de carbonates de calcium est un mécanisme fréquemment rencontré dans le monde du vivant. De nombreux organismes pluricellulaires utilisent cette précipitation pour former leur squelette interne (par exemple les vertébrés) ou externe (par exemple les tests des mollusques). Ce mécanisme n'est pas spécifique aux organismes pluricellulaires, les organismes unicellulaires peuvent également précipiter les carbonates de calcium. Ainsi, les Coccolithophoridées synthétisent une couche protectrice constituée de plaques calcaires autour de leur cellule. Les formations les plus remarquables de cellules procaryotes sont les stromatolites. Les plus anciennes datent de 3,5 milliards d'années et sont à l'origine du piégeage du CO₂ de l'atmosphère primitive. Ce phénomène naturel de précipitation des carbonates sous l'action de microorganismes procaryotes est toujours présent.

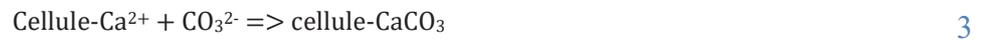
La précipitation des carbonates de calcium peut s'effectuer de différentes manières et interagir avec différents cycles biogéochimiques. Trois voies métaboliques [71][72] sont mises en jeu par les microorganismes autotrophes¹ : (i) la méthanogenèse non méthylophile faisant intervenir des archéobactéries méthanogènes, (ii) la photosynthèse non oxygénique réalisée par des bactéries photosynthétiques pourpres ou vertes, sulfureuses ou non et (iii) la photosynthèse oxygénique effectuée par les cyanobactéries. 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 :



2

Des microorganismes hétérotrophes peuvent aussi 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 transporteurs Ca²⁺. La précipitation passive résulte de la production d'ions carbonate et hydrogencarbonate 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 [71].

Au niveau de la paroi cellulaire, chargée négativement, des ions calcium peuvent se fixer formant ainsi un complexe cellule-Ca²⁺. Les ions carbonate précédemment formés vont précipiter en contact avec les ions calcium :



Cet état de l'art va uniquement se focaliser sur un type de précipitation des carbonates de calcium qui interagit avec le cycle biogéochimique de l'azote. Ce mécanisme est catalysé par une enzyme, l'uréase, qui transforme l'urée en CO₂ et ammonium.

La précipitation des carbonates de calcium résulte d'une suite de réactions biochimiques initiée par l'activité de l'uréase bactérienne :

$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$	Réaction intracellulaire	4
$\text{NH}_2\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{CO}_3$	Réaction spontanée	5
$\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$		6
$2 \text{NH}_3 + 2 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 2 \text{NH}_4^+ + 2 \text{OH}^-$		7
$\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2 \text{NH}_4^+ + 2 \text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{NH}_4^+$		8

Au niveau de la paroi cellulaire, chargée négativement, des ions calcium peuvent se fixer formant ainsi un complexe cellule-Ca²⁺. Les ions carbonate précédemment formés vont précipiter en contact avec les ions calcium :



4.1.1. Rôle des sites de nucléation de la paroi cellulaire dans la bioprécipitation

Les éléments qui composent la paroi cellulaire des bactéries gram + sont chargés négativement, ce qui, en raison de leur polarité, attirent les cations divalents tels que Ca⁺² ou Mg⁺² [73], formant ainsi de sites de nucléation. La composition et l'épaisseur de la paroi cellulaire varie en fonction du type de bactérie. À ce propos, les bactéries sont classées comme Gram +, si elles possèdent une multicouche de peptidoglycane (polymère chargé négativement), ou comme Gram -, s'ils ne possèdent qu'une couche fine de peptidoglycane entourée par des phospholipides (Figure 5).

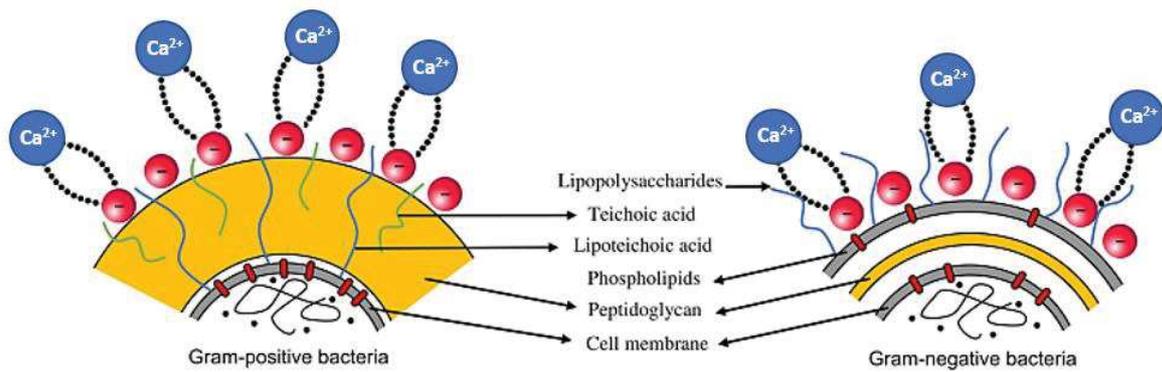


Figure 5. Membrane cellulaire des bactéries Gram + et Gram -, attirant des ions calcium. Modifié de [74].

4.2. Influence des paramètres environnementaux

Les facteurs environnementaux tels que l'humidité relative (HR), l'alcalinité... entre autres, dans lesquels les bactéries se développent, ont également une influence importante sur la bioprécipitation. Les différents paramètres et leur rôle sont décrits ci-dessous.

4.2.1. Humidité relative :

L'humidité relative (HR) est la quantité maximale de vapeur d'eau que l'air peut contenir à une même température. Dans la bioprécipitation, ce paramètre est important dans deux cadres : (i) pour le développement microbien, et (ii) pour la disponibilité des ions carbonate.

A ce qui concerne le développement microbien, il est établi que pour favoriser le développement microbien sur une surface, l'HR doit être supérieure à 60% [75], mais il est recommandé de maintenir une humidité supérieure à 95 %. Cette valeur est non seulement importante pour la croissance bactérienne, mais aussi pour la formation de biofilm, car il est estimé qu'un biofilm est constitué de 75 et 98 % d'eau [76].

En ce qui concerne à la disponibilité d'ions carbonate (CO_3^{2-}), si l'HR n'est pas supérieur 30 %, le CO_2 ne peut pas être dissolu en H_2CO_3 , pour ensuite former du CO_3^{2-} (équations 10,11 et 12)[77]. Cette dissolution est aussi dépendante du degré d'alcalinité à température ambiante. Le rôle de l'alcalinité sur la spéciation des ions carbonate est décrit dans la section suivant.





4.2.2. Le pH

Pour précipiter le CaCO_3 , une quantité suffisante et non limitante de Ca^{2+} et de CO_3^{2-} est nécessaire. Cette dernière dépend de la dissolution du CO_2 , qui se transforme en CO_3^{2-} par la dissociation successive du polyacide H_2CO_3 . A un pH supérieur à 10,3, les ions CO_3^{2-} sont prédominants (Figure 6), donc à ce pH, en présence d'ions Ca^{2+} , la précipitation du CaCO_3 est favorisée.

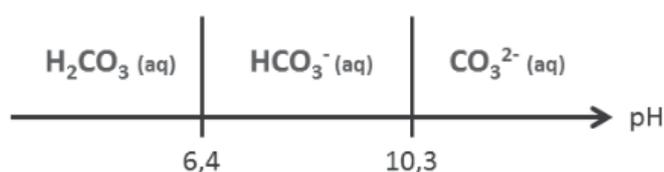


Figure 6. Prédominance acide-base des espèces $\text{H}_2\text{CO}_3(\text{aq})$, $\text{HCO}_3^-(\text{aq})$ et $\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})$, modifié de [10].

4.2.3. Moteur d'alcalinité

L'alcalinité est définie comme la mesure de la capacité d'un matériau à neutraliser un acide. Spécifiquement pour la bioprécipitation, il est appelé « moteur d'alcalinité » (MA), la somme de tous les processus impliqués dans l'augmentation du pH du micro ou macro environnement, qui favorisent la production de CaCO_3 [78]. Le MA est classé comme intrinsèque ou extrinsèque [79]. Le MA est intrinsèque quand l'alcalinité augmente grâce à de l'activité bactérienne, par exemple, la production d'ions CO_3^{2-} suite à l'hydrolyse de l'urée. Il est extrinsèque quand les conditions du macro-environnement font augmenter le pH, comme la composition chimique de la surface dans laquelle la bioprécipitation est réalisée.

Dans le moteur d'alcalinité intrinsèque, nous trouvons un fait appelé "concentration locale d'ions CO_3^{2-} " (Figure 7) qui implique que lorsque les bactéries sont dans un environnement humide, elles sont entourées d'une fine couche d'eau appelée « couche de limite hydrodynamique » [80]. Dans cette enveloppe d'eau, des gradients de concentration d'ions peuvent se former lorsque les concentrations locales sont plus élevées que dans l'environnement aqueux global. La sursaturation varie en fonction de la concentration en ions et la précipitation est donc favorisée à proximité de la surface de la cellule où la concentration est la plus élevée. Ces gradients sont la combinaison de l'activité métabolique des bactéries, qui produisent CO_3^{2-}

, de l'activation des énergies thermodynamiques et de la séquestration des ions par la membrane cellulaire. Ce principe s'étend également à la précipitation réalisée par les biofilms à travers les exopolysaccharides (EPS).

L'effet du microenvironnement lié à la couche de limite hydrodynamique est très important que même dans des conditions défavorables, comme dans les environnements acides défavorables, la bioprécipitation peut avoir lieu à travers de ce mécanisme.

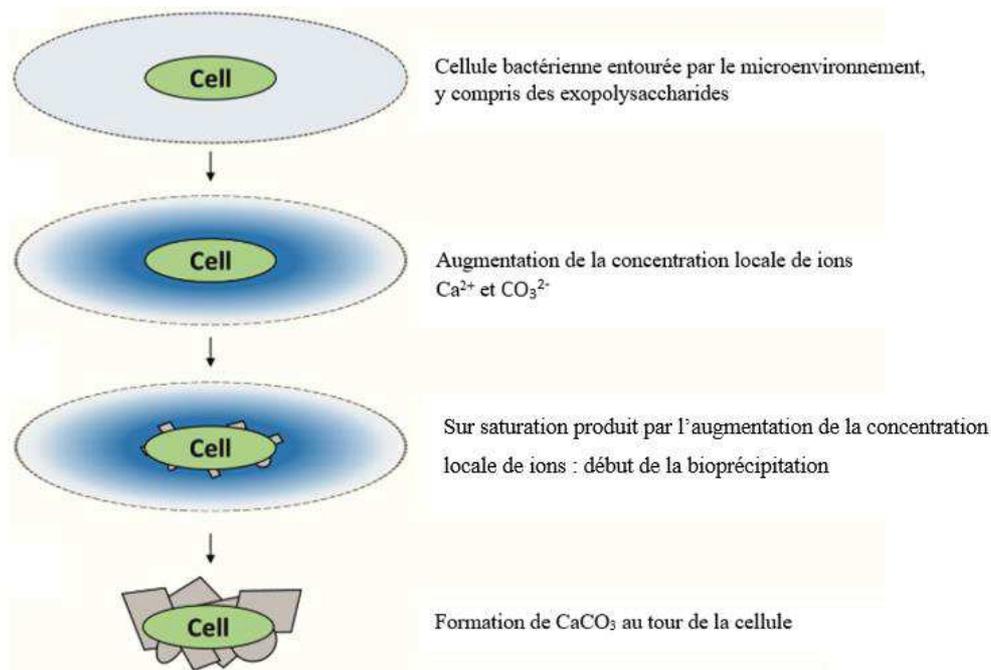


Figure 7. Saturation des ions, causée par la présence de la couche de limite hydrodynamique. Figure modifiée de [80].

4.2.4. La température

La température influe à la fois sur les facteurs biotiques, tels que la croissance bactérienne, et sur les facteurs abiotiques, tels que les phénomènes physico-chimiques qui conduisent à la précipitation du CaCO_3 .

Dans la plupart des études dans lesquelles la bioprécipitation bactérienne est analysée, la priorité est donnée à la température optimale du développement bactérien. La logique derrière cela est qu'en fixant des paramètres qui favorisent l'abondance cellulaire, plus de sites de nucléation sont disponibles et donc plus il y a de précipitation de CaCO_3 . Dans le cas de la bioprécipitation sur les matériaux de construction, l'utilisation de bactéries se développant à température ambiante est généralement envisagée afin de pouvoir traiter les surfaces des structures en extérieur.

Quant à l'influence de la température sur les facteurs physico-chimiques, il est possible de ressortir les effets de :

La solubilité des ions : Selon le principe de Le Chateliers, la température augmente la solubilité d'un composé ionique [81] cependant, à température ambiante, c'est le pH qui dicte la quantité de CO_2 transformée en CO_3^- et qui affecte par conséquent la formation de CaCO_3 [82].

La morphologie du cristal : Il a été démontré qu'à des températures inférieures à 30°C , la vaterite se transforme en calcite, à des températures supérieures à 40°C la vaterite se transforme en aragonite [83].

4.3. Conclusion

Différents facteurs biotiques et abiotique sont responsables de la bioprécipitation bactérienne. Chacun d'entre eux doit être pris en compte pour utiliser ce processus, afin qu'il soit efficace et efficient.

Le mécanisme responsable de la bioprécipitation dépend du type microbien et des éléments présents dans l'environnement où il se développe. Il convient de noter que, selon le mécanisme, des sous-produits indésirables tels que H_2SO_4 peuvent être générés.

Les bactéries classées Gram + sont plus intéressantes à utiliser dans un processus de bioprécipitation en raison de la composition de leur membrane qui génère plus de sites de nucléation que les bactéries Gram -.

L'alcalinité est un facteur important pour ce processus, elle influence la disponibilité des ions CO_3^{2-} . Par ailleurs, il faut une biomasse importante pour optimiser les chances de précipiter de façon homogène les CaCO_3 , les matériaux cimentaires ont un pH de surface très alcalin d'où il est préférable de travailler avec une biomasse capable de croître à la surface de ces matériaux. A ce propos, il faut donc travailler avec des bactéries alcalinophiles ou alcalino-tolérantes.

Comme indiqué précédemment, l'objectif principal de cette recherche est de former une couche de CaCO_3 autour des gravillons recyclés afin de réduire leur porosité et par conséquent leur absorption d'eau. Pour atteindre cet objectif, il faut établir une bioprécipitation homogène autour des gravillons, ce qui nécessite un développement uniforme sur toute leur surface. Il a donc été suggéré que ce développement uniforme peut être réalisé par la formation d'un biofilm, comme c'est le cas sur les supports bactériens en plastique utilisé dans la bioremédiation (Figure

8). À cette fin, il est donc nécessaire de comprendre la formation d'un biofilm. Dans la section suivante, les facteurs qui influencent sa formation sont abordés.

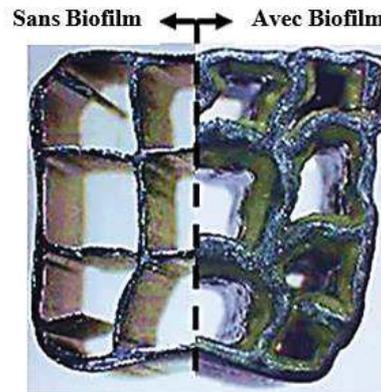


Figure 8. Support formateur de biofilm utilisé dans des bioréacteurs à lit fluidisé pour le traitement d'eaux résiduelles [84].

5. Biofilm

Un biofilm est un amas architectural dans lequel les cellules microbiennes sont enrobées dans une matrice composée de substances polymériques extracellulaires (EPs). À son tour, les EPS sont composées de protéines, de lipides, de polysaccharides, d'ADN, de minéraux et d'autres biomolécules [85]. Cette matrice joue un rôle important dans l'adhésion microbienne aux surfaces, favorise la connexion intracellulaire, fournit un support mécanique, modifie les conditions chimiques du microenvironnement pour favoriser la croissance microbienne et permet de résister aux différents stress comme le stress hydrique. Un biofilm peut être constitué d'une seule espèce microbienne (mono-espèce), ou de deux ou plusieurs espèces (multiespèces). Dans la nature, le biofilm est toujours constitué de plusieurs espèces [86].

Cette section décrit le développement de biofilm en surface et la formation de CaCO_3 au sein d'un biofilm.

5.1. Formation du biofilm bactérien

La capacité de bactéries à adhérer et à se développer sur une surface est en grande partie attribuée à la formation du biofilm [87]. La manière dont un biofilm est formé est illustrée dans la Figure 9, [88] : (1) Au départ, des bactéries, ou des spores bactériennes, arrivent à une surface, à ce moment l'adhésion est réversible car l'attachement est géré par des angles de contact avec des liquides et à travers des flagelles situés à l'extérieur des bactéries (2) lorsque les conditions sont propices à la croissance, ils commencent à se dupliquer, à se différencier et à se déplacer

(3) les bactéries qui ont adhéré à la surface, commencent à former des agglomérats cellulaires, formant une matrice molle (4). Des nutriments commencent à être transportés et distribuer dans la matrice (5) ensuite les cellules bactériennes au sein de la matrice favorisent l'échange de signaux moléculaires, régulant le comportement cellulaire. (6) Différents gradients chimiques sont formés dans différentes parties du biofilm pour modifier le microenvironnement et le rendre plus favorable au développement microbien. À l'extérieur du biofilm, différents agents antimicrobiens l'endommagent, mais les bactéries restent protégées à l'intérieur (selon l'agent antimicrobien, les cellules pourraient arriver à générer une résistance),(8) des morceaux de biofilm peuvent se détacher et entamer un nouveau processus de colonisation. Ces phases peuvent avoir lieu lors de la formation d'un jeune biofilm ainsi que dans un biofilm mature. L'adhésion, colonisation et maturation du biofilm sont expliquées plus en détail ci-dessous.

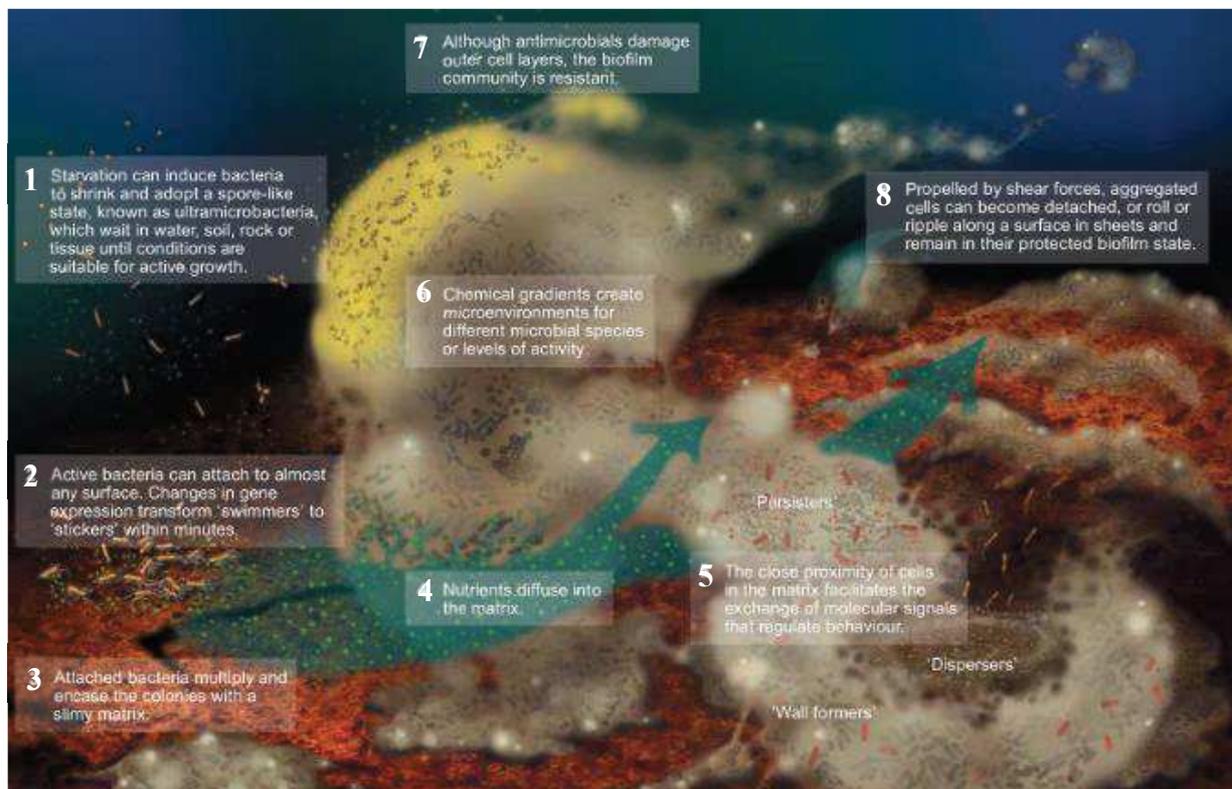


Figure 9. Formation d'un biofilm microbien. Image originale modifiée, extraite de [88]

5.1.1. Adhésion

Dans les premiers stades de l'adhésion, celle-ci est réversible en raison de la faiblesse des forces de Van Der Waals ou d'interactions électrostatiques ou d'interactions stériques [89][90], [91]. Entre la phase d'adhésion et la phase de colonisation, il y a une phase de transition où l'adhésion réversible devient irréversible [92]. Quand les cellules qui sont en

contact avec la surface sont complètement immobilisées, elles génèrent de fortes interactions hydrophobes et hydrophiles grâce à la production d'exopolysaccharides (EPS), de lipopolysaccharides (LPS) [90][93]. Après avoir adhéré à la surface, le processus de formation du biofilm se poursuit par la colonisation.

5.1.2. Colonisation

La colonisation est une étape critique du biofilm jeune et mature, car les cellules cherchent à établir une population viable [94]. Une fois que les cellules bactériennes ont adhéré à une surface, elles la colonisent au travers de trois mécanismes [95] : (i) par la formation d'agglomérats cellulaires, (ii) par la mobilité cellulaire, et (iii) par le recrutement de nouveaux agrégats cellulaires dans le biofilm déjà formé.

Tous ces processus dépendent de l'activation de différentes voies métaboliques, dont la plus importante est la production d'EPS [96]–[99]. Ceux-ci exercent des fonctions de protection contre de facteurs de stress tels que le pH, la déshydratation, les antibiotiques... [100]. C'est donc grâce à la protection de l'EPS que les cellules bactériennes survivent, et augmentent la population en formant des agglomérats. Dans cet état, le biofilm est dit mature [94].

5.1.3. Maturation

Dans la phase de maturation, la région proche de la surface contient des cellules bactériennes enfermées dans une matrice à forte concentration d'acide désoxyribonucléique (ADN), des polysaccharides et des protéines qui les lient à la surface [101], [102]. Le noyau du biofilm mature est composé de canaux qui distribuent l'eau, les nutriments, les déchets et les polysaccharides. Dans un biofilm mature couvrant une grande surface, la distribution des nutriments par diffusion s'avère difficile, c'est pourquoi des canaux qui facilitent la distribution des nutriments sont construits [103].

5.1.4. Dispersion

Deux mécanismes leur sont attribués à la dispersion, un mode actif dans lequel les bactéries initient par elles-mêmes le processus, et un mode passif dans lequel la dispersion est accomplie par des forces externes, telles que l'intervention humaine [104], [105]. Selon la manière dont la dispersion est effectuée, elle peut être classée en trois catégories : desquamation, ensemencement et érosion. Lors de la desquamation, de grandes parties du biofilm sont détachées, lors de l'ensemencement, les cellules bactériennes sont détachées de l'intérieur du biofilm et lors de l'érosion, de petits morceaux de biofilm et de cellules

bactériennes sont enfoncés en continuité pendant la formation du biofilm [104]. L'ensemencement se fait comme un mécanisme actif, tandis que l'écaillage et l'érosion peuvent se faire de manière active ou passive.

5.2. Formation d'un biofilm uniforme

Les facteurs qui influencent le développement d'un biofilm sont classés en trois groupes : - (i) les facteurs environnementaux, tels que la disponibilité des nutriments, la HR, le pH et la température

- (ii) les propriétés de surface, telles que l'hydrophobie, la topographie et la polarité,
- et (iii) les propriétés bactériennes où nous trouvons, le génotype (information génétique des bactéries qui conduit à la production d'EPS et d'autres biomolécules), et le phénotype (caractéristiques physiques des bactéries, comme la présence de flagelles) [106].

Parmi ces facteurs, la capacité à produire des EPS, la disponibilité de nutriments et la rugosité de la surface, sont considérés comme les plus importants [107], [108]. En étudiant la colonisation de *Bacillus subtilis*, il a été établi que les EPS jouent un rôle encore plus important que la motilité bactérienne. Ceux-ci génèrent des gradients de pression osmotique qui permettent la dispersion du biofilm [109], [110]. Ainsi, en travaillant avec une ou plusieurs bactéries qui produisent des EPS en abondance, il est plus probable d'avoir un biofilm qui se disperse dans toutes les directions.

En ce qui concerne à la disponibilité de nutriments, il a été montré avec certaines espèces bactériennes qu'un biofilm formé dans un environnement à faible concentration de nutriments est plus épais et plus abondant [111]. Cependant, ceux-ci se caractérisent par une faible concentration cellulaire. Cela signifie que lorsqu'on induit la formation d'un biofilm dans un environnement riche en nutriments, le biofilm peut ne pas être aussi épais, mais contenir une concentration cellulaire importante. Quant à la bioprécipitation, les cellules bactériennes sont connues pour contenir un grand nombre de sites de nucléation pour la formation de CaCO_3 , il est donc possible d'envisager de travailler avec un biofilm dans lequel des nutriments sont constamment fournis afin d'avoir un biofilm avec une concentration cellulaire élevée.

En ce qui concerne la rugosité de la surface, il a été démontré que les bactéries adhèrent mieux à une surface rugueuse qui présente des irrégularités topographiques de taille similaire au diamètre de cellules [107], [112]. Par conséquent, le fait de travailler avec une surface

contenant des irrégularités de formes et de tailles diverses devrait être propice à la formation de biofilms.

5.3. Formation de CaCO_3 à travers du Biofilm

La précipitation du CaCO_3 au sein du biofilm se déroule au niveau de certains sites fonctionnels des EPS (Figure 10) [113]. La quantité et le type de précipitations sont influencés par le type de EPS, à tel point que même ceux-ci peuvent inhiber les précipitations [79]. La façon dont les CaCO_3 sont formés peut varier, allant de formations cristallines bien ordonnées à des amas de cristaux amorphes.

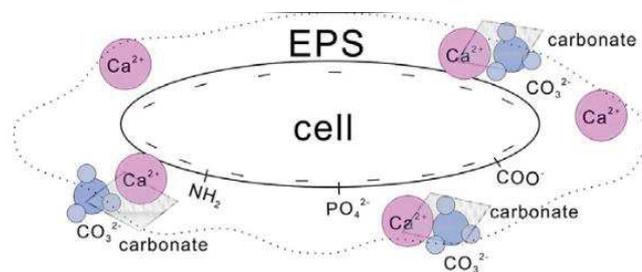


Figure 10. Illustration de la formation de CaCO_3 à travers la matrice d'EPS. Extrait et modifié de [114].

5.4. Conclusion

La colonisation bactérienne d'une surface par la formation d'un biofilm est un phénomène évolutif naturel. Ces microorganismes disposent des outils nécessaires pour se développer sur une surface, pour autant que les conditions du milieu dans lequel ils se développent soient propices à cela.

Parmi les facteurs internes et externes qui favorisent la formation du biofilm, il convient de souligner :

- (i) La capacité des bactéries à produire de EPS
- (ii) La disponibilité des nutriments : plus il est abondant, plus la concentration cellulaire est élevée
- (iii) La taille et la forme des imperfections présentes à la surface du matériau
- (iv) $\text{HR} > 60\%$

Les EPS qui composent le biofilm peuvent servir de sites de nucléation où le CaCO_3 va précipiter contribuant à une bioprécipitation bien répartie et homogène.

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

Après avoir décrit les bases de la bioprécipitation et de la formation de biofilms, la section suivante aborde certaines études dans lesquelles la bioprécipitation est utilisée pour traiter des matériaux de construction, notamment les gravillons recyclés.

6. Application de la bioprécipitation

Les premières applications de la bioprécipitation remontent à 1995 avec le brevet français N° 95 05861 (ce brevet concerne une composition pour mortier biologique contenant séparément une charge minérale et une quantité efficace de bactéries carbonatogènes). Cette technologie est développée sur les monuments historiques est reste une solution [115]. Il est également utilisé pour la consolidation des sols, et il existe un brevet Soletanche à ce sujet, le brevet européen N° EP2118236A1[116].

Bien qu'elle soit utilisée pour la restauration de monuments ou la consolidation de sols, l'application de cette technique sur matériaux cimentaires a continué à être expérimentée. En effet, chaque jour, de nouvelles espèces microbiennes actrices de la bioprécipitation sont découvertes, et des technologies plus efficaces et plus rentables apparaissent. C'est pourquoi de nouvelles expériences sont mises en place afin de comprendre fondamentalement le processus de bioprécipitation en utilisant ces nouvelles découvertes.

6.1. Application sur les matériaux cimentaires, roches et sables

Cette technologie peut être appliquée dans différents domaines : la médecine, l'agriculture, l'exobiologie... nous nous concentrerons sur son application dans le domaine du génie civil. Certaines études et applications de la bioprécipitation sur différents matériaux cimentaires sont résumées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Études dans lesquelles l'analyse ou l'application de la bioprécipitation sur différents matériaux de construction est réalisée.

	Objectif	Microorganisme	Support	Application	Observations	Article
Matériaux cimentaires	Diminution de la perméabilité à l'eau	<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 225 57 (bactérie uréolytique)	Cylindres de mortier (CEM I 52.5)	Immersion dans une suspension bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Le dépôt de CaCO₃ à la surface des échantillons a entraîné une diminution de la succion capillaire et de la perméabilité aux gaz ➤ Le type de culture bactérienne peut influencer la morphologie des CaCO₃ 	[117]
	Diminution de la perméabilité à l'eau	<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 225 57 (bactérie uréolytique)	Cylindres de mortier (CEM I 52.5 N):sable 0/4 ratio	Immersion dans une suspension bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La bioprécipitation a diminué l'absorption d'eau de 65 à 90 % selon la porosité des échantillons ➤ La vitesse de carbonatation et la migration des chlorures ont diminué de 25-30% et 10-40% respectivement 	[118]
	Diminution de la perméabilité à l'eau	<i>Sporosarcina pasteurii</i> souche ATCC 11859 (bactérie uréolytique)	Cylindres de mortier (ASTM C33 et C192)	Aspersion de la suspension bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La perméabilité à l'eau des échantillons a été réduite de 1 à 5 et présente une résistance élevée à la carbonatation 	[119]
	Diminution de la perméabilité à l'eau	<i>Sporosarcina pasteurii</i> souche ATCC 11859 (bactérie uréolytique)	Cylindres de béton (442 Kg ; sable, 473 Kg ; agrégats, 1280 Kg ; et eau, 221 Kg)	Immersion dans une suspension bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La bioprécipitation a réduit l'absorption d'eau capillaire du 25 – 40% (valeur relative) ➤ Le taux de bioprécipitation a été corrélé au rapport eau-ciment. Il est lié à la nature et à la connectivité des pores. Les pores plus grands ont présenté des taux de carbonatation plus élevés. 	[120]
	Améliorer la résistance à la compression d'un mortier	<i>Bacillus algicola</i> KNUC501 (bactérie uréolytique) et <i>Exiguobacterium marinum</i> KNUC513	Cubes de mortier	Incorporations de cellules dans le mortier et immersion dans un milieu	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La résistance à la compression a été augmentée (20%) par l'ajout de bactéries. 	[121]

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

	Améliorer la résistance à la compression d'un mortier	<i>Shewanella</i> sp.	Cubes de mortier Ciment/sable = 1:3 Eau/ciment = 0.4	Incorporations de cellules dans le mortier	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La résistance de mortiers a augmenté en raison du dépôt minéral réalisé par les bactéries ➤ Une protéine sécrétée par la bactérie lixivie la silice et forme de nouvelles phases de silicate qui remplissent les micropores, diminuant la perméabilité 	[122]
	Améliorer la résistance à la compression d'un mortier	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> WJ-8 (bactérie uréolytique)	ciment Hydraulique (KSL 5201)	Incorporations de cellules dans le béton	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les résistances à la compression des échantillons avec <i>Lysinibacillus sphaericus</i> WJ-8 étaient supérieures de 10% et de 11% par rapport aux échantillons non traités. 	[123]
	Diminution de la perméabilité à l'eau	<i>Bacillus pseudofirmus</i> et <i>Sporosarcina pasteurii</i> (bactéries uréolytiques)	Béton	Aspersion de la suspension bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Le procédé diminue la perméabilité du béton fissuré. Brevet US 8.460,458 B2 ➤ L'invention réduit la porosité et colmate les fissures qui apparaissent dans le béton au fil du temps 	[124]
Roche	Protection et consolidation des monuments d'art	<i>Myxococcus xanthus</i> 422	Calcaire poreux de monuments historiques espagnols	Immersion dans une suspension bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La bioprécipitation entraîne une protection et une consolidation importantes des pierres calcaires ➤ La plupart de CaCO₃ sont précipités dans les 5 à 10 premiers jours ➤ Il a été démontré que la composition du milieu, les conditions de culture et le type de bactéries sont des facteurs clés pour contrôler la formation du biofilm, ce qui pourrait améliorer les effets de consolidation et de protection du ciment 	[125]
	Protection des monuments d'art	<i>Bacillus cereus</i> (bactérie uréolytique)	Façade orientale de la cathédrale d'Amiens Brevet français n° 95 05861.	Inoculation bactérienne directe et pulvérisation périodique	<ul style="list-style-type: none"> ➤ L'application de cette invention permet la réparation et l'amélioration des monuments à base de béton 	[126]
	Protection des monuments d'art	(-) Bactérie aérobie	Roches de Tuffeau et de Saint Vaast	Inoculation bactérienne directe et pulvérisation de milieu périodique	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La formation d'une couche de CaCO₃ à la surface réduit l'absorption d'eau ➤ Il est recommandé de nettoyer les zones à traiter avant la bioprécipitation afin d'éliminer les éventuels composants chimiques qui inhibent la croissance bactérienne ➤ Se mejoro la apariencia fisica de los monumentos 	[127]
Sols	Consolidation des sols	<i>Bacillus pasteurii</i>	Sol sablonneux (Rafsanjan Inde)	Injection dans une colonne de sable	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les propriétés mécaniques et physiques des sols sableux ont été améliorées 	[128]

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

		(bactérie uréolytique)			<ul style="list-style-type: none"> ➤ La perméabilité a diminué de 78,3% par rapport au sable non traité 	
	Consolidation des sols	<i>Bacillus pasteurii</i> DSM33 (bactérie uréolytique)	Sable (non spécifié)	Injection dans une colonne de sable	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La résistance des échantillons traités a été cinq fois supérieure à celle des spécimens non traités ➤ L'augmentation de la force est directement liée à la génération de calcite ➤ L'injection supplémentaire de bactéries n'a pas d'effet significatif sur la génération ou la précipitation de CaCO₃ 	[129]
	Consolidation des sols	<i>Sporosarcina pasteurii</i> (bactérie uréolytique)	(Coarse sand: 4.75mm - 2.00mm IS Sieve and Fine sand: 0.425mm - 0.075mm IS Sieve)	Injection dans une colonne de sable	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La perméabilité a été réduite ➤ La résistance à la compression a été significativement plus élevée après que les échantillons aient été traités 	[130]

Parmi les points les plus importants à retenir des études et analyses décrites, on peut citer les suivants :

- (i) Le matériel biologique : la plupart des études utilisent des bactéries uréolytiques. Cependant, récemment il a été démontré que les bactéries hétérotrophes non uréolytiques ont un taux de précipitation plus élevé que celle de bactéries uréolytiques[131].
- (ii) L'application du traitement : par immersion (lorsqu'il s'agissait surtout de gravillons et éprouvettes) et par pulvérisation (dans le cas de traitement de la surface de monuments). Les études concluent que les résultats sont similaires en appliquant le traitement par ces deux manières.

Toutes les études indiquent que la perméabilité a diminué en raison du dépôt de CaCO_3 à la surface ou à l'intérieur des matériaux. Il est également indiqué que l'augmentation des propriétés mécaniques est proportionnelle à la quantité de CaCO_3 bioprécipité.

Il convient de mentionner que l'application de la bioprécipitation présente des inconvénients technologiques, tels que le dépôt aléatoire de CaCO_3 ou la contamination par des espèces invasives, et économiques, tels que l'utilisation d'énergie pour la production de biomasse ou l'utilisation de milieux de culture coûteux [132].

La section suivante aborde quelques études dans lesquelles le traitement par bioprécipitation de gravillons recyclés est analysé.

6.2. Bioprécipitation sure de gravillons recyclés (GBR)

L'application de la bioprécipitation sur les gravillons recyclés a pour but de réduire leur perméabilité à l'eau. Plus précisément, il s'agit de réduire la porosité du mortier résiduel en précipitant le CaCO_3 dans les pores et les microfissures (Figure 11). Certaines études dans lesquelles la bioprécipitation est appliquée sur des gravillons recyclés sont résumées dans le Tableau 5.

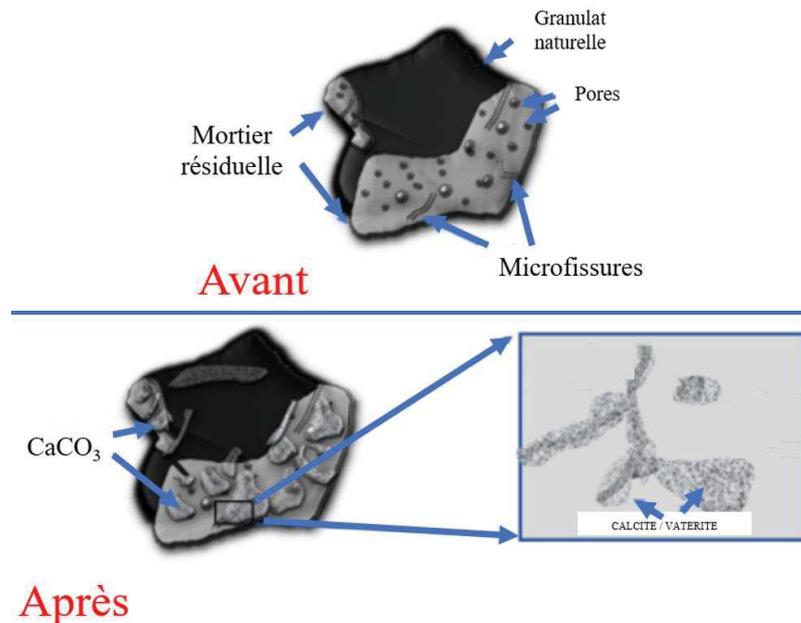


Figure 11. Précipitation de CaCO_3 dans les pores et les microfissures de gravillons recyclés, avant et après d'être traités par bioprécipitation. Modifiée de [132].

Tableau 5. Application de la bioprécipitation sur des gravillons recyclés.

	Objectif	Microorganisme	Support	Application	Observations	Article
Granulats recyclés	Diminution de l'absorption d'eau	<i>B. halodurans</i> C-125 1 x 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹	Gravillons recyclés < 10mm	Immersion dans une suspension bactérienne Urée T=20 -25 °C 28 jours d'incubation Source de Ca ²⁺ = acétate de calcium, C ₄ H ₆ CaO ₄ (50 g·L ⁻¹)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Précipitation hétérogène à la surface des gravillons ➤ Aucune réduction de la perméabilité à l'eau n'a été observée, au contraire, une augmentation a été détectée (peut-être liée à la porosité du CaCO₃ bioprécipité). 	[10]
	Diminution de l'absorption d'eau	<i>B. pseudofirmus</i> (DSM8715) 1 x 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹	Gravillons recyclés et mortier (w/c ratio 0.35 et 0.5) (Ciment portland ASTM Type I <5 mm, 5–10 mm 10–20 mm)	Immersion dans une suspension bactérienne T=26°C 28 jours d'incubation Source de Ca ²⁺ = CaCl ₂ (3.3 g·L ⁻¹)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ L'absorption a été réduite pour les fractions <5 mm, 5–10 mm et 10–20 mm, de 1.38 %, 0.6% et 0.8 % respectivement (valeur absolue). ➤ Pour les mortiers fabriqués (w/c ratio 0.35 et 0.5) avec les gravillons recyclés, l'absorption a été réduite de 4.5 % (valeur absolue). 	[133]
	Diminution de l'absorption d'eau	<i>Bacillus sphaericus</i> LMG22257 3 x 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹	Granulats de béton concassé (CA) et granulats recyclés mélangés (MA).	Pulvérisation et immersion d'une suspension bactérienne T=20 ±1 °C 1 ou 3 jours d'incubation Source de Ca ²⁺ = nitrate de calcium 0.5 M Conditions :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La méthode la plus efficace pour traiter les graviers recyclés était le procédé d'immersion. ➤ Pour les CA, l'absorption a été réduite pour les conditions A, B, C et D de, 0.2 %, 0.3 %, 0.1 % et 0.5 % (valeur absolue). ➤ Pour les MA, l'absorption a été réduite pour les conditions A, B, C et D de, 0.4 %, 0.1 %, 0.7 % et 1.7 % (valeur absolue). 	[134]

				<p>A – immersion dans un milieu 24h et ensuite Immersion dans suspension bactérienne avec source de calcium pendant 3j</p> <p>B - les agrégats immergés dans une suspension bactérienne (3j) très concentrée (10^9 cellules \cdot mL⁻¹), et en remettant en suspension les culots dans du NaCl (8,5 g \cdot L⁻¹).</p> <p>C – le traitement était le même que pour A, seulement le milieu contenait de l'extrait de levure (5 g \cdot L⁻¹).</p> <p>D – Le traitement A appliqué deux fois</p>		
Améliorer la résistance mécanique de mortiers avec recyclés	Espèces de bacilles H4 10^8 UFC \cdot mL ⁻¹	Gravillons recyclés de mortier (ASTM type I) < 5mm	<p>A - Immersion de sables dans une suspension bactérienne T=26 ± 0.5 °C 20 jours d'incubation</p> <p>B - Immersion de sables dans une suspension bactérienne pendant 2 h et après pulvérisation de milieu nutritif en surface (mêmes conditions que A)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les deux méthodes (A et B) sont efficaces pour améliorer les performances mécaniques, et l'absorption des gravillons de mortier ➤ Pour les conditions A et B, l'absorption a été réduite de, 2.9 % et 3.6 % respectivement (valeur absolue). ➤ La résistance à la compression de gravillons de mortier a été augmentée d'un 11,3 % et 16,1 % ➤ La résistance à la flexion de gravillons a été élevée d'une 12,9 % et 20,23 % pour les gravillons de mortier 	[135]	

				C – sables non traités		
Diminution de l'absorption d'eau	<i>B. sphaericus</i> LMG 222 57 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹	Granulats recyclés mixtes et céramiques types : TEC-REC, ANTWERP et BIERZO S - 4–12.5 mm L - 12.5–20 mm	Immersion dans une suspension bactérienne pH 7 Urée T=28 °C 4 jours d'incubation Source de Ca ²⁺ = Ca (NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O (47 g·L ⁻¹)		<ul style="list-style-type: none"> ➤ La bioprécipitation a diminué l'absorption des granulats : TEC-TEC ; fraction S de 1%, fraction L 2% (valeur absolue) ANTWERP ; fraction S de 0.1%, fraction L 0.2% (valeur absolue) ➤ Bierzo ; fraction S de 1.2%, fraction L 1.3% (valeur absolue) 	[118]
Diminution de l'absorption d'eau	<i>S. pasteurii</i> DSM 33 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹	Gravillons de mortier (CEM I, 42.5 R) Condition A w/c ratio 0.45 Condition B w/c ratio 0.45 Fractions S - 6–8 mm, et L - 12–16 mm	Immersion dans une suspension bactérienne Urée T=26 °C 5 jours d'incubation Source de Ca ²⁺ = CaCl ₂ 2%		<ul style="list-style-type: none"> ➤ La bioprécipitation a diminué l'absorption des conditions : A ; fraction S de 0.8 %, fraction L 0.5 % (valeur absolue) B ; fraction S de 1.1 %, fraction L 0.5 % (valeur absolue) 	[136]

	Diminution de l'absorption d'eau	<i>B. sphaericus</i> 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹ pH culture = 7.5 et 9.5	Gravillons recyclés de haute qualité (RCA ; 6,3/20), et granulats recyclés mixtes (MA ; 6,3/20).	Immersion dans une suspension bactérienne (appliqué 1 ou 2 fois) Urée avec de l'acétate et formate à 0.25 et 0.5 M respectivement 3 jours d'incubation	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Le poids des gravillons recyclés (RCA) a augmenté de 0.41 et 0.89%, dû au dépôt de CaCO₃. Les poids des gravillons recyclés mixtes (MA) ont augmenté de 1.21 et 1.41%. ➤ Le traitement par immersion a semblé être le plus efficace ➤ La bioprécipitation a diminué l'absorption de : RCA ; avec 1 traitement de 0.24 %, 2 traitements 0.28 % (valeur absolue) MA ; avec 1 traitement de 0.04 %, 2 traitements 1.18 % (valeur absolue) ➤ 	[137]
--	----------------------------------	---	--	--	--	-------

Parmi les études présentées ci-dessus, il convient de souligner :

- (i) Généralement des bactéries uréolytiques sont utilisées (10^8 et 10^9 UFC·mL⁻¹). La plupart des études ne mentionnent pas le pH des cultures bactériennes ; il est donc suggéré qu'elles ont été réalisées au pH optimal de chaque bactérie.
- (ii) La méthode d'application : Dans la plupart des cas, les gravillons recyclés sont immergés dans des suspensions bactériennes pendant des périodes allant de 3 à 28 jours à des températures comprises entre 20 et 26 °C.
- (iii) Quantité de calcium : Tous les articles utilisent de concentrations en Ca²⁺ comprises entre 1.1 g·L⁻¹ et 12.66 g·L⁻¹.
- (iv) La diminution de l'absorption : Toutes les études sauf une montrent une diminution de la perméabilité des gravillons. Certains mettent en évidence une augmentation des propriétés mécaniques des mortiers fabriqués avec des gravillons traités par rapport à ceux fabriqués avec des gravillons non traités.

Malgré les résultats encourageants de ces études, il manque généralement des témoins comparatifs, afin d'apprécier réellement l'efficacité du traitement.

7. Conclusion de la bibliographie et plan de travail

La première partie de la synthèse bibliographique décrit l'origine et la composition des granulats de béton recyclés (GBR). Elle permet de conclure que la présence de pâte de ciment résiduelle confère aux GBR une porosité importante et de faibles performances mécaniques. De même, elle souligne que le processus de fabrication des GBR conduit à avoir plus de pâte dans les particules les plus fines. Si bien qu'aujourd'hui, on recycle relativement bien les GBR, alors que l'on utilise peu les sables de béton recyclés (SBR) du fait de leur moins bonne performance. Or, en général, lors de la fabrication des granulats recyclés, on obtient environ 50 % de sable et 50 % de gravillons. Le fait de ne pas recycler les SBR impacte donc fortement la filière de recyclage du béton.

L'absorption des SBR est un frein important sur le plan industriel. Elle est fluctuante, ce qui conduit à des irrégularités sur l'affaissement puisqu'il faut maintenir l'eau efficace constante. Et même si l'absorption est constante, elle n'est pas instantanée. Ainsi, lorsque l'état hydrique des SBR varie, il devient difficile de piloter l'ouvrabilité du béton, car l'eau amenée par le sable est absorbée ou adsorbée, mais en des proportions variables au cours du temps. On

a donc des variations d'eau disponible pour lubrifier le mélange en cours de production. Il apparaît donc nécessaire de limiter cette absorption.

Pour limiter ou diminuer cette absorption, une des voies prometteuses est la bioprécipitation, comme le montre la seconde partie de cette bibliographie. L'idée consiste à créer une gangue de CaCO_3 autour de gravillons recyclés. Le dépôt de CaCO_3 par bioprécipitation se produit grâce à l'activité microbienne, et selon le microorganisme qui le réalise, le processus peut ne pas générer de composés polluants (comme le H_2SO_4). Il s'agit donc d'un procédé respectueux de l'environnement. La bioprécipitation n'est pas un procédé mécanique ou thermique, il n'endommage pas les gravillons recyclés.

Même si cette technique ne permettra pas *a priori* de résoudre le problème de résistance mécanique (mais ceci peut être compensé par un ajout de ciment), elle devrait permettre de réguler la production de béton avec des recyclés. Dans une étude précédente [10], nous avons obtenu des résultats prometteurs sur ce sujet mais pas aussi bons qu'attendu. À l'issue de ce travail, nous avons relevé les points suivants :

- (i) *B. halodurans* C-125 a été adaptée pour se développer à un pH de 12. Cependant, son développement n'avait pas été homogène sur GBR.
- (ii) Le dépôt de CaCO_3 par *B. halodurans* C-125, avec un apport d'acétate de calcium, était hétérogène à la surface des GBR ainsi que sur des disques de mortier modèles. Il a été suggéré que la cause principale soit son mauvais développement à la surface du matériau.
- (iii) Il a été déterminé que l'uniformité du dépôt de CaCO_3 était améliorée en inoculant *B. halodurans* par pulvérisation multiple et en créant en même temps un stress hydrique. Toutefois, malgré cela, le dépôt était toujours hétérogène.
- (iv) Une conséquence de cette hétérogénéité a été qu'aucune diminution de l'absorption de sable recyclé n'a pu être observée.

Sur la base de ces points, dans la suite de la synthèse bibliographique, nous nous sommes intéressés à la compréhension des fondements du processus de bioprécipitation, de ses enjeux, ainsi que des expérimentations et applications sur les matériaux cimentaires. Cette analyse nous a permis de conclure que :

- Afin de réaliser ce processus sur les gravillons, il est donc nécessaire de travailler avec une bactérie qui résiste à un pH alcalin (pH 11-13). Il convient aussi de choisir des

bactéries Gram +, car elles possèdent un plus grand nombre de sites de nucléation que les bactéries Gram -.

- Pour que la bioprécipitation contribue à améliorer la qualité des gravillons recyclés, elle doit être réalisée sur l'ensemble de la surface du matériau. Par conséquent, si l'on veut obtenir un dépôt homogène de CaCO_3 , il faut donner la priorité à une colonisation bactérienne homogène. En conséquence, il faut privilégier des bactéries qui, en plus de se développer dans un environnement alcalin, peuvent former un biofilm dans ces conditions.
- Le biofilm protège non seulement les bactéries de l'alcalinité, de la sécheresse ou d'autres conditions défavorables, mais joue également un rôle essentiel pour l'adhérence à la surface et la colonisation, grâce à sa riche teneur en exopolymères. En plus d'aider les bactéries à coloniser, le biofilm peut également servir de site de nucléation pour la formation de CaCO_3 .
- L'application de la bioprécipitation sur les gravillons recyclés est encore à un stade expérimental. Les études sur ce sujet utilisent généralement des bactéries uréolytiques, mais il a été récemment démontré que les bactéries non uréolytiques ont un meilleur rendement de production de CaCO_3 .
- Dans la plupart des études, la bioprécipitation est appliquée par l'immersion des gravillons dans des suspensions bactériennes. Une autre technique, bien que très peu utilisée, est la pulvérisation des suspensions bactériennes sur les matériaux à traiter. Selon la littérature, ces deux techniques offrent des résultats similaires, en diminuant la perméabilité à l'eau de gravillons.
- Bien que les études visent à traiter une surface solide, elles se concentrent sur l'analyse de la production de CaCO_3 en suspension bactérienne, et non en milieu solide, ce qui manque de cohérence. Enfin, il convient d'ajouter qu'aucune analyse n'aborde la question du biofilm en tant qu'amplificateur possible de la colonisation et de la bioprécipitation.

Sur la base de cette analyse bibliographique et en partant de l'expérience acquise lors de l'étude précédente, nous avons identifié un certain nombre d'étapes visant à améliorer le traitement de granulats de béton recyclés et en particulier de sable de béton recyclé. Elles sont la base du présent travail qui est présenté dans les chapitres suivants :

- (i) Vérifier que *B. halodurans* C-125 peut, en plus de se développer en milieu alcalin et de précipiter le CaCO₃, se développer en formant un biofilm.
- (ii) Si *B. halodurans* C-125 n'est pas capable de former un biofilm, trouver de nouvelles souches qui puissent croître en milieu alcalin (11 – 13), précipiter CaCO₃, et former un biofilm homogène.
- (iii) Mettre au point un procédé de bioprécipitation sur surface modèle (gélose), des méthodes de quantification et de caractérisation des CaCO₃ obtenus et si possible une méthode permettant d'évaluer leur répartition spatiale.
- (iv) Adapter le procédé de bioprécipitation sur disques de mortier modèle, afin de faciliter les observations, et évaluer quantitativement la diminution de l'absorption.
- (v) Appliquer le procédé aux GBR et plus particulièrement aux SBR.

8. Références

- [1] J. L. Gálvez-Martos, D. Styles, H. Schoenberger, and B. Zeschmar-Lahl, "Construction and demolition waste best management practice in Europe," *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 136, no. April, pp. 166–178, 2018, doi: 10.1016/j.resconrec.2018.04.016.
- [2] Federation Francaise du Bâtiment, "Étude de scénarii pour la mise en place d'une organisation permettant une gestion efficace des déchets du bâtiment dans le cadre d'une économie circulaire," 2019. [Online]. Available: <https://www.ffbatiment.fr/federation-francaise-du-batiment/le-batiment-et-vous/construction-durable/la-gestion-des-dechets-de-chantier.html>.
- [3] Ministère de l'Économie et des Finances, "50 Mesures pour une économie % circulaire," 2018.
- [4] IREX, "Recommandations RECYBETON. Comment recycler le béton dans le béton," p. 74, 2018, [Online]. Available: https://www.pnrecybeton.fr/wp-content/uploads/2018/11/RECYBETON_Recommandations_2018-11-26.pdf.
- [5] F. De Larrard and H. Colina, "Le béton recyclé," 2018. [Online]. Available: https://www.ifsttar.fr/fileadmin/user_upload/editions/ifsttar/ouvragescientifiques/2018-OSI4-ouvragescientifiques-Ifsttar.pdf.
- [6] Cerema, "Graves de déconstruction," 2014. [Online]. Available:

- https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj81d3X8LzmAhUs8uAKHYsNDagQFjAAegQIARAC&url=https%3A%2F%2Fwww.idrrim.com%2Fressources%2Fdocuments%2F6%2F3021%2CGraves_deconstruction_02_04_14WEB.pdf&usg=AOvVaw3Yn-
- [7] M. Nedeljković, J. Visser, B. Šavija, S. Valcke, and E. Schlangen, “Use of fine recycled concrete aggregates in concrete: A critical review,” *J. Build. Eng.*, vol. 38, no. January, p. 102196, 2021, doi: 10.1016/j.job.2021.102196.
- [8] M. Nedeljković, J. Visser, T. G. Nijland, S. Valcke, and E. Schlangen, “Physical, chemical and mineralogical characterization of Dutch fine recycled concrete aggregates: A comparative study,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 270, 2021, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2020.121475.
- [9] A. Z. Bendimerad, E. Roziere, and A. Loukili, “Combined experimental methods to assess absorption rate of natural and recycled aggregates,” *Mater. Struct. Constr.*, vol. 48, no. 11, pp. 3557–3569, 2015, doi: 10.1617/s11527-014-0421-5.
- [10] M. Medevielle, “Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé, Ph.D. dissertation, MAST,” École centrale de Nantes, 2019.
- [11] D.-T. Dao, “(Multi-) recyclage du béton hydraulique, Ph.D. dissertation,” Ecole centrale de Nantes, 2012.
- [12] C. Neno, J. De Brito, and R. Veiga, “Using fine recycled concrete aggregate for mortar production,” *Mater. Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 168–177, 2014, doi: 10.1590/S1516-14392013005000164.
- [13] Z. Zhao, S. Remond, D. Damidot, and W. Xu, “Influence of fine recycled concrete aggregates on the properties of mortars,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 81, pp. 179–186, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.02.037.
- [14] F. Rodrigues, L. Evangelista, and J. De Brito, “A new method to determine the density and water absorption of fine recycled aggregates,” *Mater. Res.*, vol. 16, no. 5, pp. 1045–1051, 2013, doi: 10.1590/S1516-14392013005000074.
- [15] “NF EN 12620+A1 - Juin 2008.” <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-12620a1/granulats-pour-beton/article/702719/fa157250> (accessed Aug. 18, 2020).

- [16] T. Le, G. Le Saout, E. Garcia-Diaz, D. Betrancourt, and S. Rémond, “Hardened behavior of mortar based on recycled aggregate: Influence of saturation state at macro- and microscopic scales,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 141, pp. 479–490, 2017, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2017.02.035.
- [17] T. Sedran, “Adaptation des méthodes de formulation au béton de granulats recyclés,” in *Le béton recyclé*, F. Larrard and H. Colina, Eds. Marne-la-Vallée: Ifsttar, 2018, pp. 359–378.
- [18] C. C. Fan, R. Huang, H. Hwang, and S. J. Chao, “The effects of different fine recycled concrete aggregates on the properties of Mortar,” *Materials (Basel)*, vol. 8, no. 5, pp. 2658–2672, 2015, doi: 10.3390/ma8052658.
- [19] P. C. C. Gomes, C. Ulsen, F. A. Pereira, M. Quattrone, and S. C. Angulo, “Comminution and sizing processes of concrete block waste as recycled aggregates,” *Waste Manag.*, vol. 45, pp. 171–179, 2015, doi: 10.1016/j.wasman.2015.07.008.
- [20] S. V. Kumar and M. Santhanam, “Particle packing theories and their application in concrete mixture proportioning: A review,” *Indian Concr. J.*, vol. 77, no. 9, pp. 1324–1331, 2003.
- [21] A. Djerbi Tegguer, “Determining the water absorption of recycled aggregates utilizing hydrostatic weighing approach,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 27, no. 1, pp. 112–116, 2012, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2011.08.018.
- [22] “Free Moisture and Absorption of Aggregates - Engineering things.” <https://engthings.blogspot.com/2018/01/free-moisture-and-absorption-of.html> (accessed Jan. 29, 2021).
- [23] “Norme NF EN 1097-6, 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, ICS : 91.100.15,,” pp. 18-650–6, Accessed: Jan. 24, 2022. [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-10976/essais-pour-determiner-les-caracteristiques-mecaniques-et-physiques-des-gra/fa163899/42536>.
- [24] F. de Larrard, “Concrete mixture proportioning : a scientific approach,” p. 421, 1999.
- [25] “Norme NF EN 206/CN, Béton - Spécification, performance, production et conformité -

- Complément national à la norme NF EN 206, ICS : 91.080.40 ; 91.100.30,” 2014. <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-206-cn/beton-specification-performance-production-et-conformite-complement-nationa/fa185553/1463> (accessed Jan. 24, 2022).
- [26] M. Sereng, “Amélioration des propriétés des granulats recyclés par stockage de CO₂ : étude de la faisabilité pré-industrielle, Ph.D. dissertation, MAST,” Université Paris-Est, 2020.
- [27] M. B. Leite, “Avaliação de propriedades mecânicas de concretos produzidos com agregados reciclados de resíduos de construção e demolição,” 2001.
- [28] IFSTTAR, “Test Method No. 78:2011. Tests on Aggregates for Concrete: Measurement of Total Water Absorption by a Crushed Sand.” Paris, 2011.
- [29] J. Geng and J. Sun, “Characteristics of the carbonation resistance of recycled fine aggregate concrete,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 49, pp. 814–820, 2013, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2013.08.090.
- [30] J. Rueda, E. Dapena, P. Alaejos, and S. Menéndez De Llano, “An accelerated test to assess the quality of recycled concrete sands based on their absorption capacity,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 78, pp. 464–469, 2015, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2014.12.039.
- [31] Z. Li, J. Liu, and Q. Tian, “Method for controlling the absorbed water content of recycled fine aggregates by centrifugation,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 160, pp. 316–325, 2018, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2017.11.068.
- [32] Z. Li, J. Liu, J. Xiao, and P. Zhong, “A method to determine water absorption of recycled fine aggregate in paste for design and quality control of fresh mortar,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 197, pp. 30–41, 2019, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2018.11.115.
- [33] M. E. Sosa, L. E. Carrizo, C. J. Zega, and Y. A. Villagrán Zaccardi, “Water absorption of fine recycled aggregates: effective determination by a method based on electrical conductivity,” *Mater. Struct. Constr.*, vol. 51, no. 5, 2018, doi: 10.1617/s11527-018-1248-2.
- [34] C. Horacio, D. E. L. François, and D. Brice, “Comment recycler le beton dans le beton.” 2018, [Online]. Available: https://www.pnrecybeton.fr/wp-content/uploads/2018/11/RECYBETON_Recommandations_2018-11-26.pdf.

- [35] N. Tošić, J. M. Torrenti, T. Sedran, and I. Ignjatović, “Toward a codified design of recycled aggregate concrete structures: Background for the new fib Model Code 2020 and Eurocode 2,” *Struct. Concr.*, vol. 22, no. 5, pp. 2916–2938, Oct. 2021, doi: 10.1002/SUCO.202000512.
- [36] “Norme NF EN 1097-2, Essais pour déterminer les caractéristiques mécaniques et physiques de granulats Partie 2 : Méthodes pour la détermination de la résistance à la fragmentation, ICS : 91.100.15.” p. P 18-650-2, Accessed: Jan. 24, 2022. [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-10972/essais-pour-determiner-les-caracteristiques-mecaniques-et-physiques-de-gran/fa163871/35506>.
- [37] “Norme NF EN 1097-1, Essais pour déterminer les caractéristiques mécaniques et physiques des granulats Partie 1 : Détermination de la résistance à l’usure (micro-Deval), ICS : 91.100.15.” p. P 18-650-1, Accessed: Jan. 24, 2022. [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-10971/essais-pour-determiner-les-caracteristiques-mecaniques-et-physiques-des-gra/fa163865/37734>.
- [38] S. C. Angulo, C. Ulsen, V. M. John, H. Kahn, and M. A. Cincotto, “Chemical-mineralogical characterization of C&D waste recycled aggregates from São Paulo, Brazil,” *Waste Manag.*, vol. 29, no. 2, pp. 721–730, 2009, doi: 10.1016/j.wasman.2008.07.009.
- [39] G. Bianchini, E. Marrocchino, R. Tassinari, and C. Vaccaro, “Recycling of construction and demolition waste materials: A chemical-mineralogical appraisal,” *Waste Manag.*, vol. 25, no. 2 SPEC. ISS., pp. 149–159, 2005, doi: 10.1016/j.wasman.2004.09.005.
- [40] A. Sicakova and K. Urban, “The influence of discharge time, kind of additive, and kind of aggregate on the properties of three-stage mixed concrete,” *Sustain.*, vol. 10, no. 11, 2018, doi: 10.3390/su10113862.
- [41] S. Lotfi and P. Rem, “Recycling of End of Life Concrete Fines into Hardened Cement and Clean Sand,” *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)*, vol. 07, no. 06, pp. 934–950, 2016, doi: 10.4236/jep.2016.76083.
- [42] “Norme NF EN 933-11, Essais pour déterminer les caractéristiques géométriques des granulats Partie 11 : Essai de classification des constituants de gravillons recyclés, ICS : 91.100.15.” p. P 18-622-11, Accessed: Jan. 24, 2022. [Online]. Available:

- <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-93311/essais-pour-determiner-les-caracteristiques-geometriques-des-granulats-part/fa160044/33401>.
- [43] “Norme NF P18-545, Granulats - Éléments de définition, conformité et codification, ICS : 91.100.15.” Accessed: Jan. 25, 2022. [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-p18545/granulats-elements-de-definition-conformite-et-codification/fa164857/37796>.
- [44] S. Devoie, Z. Zhao, F. Michel, and L. Courard, “Utilisation des sables et granulats recyclés dans le béton préfabriqué: comparaison des exigences réglementaires et techniques en Europe,” 2018, no. Conférence Internationale Francophone NoMaD.
- [45] “Norme NF EN 12350-2, Essais pour béton frais — Partie 2 : Essai d’affaissement, ICS : 91.100.30.” p. P 18-431-2, Accessed: Jan. 24, 2022. [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-123502/essais-pour-beton-frais-partie-2-essai-daffaissement/fa190558/83431>.
- [46] “Norme NF EN 12390-3, Essais pour béton durci — Partie 3 : Résistance à la compression des éprouvettes, ICS : 91.100.30.” p. P 18-430-3, Accessed: Jan. 24, 2022. [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-123903/essais-pour-beton-durci-partie-3-resistance-a-la-compression-des-eprouvette/fa190566/83462>.
- [47] T. Le, S. Rémond, G. Le Saout, and E. Garcia-Diaz, “Fresh behavior of mortar based on recycled sand - Influence of moisture condition,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 106, pp. 35–42, 2016, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.12.071.
- [48] T. Ghorbel, T. Sedran, and G. Wardeh, “Propriétés mécaniques instantanées,” in *Le béton recyclé*, F. Larrand and H. Colina, Eds. Marne-la-Vallée: Ifsttar, 2018, pp. 211–240.
- [49] P. Pereira, L. Evangelista, and J. De Brito, “The effect of superplasticizers on the mechanical performance of concrete made with fine recycled concrete aggregates,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 34, no. 9, pp. 1044–1052, 2012, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2012.06.009.
- [50] H. K. A. Al-Bayati, P. K. Das, S. L. Tighe, and H. Baaj, “Evaluation of various treatment methods for enhancing the physical and morphological properties of coarse recycled concrete aggregate,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 112, pp. 284–298, Jun. 2016, doi:

- 10.1016/j.conbuildmat.2016.02.176.
- [51] E. Mulder, T. P. R. de Jong, and L. Feenstra, “Closed Cycle Construction: An integrated process for the separation and reuse of C&D waste,” *Waste Manag.*, vol. 27, no. 10, pp. 1408–1415, 2007, doi: 10.1016/j.wasman.2007.03.013.
- [52] A. Akbarnezhad, “Microwave - Assisted Production of Aggregates from Demolition Debris,” Amirkabir University of Technology, 2010.
- [53] H. Ogawa and T. Nawa, “Improving the quality of recycled fine aggregate by selective removal of brittle defects,” *J. Adv. Concr. Technol.*, vol. 10, no. 12, pp. 395–410, 2012, doi: 10.3151/jact.10.395.
- [54] S. Ismail and M. Ramli, “Engineering properties of treated recycled concrete aggregate (RCA) for structural applications,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 44, pp. 464–476, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2013.03.014.
- [55] “Calcium carbonate | CaCO₃ - PubChem.” <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10112> (accessed Apr. 28, 2020).
- [56] N. H. de Leeuw and S. C. Parker, “Surface Structure and Morphology of Calcium Carbonate Polymorphs Calcite, Aragonite, and Vaterite: An Atomistic Approach,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, no. 16, pp. 2914–2922, 2002, doi: 10.1021/jp973210f.
- [57] S. Gopi, V. K. Subramanian, and K. Palanisamy, “Aragonite-calcite-vaterite: A temperature influenced sequential polymorphic transformation of CaCO₃ in the presence of DTPA,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 48, no. 5, pp. 1906–1912, 2013, doi: 10.1016/j.materresbull.2013.01.048.
- [58] P. He, C. Shi, and C. S. Poon, “Methods for the assessment of carbon dioxide absorbed by cementitious materials,” *Carbon Dioxide Sequestration Cem. Constr. Mater.*, vol. 2, pp. 103–126, 2018, doi: 10.1016/B978-0-08-102444-7.00006-X.
- [59] B. Šavija and M. Luković, “Carbonation of cement paste: Understanding, challenges, and opportunities,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 117, no. May, pp. 285–301, 2016, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2016.04.138.
- [60] C. A. García-González *et al.*, “Modification of composition and microstructure of Portland cement pastes as a result of natural and supercritical carbonation procedures,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 45, no. 14, pp. 4985–4992, Jul. 2006, doi: 10.1021/ie0603363.

- [61] L. Czarnecki and P. Woyciechowski, “Modelling of concrete carbonation; Is it a process unlimited in time and restricted in space?,” *Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci.*, vol. 63, no. 1, pp. 43–54, 2015, doi: 10.1515/bpasts-2015-0006.
- [62] J. J. Chang, W. Yeih, R. Huang, and J. M. Chi, “Mechanical properties of carbonated concrete,” *J. Chinese Inst. Eng. Trans. Chinese Inst. Eng. A/Chung-kuo K. Ch’eng Hsueh K’an*, vol. 26, no. 4, pp. 513–522, 2003, doi: 10.1080/02533839.2003.9670804.
- [63] C. Shi, Z. Tu, M. Z. Guo, and D. Wang, “Accelerated carbonation as a fast curing technology for concrete blocks,” *Sustain. Nonconv. Constr. Mater. using Inorg. Bond. Fiber Compos.*, pp. 313–341, 2017, doi: 10.1016/B978-0-08-102001-2.00015-2.
- [64] M. Fernández Bertos, S. J. R. Simons, C. D. Hills, and P. J. Carey, “A review of accelerated carbonation technology in the treatment of cement-based materials and sequestration of CO₂,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 112, no. 3, pp. 193–205, 2004, doi: 10.1016/j.jhazmat.2004.04.019.
- [65] S. Ahmad, “Accelerated carbon dioxide sequestration,” *Carbon Dioxide Sequestration Cem. Constr. Mater.*, pp. 81–101, 2018, doi: 10.1016/B978-0-08-102444-7.00005-8.
- [66] Q. Huy Vu *et al.*, “Impact of different climates on the resistance of concrete to natural carbonation,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 216, pp. 450–467, 2019, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2019.04.263.
- [67] J. Zhang, C. Shi, Y. Li, X. Pan, C. S. Poon, and Z. Xie, “Influence of carbonated recycled concrete aggregate on properties of cement mortar,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 98, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.08.087.
- [68] Z. Zhao, S. Remond, D. Damidot, L. Courard, and F. Michel, “Improving the properties of recycled concrete aggregates by accelerated carbonation,” *Proc. Inst. Civ. Eng. Constr. Mater.*, vol. 171, no. 3, pp. 126–132, 2018, doi: 10.1680/jcoma.17.00015.
- [69] P. Anbu, C. H. Kang, Y. J. Shin, and J. S. So, “Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications,” *Springerplus*, vol. 5, no. 1, pp. 1–26, 2016, doi: 10.1186/s40064-016-1869-2.
- [70] W. M. Shaban, J. Yang, H. Su, K. H. Mo, L. Li, and J. Xie, “Quality improvement techniques for recycled concrete aggregate: A review,” *J. Adv. Concr. Technol.*, vol. 17, no. 4, pp. 151–167, 2019, doi: 10.3151/jact.17.4.151.

- [71] S. Castanier, G. Le Métayer-Levrel, and J.-P. Perthuisot, “Ca-carbonates precipitation and limestone genesis the microbiogeologist point of view,” *Sediment. Geol.*, vol. 126, pp. 9–23, 1999.
- [72] S. Castanier, G. Le Metayer-Levrel, and J. P. Perthuisot, “Bacterial carbonatogenesis,” in *Hydrology and Isotope Geochemistry*, 1998, pp. 197–218, [Online]. Available: <https://inis.iaea.org/search/searchsinglerecord.aspx?recordsFor=SingleRecord&RN=30008490>.
- [73] J. Wang, Y. C. Ersan, N. Boon, and N. De Belie, “Application of microorganisms in concrete: a promising sustainable strategy to improve concrete durability,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 7, pp. 2993–3007, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7370-6.
- [74] M. Seifan and A. Berenjian, “Application of microbially induced calcium carbonate precipitation in designing bio self-healing concrete,” *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018 3411, vol. 34, no. 11, pp. 1–15, Nov. 2018, doi: 10.1007/S11274-018-2552-2.
- [75] N. Dilbaghi and S. Sharma, “Food spoilage, food infections and intoxications caused by microorganisms and methods for their detection,” *Food Ind. Microbiol.*, no. January, pp. 2–42, 2007.
- [76] K. Quan *et al.*, “Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions,” *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–20, 2021, doi: 10.1080/1040841X.2021.1962802.
- [77] B. Bary and A. Sellier, “Coupled moisture - Carbon dioxide-calcium transfer model for carbonation of concrete,” *Cem. Concr. Res.*, vol. 34, no. 10, pp. 1859–1872, 2004, doi: 10.1016/j.cemconres.2004.01.025.
- [78] D. Christophe, R. P. Reid, and V. Pieter T., “Microbialites,” *Encyclopedia of Geobiology*. Springer Netherlands, pp. 617–635, 2003.
- [79] C. Dupraz, R. P. Reid, O. Braissant, A. W. Decho, R. S. Norman, and P. T. Visscher, “Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats,” *Earth-Science Rev.*, vol. 96, no. 3, pp. 141–162, 2009, doi: 10.1016/j.earscirev.2008.10.005.
- [80] T. D. Hoffmann, B. J. Reeksting, and S. Gebhard, “Bacteria-induced mineral precipitation: A mechanistic review,” *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 167, no. 4,

- 2021, doi: 10.1099/mic.0.001049.
- [81] J. A. Campbell, “Le Chatelier’s Principle, Temperature Effects, and Entropy,” vol. 62, no. 3, pp. 231–232, 1985.
- [82] W. Knoche, “Chemical Reactions of CO₂ in Water,” Springer, Berlin, Heidelberg, 1980, pp. 3–11.
- [83] W. Mejri, A. Korchef, M. Tlili, and M. Ben Amor, “Effects of temperature on precipitation kinetics and microstructure of calcium carbonate in the presence of magnesium and sulphate ions,” *Desalin. Water Treat.*, vol. 52, no. 25–27, pp. 4863–4870, 2014, doi: 10.1080/19443994.2013.808813.
- [84] A. di Biase, T. R. Devlin, and J. A. Oleszkiewicz, “Start-Up of an Anaerobic Moving Bed–Biofilm Reactor and Transition to Brewery Wastewater Treatment,” *J. Environ. Eng.*, vol. 142, no. 12, p. 06016008, 2016, doi: 10.1061/(asce)ee.1943-7870.0001146.
- [85] L. Karygianni, Z. Ren, H. Koo, and T. Thurnheer, “Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities,” *Trends Microbiol.*, vol. 28, no. 8, pp. 668–681, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.TIM.2020.03.016.
- [86] M. Burmølle, D. Ren, T. Bjarnsholt, and S. J. Sørensen, “Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter?,” *Trends Microbiol.*, vol. 22, no. 2, pp. 84–91, 2014, doi: 10.1016/j.tim.2013.12.004.
- [87] D. López, H. Vlamakis, and R. Kolter, “Biofilms,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, pp. 1–11, 2010.
- [88] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, “Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, 2004, doi: 10.1038/nrmicro821.
- [89] T. R. Garrett, M. Bhakoo, and Z. Zhang, “Bacterial adhesion and biofilms on surfaces,” *Prog. Nat. Sci.*, vol. 18, no. 9, pp. 1049–1056, 2008, doi: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- [90] W. Yin, Y. Wang, L. Liu, and J. He, “Biofilms: The microbial ‘protective clothing’ in extreme environments,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 14, 2019, doi: 10.3390/ijms20143423.
- [91] C. R. Armbruster and M. R. Parsek, “New insight into the early stages of biofilm

- formation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 17, pp. 4317–4319, 2018, doi: 10.1073/pnas.1804084115.
- [92] V. Carniello, B. W. Peterson, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher, “Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 261, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1016/j.cis.2018.10.005.
- [93] D. H. Limoli, C. J. Jones, and D. J. Wozniak, “Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–19, 2015, doi: 10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014.
- [94] M. Grinberg, T. Orevi, and N. Kashtan, “Bacterial surface colonization, preferential attachment and fitness under periodic stress,” *PLOS Comput. Biol.*, vol. 15, no. 3, p. e1006815, Mar. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1006815.
- [95] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton, “Biofilms as Complex Differentiated Communities,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 187–209, 2002, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- [96] R. M. Donlan, “Biofilms: microbial life on surfaces.,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 9, pp. 881–90, 2002, doi: 10.3201/eid0809.020063.
- [97] A. D. Baughn and K. Y. Rhee, “Biofilm Matix Proteins,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 2, no. 3, pp. 1–16, 2014, doi: 10.1128/microbiolspec.
- [98] P. S. Stewart and M. J. Franklin, “Physiological heterogeneity in biofilms.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 199–210, 2008, doi: 10.1038/nrmicro1838.
- [99] N. Castro-Bravo, J. M. Wells, A. Margolles, and P. Ruas-Madiedo, “Interactions of surface exopolysaccharides from bifidobacterium and lactobacillus within the intestinal environment,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. OCT, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02426.
- [100] M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, and N. Nomura, “Environmental factors that shape biofilm formation,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 80, no. 1, pp. 7–12, 2016, doi: 10.1080/09168451.2015.1058701.
- [101] A. ROUX and J.-M. GHIGO, “Les biofilms bactériens,” *Bull. Acad. Vet. Fr.*, no. 1, p. 261, 2006, doi: 10.4267/2042/47842.

- [102] P. D. Martino, “What About Biofilms on the Surface of Stone Monuments?,” *Open Conf. Proc. J.*, no. April, pp. 29–38, 2016, doi: 10.2174/22102892016070.
- [103] J. N. Wilking, V. Zaburdaev, M. De Volder, R. Losick, M. P. Brenner, and D. A. Weitz, “Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 3, pp. 848–852, 2013, doi: 10.1073/pnas.1216376110.
- [104] J. B. Kaplan, “Biofilm Dispersal : Mechanisms , Clinical Implications , and Potential Therapeutic Uses,” vol. 89, no. 3, pp. 205–218, 2010, doi: 10.1177/0022034509359403.
- [105] D. Fleming and K. P. Rumbaugh, “Approaches to Dispersing Medical Biofilms Approaches to Dispersing Medical Biofilms,” no. April 2017, 2018, doi: 10.3390/microorganisms5020015.
- [106] A. N. Yadav, J. Singh, A. Rastegari, and N. Yadav, *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*, no. March. 2020.
- [107] Y. Ammar, D. Swailes, B. Bridgens, and J. Chen, “Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 284, pp. 410–416, 2015, doi: 10.1016/j.surfcoat.2015.07.062.
- [108] H. Nguyen, A. Ybarra, H. Başağaoğlu, and O. Shindell, “Biofilm viscoelasticity and nutrient source location control biofilm growth rate, migration rate, and morphology in shear flow,” *Sci. Reports 2021 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–17, Aug. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-95542-1.
- [109] H. Vlamakis, Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick, and R. Kolter, “Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 3, pp. 157–168, 2013, doi: 10.1038/nrmicro2960.
- [110] A. Seminara *et al.*, “Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 4, pp. 1116–1121, 2012, doi: 10.1073/pnas.1109261108.
- [111] O. E. Petrova and K. Sauer, “Sticky situations: Key components that control bacterial surface attachment,” *J. Bacteriol.*, vol. 194, no. 10, pp. 2413–2425, May 2012, doi: 10.1128/JB.00003-12.
- [112] A. K. Epstein, A. I. Hochbaum, P. Kim, and J. Aizenberg, “Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry,” *Nanotechnology*, vol.

- 22, no. 49, 2011, doi: 10.1088/0957-4484/22/49/494007.
- [113] O. Braissant, A. W. Decho, C. Dupraz, C. Glunk, K. M. Przekop, and P. T. Visscher, “Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals,” *Geobiology*, vol. 5, no. 4, pp. 401–411, 2007, doi: 10.1111/j.1472-4669.2007.00117.x.
- [114] T. Zhu and M. Dittrich, “Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: A review,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, no. JAN, pp. 1–21, 2016, doi: 10.3389/fbioe.2016.00004.
- [115] “Amonit | CALCITE |.” <http://www.amonit.fr/fr/calcite> (accessed Jan. 10, 2022).
- [116] S. Darson-Balleur and O. Girinski, “Calcification method using calcification bacteria,” EP2118236A1, Jan. 30, 2008.
- [117] W. De Muynck, D. Debrouwer, N. De Belie, and W. Verstraete, “Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials,” *Cem. Concr. Res.*, vol. 38, no. 7, pp. 1005–1014, 2008, doi: 10.1016/j.cemconres.2008.03.005.
- [118] J. García-González *et al.*, “Quality improvement of mixed and ceramic recycled aggregates by biodeposition of calcium carbonate,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 154, pp. 1015–1023, 2017, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2017.08.039.
- [119] G. D. O. Okwadha and J. Li, “Biocontainment of polychlorinated biphenyls (PCBs) on flat concrete surfaces by microbial carbonate precipitation,” *J. Environ. Manage.*, vol. 92, no. 10, pp. 2860–2864, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.jenvman.2011.05.029.
- [120] P. Li and W. Qu, “Microbial carbonate mineralization as an improvement method for durability of concrete structures,” *Adv. Mater. Res.*, vol. 365, pp. 280–286, 2012, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.365.280.
- [121] P. Sung-Jin, W. Y. Chun, W. J. Kim, and S. Y. Ghim, “Application of alkaliphilic biofilm-forming bacteria to improve compressive strength of cement-sand mortar,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 22, no. 3, pp. 385–389, 2012, doi: 10.4014/jmb.1110.10009.
- [122] S. Ghosh, M. Biswas, B. D. Chattopadhyay, and S. Mandal, “Microbial activity on the microstructure of bacteria modified mortar,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 31, no. 2, pp. 93–98, 2009, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2009.01.001.

- [123] J. H. Jeong, Y. S. Jo, C. S. Park, C. H. Kang, and J. S. So, “Biocementation of concrete pavements using microbially induced calcite precipitation,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1331–1335, 2017, doi: 10.4014/jmb.1701.01041.
- [124] H. Marius Jonkers, “United States Patent, US 8.460,458 B2,” 2013.
- [125] C. Rodriguez Navarro, M. Rodriguez Gallego, K. Ben Chekroun, and M. T. Gonzalez Muñoz, “Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 4, pp. 2182–2193, 2003, doi: 10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003.
- [126] S. Castanier, G. Levrel, and J. Loubiere, “FR2734261A1,” FR2734261A1, 1995.
- [127] G. Oriol, S. Castanier, G. Le Metayer, and J.-F. Loubiere, “The biomineralization: a new process to protect calcareous stone; applied to historic monuments.,” in *Biodeterioration of cultural property 2: proceedings of the 2nd International Conference on Biodeterioration of Cultural Property: October 5-8, 1992, held at Pacifico Yokohama (Pacific Convention Plaza Yokohama)*, 1993, pp. 98–116.
- [128] M. Khaleghi and M. Rowshanzamir, “Soil Improvement with Microbial-Induced Carbonate Precipitation System,” no. November, 2020.
- [129] Y. D. Sari, “Soil Strength Improvement by Microbial Cementation,” *Mar. Georesources Geotechnol.*, vol. 33, no. 6, pp. 567–571, 2015, doi: 10.1080/1064119X.2014.953234.
- [130] V. Srinivasa Reddy, K. Hema Latha, R. S. Lahari, and M. V. Seshagiri Rao, “Bio-Mediated Sandy Soil Stabilization Using Urease Enzymatic Calcite Precipitation: A Sustainable Solution,” *E3S Web Conf.*, vol. 184, pp. 10–15, 2020, doi: 10.1051/e3sconf/202018401113.
- [131] I. Justo-Reinoso, A. Heath, S. Gebhard, and K. Paine, “Aerobic non-ureolytic bacteria-based self-healing cementitious composites: A comprehensive review,” *J. Build. Eng.*, vol. 42, p. 102834, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.JOBE.2021.102834.
- [132] C. Feng, B. Cui, H. Ge, Y. Huang, W. Zhang, and J. Zhu, “Reinforcement of Recycled Aggregate by Microbial-Induced Mineralization and Deposition of Calcium Carbonate—Influencing Factors, Mechanism and Effect of Reinforcement,” *Cryst. 2021, Vol. 11, Page 887*, vol. 11, no. 8, p. 887, Jul. 2021, doi: 10.3390/CRYST11080887.
- [133] C. R. Wu, Y. G. Zhu, X. T. Zhang, and S. C. Kou, “Improving the properties of recycled

- concrete aggregate with bio-deposition approach,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 94, pp. 248–254, 2018, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2018.09.012.
- [134] J. Wang, B. Vandevyvere, S. Vanhessche, J. Schoon, N. Boon, and N. De Belie, “Microbial carbonate precipitation for the improvement of quality of recycled aggregates,” *J. Clean. Prod.*, vol. 156, pp. 355–366, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.04.051.
- [135] C. R. Wu, Z. Q. Hong, J. L. Zhang, and S. C. Kou, “Pore size distribution and ITZ performance of mortars prepared with different bio-deposition approaches for the treatment of recycled concrete aggregate,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 111, no. April, p. 103631, 2020, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2020.103631.
- [136] A. M. Grabiec, J. Klama, D. Zawal, and D. Krupa, “Modification of recycled concrete aggregate by calcium carbonate biodeposition,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 34, pp. 145–150, 2012, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2012.02.027.
- [137] B. Vandevyvere and S. Vanhessche, “Improving the quality of recycled aggregates by biodeposition of CaCO₃ in the pore structure,” 2016.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Un certain nombre de techniques classiques ont été utilisées tout au long de ce travail. Pour faciliter la lecture, ces techniques sont regroupées dans ce chapitre. Les méthodologies plus spécifiques développées au cours des différents chapitres sont par contre conservées au sein du chapitre concerné pour faciliter la compréhension de la démarche.

1. Milieu de culture

Trois types de milieux de cultures sont utilisés pour la croissance bactérienne : le milieu nutritif, le milieu MSgg et un milieu associant le milieu nutritif et le milieu MSgg. Ces milieux ont été utilisés sous forme liquide (bouillon) ou sous forme solide (gélose).

1.1. Milieu nutritif à pH 11

Ce milieu est composé de l'extrait de viande et de peptone, il présente une coloration jaune clair et possède un pH de $6,8 \pm 0,2$ à 24°C [1]. Pour la préparation du bouillon nutritif, nous avons utilisé le milieu « nutrient broth PanReac - 413793.1210 » de AppliChem à une concentration de $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ensuite le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre (Mettler Toledo EL2 / 1232075516) puis ajusté à pH 11 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 5M). Une fois le pH ajusté, le bouillon nutritif est stérilisé à l'autoclave à 121°C , 1 atm, pendant 15 minutes.

1.2. Milieu MSgg (Minimum Salts glycerol-glutamate) à pH 11

Le milieu MSgg est couramment utilisé pour étudier la morphologie et les propriétés d'un biofilm [2], [3]. Le glutamate est sa principale source de carbone [4]. Ce milieu fournit les nutriments favorisant la production de composants extracellulaires. Les composants de ce milieu sont présentés dans le Tableau 6.

Pour la préparation du milieu, on ajoute les composants dans une bouteille en pyrex contenant 1/3 du volume final du milieu (Tableau 6). Ce processus a été réalisé sous agitation constante à l'aide d'un agitateur magnétique. Une fois que tous les composants sont introduits, le reste de l'eau distillée est ajouté pour compléter au volume souhaité. Le pH du milieu est ajusté à pH 11 avec une solution de NaOH à 5 M puis le milieu est stérilisé à 121°C et 1 atm, pendant 15 minutes.

Tableau 6. Composition du milieu MSgg pour la préparation de 1 L de milieu.

Composant		Quantité pour 1 L
K ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de potassium	0.61 g
MOPS		20,9 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	Magnésium Chloride	0.40 g
CaCl ₂ [700 mM]	Chlorure de Calcium	1 mL
MnCl ₂ [50 µM]	Chlorure de Manganèse	0,5 mL
FeCl ₃ [50 µM]	Chlorure de Fer	1 mL
ZnCl ₂ [1 µM]	Chlorure de Zinc	1 mL
Thiamine [2 µM]		1 mL
Glycérol 0.5% V/V		5,7 mL
Glutamate 0.5 % m/V		100 mL
Phénylalanine		0.05 g
Tryptophane		0.05

1.3. Milieu nutritif-MSgg pH 11

Ce milieu a été créé afin de combiner les propriétés fournies par le milieu nutritif et le milieu MSgg. Pour le préparer, des milieux nutritifs et MSgg sont réalisés séparément à une concentration 2 fois plus élevée que la concentration finale une fois les 2 milieux mélangés. En se basant sur la préparation de 1 L : pour préparer le milieu nutritif, 8 g de poudre sont ajoutés à 500 mL d'eau distillée. Les ingrédients nécessaires pour préparer 1 L de milieu MSgg sont ajoutés à 500 mL d'eau distillée. Ensuite, les deux milieux sont mélangés puis le pH est ajusté à pH 11. Le milieu nutritif-MSgg est stérilisé à 121°C, sous 1 atm pendant 15 min.

Après autoclavage, le pH du milieu est vérifié afin de s'assurer que ce dernier est toujours à pH 11.

2. Milieu gélosé

La préparation des géloses nutritives ou MSgg ou nutritive-MSgg suivent les mêmes processus que dans pour les milieux liquides, mais avant d'ajuster le pH, de l'Agar (Sigma life

sciences ; CAS 9002-18-0) est ajouté à 1,5 % du volume final, puis le pH est ajusté à pH 11. Le milieu gélosé est ensuite autoclavé à 121°C, sous 1 atm pendant 15 min.

3. Coloration Gram

Cette technique de coloration permet de classer les bactéries en fonction des composants de leur paroi cellulaire. Si, après le traitement, les bactéries conservent une teinte violette, elles sont classées comme Gram positif (Gram +), mais si elles sont teintées en rose, elles sont Gram négatif (Gram -). Si elles sont Gram +, cela implique qu'elles ont une épaisse couche de peptidoglycane qui constitue leur paroi cellulaire.

La coloration a été réalisée avec le kit Gram MERC Sigma Aldrich (77730-1KT-F). D'abord, un millilitre d'une suspension bactérienne âgée de 3 jours est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur. Une goutte est placée au centre d'une lamelle en verre, puis l'échantillon est fixé à la flamme à l'aide d'un bec Bunsen. Ensuite, 1 ml du colorant de violet de gentiane est prélevé avec une pipette Pasteur puis déposé sur la lame et laissé en contact pendant une minute. L'échantillon est ensuite lavé abondamment avec de l'eau distillée. Après, 1 ml d'une solution de Lugol est prélevé à l'aide de la pipette Pasteur et réparti sur l'échantillon. On laisse ensuite le Lugol agir pendant une minute. Puis, les échantillons sont lavés avec la solution éthanol-acétate du kit. La mise en contact avec cette solution dure entre 3 et 6 secondes. Pour terminer le traitement, on place 1 ml de colorant de safranine sur l'échantillon, on laisse agir pendant 1 minute, puis l'échantillon est lavé abondamment à l'eau distillée. Une lamelle est ensuite placée sur l'échantillon pour être observé au microscope. Les observations sont réalisées sur un microscope binoculaire Paraplux L1100s2. L'ajustement de l'image est fait progressivement jusqu'à ce que les échantillons soient observés avec le grossissement maximum de 1600 X.

4. Mise en culture et dénombrement des microorganismes.

4.1. Mise en culture

La suspension utilisée avant chaque expérience est appelée « suspension mère ». Elle est préparée à partir de cultures, qui peuvent être réalisées à partir:

- D'une culture sur gélose : à l'aide d'une anse microbiologique stérile, la biomasse récupérée d'une culture est placée dans un tube à essai contenant du bouillon nutritif. La culture est ensuite incubée à 30°C et 60 rpm.
- D'un échantillon congelé : l'inoculum de 1mL est décongelé à température ambiante, puis inoculé dans du bouillon nutritif. Ensuite la culture est incubée à 30°C et 60 rpm.

Les suspensions mères sont réalisées 3 jours avant le lancement d'une nouvelle expérience. Les suspensions sont préparées en dilution de 1:8, en fonction du volume souhaité. Elles sont incubées à 30°C et 60 rpm.

4.2. Conservation des souches bactériennes à -20°C

À partir d'une suspension mère, 500 µl sont prélevés et vortexés dans un flacon Eppendorf avec 500 µl d'une solution de glycérol (50%) stérile. Les cultures sont ensuite conservées à -20°C.

Les souches sont décongelées après une période maximale de 8 semaines, sauf pendant le premier confinement lié à la COVID-19, où les souches sont restées congelées plus de 15 semaines.

4.3. Dénombrement sur milieu gélosé

Afin de connaître la concentration cellulaire des suspensions microbiennes, une détermination des unités formant colonies (UFC) est réalisée à chaque début d'expérience. Pour réaliser le dénombrement des colonies, des dilutions en série sont réalisées à partir de 1mL prélevé de la suspension mère qui est ensuite inoculé dans un tube contenant 9mL de bouillon nutritif stérile à pH 11 ; cette première dilution correspond à celle de 10^{-1} , où la suspension mère est 10 fois plus concentrée. Ce processus est poursuivi de la dilution 10^{-1} à 10^{-8} .

Une fois les dilutions successives préparées, 100µL des dilutions 10^{-5} à 10^{-8} sontensemencées sur des géloses nutritives (Ø 8cm) à pH 11. Deux géloses par dilution sont inoculées par niveau de dilution. Ces cultures sont ensuite incubées à 30°C pendant deux jours. À la suite de la période d'incubation, les colonies bactériennes sont dénombrées. Seules les boîtes successives comprenant entre 30 et 300 colonies sont prises en compte. Le nombre N d'UFC·mL⁻¹ est estimé en utilisant l'équation 13.

$$N = \frac{\sum N_{colonies}}{(n_1 + 0, 1n_2)} \times \frac{1}{V \cdot d}$$
 13

Avec :

$\sum N_{colonies}$ = nombre total de colonies observées

n_1 = nombre de boîtes (en général 2) pour la dilution la moins forte retenue

n_2 = nombre de boîtes (en général 2) pour seconde dilution retenue (dix fois plus diluée que la première)

V = volume d'inoculum par boîte exprimé en mL

d = valeur de la première dilution retenue (sans unité, 10^{-6} , 10^{-7} ...).

Dans l'annexe E, figurent les UFC·cm⁻² de B.H,ensemencés dans chaque expérience.

5. Développement bactérien

5.1.Suivi de la croissance bactérienne par densité optique

La croissance bactérienne est définie comme l'ensemble des réactions conduisant à la production de biomasse [5]. Grâce à son analyse, il est possible de déterminer le temps de doublement d'une souche, la durée de sa phase exponentielle, de sa phase stationnaire et de sa phase de déclin.

La densité optique (D.O) mesure le degré de diffusion de la lumière causée par un élément en suspension. Lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique traverse une suspension bactérienne, la concentration cellulaire est proportionnelle à la quantité de lumière absorbée [6]. Cette analyse est effectuée dans un spectrophotomètre ou un lecteur de microplaques, et la longueur d'onde utilisée est de 600 nm, car elle n'endommage pas les cellules, contrairement à l'utilisation des UV qui peut entraîner la mort cellulaire. La relation entre la densité optique et la concentration cellulaire est linéaire dans une gamme de valeurs connue. Pour connaître donc la concentration cellulaire par mesure de D.O, il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage en déterminant les DO des différentes dilutions indiquées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Dilution de la suspension mère utilisée pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage.

VOLUME suspension mère (mL)	VOLUME du bouillon nutritif stérile (mL)
1	0
0.8	0.2
0.6	0.4
0.4	0.6
0.2	0.8

Le suivi de la croissance bactérienne, est réalisé sur microplaques de 96 puits ($v = 300\mu\text{L}$). Les 8 puits de la première colonne servent de contrôle et contiennent 200 μL de bouillon nutritif stérile à pH 11. Les 8 puits de la deuxième colonne contiennent une dilution au 1 :10 de la suspension mère (200 μL de cette suspension). Dans la 3e colonne 200 μL des dilutions de la courbe d'étalonnage, sont déposées. Un schéma de l'ordre des échantillons est présenté dans la Figure 12.

La quantité de $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la suspension mère sont obtenues par dénombrement sur gélose. À partir de la D.O de la courbe d'étalonnage et les $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la suspension mère, on obtient l'équation de la pente permettant de convertir les D.O en $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ au cours du suivi de la croissance.

Les lectures de D.O sont effectuées toutes les 30 minutes pendant 4 jours à $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Durant cette période, la microplaque est soumise à une agitation à faible intensité pendant 38 secondes, chaque 10 minutes. Les données sont récupérées et traitées en format Excel depuis le logiciel (Skanlt Software 6.1).

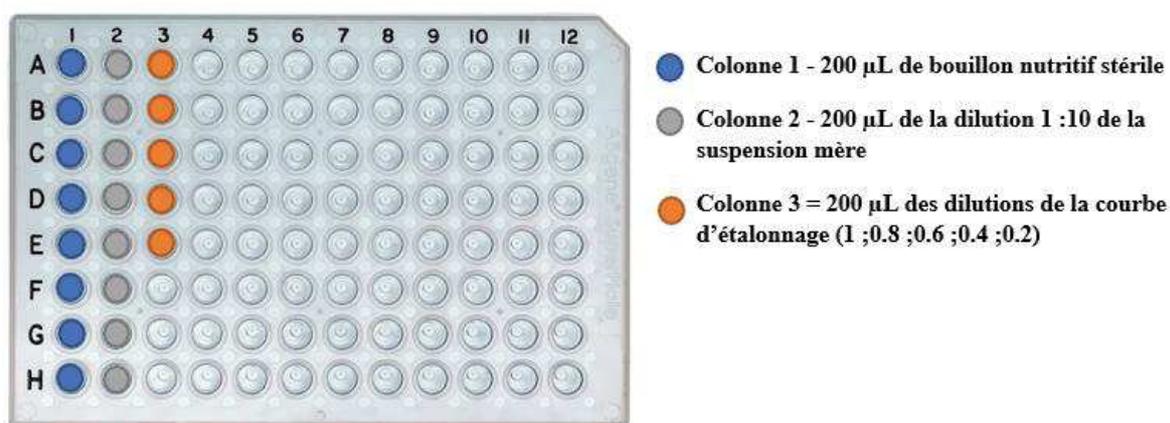


Figure 12. Schéma de la microplaque utilisée pour effectuer la lecture de la densité optique à 600 nm.

La valeur de la D.O de la suspension bactérienne diluée au 1 :10 est obtenue à partir de la moyenne de la D.O des 8 puits. À partir de la courbe obtenue, on peut calculer le temps de doublement de la population (G) en heure à l'aide de l'équation 14.

$$\mu = \frac{1}{G} \times \ln 2 \quad 14$$

Où :

μ - le taux de croissance (la valeur de la pente de l'équation du graphique de la D.O en fonction du temps) en h^{-1}

5.2.Par analyse d'image sur Gélose

Afin d'obtenir des données qualitatives et semi-quantitatives du développement des cultures bactériennes sur gélose, des photographies ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique ou de l'appareil photo intégré du microscope optique.

5.2.1. Mise en place d'un mini studio

Pour obtenir des photographies de bonne qualité présentant des niveaux de luminosités similaires et indépendantes des conditions extérieures, un mini studio facilement installable à l'intérieur d'une hotte microbiologique a été développé. Le mini-studio (boîte en plastique de dimensions 40 cm x 30 cm x 30 cm) a servi de plate-forme pour placer les échantillons en les exposant à une lumière constante (bande de LED 50/60 Hz, à 60 % de sa capacité lumineuse). Le mini-studio est équipé d'un orifice à sa surface pour pouvoir placer l'objectif de l'appareil photo et éviter les éventuels reflets occasionnés par la lumière extérieure sur la surface des échantillons (Figure 13). Afin de maintenir des conditions stériles, le processus est effectué à l'intérieur d'une hotte microbiologique. Avant d'introduire la boîte dans la hotte, sa surface est entièrement nettoyée avec de l'éthanol à 70%. Une fois à l'intérieur de la hotte, le mini-studio est positionné avec le couvercle ouvert, et une stérilisation aux UV pendant 30 minutes de son intérieur est effectuée.



Figure 13. Mini Studio pour la prise de photographies

Les photographies ont été prises en utilisant le réglage automatique de l'appareil (CANNON EOS 200D-EFS18-55 mm) et l'objectif de 30 et 35 mm. Les photographies ont été ensuite récupérées au format JPEG.

Les photos obtenues avec le microscope sont prises avec la caméra AxioCam color 506, Zeiss Scope A1. Les photographies ont été ensuite enregistrées aux formats .jpeg et .czi.

5.2.2. Analyse d'image, logiciel Image J : estimation de la taille des colonies et recouvrement de la biomasse

Le logiciel ImageJ est utilisé pour estimer la taille des cellules, des colonies ou de tout autre élément présent sur les photographies. Tout d'abord, à l'aide de l'outil « straight », la relation métrique entre les pixels et l'échelle de la photographie en mm a été établie avec l'option « set scale » (Figure 14-A, B).

Puis l'outil « straight » a été utilisé pour obtenir la longueur des éléments à mesurer. Les mesures sont faites au hasard, sur une trentaine d'éléments afin d'estimer une taille moyenne (Figure 14-C). Pour avoir un contrôle sur les éléments comptés, l'outil « ROI manager - Label » est utilisé (Figure 14-D). Les données ont été exportées au format Comma-Separated Values (.csv).

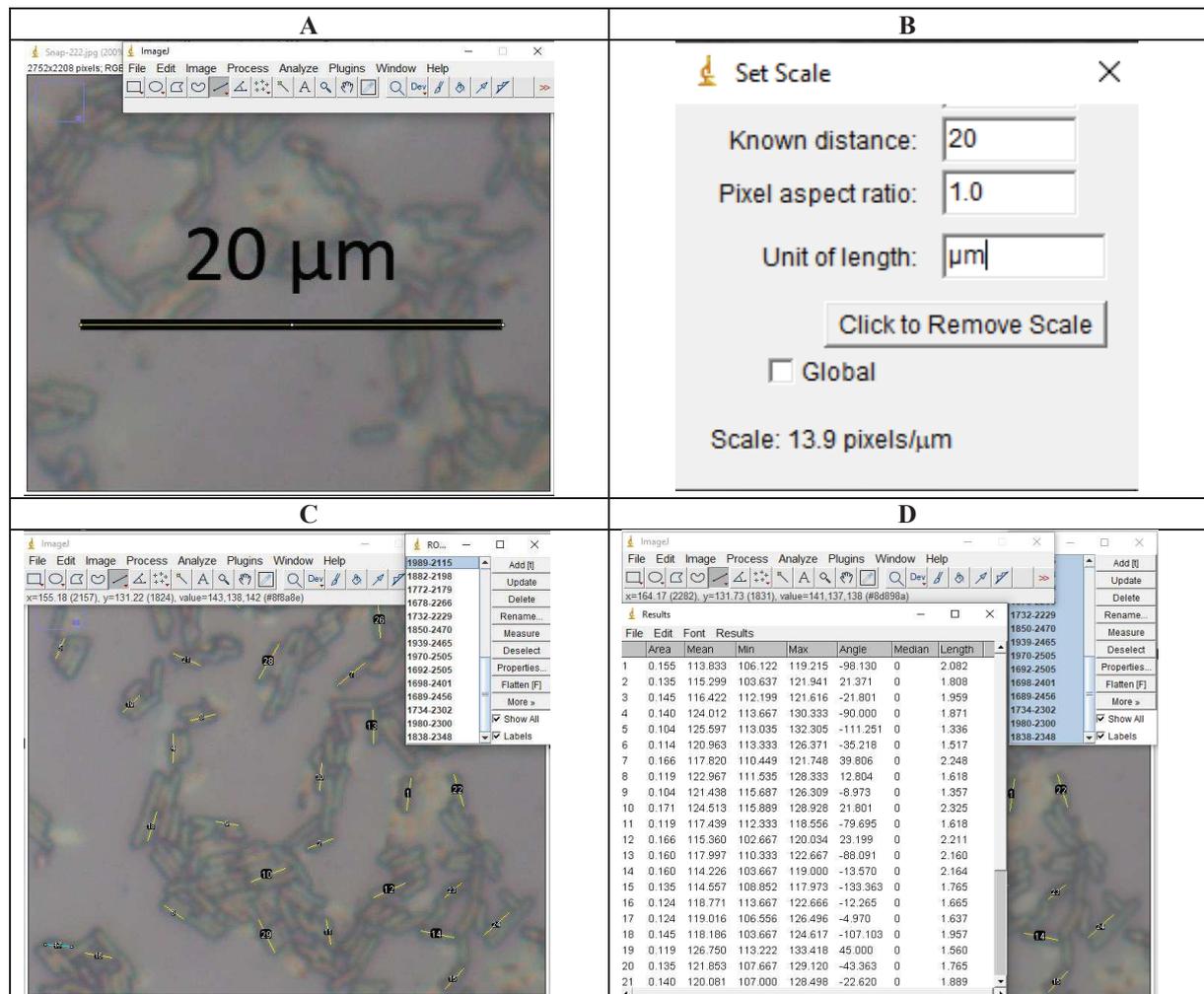


Figure 14. Obtention de la taille des cellules bactériennes avec le logiciel Image J.

À partir des photographies prises à la surface des géloses, il a été possible d'estimer le nombre d'unités formant colonies (UFC) et le pourcentage de surface occupée par la biomasse.

Après avoir établi la relation pixels-cm, l'image est transformée en noir et blanc en sélectionnant l'onglet « image », puis « type » et "8-bit". Une fois transformé en noir et blanc, le filtre « Bandpass » est ajouté sur l'image, ce qui permet d'avoir une image plus nette. Puis, l'outil « Threshold » est utilisé afin d'équilibrer le niveau des zones en noir et blanc de la photographie, en le fixant entre 12 et 14 %. Les colonies blanches sont ainsi mises en contraste avec le fond noir de la gélose, ce qui permet de les dénombrer avec l'outil « analyse des particules » en établissant la taille des particules de 0 à l'infini, la circularité de 0.00 à 1.00 et en éliminant les colonies qui étaient présentes aux bords de la gélose (Figure 15). Les données ont été enregistrées au format Comma-Separated Values (csv.).

Pour traiter les valeurs, le logiciel Excel® est ensuite utilisé. Pour calculer la surface occupée par les colonies, la surface de chacune est additionnée avec l’outil « Somme ». Dans le cas du tapis de biomasse, la valeur de sa surface est directement acquise en cm^2 dans l’archive .CSV.

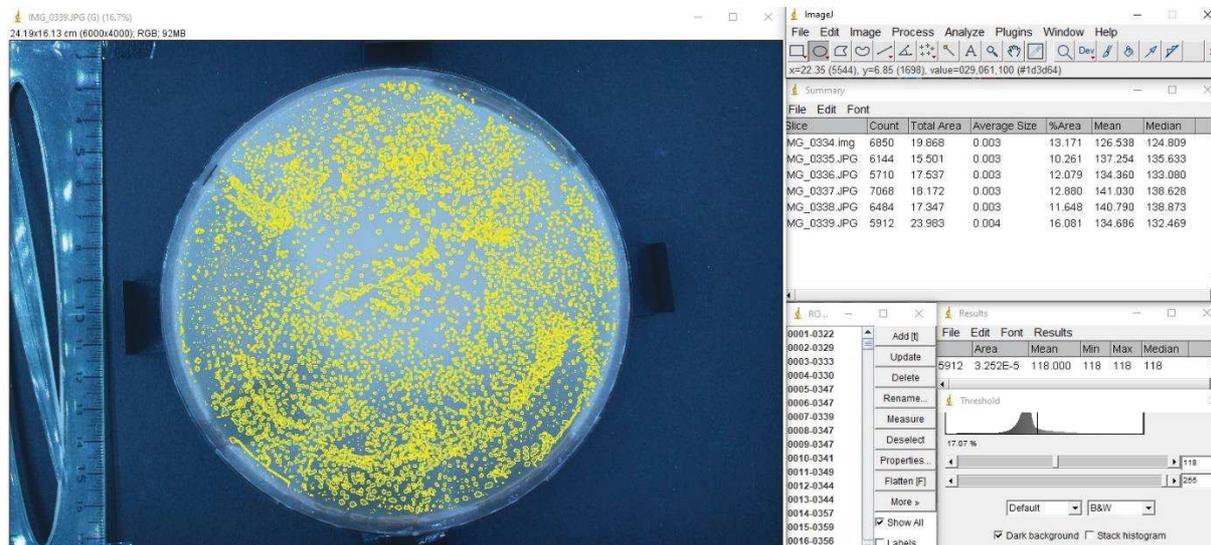


Figure 15. Comptage des unités formatrices de colonies sur gélose avec le logiciel Image J.

6. Analyse qualitative et quantitative du CaCO_3 bioprécipité

Afin de caractériser et de quantifier le CaCO_3 produit dans les manipulations, un certain nombre de techniques ont été utilisées.

6.1. Analyse qualitative

Cette section décrit les techniques utilisées pour : (i) vérifier que les précipités obtenus dans les expériences sont du CaCO_3 , et (ii) déterminer la morphologie du CaCO_3 , soit la calcite, la vaterite ou l'aragonite.

6.1.1. Microscopie RAMAN

Cette technique « non invasive » permet de distinguer le type de polymorphe de CaCO_3 bioprécipité directement sur les géloses ou sur les disques de mortiers. L'équipement utilisé est un spectromètre Raman de Renishaw (modèle InVia), connecté à un microscope optique Leica. Le laser utilisé pour les expériences possède une longueur d'onde de 785 nm. L'étalonnage de l'équipement est effectué avec du silicium standard à $520,5 \text{ cm}^{-1}$ et la taille du spot théorique, avec un objectif x50 longue distance, est de $2 \mu\text{m}$. Les spectres ont été acquis à différentes

puissances du laser (puissance maximale de 90 mW) sur des durées de 10 à 30 s. Enfin la résolution spectrale est inférieure à 2 cm^{-1} .

Une fois les paramètres définis, les échantillons sont placés sous l'objectif du microscope. Les précipités à analyser sont repérés visuellement sur l'écran de l'ordinateur connecté au microscope. Après acquisition des spectres, les données ont ensuite été exportées au format Comma-Separated Values (.csv) et les images en Format JPEG. Les spectres obtenus sont comparés aux spectres de référence de la calcite, de la vaterite et de l'aragonite [7](Figure 16). De plus afin de vérifier que les spectres observés n'étaient pas liés à la présence d'acétate de calcium, le spectre d'acétate de calcium a aussi servi de référence [8] (Figure 17).

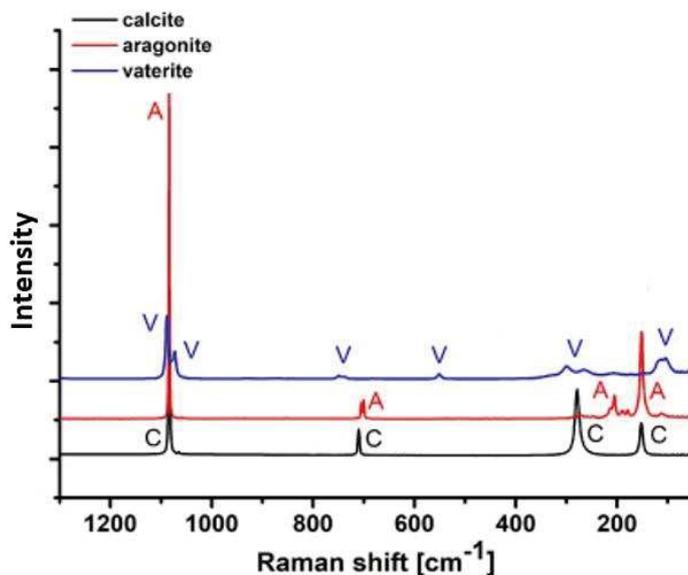


Figure 16. Spectres RAMAN de référence de la calcite (C), de la vaterite (V) et de l'aragonite (A).

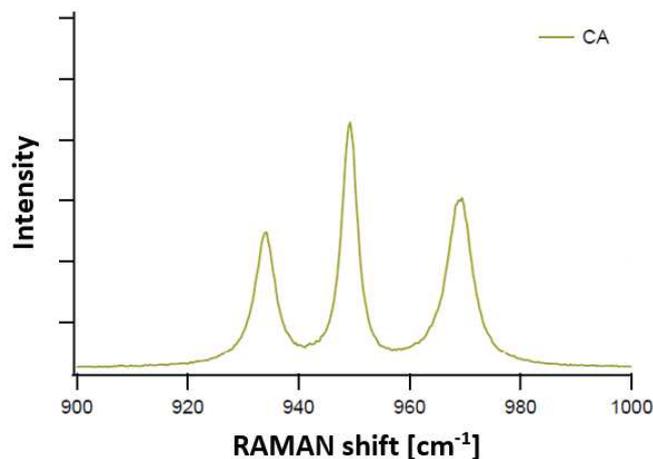


Figure 17. Spectre RAMAN de référence de l'acétate de calcium (CA).

Afin d'effectuer une analyse RAMAN sur les colonies bactériennes suspectées d'être carbonatées, une présélection des colonies a été effectuée à l'aide du microscope optique. Cette présélection a été faite pour vérifier l'homogénéité de la carbonatation à la surface des colonies et pour prendre une photo 2,5 X de la zone avant de l'analyser en microscopie Raman. Cela permettrait d'identifier et de cibler les parties ou éléments de la surface d'intérêt à analyser avec le RAMAN. En fonction de la manipulation effectuée, la présélection pouvait être faite en lumière blanche ou avec une lampe à vapeur de mercure (HXP//120C) en utilisant un filtre GFP (λ_{ex} 305 nm, λ_{em} 509 nm). Une fois les colonies identifiées, elles ont été à nouveau repérées avec le microscope couplé au RAMAN et analysées.

6.1.2. Diffraction des rayons X (DRX)

Pour analyser le CaCO_3 bioprécipité par la diffraction des rayons X, celui-ci a dû être extrait des gélules. Les méthodologies d'extraction mises en place à cette fin sont décrites dans les chapitres 4 et 6. Le CaCO_3 extrait forme une poudre blanche qui est analysée par la technique de DRX qui identifie les phases cristallographiques d'un échantillon.

Les analyses diffractomètres sont effectuées sur le diffractomètre PANalytical Empyrean avec le rayonnement $K\alpha$ du cobalt (40KeV et 30mA), au moyen d'un détecteur PIXcel3D et de l'optique Bragg-BrentanoHD. L'essai est effectué sur un porte-échantillon équipé d'un spinner. Les analyses sont enregistrées entre 4 et 80 ° / 2 θ sur les échantillons. Les distances entre les plans de diffraction sont obtenues par la loi de Bragg (équation 15) :

$$2 \cdot d \cdot \sin(\theta) = n \cdot \lambda$$

Où :

d = la distance entre les plans de diffraction correspondant aux distances interatomiques

θ = l'angle diffracté obtenu

$n \cdot \lambda$ = paramètre machine (λ = longueur d'onde émise par la lampe au cobalt)

Les d obtenus correspondent aux paramètres cristallins des différentes phases composant l'échantillon ce qui permet donc de les identifier. Un diffractogramme enregistre l'intensité des rayons diffractés en fonction de θ et donc de d . Les diffractogrammes obtenus sont traités par le logiciel « Highscore + » au moyen de la base de données COD. Plus précisément dans le cadre de la présente étude, on cherche à trouver les pics de référence de : la calcite ($d=3.03$), la vaterite ($d=3.55$), et l'aragonite ($d=3.38$) (Figure 18). Les données du diffractogramme ont été exportées au format Excel (.csv) pour leur traitement et comparaison, en utilisant Excel ou MATLAB.

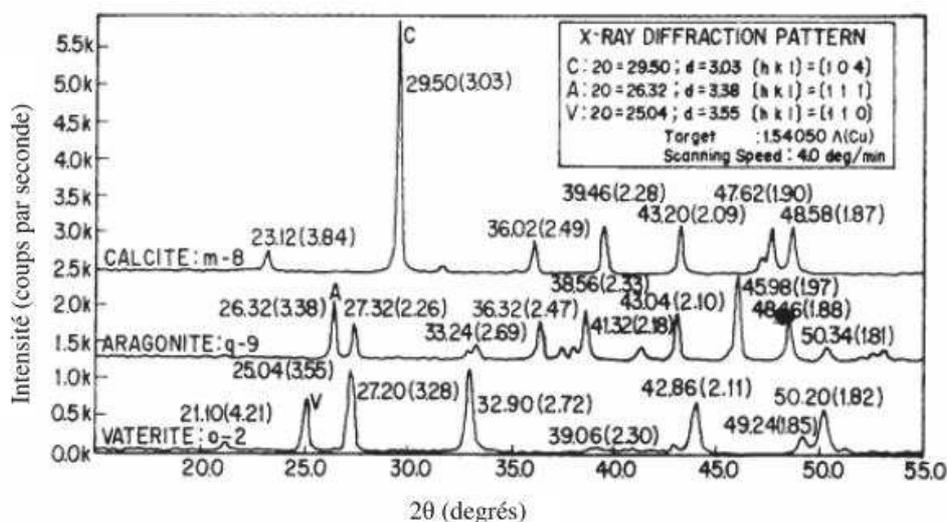


Figure 18. Diffractogramme montrant les pics d'intensité représentatifs de la calcite, la vaterite et l'aragonite. [9] modifié par Medevielle M. [10]

6.2. Quantification du CaCO₃ par Analyse Thermogravimétrique (ATG)

Comme c'est une technique destructive, l'ATG a toujours été réalisée après avoir caractérisé les CaCO₃ par la microscopie RAMAN ou par la DRX. L'équipement utilisé pour

cette analyse est un ATG Netzsh Sta 409 E. Le principe de cette analyse est basé sur l'exposition de l'échantillon à une augmentation constante de température ($10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) allant de 20°C à 1250°C dans un environnement sans oxygène et purgé à l'azote ($\text{N}_2 - 80\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), ce qui permet d'éviter l'oxydation des composants de l'échantillon. Cet équipement peut également réaliser aussi une analyse thermique différentielle, grâce à la présence d'un échantillon de référence (kaolin calciné). Au cours de ce processus, la masse de l'échantillon est suivie avec une balance de précision qui varie en fonction de sa perte de masse qui est liée à la transformation physique de l'échantillon ou aux réactions chimiques des composés qu'il contient.

Les données acquises sont interprétées dans le logiciel Proteus Analysis où la perte de masse en fonction de la température est tracée (TG). De même, la dérivée première de cette courbe (DTG) est tracée. Elle représente la vitesse des réactions observées lors de l'analyse et permet de mieux déterminer les pertes de masse de la courbe TG. Si souhaitée, une analyse thermique différentielle (ATD) peut-être réalisée, afin d'observer la différence de la température de l'échantillon et celle du matériau de référence, pendant l'élévation de la température. Cette dernière analyse permet d'apprécier les différentes transformations de l'échantillon (pertes d'eau, de CO_2 ou transformation de phases sans perte de masse).

À la fin de l'analyse, les graphiques ont été exportés au format JPEG (Figure 19).

Pour obtenir la masse du CaCO_3 des échantillons analysés par ATG, on se concentre sur le pourcentage de perte de masse entre 750 et 850°C qui correspond à la plage de températures de décarbonatation des CaCO_3 . Connaissant la masse initiale de l'échantillon on en déduit la masse de CO_2 en grammes perdu, qui provient par hypothèse des seuls CaCO_3 bioprécipités. Cette valeur est ensuite divisée par $44\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (masse molaire du CO_2) pour obtenir les moles de CO_2 , puis multipliée par la masse molaire du CaCO_3 ($100\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) pour obtenir la masse correspondante de CaCO_3 . Les analyses thermogravimétriques de la gélose seule et de l'acétate de calcium sont affichées dans l'annexe A.

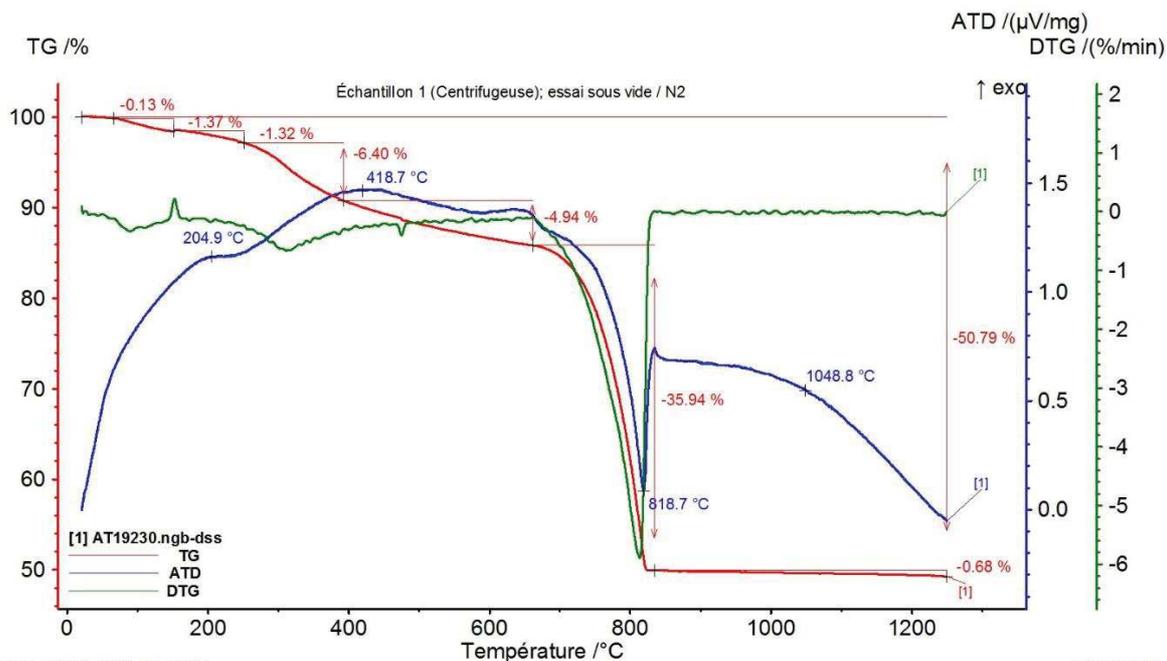


Figure 19. Graphique obtenu lors des analyses quantitatives de CaCO₃ produit par bioprécipitation.

6.3. Calcul du rendement de formation du CaCO₃

Pour calculer le rendement de production (R_p) du CaCO₃, on divise la quantité en grammes de CaCO₃ qui a été précipitée par la quantité de CaCO₃ théoriquement formable (équation 16).

$$R_p = 100 \cdot ((g) \text{ CaCO}_3 \text{ bioprécipité} / (g) \text{ CaCO}_3 \text{ formable}) \quad 16$$

Le calcul de la quantité de CaCO₃ formable est obtenu, en considérant qu'une mole d'acétate de calcium peut former 1 mole de CaCO₃. Si la quantité d'acétate de calcium ajoutée est divisée par son poids moléculaire, on obtient les moles de Ca²⁺ (équation 17). Pour obtenir la masse en grammes de CaCO₃ qui correspond aux moles de Ca²⁺, ceux-ci sont multipliés par le poids moléculaire du CaCO₃ (équation 18). La masse en grammes de CaCO₃ bioprécipité peut être obtenue à partir de l'analyse ATG.

$$\text{Moles de Ca}^{2+} \text{ ajoutées} = \frac{\text{g d'acétate de calcium ajouté}}{158 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} (\text{poids moléculaire de l'acétate de calcium})} \quad 17$$

$$\text{g de CaCO}_{3\text{formable}} = \text{Moles de Ca}^{2+} \cdot 100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} (\text{poids moléculaire du CaCO}_3) \quad 18$$

7. Mortiers

L'objectif final du traitement bactérien est d'être appliqué sur des granulats de béton recyclé. Toutefois avant de franchir cette étape, et pour pouvoir faciliter et mieux contrôler le traitement et observer plus facilement la colonisation d'une surface à base cimentaire, il est intéressant de prendre des disques de mortier comme échantillons modèles. Ils présentent une nature proche de celle des granulats recyclés et une surface plane facilitant l'observation optique et microscopique.

7.1. Frabrication des mortiers

Les mortiers étudiés sont des mortiers normalisés NF EN 196-1 2016 [10]. Ils sont composés de ciment Portland (CEM I) et du sable siliceux standard 0/4. Le rapport eau/ciment est fixé à 0,5 et le rapport sable/ciment à 3. Une fois les cylindres (6 cm de diamètre et 14 cm de hauteur) coulés, on les laisse durcir pendant 48 h avant démoulage. Ils sont ensuite immergés dans l'eau pendant 28 jours pour poursuivre leur hydratation. Après, les éprouvettes sont sciées à l'eau pour former des disques de différentes hauteurs.

7.2. Observations des mortiers au MEB

Avant d'observer les disques au MEB (XL 30, Philips et Quanta) ils ont été placés dans une enceinte à 60°C pendant au moins une journée, afin de s'assurer qu'ils étaient complètement secs. Leur observation est effectuée en SE (électrons secondaires) et BSE (électrons rétrodiffusés) sans métallisation préalable en mode faible vide (low vaccum), tension du filament = 2.21V.

8. Références

- [1] R. M. Atlas and L. C. Parks, *Handbook of Microbiological Media*. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [2] S. S. Branda, J. E. González-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick, and R. Kolter, "Fruiting

- body formation by *Bacillus subtilis*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 20, pp. 11621–6, 2001, doi: 10.1073/pnas.191384198.
- [3] A. Seminara *et al.*, “Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 4, pp. 1116–1121, 2012, doi: 10.1073/pnas.1109261108.
- [4] R. Fall, D. B. Kearns, and T. Nguyen, “A defined medium to investigate sliding motility in a *Bacillus subtilis* flagella-less mutant,” *BMC Microbiol.*, vol. 6, pp. 1–11, 2006, doi: 10.1186/1471-2180-6-31.
- [5] R. J. Allen and B. Waclaw, “Bacterial growth: a statistical physicist’s guide,” *Rep. Prog. Phys.*, vol. 82, no. 1, p. 016601, Jan. 2019, doi: 10.1088/1361-6633/AAE546.
- [6] A. Meyers, C. Furtmann, and J. Jose, “Direct optical density determination of bacterial cultures in microplates for high-throughput screening applications,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 118, pp. 1–5, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2018.06.016.
- [7] R. Ševčík and P. Mácová, “Localized quantification of anhydrous calcium carbonate polymorphs using micro-Raman spectroscopy,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 95, pp. 1–6, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.VIBSPEC.2017.12.005.
- [8] S. Le Grill, “Composite chitosane-phosphate de calcium : synthèse par atomisation séchage et caractérisation structurale,” <http://www.theses.fr>, Jan. 2018, Accessed: Dec. 13, 2021. [Online]. Available: <http://www.theses.fr/2018TOU30023>.
- [9] C. Y. Tai and F.-B. Chen, “Polymorphism of CaCO_3 , precipitated in a constant-composition environment,” *AIChE J.*, vol. 44, no. 8, pp. 1790–1798, Aug. 1998, doi: 10.1002/aic.690440810.
- [10] M. Medevielle, “Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé, Ph.D. dissertation, MAST,” Université Bretagne Loire, 2017.

Chapitre 3 : Isolement, sélection et identification de microorganismes présents à la surface de gravillon de béton recyclé

Lors de l'étude précédente menée par M. Médevielle [1], les dépôts de CaCO_3 formés en surface des mortiers et des granulats de béton recyclés n'étaient pas homogènes. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est l'incapacité de la souche bactérienne étudiée (*Bacillus halodurans*) à former un biofilm. Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à confirmer cette hypothèse. Pour cela nous nous sommes focalisés sur l'aspect génomique de la souche bactérienne.

1. Étude génomique de la capacité de *B. halodurans* à former un biofilm

Chez *B. subtilis*, les protéines TAS A et TAP A sont essentiels pour maintenir un biofilm bien assemblé et structuré. Tas A est une protéine fibreuse de type amyloïde présente dans la matrice extracellulaire, elle est fixée à la paroi cellulaire grâce à la protéine d'assemblage TAP A [2]. La présence de ces deux protéines entraîne la formation d'agglomérats cellulaires bien répartis, ce qui entraîne la production d'un biofilm bien structuré (Figure 20).

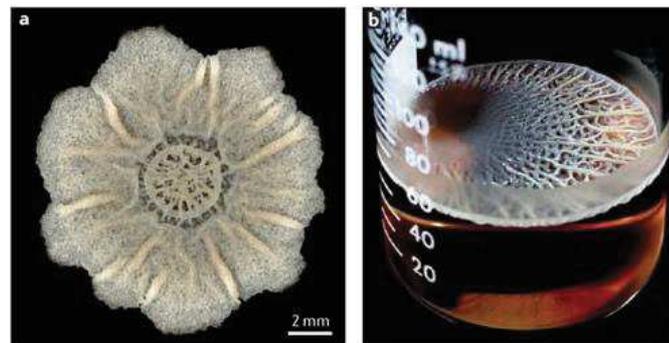


Figure 20. Biofilm produit par *B. subtilis* str 18 dans un milieu MSgg (Minimum Salts glycérol-glutamate) d'après [2]

B. subtilis et *B. halodurans* ont une grande similitude en termes de matériel génétique, comme la taille du génome (environ 4.2 millions de nucléotides) et une teneur en guanine/cytosine (G/C) d'environ 46 % [2]–[6]. En raison de cette grande similarité génétique, il est possible de suggérer que la même machinerie, pour former un biofilm, utilisée par *B. subtilis* pourrait être retrouvée chez *B. halodurans* C-125. Pour tester cette hypothèse, il a été décidé de réaliser un test *in silico* avec des outils informatiques (NCBI BLAST [7]).

L'objectif est de déterminer si *B. halodurans* C-125 (Taxid :866665) possède les séquences de nucléotides des gènes qui codent les protéines TAS A et TAP A de son homologue *B. subtilis* str. 168.

1.1. Méthodologie spécifique

Les séquences des gènes, codant TAS A et TAP A, ont été extraites de la banque de gènes de NCBI au format FASTA ; avec les numéros d'identification : 938532 (TAP A, lipoprotéine) et 937636 (TAS A, Iols putative aldo-céto réductase). Les séquences de TAP A et TAS A, sont présentées dans l'annexe B.

La séquence de nucléotides des protéines TAS A (1 213 nucléotides) et TAP A (990 nucléotides) ont été alignées sur le génome de *B. halodurans* C-125 (4,2 millions de nucléotides) [8]. Les alignements ont été optimisés pour des séquences plus dissemblables et pour des séquences très similaires afin de couvrir toute la gamme possible de compatibilité (Figure 21).

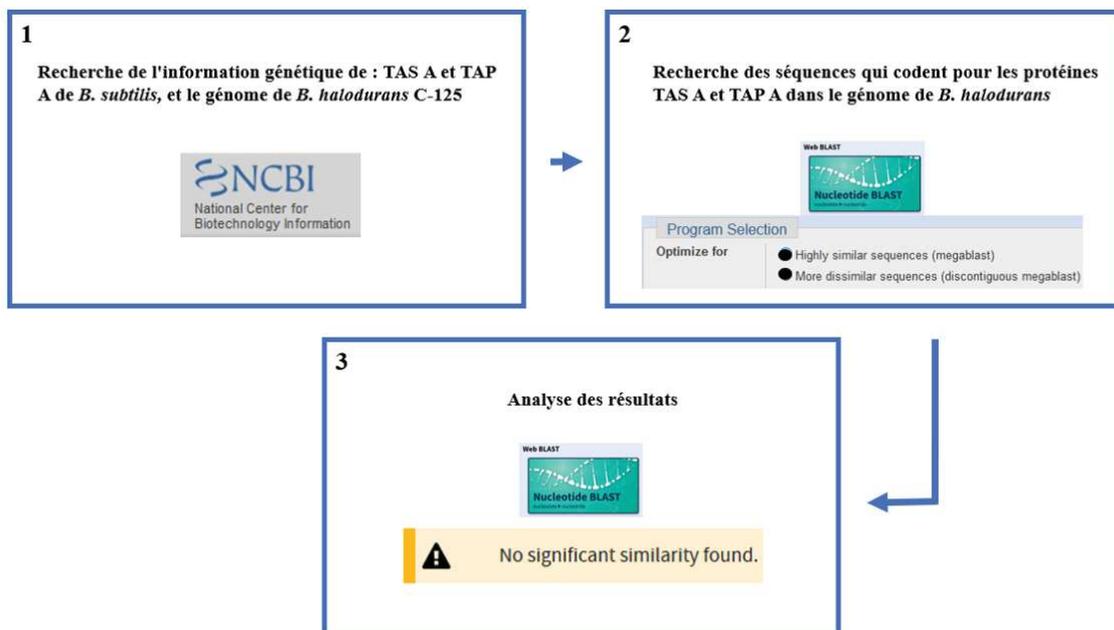


Figure 21. Résumé des étapes de recherche des séquences des protéines TAS A et TAP A de *B. subtilis* dans le génome de *B. halodurans*, à l'aide des outils NCBI.

1.2. Résultat

Après avoir réalisé les alignements des gènes qui codent les protéines TAP A et TAS A dans le génome de *B. halodurans* C-125, aucune similarité n'a été retrouvée.

1.3. Discussion et conclusion

Roméro et al., ont supprimé la séquence du gène TAS A ou TAP A dans différentes souches de *B. subtilis* [9]. Ils ont conclu que l'absence de ces deux protéines entraînait la formation, d'un biofilm désorganisé, d'un biofilm mince ou simplement l'absence de biofilm. Si les gènes de protéines TAS A et TAP A, ne sont pas dans le génome de *B. halodurans* C-125, cela signifie que cette dernière ne peut pas former un biofilm similaire à celui de *B. subtilis* str. 168. Selon Roy et al., [6], certaines séquences (facteurs de transcription, gènes codifiables) responsables de la formation du biofilm chez *B. subtilis* str. 168 pourraient avoir été remplacées dans *B. halodurans* C-125 de façon évolutive, afin de résister à de fortes alcalinités. Cela suggère que *B. halodurans* C-125 pourrait être incapable de former un biofilm.

En conclusion, il a été constaté que *B. halodurans* C-125, utilisé dans l'étude précédente à cette thèse [10], ne possède pas les gènes codant pour les protéines TAP A et TAS A, et qu'elle, *a priori*, ne serait pas capable de produire un biofilm similaire à celui de *B. subtilis* str. 168.

Bien qu'il ait été démontré que *B. halodurans* C-125, puisse croître et produire de CaCO_3 à la surface de matériaux cimentiers [10], l'effet de ne pas produire un biofilm, pourrait la rendre vulnérable, et est probablement un frein à sa capacité à former une couche homogène de CaCO_3 . Il s'avère donc nécessaire de trouver d'autres microorganismes qui ont la capacité de former un biofilm et de précipiter du CaCO_3 .

La section suivante décrit le processus d'isolement des microorganismes présents à la surface des gravillons recyclés, avec l'objectif de trouver des candidats ayant la capacité de survivre à la surface de matériaux cimentiers, de former un biofilm et de précipiter du CaCO_3 .

2. Isolement de souches bactériennes

Des études [11]–[14] montrent que les microorganismes qui habitent dans des environnements calcaires peuvent se développer dans des environnements alcalins, former du biofilm et précipiter du CaCO_3 . Dans ces études, les auteurs ont analysé la possibilité d'utiliser de souches des environnements sauvages, pour la réparation de matériaux de construction à travers la bioprécipitation. En partant de cette idée, des gravillons de béton recyclé (GBR) ont été récupérés de deux big bags stockés en plein air sur le campus de Nantes de l'Université Gustave Eiffel, afin d'isoler le microbiote présent à leur surface.

2.1. Méthodologie spécifique

Comme dans la littérature, il a été décidé, dans un premier temps, d'isoler les microorganismes à pH 7 et d'analyser ensuite leur capacité à se développer à pH alcalin. Le processus d'isolement a été effectué 2 jours plus tard au laboratoire de microbiologie de l'Université Eiffel à Champs-sur-Marne. Tout le processus a été réalisé sous une hotte microbiologique (Angelontoni Industry Sterile-VBH) afin de ne pas altérer le microbiote présent à la surface des granulats. Trois techniques pour la récupération des microorganismes ont été mises en place (Figure 22). Au total, deux gravillons de béton recyclé ont été utilisés, en appliquant les trois techniques d'isolement sur chacun de manière consécutive :

- La première technique (1) a été réalisée par contact direct entre le GBR et une gélose nutritive à pH 7.
- La deuxième technique (2) a consisté à rincer le même GBR, avec 10 ml l'eau distillée et à étaler 100 µl de l'eau de rinçage récupérée sur toute la surface d'une deuxième gélose nutritive à pH 7.
- La troisième technique (3) a consisté à réaliser un ensemencement, à l'aide d'une anse microbiologique au préalable trempée dans l'eau récupérée à la suite du lavage de la technique 2.

Toutes les boîtes de Petri utilisées ont été incubées pendant 3 jours à 30°C.

A) Gravillon GBR-A (2,3 x 1 x 1,6 cm) et B) Gravillon GBR-B (1,2 x 0,9 x 1 cm)

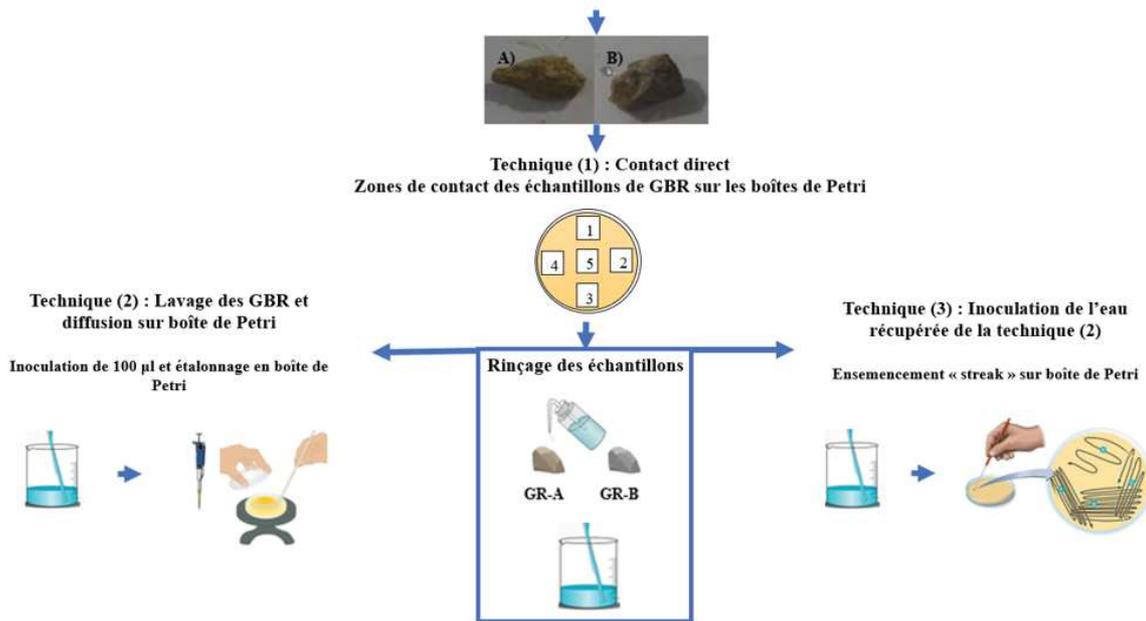


Figure 22. Techniques utilisées pour l'isolement du microbiote présent à la surface des GBR.

Les microorganismes isolés ont été identifiés par une lettre A s'ils appartenaient à l'échantillon GBR-A, et par la lettre B s'ils appartenaient à l'échantillon GBR-B. Les chiffres 1,2 ou 3, ont été placés après la lettre en fonction du type de technique d'isolement utilisée. Le chiffre à la fin correspond au numéro donné aux colonies bactériennes qui sont apparues à la surface des géloses.

2.2. Résultats

La Figure 23 montre les boîtes de Petri utilisées pour réaliser l'isolement, de l'échantillon GBR-A, après 3 jours d'incubation. La première technique (Figure 23-A) d'isolement a permis d'isoler 7 colonies de morphologie circulaire et irrégulière. La deuxième technique (Figure 23-B) a permis d'isoler 4 colonies, et la troisième technique (Figure 23-C) aucune.

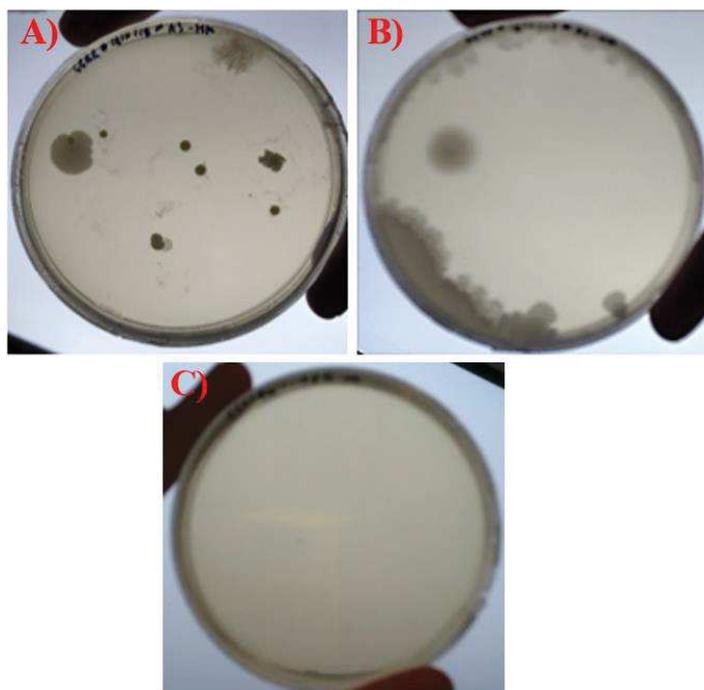


Figure 23. Boîtes de Petri correspondant aux trois techniques d'isolement utilisées de l'échantillon GBR-A. A) Technique (1) de contact direct. B) Boîte correspondant à la technique (2) de lavage et de distribution. C) Boîte de Petri correspondant à la technique (3) d'isolement par « streak ».

De la même façon, la Figure 24 montre les géloses correspondant à l'échantillon GBR-B, après 72 h d'incubation. La Figure 24-A, correspondant à la première technique d'isolation, a permis d'isoler 8 colonies, 4 colonies de morphologie circulaire, et 4 d'aspect filamenteux. Dans la boîte de la deuxième technique (Figure 24-B), 3 colonies ont été isolées, et dans la boîte de la troisième technique (Figure 24-C) aucune.

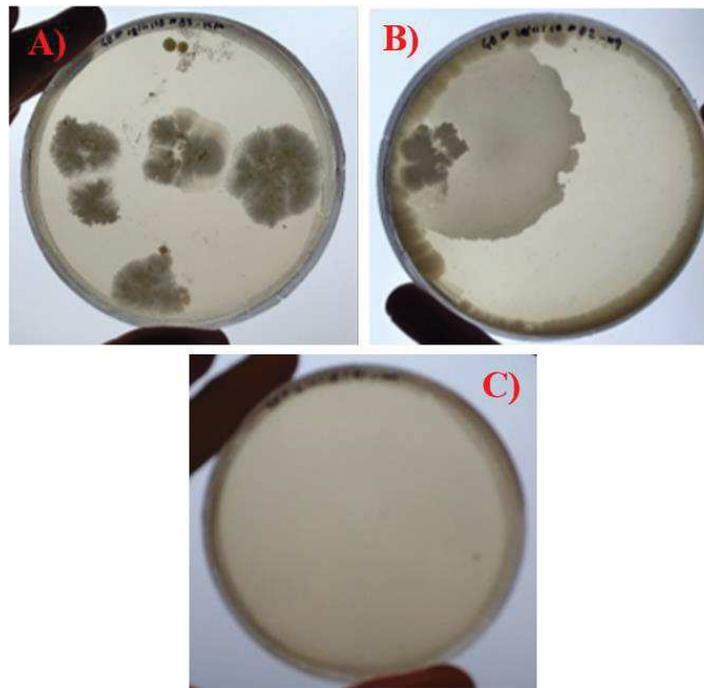


Figure 24. Boîtes de Petri correspondant aux trois techniques d'isolement utilisées de l'échantillon GBR-B. A) Technique (1) de contact direct. B) Boîte correspondant à la technique (2) de lavage et de distribution. C) Boîte de Petri correspondant à la technique (3) d'isolement par « streak ».

2.3. Discussion

Au total, 22 colonies microbiennes ont été isolées. Onze récupérées du granulat GBR-A et onze du granulat GR-B. Le Tableau 8 indique le numéro d'identification avec lequel les microorganismes ont été nommés.

Tableau 8. Liste des microorganismes isolés par type d'échantillon, technique d'isolement et ensemencement sur boîte de Petri.

Échantillon GBR-A et Technique d'isolement	Microorganisme	Échantillon GBR-B et Technique d'isolement	Microorganisme
A1	1	B1	1
A1	2	B1	2
A1	3	B1	3
A1	4	B1	4
A1	5	B1	5
A1	6	B1	6
A1	7	B1	7
A2	1	B1	8
A2	2	B2	1
A2	3	B2	2
A2	4	B2	3

La technique (1) a permis d'isoler le plus de colonies, au contraire, les boîtes inoculées par la technique (3) n'ont montré aucune présence de microorganismes. Il semble que l'eau récupérée lors du lavage de la technique 2 était trop diluée pour pouvoir isoler à travers de la technique 3 par épuisement.

La section suivante décrit le processus de sélection des souches en fonction de leur développement dans un environnement alcalin, tel que celui de la surface des gravillons (pH 11 - 13).

3. Croissance à pH alcalin en milieu nutritif

3.1. Méthodologie spécifique

Après leur isolement, les vingt-deux microorganismes ont été cultivés séparément dans 7 ml de bouillon nutritif à pH 7 (ajusté pour cela avec une solution de NaOH 1N), et incubés pendant 4 jours. Pour commencer le processus de sélection, 1 mL de chaque suspension a été transféré dans 7 mL de bouillon nutritif à pH 8, après 4 jours d'incubation ; les souches qui se sont développées ont alors étéensemencées à pH 9, et ainsi de suite jusqu'à un pH de 12.

3.2. Résultats

Le Tableau 9 montre les étapes du processus de sélection en fonction du pH. De plus, il est indiqué l'état dans lequel les micro-organismes se sont développés dans les cultures. Deux souches se sont avérées être des microchampignons. Ceux-ci (B1-8 et B2-1) ont été conservés dans un milieu PDA (Potato dextrose agar) pour une utilisation ultérieure éventuelle.

Tableau 9. Suivi de croissance des microorganismes isolés à partir du GBR- A et GBR-B aux différents pH

Souche	Croissance					
	pH7	pH8	pH9	pH 10	pH 11	pH 12
A1-1	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
A1-2	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
A1-3	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Au fond du tube	/	/
A1-4	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Au fond du tube	/	/
A1-5	OK	Biofilm à la surface	Pas de développement			
A1-6	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
A1-7	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
A2-1	OK	Fond du tube	/	/	/	/
A2-2	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/
A2-3	OK	Biofilm à la surface	Pas de développement			
A2-4	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/
B1-1	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
B1-2	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
B1-3	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/
B1-4	OK	Fond du tube	/	/	/	/
B1-5	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
B1-6	OK	Biofilm à la surface	Pas de développement			
B1-7	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/
B1-8	OK	Microchampignon	/	/	/	/
B2-1	OK	Microchampignon	/	/	/	/
B2-2	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Pas de développement	/	/
B2-3	OK	Biofilm à la surface	Biofilm à la surface	Au fond du tube	/	/

3.3. Discussion et conclusion

Trois souches ont pu se développer jusqu'à un pH de 11, à savoir A1-5, A2-3, B1-6. A noter qu'aucune souche n'a présenté de croissance à pH 12. Cela nous permet de classer ces souches comme des alcalophiles facultatifs.

A1-5, A2-3, B1-6 se sont développées à chaque échéance en formant de floccs (Figure 25). Cette action indique : (i) qu'elles sont capables de produire des composants extracellulaires qui leur permettent de rester agglomérées et (ii) qu'elles ont besoin d'oxygène et forment donc des agglomérats dans la partie de la culture où la concentration d'oxygène est la plus élevée.

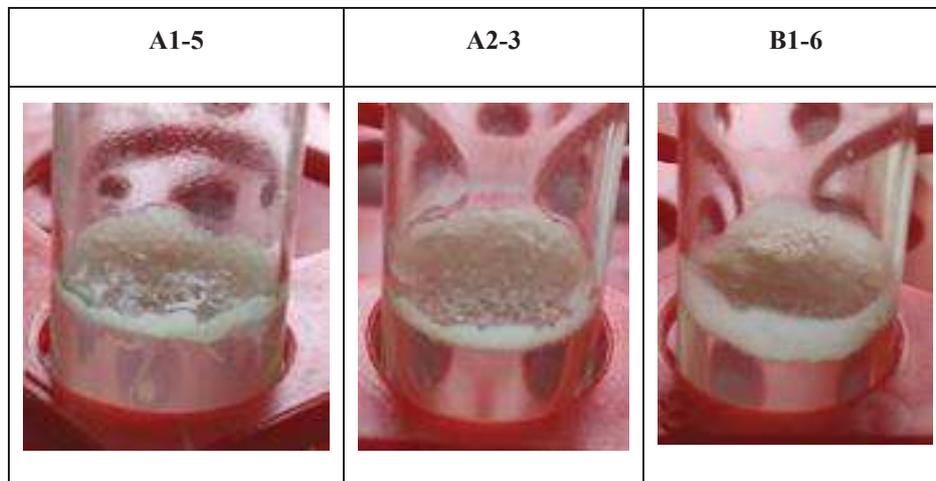


Figure 25. Formation de floccs lors de la croissance des microorganismes A1-5, A2-3 et B3-6 dans de bouillon nutritif à pH 11.

Dans la littérature, il est suggéré que la production de composants extracellulaires est étroitement liée aux facteurs de stress (tels que le pH). La production de ces composants permet aux microorganismes de réguler en outre le pH et l'humidité du micro-environnement, afin d'atténuer les effets des conditions qui ne sont pas favorables à leur développement [15]–[18].

Le fait que ces bactéries soient capables de produire des composants extracellulaires pour former des agglomérats cellulaires est souhaitable, car il pourrait y avoir une possibilité que ces souches se développent en formant un biofilm. Et comme le biofilm joue un rôle important dans la colonisation d'une surface, cette caractéristique pourrait permettre d'effectuer une colonisation uniforme de la surface de gravillons recyclés.

Il faut mentionner que la capacité de formation de floccs de biofilm de la part d'une souche microbienne sauvage peut disparaître, à cause d'un phénomène appelé domestication [19]–[21]. Ce phénomène se réfère à la culture en suspension d'une espèce microbienne sauvage au laboratoire. Pour tenter d'éviter ce phénomène, lié à la culture en suspension, il est suggéré que A1-5, A2-3, B1-6 soient cultivés en gélose, avant de préparer des précultures en suspension.

En conclusion, cette étude a permis de sélectionner 3 bactéries (A1-5, A2-3, B1-6) capables de croître dans un milieu nutritif à pH 11, les classant comme des alcalophiles facultatifs. Bien qu'ils ne se soient pas développés à pH 12 à cette étape du projet, il est suggéré que leur développement à pH 11 est suffisant. La formation de biofilm par A1-5, A2-3, B1-6 à la surface d'une solution à pH 11 laisse présager leur aptitude à développer un biofilm sur des mortiers. Cette propriété pourrait être exploitée pour protéger les bactéries de l'alcalinité du gravillon, ce qui permettra d'avoir une colonisation homogène. C'est pourquoi dans la section suivante nous allons vérifier la capacité de ces bactéries et de *B. halodurans* C-125 incluse à former un biofilm.

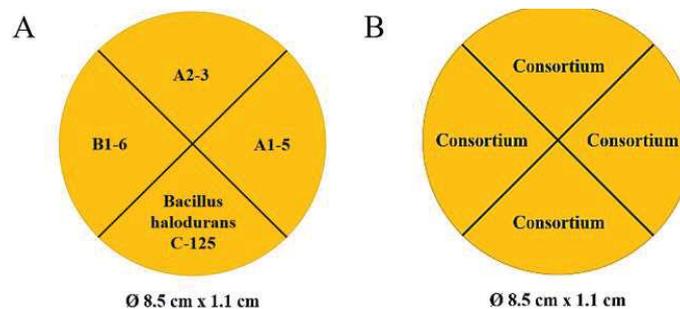
4. Capacité à former un biofilm sur milieu MSgg

Précédemment A1-5, A2-3 et B1-6 ont montré leur capacité pour former des floccs en suspension. Il a donc été suggéré qu'elles pourraient se développer en formant du biofilm. Pour tester cette hypothèse, il a été décidé d'inoculer ces souches dans un milieu inducteur de biofilm connu comme « MSgg » (Minimum Salts glycérol-glutamate). En complément, afin de confirmer les conclusions présentées dans la section 0, qui stipulent que *B. halodurans* C-125 n'est pas capable de former du biofilm, il a été aussi décidé d'inoculer *B. halodurans* C-125 dans le milieu MSgg. En parallèle, il a été aussi choisi d'analyser la formation de biofilm par consortium, composé par A1-5, A2-3, B1-6 et *B. halodurans* C-125, car elles peuvent avoir une éventuelle synergie. Les 3 premières bactéries citées existent de façon naturelle sur les gravillons de béton et sont susceptibles de produire du biofilm, alors que *B. halodurans* C-125 n'en produit, a priori, pas. Par contre cette dernière a démontré qu'elle produit de façon relativement efficace du CaCO₃ [10].

4.1. Méthodologie spécifique

Pour éviter la perte de capacité de formation de biofilm par les bactéries isolées, due au phénomène de domestication [22]–[24], 100 µL d'une suspension mère de chaque souche a été cultivé en gélose et incubé pendant 3 jours. Après l'incubation, à l'aide d'une anse microbiologique, les colonies formées ont été prélevées puis mises en suspension dans 8 ml de bouillon nutritif. Les suspensions ont ensuite été incubées pendant 3 jours, avant d'être inoculées sur les géloses MSgg. Pour cette manipulation, la concentration cellulaire n'a pas été calculée, car il a été juste envisagé d'analyser qualitativement la production de biofilm.

Au total, deux géloses MSgg ont été utilisées : sur la gélose A, les quatre bactéries ont été inoculées séparément, et sur la gélose B, les 4 bactéries ont été inoculées en consortium. Avant l'inoculation, la surface des boîtes Petri a été divisée en quatre zones, comme indiqué dans la Figure 26. Dans la gélose A, 10 µl des suspensions de chaque bactérie ont étéensemencés. Dans la gélose B, 10 µl de chaque suspension ont été inoculés conjointement sur chaque zone, donc 40 µL par zone. Les deux boîtes de Petri ont été incubées pendant 10 jours. À la fin de l'incubation, une photographie de la surface de chaque gélose a été prise.



4.2. Résultats et discussion

La Figure 27 montre les photographies des biofilms formés par A1-5, A2-3, B1-6, et le consortium (composé de A1-5, A2-3, B1-6). Toutes ces bactéries ont formé un biofilm de couleur blanche d'un diamètre d'environ 1 cm et une épaisseur inférieure au millimètre. Ils présentaient un centre dense entouré d'une sorte de halo formé par des ramifications allant de

l'intérieur vers l'extérieur, indiquant sa propagation [25]. Dans la photographie de la zone où *B. halodurans* C-125 a été inoculée, il est possible de voir une opacité de la gélose, ce qui pourrait indiquer son développement, mais elle n'a pas formé de biofilm comme les autres bactéries.

B. subtilis str 18., est une bactérie modèle, utilisé dans différentes études pour comprendre le développement, la dispersion et la morphologie d'un biofilm microbien [9], [26], [27]. Ben-Jacob et al., [25] ont analysé la propagation d'un biofilm produit par *B. subtilis* en fonction de la quantité de nutriments présents dans les cultures. Ils ont déterminé que lorsqu'il n'y avait pas la privation nutriments, les branches étaient plus larges (Figure 28-A), et que lorsque la quantité de nutriments diminue, le biofilm devenait plus ramifié avec des branches fines (Figure 28-B). Si les biofilms de A1-5, A2-3 et B3-6 et du consortium sont comparés avec celles de l'étude de Ben-Jacob et al., [25] ils ressemblent à celui de la Figure 28-A [25]. D'après Stanley et Lazazzera [28], cette morphologie acquise pendant la formation du biofilm pourrait être due au fait que les cellules du centre de la colonie sont inactives à cause de l'épuisement des nutriments, alors que celles des parties extérieures sont actives et cherchent de nouveaux nutriments en se dispersant. Ce comportement pourrait avoir un impact positif sur le développement homogène des bactéries, puisque comme observé, les branches des biofilms sont larges et semblent s'étendre jusqu'à 3 mm dans le cas de A2-3.

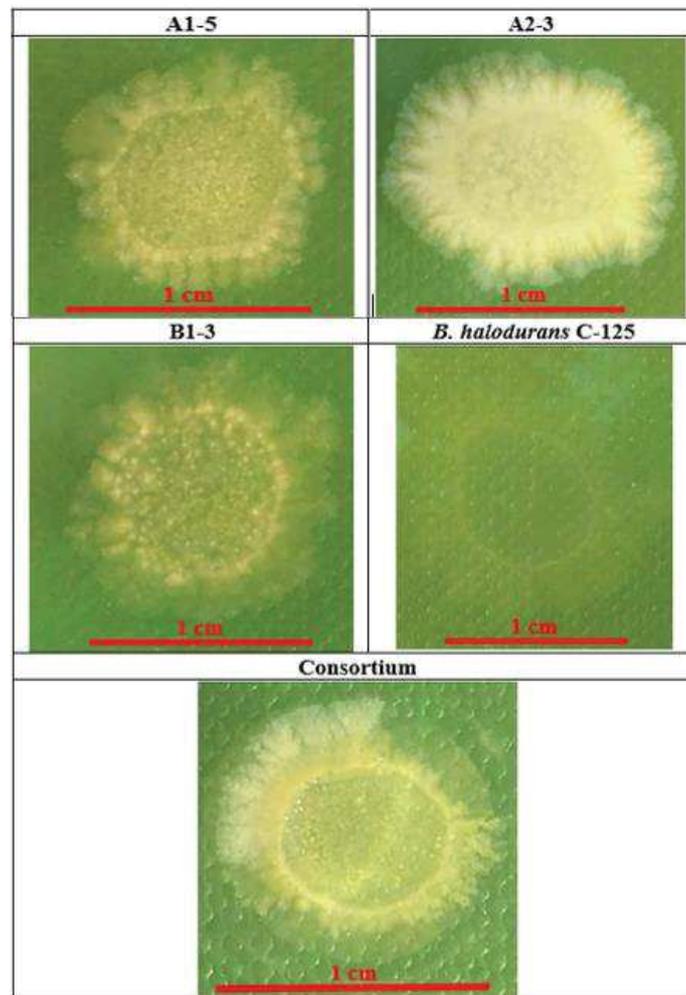


Figure 27. Développement de A1-5, A2-3 et B1-6, *B. halodurans* C-125 et du consortium, sur le milieu MSgg après 10 j d'incubation à 30 °C ± 1.

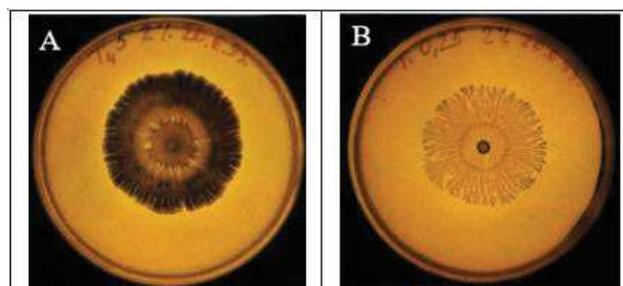


Figure 28. Biofilm formé par *B. subtilis*. A- croissance de la souche sur une gélose avec 5 g·L⁻¹ de peptone, et B- croissance de la souche en présence de 0.25 g·L⁻¹ [25].

Comme anticipé dans l'analyse *in silico* de la section 1 de ce chapitre, *B. halodurans* C-125 n'a pas formé du biofilm. Cependant, il est possible d'observer une opacité dans la zone où elle a été inoculée semblable à un anneau qui s'étend vers l'extérieur. Il est donc possible que *B. halodurans* C-125 se soit développée sans former de biofilm et que ses cellules aient cherché

à se disperser. Bien que *B. halodurans* soit couramment comparée à *B. subtilis* (en raison de leur parenté génétique), la différence réside dans l'énorme potentiel de formation de biofilm de cette dernière. Takami et al.[7], suggèrent que *B. halodurans* C-125 a évolué pour être alcalin obligatoire, éliminant certains mécanismes génétiques qui lui permettaient de former un biofilm, les remplaçant par d'autres qui lui permettent de survivre à des pH plus alcalins [7].

Sur la base de ces résultats, la séquence suivante pourrait être intéressante afin d'exploiter les caractéristiques des bactéries pour réaliser de la bioprécipitation homogène : (i) former un biofilm avec A1-5, A2-3 et B1-6, sur l'ensemble d'une surface et (ii) une fois le biofilm formé, inoculer *B. halodurans* C-125 afin qu'elle puisse profiter du biofilm, se développer et précipiter du CaCO₃. Cette proposition est très idéaliste et nécessiterait d'autres études complémentaires pour déterminer si elle est réalisable ou non. Bien que le consortium bactérien ait formé un biofilm, il n'est pas possible, à ce stade, de suggérer qu'elle serait le comportement des bactéries dans le biofilm, les scénarios possibles sont : (i) la coopération ou (ii) la concurrence. Dans le premier cas, toutes les bactéries (A1-5, A2-3, B1-6 et *B. halodurans* C-125) se développeraient en harmonie, ce qui conduirait à une colonisation et précipitation uniforme de CaCO₃. Dans le second scénario, les bactéries entreraient en compétition les unes avec les autres en limitant le développement de certaines souches, ce qui pourrait entraîner une croissance non homogène ou simplement la mort de certaines souches [29] [30].

4.3. Conclusion

Les résultats permettent de conclure que A1-5, A2-3 et B1-6 sont attractifs pour être utilisés comme colonisateurs d'une surface, formant un biofilm. Parmi toutes les bactéries, A2-3 est celle qui a formé le biofilm le plus épais et le plus robuste, et c'est celle qui s'est le plus étendue dans différentes directions.

Sachant que le consortium bactérien a également formé un biofilm, il a été envisagé d'utiliser A1-5 et B1-6 dans les expériences à suivre. Il a été aussi confirmé que *B. halodurans* C-125 n'est pas capable de former un biofilm, mais son développement sur la gélose MSgg est suspecté.

Après avoir déterminé le potentiel des bactéries isolées à former du biofilm et à se disperser, il est suggéré que, pour l'étape suivante, il fallait obtenir le plus d'information possible sur les trois souches, dont leur morphologie et leur identité. C'est pourquoi dans la

section suivante, des observations microscopiques et des analyses phylogénétiques sont réalisées sur A1-5, A2-3 et B1-6.

5. Identification de trois souches

5.1. Observation microscopique et coloration Gram

Pour observer la morphologie de A1-5, A2-3 et B1-6, des observations microscopiques de chaque suspension bactérienne ont été réalisées. De même, une analyse de coloration de Gram a été réalisée pour les classer en Gram + ou Gram -. Comme mentionné dans la bibliographie, la présence de sites de nucléation dans les bactéries Gram + est plus importante que dans les bactéries Gram – favorisant la quantité de CaCO₃, qui pourrait être produite dans une éventuelle bioprécipitation.

5.1.1. Résultats et discussion

Dans la Figure 29, il est possible d'observer que les trois bactéries ont une morphologie arrondie et bâtonnée. Les tailles moyennes des cellules sont présentées dans le Tableau 10. A2-3 est la plus longue, suivi de B1-6 et de A1-5. De plus, A2-3 et B1-6, semblent former de longs filaments cellulaires, tandis que A1-5 semble être mono et bicellulaire. Après la coloration de Gram, les 3 bactéries ont retenu le colorant violet de gentiane, ce qui les classe dans la catégorie Gram +.

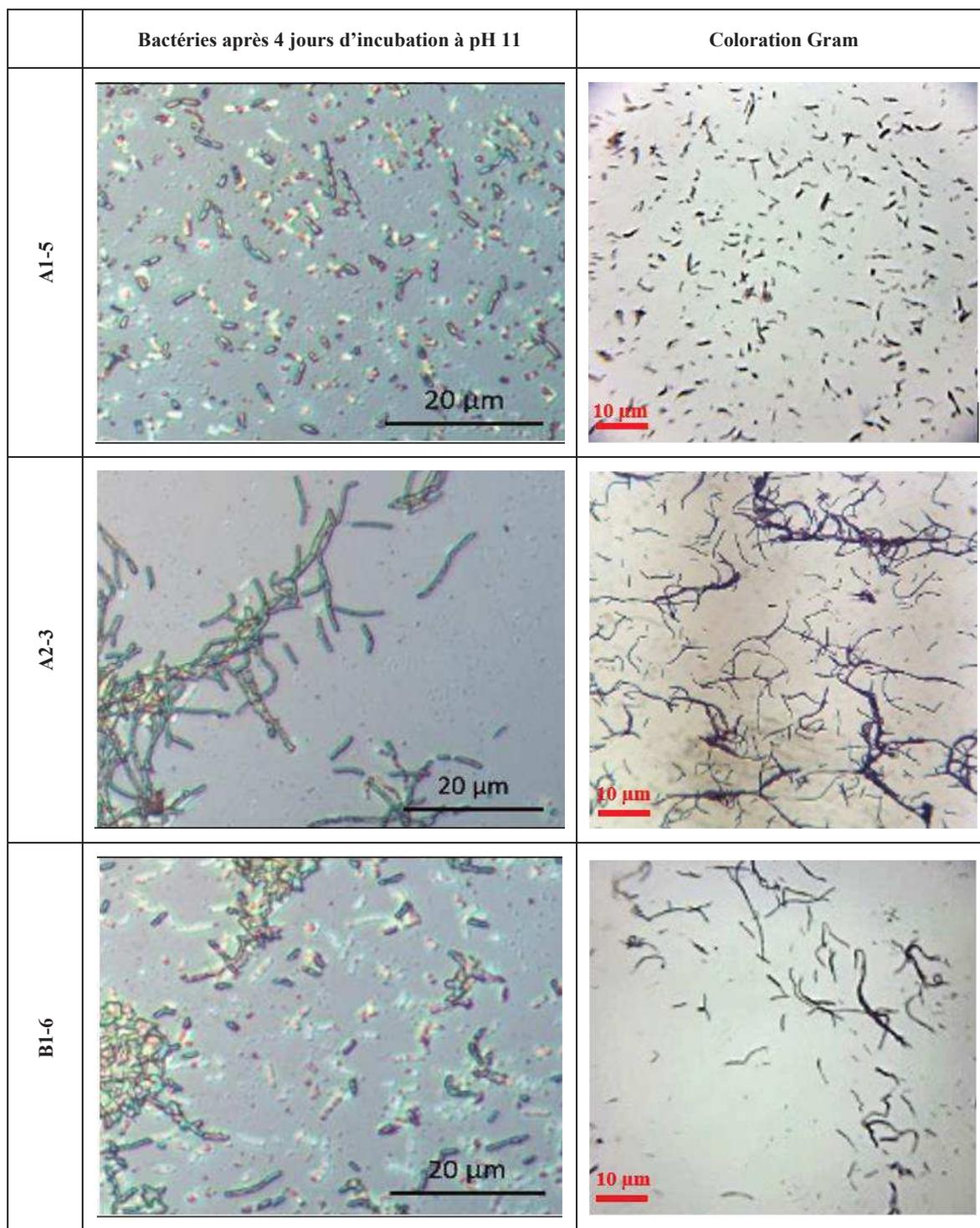


Figure 29. Observations microscopiques des souches, A1-5, A2-3 et B1-6 après 4 jours d'incubation dans BN à pH 11 et la coloration Gram.

Tableau 10. Taille moyenne des bactéries à pH11.

Bactérie	Longueur (µm)
A1-5	1,9 (σ 0,39 ; n=25)
A2-3	3,1 (σ 0.58 ; n=25)
B1-6	2.7 (σ 0,81 ; n=25)

A1-5 et B1-6 ont des morphologies similaires et se sont développées en formant des filaments longs et fins. Leur morphologie ressemble à celle de cellules de *B. subtilis* qui mesurent environ de 2 à 4 µm et qui forment aussi de longs filaments (Figure 30-A) [31], [32]. Au contraire, A1-5 n'a pas formé de longs filaments et ses cellules semblaient être un peu plus larges, ce qui leur donnait une forme de graine comme les coccobacilles (Figure 30-B).

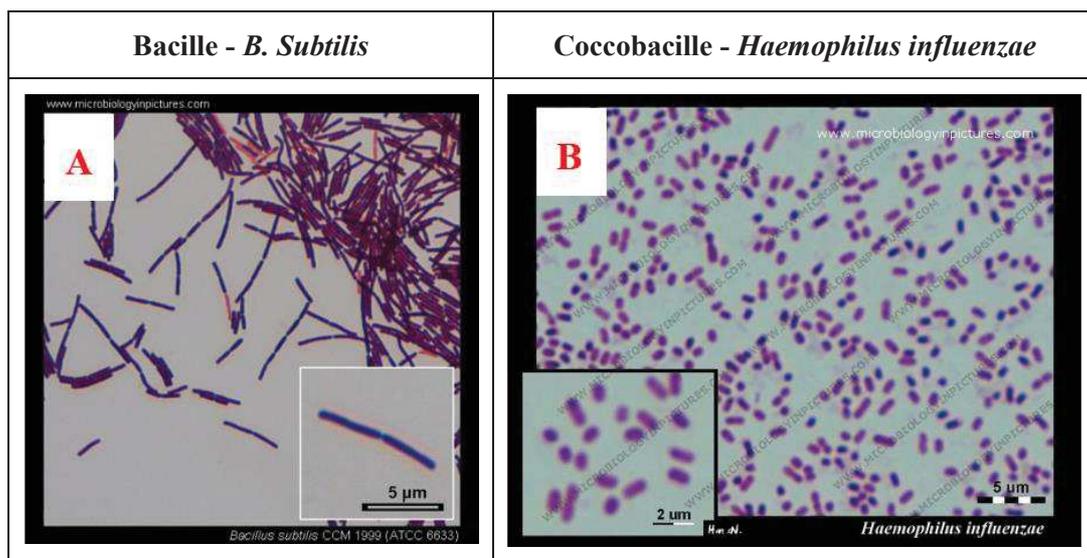


Figure 30. Morphologie des bactéries, bacille et coccobacille [33].

Le fait que les bactéries aient été classées comme Gram + génère des informations qui ont un impact sur : (i) la connaissance de leur structure et de potentielles conséquences sur une éventuelle bioprécipitation et (ii) sur leur tendance à être pathogènes. En ce qui concerne le premier point, les bactéries Gram + ont une paroi cellulaire d'une épaisseur comprise entre 20 et 80 nm, contrairement au Gram - dont l'épaisseur de la paroi est de 1,5 à 10 nm [34]. C'est pourquoi les bactéries Gram + ont des avantages adaptatifs par rapport aux bactéries Gram -,

leur paroi cellulaire épaisse contient différentes protéines ayant des fonctions enzymatiques, d'adhésion et de transport de nutriments [35]. De plus, cette paroi cellulaire épaisse diminue le risque de mort par lyse. D'après la composition et la structure de la paroi cellulaire des Gram +, elles ont des sites de nucléation plus accessibles qui donneraient lieu à la formation de CaCO_3 [36], [37].

Sur la base des avantages physico-chimiques que A1-5, A2-3 et B1-6 semblent avoir en tant que Gram +, ils semblent être les candidats idéaux pour être utilisés dans un processus de bioprécipitation. En effet le simple fait d'avoir une structure avec de multiples sites de nucléation pourrait également être exploité puisque l'objectif général est de former une couche uniforme de CaCO_3 sur les gravillons de béton recyclé.

En ce qui concerne le deuxième point, la pathogénicité bactérienne, elle est généralement associée aux bactéries Gram-. Bien que, les raisons pour lesquelles ces bactéries sont plus pathogènes que les bactéries Gram + ne soient pas encore bien connues, il est suggéré que leur métabolisme induit une réponse inflammatoire, dont elles profitent pour infecter les tissus et les organes chez l'homme [38]. Les bactéries Gram – sont, de plus, reconnues pour leur grande capacité à résister et à s'adapter à l'utilisation d'antibiotiques [39].

5.1.2. Conclusion

Les observations permettent de conclure que : (i) des bactéries du type bacille ont été isolées, et (ii) les 3 bactéries isolées sont Gram +. En raison des caractéristiques et des propriétés que les Gram + possèdent, elles pourraient avoir le potentiel de précipiter CaCO_3 et d'être utilisées pour réaliser la bioprécipitation. Afin d'obtenir des informations plus spécifiques sur ces bactéries, il a été décidé, dans la section suivante, d'effectuer une analyse phylogénétique pour identifier leur parenté avec d'autres bactéries. Cela pourrait enrichir les connaissances sur leur métabolisme et leur comportement.

5.2. Identification phylogénétique

Afin d'associer phylogénétiquement à A1-5, A2-3 et B1-6 avec d'autres bactéries, un séquençage de l'ARN 16s a été effectué. Les séquences d'ARN ribosomique sont affichées dans l'annexe C.

À partir des génomes des bactéries avec lesquelles A1-5, A2-3 et B1-6 ont été associées, il a été décidé d'effectuer un BLAST sur leurs génomes afin de trouver la présence des protéines TAS A et TAP A (responsables de la formation du biofilm chez *B. subtilis*).

5.2.1. Résultats et discussion

Les résultats ont associé à :

- A2-3 avec *B. haynesii*, ayant un pourcentage d'identité de 96.2 % (98 % de « query cover » et 0 de valeur E)
- A1-5 et B1-6, avec *B. licheniformis*, ayant de pourcentages d'identité de 92 % (99 % de « query cover » et 0 de valeur E) et 96.6 % (98 % de « query cover » et 0 de valeur E) respectivement.

En raison du pourcentage d'identité < 97 %, ces souches pourraient être considérées comme de nouveaux types de souches [40]. Dans les 3 cas, le « query cover » est supérieur à 98 %, indiquant un degré élevé d'alignement des séquences. Enfin, la valeur E égale à 0 indique l'homologie des séquences analysées.

Bacillus haynesii (associé à A2-3) est faiblement documentée et il n'y a pas d'études qui approfondissent spécifiquement ses aspects métaboliques. De plus, il n'y a aucune étude qui la relie à la bioprécipitation. Il est important de noter que *Bacillus haynesii* et ses souches n'ont pas été signalées comme étant pathogènes et sont considérées comme sûres pour l'utilisation.

Pour *Bacillus licheniformis* (associé à A1-5 et B1-6), le génome complet de 33 souches est disponible. Cette bactérie est déjà utilisée dans différents procédés industriels (production extracellulaire des enzymes, production de surfactants...)[41]. Elle est connue pour son adaptation aux milieux alcalins, sa capacité à sporuler et à former du biofilm [6]. Par exemple, *Bacillus licheniformis* est utilisée pour la production d'un surfactant appelé lichenisine [42]. Il a été signalé que son biofilm a une influence sur la morphologie du CaCO₃, en effet, il favorise la formation de calcite plus que la formation de vaterite [43]. Dans le cas particulier de *B. licheniformis*, la pathogénicité chez l'homme a été constatée dans de rares cas où l'immunité est compromise en raison de complications cliniques [44], [45]. Comme les cas de pathogénicité

de cette bactérie sont isolés, il est considéré qu'elle est une bactérie sûre à utiliser pour la production de produits industriels [41].

L'identification phylogénétique de A2-3, A1-5 et B1-6 avec des bactéries dont l'information génétique est bien connue, nous permet de réaliser des tests *in silico* qui nous aident à comprendre les mécanismes qui pourraient être impliqués dans la formation de leur biofilm. Après avoir associé les bactéries au groupe *Bacillus*, il a été décidé de se baser sur l'analyse comparative réalisée entre *B. halodurans* et *B. subtilis* dans la section 0. Il a donc été décidé de rechercher les séquences génétiques codant pour la production des protéines TAP A et TAS A associées à la production de biofilm chez *B. subtilis* dans le génome *B. haynesii* et *B. licheniformis*.

Les résultats ont indiqué que dans le génome de la bactérie *B. Haynesii*, il y a un alignement de séquence pour TAS A, avec un pourcentage d'identité de 71,28 %, « query cover » de 99 % et une valeur E de 9^{-108} . Ces valeurs permettent d'inférer que *B. haynesii* produit une protéine similaire à TAS A. Quant à la séquence de TAP A, elle s'est alignée sur un segment du génome de *B. Haynesii* avec un pourcentage d'identité de 76,06 %, une « query cover » de 9 % et une valeur E de 8^{-07} , inférant que *B. Haynesii* ne serait pas en mesure de produire la protéine TAP A. En ce qui concerne le BLAST effectué sur le génome de *B. Licheniformis*, il a été constaté que la séquence de TAS A était alignée avec un pourcentage d'identité de 70,71 %, une « query cover » de 99 % et une valeur E de 4^{-104} . Inférant que *B. Licheniformis* produit une protéine similaire à la TAS A. Quant à la séquence TAP A, il a été constaté qu'elle s'alignait à un segment, ayant un 77,46 % de pourcentage d'identité, 9 % de « query cover » et 6^{-07} de valeur E. Ce qui suggère que même si une partie de la séquence TAP A est présente dans *B. licheniformis*, elle ne produit pas la protéine TAP A.

Comme décrite, *B. Haynesii* et *B. Licheniformis* sont capables de produire une protéine similaire à TAS A, mais ne produisent pas TAP A. Selon les études traitant le sujet, la production de TAS A sans TAP A dans *B. subtilis*, génère la formation d'un biofilm qui n'est pas dense, puisque TAP A assemble TAS A pour donner de la robustesse à la structure du biofilm [2], [22], [46]. En revanche, dans une étude visant à identifier les facteurs génétiques responsables de la formation du biofilm chez *Bacillus Cereus*, Caro-Astorga et al., ont déterminé que cette bactérie produisait deux protéines TAS Ab et camelysin (UniprotKB :

QOGJ76), similaires à TAS A de *B. subtilis*, mais aucune protéine similaire à TAP A [47]. Ainsi, ils ont déduit un nouveau procédé d'assemblage, en découvrant que la protéine camelysin assemble TAS Ab grâce à un mécanisme similaire à celui du TAP A de *B. subtilis*. Subséquemment, leurs résultats suggèrent que la robustesse d'un biofilm d'une souche proche de *B. subtilis* comme *B. cereus* dépend de la présence de protéines similaires à TAS A, mais pas de TAP A. De ce fait, avec les résultats de BLAST, il est possible de déduire que la production d'un biofilm robuste chez *B. haynesii* et *B. licheniformis*, dépend de la production de TAS A, mais pas de TAP A. En extrapolant cette hypothèse sur les résultats obtenus sur la MSgg avec les biofilms de B.H, A1-5 et B1-6, il est possible que ces bactéries produisent du TAS A et que celui-ci soit assemblé par une autre protéine ayant la même fonction que le TAP A de *B. subtilis*.

Afin de déterminer si cette protéine n'est pas la camélysine identifiée par Caro-Astorga et al. [47], dans *B. cereus*, il a été décidé d'effectuer une analyse BLAST pour identifier la séquence codant pour la protéine de camélysine dans le génome de *B. haynesii* et *B. licheniformis*. Ces analyses indiquent que les deux souches ne sont pas capables de produire cette protéine. De sorte que le processus d'assemblage du TAS A dans *B. haynesii* et *B. licheniformis* est encore inconnu.

En conclusion, l'analyse phylogénétique a permis de relier A2-3, A1-5 et B1-6 à *B. haynesii* et *B. licheniformis* respectivement. Pour connaître avec certitude l'identité des 3 bactéries, il faudrait réaliser d'autres essais complémentaires. Cependant, la détermination à 100 % de l'identité des bactéries n'est pas indispensable, mais elle sera réalisée si les bactéries s'avèrent être potentiellement utiles pour les objectifs finaux de ce projet.

D'après les analyses in silico, il est possible de conclure que la formation de biofilm pour A2-3, A1-5 et B1-6 est probablement gouvernée par l'action d'une protéine homologue du TAS A. Cette information pourrait être utile si, à l'avenir, il est envisagé de potentialiser ou de réduire la formation de biofilm chez A2-3, A1-5 et B1-6 par modification génétique.

6. Développement en suspension et gélose nutritive.

Trois bactéries (A2-3, A1-5 et B1-6) du type bacille, alcalin facultatif et Gram +, ont été isolées. Les 3 bactéries forment de biofilms à pH 11, séparément et en consortium avec *B.*

halodurans C-125. A2-3 s'est distinguée parmi elles en formant le biofilm le plus épais et le plus robuste. Par conséquent, pour des raisons pratiques, il a été décidé de ne travailler qu'avec cette bactérie, afin de disposer d'une quantité raisonnable d'échantillons à traiter pour la suite des expériences. Pour faciliter la lecture, il a donc été décidé de changer le nom de la bactérie de A2-3 en « B.H » dans la suite du document.

Les objectifs de cette section sont donc d'analyser : (i) les phases de développement de B.H en suspension, et (ii) sa croissance sur différents types de géloses.

6.1. Développement en suspension

Lors des manipulations réalisées au cours de la première et de la deuxième année de cette recherche, deux manipulations ont été effectuées dans le but de déterminer les stades de développement de B.H. Cependant, les résultats ont été remis en question, car de grands amas de cellules se sont formés dans les précultures de B.H. Ces agglomérats ont provoqué des interférences importantes lors de l'interprétation des résultats. Au cours de la troisième année, un lecteur de microplaques a été acquis, ce qui a permis de réaliser cette manipulation dans de meilleures conditions. La croissance de B.H en suspension a donc été réalisée sur microplaque par densité optique à 600 nm.

6.1.1. Résultats

Les résultats de l'analyse sont affichés dans le (Tableau 11). B.H semble avoir un temps de latence et de phase exponentielle compris entre 3 et 4 h, avec un temps de doublement de 3h 14 min.

Tableau 11. Valeurs acquises à partir de l'analyse du développement de B.H en suspension à pH 11.

Concentration suspension mère	4,5 x 10 ⁷ UFC·mL ⁻¹
Phase de latence	3h
Phase exponentielle	4h
μ_{max}	0,11h ⁻¹

Temps de doublement	3,14h
K-max	1,1 x 10 ⁷ UFC·mL ⁻¹

6.1.2. Discussion et conclusion

Il est démontré que B.H a un temps de doublement acceptable, si elle est comparée à d'autres bacilles alcalophiles comme *Bacillus halodurans* C-125 qui a un temps de doublement de 4h à pH 9,7, comme *Clostridium paradoxum* qui à pH 10 a un temps de doublement de 20 min [48], ou *Bacillus firmus* OF4 qui à pH 11 a un temps de doublement de 11 h [49].

Bien que la capacité de B.H à précipiter le CaCO₃ ne soit pas encore connue, elle a un temps de croissance exponentielle relativement court. Il est indiqué dans la littérature que pour les microorganismes qui utilisent la voie de l'urée pour réaliser de la bioprécipitation, c'est dans la phase de croissance exponentielle qu'ils précipitent la majeure quantité de CaCO₃ [50]. C'est pourquoi, il est souhaitable que ces bactéries aient un temps de doublement lent et une longue phase exponentielle. S'il est démontré par la suite que B.H précipite du CaCO₃ par la voie de l'urée, mais qu'en raison de sa courte phase exponentielle, sa production est faible, elle pourrait être utilisée dans un premier temps pour coloniser et acclimater la surface des gravillons recyclés. De cette façon, une fois que B.H a colonisé la surface, une autre bactérie telle que *B. halodurans* C-125 pourrait être inoculée pour profiter de la colonisation faite par B.H et précipiter le CaCO₃.

Il faut prendre en compte que le développement de B.H peut changer lorsqu'elle croit sur un support solide. En effet, le comportement d'une bactérie peut s'avérer différent en fonction du type de culture, en suspension ou solide. Pipe et Grimson, affirment qu'une bactérie change de comportement et de morphologie lorsqu'elle est cultivée en milieu solide, car elle est affectée par la diffusion de l'oxygène et la disponibilité des nutriments [51]. S'il est intéressant de connaître les phases de croissance de B.H lorsqu'il est cultivé en suspension, l'objectif final est de l'utiliser sur une surface solide, où ses phases de développement pourraient varier.

Les résultats acquis lors de cette manipulation sont utiles pour l'élaboration de précultures, ce qui permettrait d'avoir une bactérie métaboliquement active à tout moment.

En plus d'analyser sa croissance en suspension, il a été décidé d'analyser sa croissance sur une surface solide, afin d'effectuer une manipulation qui se rapproche des conditions de surface des gravillons recyclés.

6.2. Développement sur gélose : Cinétique de croissance sur culture nutritive, MSgg et nutritive-MSgg

Comme mentionné dans la section précédente, le comportement et la morphologie d'une bactérie changent en fonction type du milieu (en suspension ou en gélose) dans lequel elle est inoculée. Comme il est prévu que B.H soit utilisé pour se développer à la surface d'un gravillon, il a été suggéré que son développement devrait être analysé qualitativement et semi quantitativement, sur une surface solide, suggérant la réalisation d'une cinétique de croissance sur géloses.

Jusqu'à ce point, B.H a été cultivé sur deux types de milieux gélosés : (i) nutritif (pour l'élaboration de suspensions mères), et (ii) MSgg (pour l'analyse de la formation du biofilm). Dans chacun d'eux, B.H se développe différemment, il a été observé que dans le milieu MSgg B.H forme un biofilm robuste et cotonneux. Cependant, il a été observé que si une concentration bactérienne élevée est inoculée dans une gélose nutritive, B.H forme un tapis homogène et d'apparence robuste.

Comme B.H présente des caractéristiques morphologiques différentes dans les deux milieux (gélose nutritive et MSgg), le but de cette manipulation est d'analyser qualitativement et semi quantitativement son développement sur ces deux géloses, ainsi que sur un troisième milieu combinant les propriétés des deux, créant ainsi la gélose nutritive-MSgg, afin d'observer si la composition des deux cultures influence la colonisation de B.H.

6.2.1. Méthodologie spécifique

Pour cette analyse, une gélose (\varnothing 13.5 cm) a été préparée par milieu (nutritif, MSgg et nutritif-MSgg). Sur chaque gélose, 275 μ L d'une dilution 10^{-3} d'une suspension de B.H âgée de 3 jours ($\approx 2.7 \times 10^4$ UFC \cdot mL $^{-1}$ ou 52 UFC \cdot cm $^{-2}$) ont été inoculés. Toutes les boîtes ont été

ensuite incubées. Le suivi a été réalisé en prenant des photographies de la surface des géloses tous les jours en conditions stériles. Les photographies ont été ensuite traitées avec le logiciel image J afin d'obtenir la taille de colonies et un pourcentage approximatif de la surface des géloses occupée par de la biomasse.

6.2.2. Résultats et discussion

Dans la Figure 31 les photographies des géloses sont présentées. Malheureusement, la présence de reflets et le séchage de la gélose ont perturbé l'analyse des images. Pour cette raison, seules les photographies et les analyses d'image prises durant les 8 premiers jours sont présentées, car celles postérieures à cette date sont inexploitables.

La Figure 32 présente l'évolution du pourcentage de la surface couverte par la biomasse. Après 1 jour, des colonies de B.H ont été observées uniquement sur les géloses nutritives et nutritives MSgg. Cependant celles-ci étaient plus visibles sur la gélose nutritive, avec des colonies de couleur blanche et de morphologie circulaire. Le 3^e jour, sur les géloses nutritives et nutritives-MSgg, un tapis de biomasse blanc s'était déjà formé au centre des géloses, couvrant entre 60 et 70 % de la surface. En contrepartie, dans la gélose MSgg, la formation de colonies bactériennes était à peine perceptible. Au 6^e jour, les trois géloses ont commencé à se dessécher, ce séchage était plus visible dans les géloses nutritives et MSgg. Cela a entraîné une réduction de la surface initiale disponible. Malgré la réduction de la surface des géloses, l'estimation du pourcentage de couverture a été poursuivie, inférant que la biomasse et les géloses ont diminué leur surface proportionnellement. Ce même jour, il a été observé que dans les 3 géloses il y avait un tapis de biomasse de couleur blanche. Le tapis à la surface de la gélose MSgg ne couvrait que 35 % de la surface, alors que sur les autres géloses le recouvrement atteignait déjà entre 70 et 90 %. À partir du 6^e jour, aucun changement significatif de la présence de la biomasse dans les géloses n'a été observé, seulement une augmentation de l'opacité de la surface des géloses due à la sécheresse.

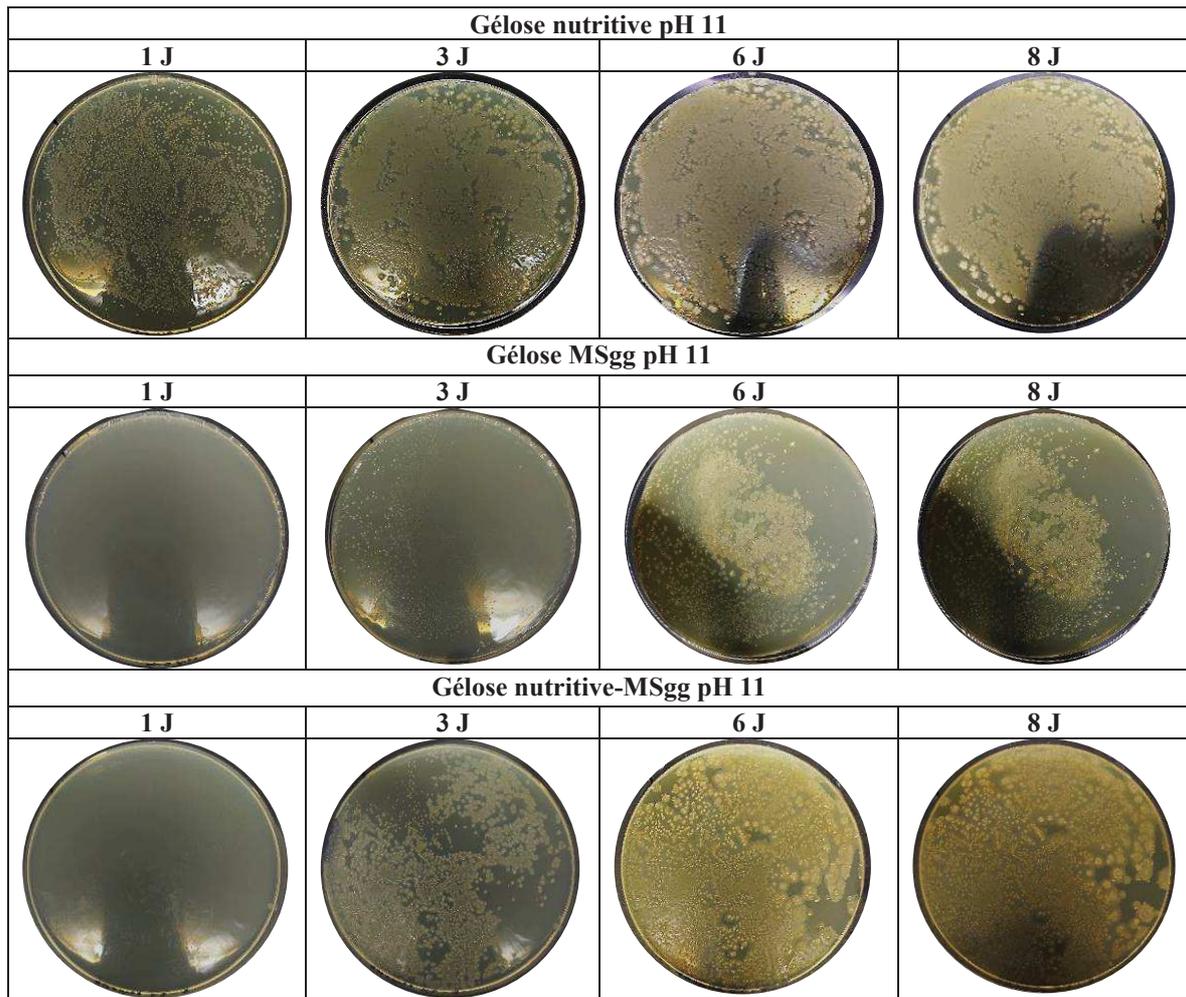


Figure 31. Développement de B.H sur les milieux géloses nutritives, MSgg et nutritive-MSgg.

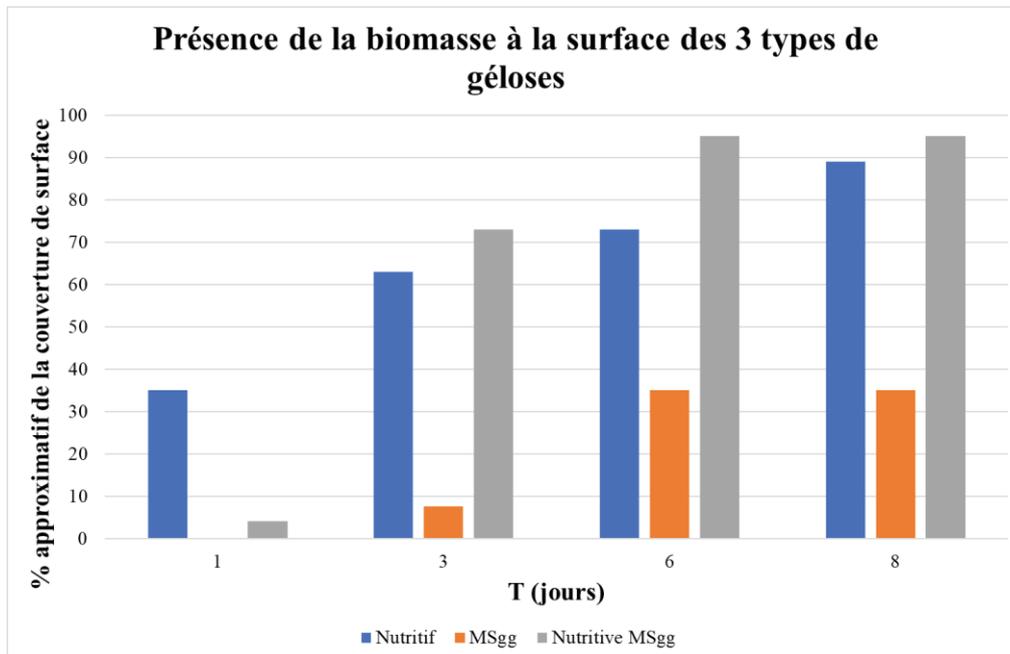


Figure 32. Pourcentage approximatif de la couverture de surface des géloses par la biomasse de B.H.

Il a été observé que B.H se développe plus rapidement sur la gélose nutritive que sur les autres géloses. Ceci pourrait être dû au fait que le milieu de la suspension mère est le même que celle de la gélose nutritive, donc, le temps de latence (le temps nécessaire à une bactérie pour s'adapter à un milieu de culture) a possiblement été inférieur que celle des géloses MSgg et nutritive-MSgg. Cependant, entre ces deux milieux, il semble que la période de latence fût plus courte sur le milieu nutritif-MSgg, vu que des colonies ont été observées dès le 1^e jour. Bien que la gélose nutritive a permis à B.H de se développer plus rapidement, c'est sur la gélose nutritive-MSgg que B.H semble avoir couvert la plus grande surface de la gélose. Il est possible que le mélange des deux milieux ait optimisé le développement et dispersion de B.H, d'une part le milieu nutritif fournissant des nutriments et le milieu MSgg induisant la formation de biofilm.

6.2.3. Conclusion

En conclusion, B.H semble se développer plus uniformément sur les géloses nutritives et les nutritives-MSgg. Le milieu MSgg s'est avéré être le moins propice à une dispersion et une colonisation bactérienne uniforme. Comme le pourcentage de surface couverte par la biomasse a été équivalent sur les géloses nutritives et nutritives-MSgg, il est donc suggéré d'effectuer de futures analyses en parallèle avec la gélose nutritive et nutritive-MSgg.

Comme la surface des géloses était affectée par la sécheresse, et que la présence de reflets sur les photographies perturbait les analyses qualitatives et semi-quantitatives, il a été proposé de refaire la manipulation en modifiant certains paramètres et en développant la mise au point du mini-studio de photos (Chapitre 2 partie 5.2.1).

6.3. Cinétique de croissance sur gélose, modifiée

Ce protocole vise à reproduire les résultats obtenus lors de la première cinétique de croissance de B.H, en améliorant les techniques d'incubation (pour éviter la déshydratation des géloses) et la prise de photographies sans reflets. Dans un premier temps, afin d'éviter le séchage rapide des cultures, il a été décidé de travailler avec une plus grande quantité de gélose par échantillon, jusqu'à l'obtention d'une masse d'environ 120 g (précédemment, la masse de la gélose était d'environ 90g).

6.3.1. Méthodologie spécifique

À la différence de la première cinétique, 3 géloses ont été préparées pour chaque milieu, afin de travailler en triplicata. Sur chaque gélose, 275 μL (2×10^4 UFC mL^{-1} ou 38 UFC $\cdot \text{cm}^2$) d'une dilution 10^{-3} d'une suspension de B.H âgée de 3 jours ont été inoculées et réparties de manière homogène. Ensuite, toutes les boîtes ont été incubées pendant 11 jours. Le suivi de croissance a été réalisé en prenant des photos tout les 24 h (inclus le T0), pendant 11 jours.

6.3.2. Résultats et discussion

Dans la Figure 33 sont présentées les photographies d'un des échantillons de chaque type de milieu. Le contraste de ces photographies a été modifié afin de faire ressortir la biomasse sur la gélose. Malgré ces modifications, la biomasse des géloses MSgg est restée imperceptible sauf sur la photographie du 3^e jour.

Dans les photographies du 1^e jour, il est possible d'observer la présence de colonies rondes et blanches qui commencent à former sur certaines zones de la gélose nutritive. Des colonies sont aussi observées sur la gélose nutritive-MSgg, mais en plus faible quantité. Au 3^e, un tapis de biomasse uniforme s'était formé à la surface de ces deux géloses avec un ton blanc plus marqué que celle du 1^e jour. Cependant, entre le 3^e et le 8^e jour, une perte de couleur de la biomasse est apparue, ne laissant que quelques taches blanches à la surface. Malgré ce

Chapitre 3 : Isolement, sélection et identification de microorganismes présents à la surface de gravillon de béton recyclé

phénomène, la biomasse était toujours présente dans les géloses avec une couleur quasi transparente. Entre 8e et 11e jour, aucune différence significative n'a été observée.

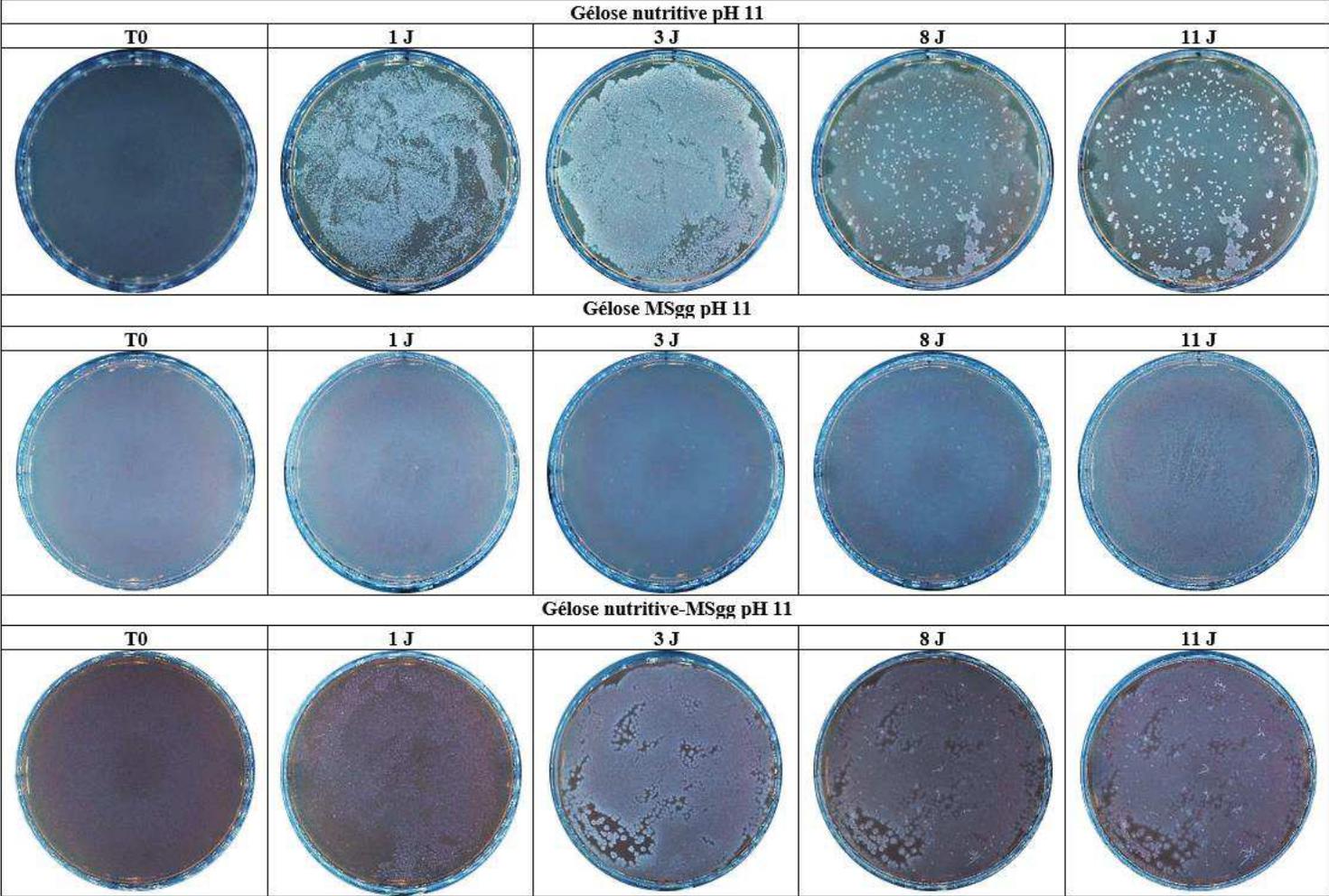


Figure 33. Développement de B.H sur les géloses nutritive, MSgg et nutritive-MSgg

En ce qui concerne la colonisation de la surface (Figure 34), c'est entre les jours 1 et 3 que la plus grande différence de pourcentage de couverture a été observée, due au rapide développement de B.H sur la gélose nutritive. Par la suite, les pourcentages entre les jours 4 et 11, ont été équivalents. Ce résultat confirme ce qui a été observé lors de la première cinétique, ce qui permet de déduire que le développement de B.H dans les deux milieux n'influence pas le degré de colonisation. Le seul facteur qui semble limiter un développement rapide dans les géloses nutritives MSgg est le temps de latence de B.H, qui pourrait probablement être réduit si la suspension mère de B.H à inoculer était également réalisée avec ce milieu.

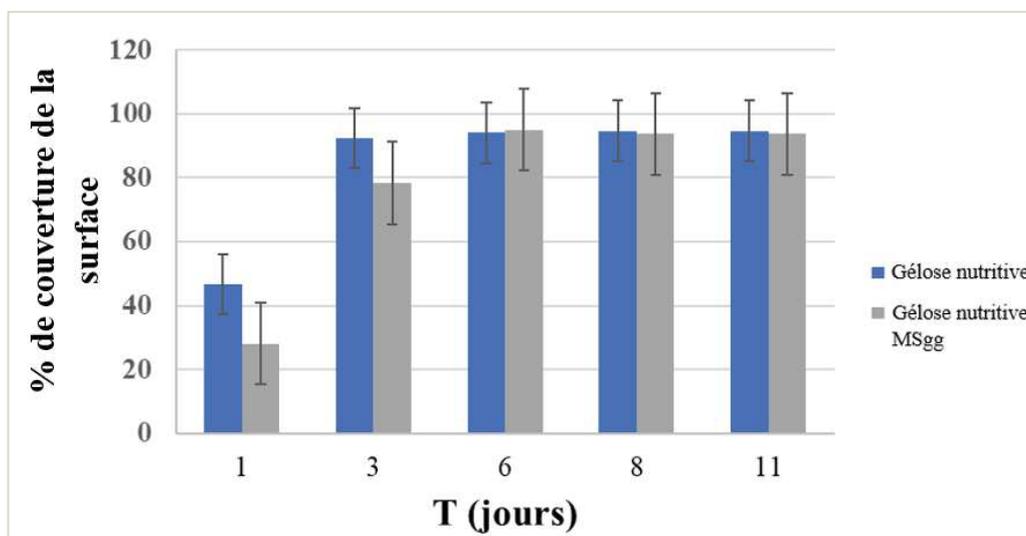


Figure 34. Pourcentage de la couverture de surface des géloses nutritives et nutritives-MSgg par la biomasse.

Dans les photographies de la cinétique, il peut être observé que la gélose nutritive permet le meilleur développement de la biomasse, suivi par la gélose nutritive-MSgg. Il semble que la coloration blanche du milieu MSgg ait rendu la biomasse à sa surface, imperceptible.

Sur les géloses nutritives et nutritives-MSgg, la couleur blanche de la biomasse a commencé à disparaître dès le 3^e jour. Ce phénomène est inexplicable, mais il est possible que ceci soit associé à la mortalité de cellules bactériennes.

Si le développement de la biomasse sur la gélose nutritive MSgg est observé en détail, il est possible d'apprécier qu'au 1^{er} jour, la biomasse n'a pas de couleur, et ce n'est qu'au 3^e jour qu'elle devient blanche. Cela nous permettrait de supposer que lorsque la concentration

cellulaire augmente, la biomasse devient blanche, et par conséquent, si la couleur blanche diminue, cela pourrait être un indicateur que la concentration cellulaire diminue.

6.3.3. Conclusion

En conclusion, les résultats confirment que B.H se développe plus rapidement sur la gélose nutritive que sur les autres géloses, commençant à former un tapis de biomasse dès le 1^{er} jour. En estimant le pourcentage final de surface couverte, il a été déterminé que la vitesse de développement de B.H n'influence pas la surface finale qu'elle peut couvrir. De même, il peut être déterminé que la colonisation, en termes de surface, est équivalente pour les deux géloses, il est donc suggéré que la présence du MSgg dans le milieu nutritif MSgg ne contribue pas à augmenter la colonisation de B.H.

7. Conclusion du Chapitre

Dans le cadre de l'étude de la bioprécipitation pendant la thèse de Marion Medevielle [9], il a été observé que *B. halodurans* C-125 ne se développait pas uniformément sur une surface. Au début de cette thèse, il a été suggéré que la principale raison était l'incapacité de cette bactérie à produire du biofilm ce qui générerait une précipitation hétérogène et ne permettait pas d'améliorer la qualité des graviers recyclés par biocarbonatation.

Afin de valider cette hypothèse, il a été réalisé dans ce premier chapitre, une analyse *in silico* qui a permis de démontrer que *B. halodurans* C-125, n'était pas capable de produire les protéines TAP A et TAS A, nécessaire pour produire un biofilm.

Ultérieurement, dans une analyse *in vitro*, son incapacité à former un biofilm a été confirmée. À la suite de ces résultats, il a été décidé de chercher de nouveaux micro-organismes ayant la capacité de former un biofilm dans un environnement alcalin, suggérant que cette capacité leur donnerait un avantage sur *B. halodurans* C-125 pour coloniser de façon homogène une surface. C'est pourquoi il a été décidé de prélever du microbiote à la surface de gravillons de béton recyclé âgés, car des micro-organismes capables de subsister naturellement dans ces conditions pourraient être de bons candidats pour l'objectif que l'on s'est fixé. À partir de ce prélèvement, 3 bactéries ayant la capacité de se développer à un pH de 11 ont ensuite été isolées. Elles sont toutes Gram positifs ce qui leur confère, *a priori*, un risque moindre de pathogénicité

et, en raison de la structure de leur paroi cellulaire, la capacité de former de multiples sites de nucléation pour la précipitation du CaCO_3 . Une analyse phylogénétique a associé les 3 bactéries candidates aux *B. licheniformis* et *B. haynesii*. Ce qui a permis de confirmer le caractère non pathogène des souches.

Il a ensuite été prouvé que les bactéries étaient capables de produire du biofilm

Pour limiter le nombre d'expériences et à la vue de la meilleure capacité de A2-3 à former du biofilm, il a été décidé de travailler uniquement avec cette bactérie pour les expériences suivantes. Son nom a également été changé de A2-3 à B.H pour plus de lisibilité dans le reste du document.

Partant du constat que le développement de B.H soit différent (i) sur une surface solide ou en suspension (ii) en fonction du type de milieu utilisé, une cinétique de croissance a été réalisée sur 3 géloses différentes : nutritives, MSgg et nutritives-MSgg. Il a été déterminé que la colonisation et la surface couverte par B.H étaient équivalentes sur les géloses nutritives et nutritives-MSgg, couvrant plus de 90% de la surface disponible en 3 jours. Au contraire, il a été démontré que le milieu MSgg seul n'aidait pas à avoir une colonisation uniforme. Par conséquent, la gélose nutritive est la candidate privilégiée pour être utilisée dans de futures expériences mais il est recommandé de réaliser, en parallèle, les expériences sur la gélose nutritive MSgg, pour comparer les résultats.

Compte tenu des résultats encourageants acquis lors des expériences de ce chapitre avec la souche B.H, le prochain objectif serait de déterminer si BH est capable de bioprécipiter des CaCO_3 . BH étant une bactérie Gram +, capable de former un biofilm, il est supposé qu'elle pourrait générer notamment de multiples sites de nucléation et donc avoir un bon rendement de production de CaCO_3 .

8. Références

- [1] M. Medevielle, "Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé, Ph.D. dissertation, MAST," École centrale de Nantes, 2019.
- [2] H. Vlamakis, Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick, and R. Kolter, "Sticking together:

- Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 3, pp. 157–168, 2013, doi: 10.1038/nrmicro2960.
- [3] D. Romero, H. Vlamakis, R. Losick, and R. Kolter, “An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms,” *Mol. Microbiol.*, vol. 80, no. 5, pp. 1155–1168, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07653.x.
- [4] A. G. Stöver and A. Driks, “Control of Synthesis and Secretion of the *Bacillus subtilis* Protein YqxM These include : Control of Synthesis and Secretion of the *Bacillus subtilis* Protein YqxM,” *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 22, pp. 1–6, 1999, doi: [PubMed: 10559173].
- [5] S. S. Branda, F. Chu, D. B. Kearns, R. Losick, and R. Kolter, “A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix,” *Mol. Microbiol.*, vol. 59, no. 4, pp. 1229–1238, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x.
- [6] M. W. Rey *et al.*, “Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species.,” *Genome Biol.*, vol. 5, no. 10, 2004.
- [7] T. L. Madden, R. L. Tatusov, and J. Zhang, “[9] Applications of network BLAST server,” *Methods Enzymol.*, vol. 266, pp. 131–141, Jan. 1996, doi: 10.1016/S0076-6879(96)66011-X.
- [8] H. Takami *et al.*, “Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 21, pp. 4317–31, 2000, doi: 10.1093/nar/28.21.4317.
- [9] D. Romero, H. Vlamakis, R. Losick, and R. Koltera, “Functional analysis of the accessory protein TapA in *Bacillus subtilis* amyloid fiber assembly,” *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 8, pp. 1505–1513, 2014, doi: 10.1128/JB.01363-13.
- [10] M. Medevielle, “Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé, Ph.D. dissertation, MAST,” Université Bretagne Loire, 2017.
- [11] N. Kaur, M. S. Reddy, and A. Mukherjee, “Biomining of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 5, pp. 707–714, 2013, doi: 10.4014/jmb.1212.11087.

- [12] P. Cacchio, C. Ercole, G. Cappuccio, and A. Lepidi, “Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil,” *Geomicrobiol. J.*, vol. 20, no. 2, pp. 85–98, 2003, doi: 10.1080/01490450303883.
- [13] M. García G., M. A. Márquez G., and H. C. X. Moreno, “Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines,” *Microbiol. Res.*, vol. 182, pp. 21–30, 2016, doi: 10.1016/j.micres.2015.09.006.
- [14] K. Benzerara, J. Miot, G. Morin, G. Ona-Nguema, F. Skouri-Panet, and C. Féraud, “Importance, mécanismes et implications environnementales de la biominéralisation par les microorganismes,” *Comptes Rendus - Geosci.*, vol. 343, no. 2–3, pp. 160–167, 2011, doi: 10.1016/j.crte.2010.09.002.
- [15] W. Yin, Y. Wang, L. Liu, and J. He, “Biofilms: The microbial ‘protective clothing’ in extreme environments,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 14, 2019, doi: 10.3390/ijms20143423.
- [16] R. Subramani and M. Jayaprakashvel, *Bacterial Quorum Sensing: Biofilm Formation, Survival Behaviour and Antibiotic Resistance*. 2019.
- [17] H. C. Flemming, “Biofilms and environmental protection,” *Water Sci. Technol.*, vol. 27, no. 7–8, pp. 1–10, 1993.
- [18] E. Giaouris, N. Chorianopoulos, and G. J. E. Nychas, “Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella Enterica enteritidis* PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements,” *J. Food Prot.*, vol. 68, no. 10, pp. 2149–2154, 2005, doi: 10.4315/0362-028X-68.10.2149.
- [19] A. L. McLoon, S. B. Guttenplan, D. B. Kearns, R. Kolter, and R. Losick, “Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium,” *J. Bacteriol.*, vol. 193, no. 8, pp. 2027–2034, 2011, doi: 10.1128/JB.01542-10.
- [20] F. Lécuyer, J.-S. Bourassa, M. Gélinas, V. Charron-Lamoreux, V. Burrus, and P. B. Beauregard, “Biofilm Formation Drives Transfer of the Conjugative Element,” vol. 3, no. 5, pp. 1–12, 2018.

- [21] M. Marvasi, P. T. Visscher, and L. Casillas Martinez, “Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: Polymers and genes encoding their synthesis,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 313, no. 1, pp. 1–9, 2010, doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02085.x.
- [22] B. Mielich-Süss and D. Lopez, “Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation,” *Environ. Microbiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 555–565, 2015, doi: 10.1111/1462-2920.12527.
- [23] S. S. Branda, J. E. González-pastor, S. D. Ehrlich, R. Losick, E. Gonza, and E. Dervyn, “Genes Involved in Formation of Structured Multicellular Communities by *Bacillus subtilis*,” *Society*, vol. 186, no. 12, pp. 3970–3979, 2004, doi: 10.1128/JB.186.12.3970.
- [24] S. S. Branda, J. E. González-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick, and R. Kolter, “Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 20, pp. 11621–6, 2001, doi: 10.1073/pnas.191384198.
- [25] E. Ben-Jacob, O. Schochet, A. Tenenbaum, I. Cohen, A. Czirók, and T. Vicsek, “ce qui correspond à la bactérie à laquelle ils sont génétiquement liés,” *Nature*, vol. 368, no. 6466, pp. 46–49, 1994, doi: 10.1038/368046a0.
- [26] Y. Chai, F. Chu, R. Kolter, and R. Losick, “Bistability and Biofilm Formation in *Bacillus subtilis*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 67, no. 2, pp. 254–263, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06040.x.
- [27] R. Fall, D. B. Kearns, and T. Nguyen, “A defined medium to investigate sliding motility in a *Bacillus subtilis* flagella-less mutant,” *BMC Microbiol.*, vol. 6, pp. 1–11, 2006, doi: 10.1186/1471-2180-6-31.
- [28] N. R. Stanley and B. A. Lazazzera, “Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation,” *Mol. Microbiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 917–924, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x.
- [29] M. Burmølle, D. Ren, T. Bjarnsholt, and S. J. Sørensen, “Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter?,” *Trends Microbiol.*, vol. 22, no. 2, pp. 84–91, 2014, doi: 10.1016/j.tim.2013.12.004.
- [30] S. A. West, A. S. Griffin, and A. Gardner, “Evolutionary Explanations for Cooperation,” *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 16, pp. 661–672, 2007, doi: 10.1016/j.cub.2007.06.004.

- [31] A. C. S. Yu, J. F. C. Loo, S. Yu, S. K. Kong, and T. F. Chan, “Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 2, pp. 855–862, Jan. 2014, doi: 10.1007/s00253-013-5377-9.
- [32] H. Takami and K. Horikoshi, “Reidentification of facultatively alkaliphilic bacillus sp. C-125 to *Bacillus halodurans*,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 63, no. 5, pp. 943–945, 1999, doi: 10.1271/bbb.63.943.
- [33] H. Newman, “Microscopic morphology of *Haemophilus influenzae*,” 2015. https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria_photos/haemophilus_influenzae_photos/HAIN19.html (accessed Jun. 11, 2021).
- [34] A. Mai-Prochnow, M. Clauson, J. Hong, and A. B. Murphy, “Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep38610.
- [35] N. Malanovic and K. Lohner, “Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1858, no. 5, pp. 936–946, 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.11.004.
- [36] K. O. Konhauser, *Introduction to Geomicrobiology*, First. BLACKWELL PUBLISHING, 2007.
- [37] P. Lake and R. Drake, “Structure,” in *Advanced Information and Knowledge Processing*, no. 9783319135021, Springer London, 2014, pp. 53–79.
- [38] I. Alexandraki and C. Palacio, “Gram-negative versus Gram-positive bacteremia: What is more alarmin(g)?,” *Critical Care*, vol. 14, no. 3. BioMed Central, p. 161, May 27, 2010, doi: 10.1186/cc9013.
- [39] Z. Breijyeh, B. Jubeh, and R. Karaman, “Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it,” *Molecules*, vol. 25, no. 6. MDPI AG, Mar. 02, 2020, doi: 10.3390/molecules25061340.
- [40] R. C. Edgar, “Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs,” *Bioinformatics*, vol. 34, no. 14, pp. 2371–2375, 2018, doi: 10.1093/bioinformatics/bty113.

- [41] A. S. de Boer, F. Priest, and B. Diderichsen, “On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 5, pp. 595–598, 1994, doi: 10.1007/BF00173313.
- [42] J. Dischinger, M. Josten, C. Szekat, H. G. Sahl, and G. Bierbaum, “Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13,” *PLoS One*, vol. 4, no. 8, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006788.
- [43] J. Tourney and B. T. Ngwenya, “Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism,” *Chem. Geol.*, vol. 262, no. 3–4, pp. 138–146, 2009, doi: 10.1016/j.chemgeo.2009.01.006.
- [44] O. Masure, G. Bougeard, M. L. Colloc, G. Bergeret, and C. Chastel, “Une nouvelle observation de bactériémie à *Bacillus licheniformis* chez une Leucémique,” *Med. Mal. Infect.*, vol. 9, no. 2, pp. 100–102, Jan. 1979, doi: 10.1016/S0399-077X(79)80035-9.
- [45] M. A. Ameer, P. Dubrous, and J. L. Koeck, “*Bacillus licheniformis*: Agent causal d’érupción,” *Med. Mal. Infect.*, vol. 35, no. 7–8, pp. 417–418, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.medmal.2005.04.007.
- [46] D. Romero, C. Aguilar, R. Losick, and R. Kolter, “Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 5, pp. 2230–2234, 2010, doi: 10.1073/pnas.0910560107.
- [47] J. Caro-Astorga, A. Pérez-García, A. de Vicente, and D. Romero, “A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. DEC, pp. 1–11, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00745.
- [48] Y. Li, L. Mandelco, and J. Wiegel, “Isolation and characterization of a moderately thermophilic anaerobic alkaliphile, *Clostridium paradoxum* sp. nov.,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 43, no. 3, pp. 450–460, 1993, doi: 10.1099/00207713-43-3-450.
- [49] M. G. Sturr, A. A. Guffanti, and T. A. Krulwich, “Growth and bioenergetics of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 in continuous culture at high pH,” *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 11, pp. 3111–3116, 1994, doi: 10.1128/jb.176.11.3111-3116.1994.
- [50] S. Castanier, G. Le Métayer-Levrel, and J.-P. Perthuisont, “Ca-carbonates precipitation and limestone genesis the microbiogeologist point of view,” *Sediment. Geol.*, vol. 126,

Chapitre 3 : Isolement, sélection et identification de microorganismes présents à la surface de gravillon de béton recyclé

pp. 9–23, 1999.

[51] L. Z. Pipe and M. J. Grimson, “Spatial-temporal modelling of bacterial colony growth on solid media,” doi: 10.1039/b708241j.

Chapitre 4 : Essais de bioprécipitation ; production de CaCO_3

Comme démontré dans le chapitre précédent, B.H croît et forme un biofilm uniforme sur des géloses nutritives et nutritives-MSgg à pH 11. L'étape suivante consiste donc à évaluer la capacité de B.H à précipiter le CaCO_3 . Dans ce cadre, une série de méthodologies et de techniques ont été développées. Pour analyser qualitativement et quantitativement la bioprécipitation induite par B.H. Les objectifs de ces expériences sont de : (i) déterminer dans quel type de culture (liquide/solide) B.H peut précipiter les CaCO_3 et (ii) quantifier la production et son rendement de production, afin d'identifier les paramètres clés, qui pourraient éventuellement favoriser la bioprécipitation.

1. Production de CaCO_3 en milieu liquide

L'objectif de cette analyse est de quantifier la production de CaCO_3 réalisée par B.H. dans du bouillon nutritif.

1.1. Matériels et Méthodes spécifiques

Sur la base de la méthodologie appliquée dans les travaux de Médevielle [1], douze boîtes de Petri ($\varnothing = 8.5$ cm) ont été utilisées. Dans chacune, 20 mL de bouillon nutritif stérile ont été ajoutés. Les boîtes ont été inoculées avec 40 μL d'une suspension mère de B.H ($1,3 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$). Ensuite, 20 mL d'une solution d'acétate de calcium à une concentration de $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ont été ajoutés. Immédiatement, les 12 cultures ont été incubées. L'extraction, la caractérisation et la quantification des CaCO_3 ont été réalisées au 3e, 10e et 17e jour d'incubation, en utilisant à chaque échéance, 4 boîtes de Petri. Le CaCO_3 a été récupéré par centrifugation, après élimination du surnageant, le culot a été séché à $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ pendant 3 jours. Une fois, l'échantillon sec, les culots sont réunis puis analysés par ATG à chaque échéance.

1.2. Résultats

Aucun développement de B.H ni aucune présence de CaCO_3 n'a été pas observé dans les boîtes de Pétri contenant du bouillon nutritif à pH 11 et la solution d'acétate de calcium.

1.3. Discussion et conclusion

Depuis que B.H a été isolée, il a été démontré qu'elle se développe dans des cultures nutritives liquides et solides à pH 11, ce qui exclut un effet inhibiteur du pH alcalin sur B.H.

Comme mentionné précédemment, lorsque B.H. est cultivée dans un bouillon nutritif, elle forme des floccs agglomérés à la surface, ce qui indique que cette bactérie a besoin d'oxygène pour sa croissance. De même, la bactérie avec laquelle elle a été génétiquement associée (*B. haynesii*), est anaérobie facultative, ce qui indique qu'elle utilise de préférence la respiration de l'oxygène atmosphérique plutôt qu'un processus de fermentation anaérobie [2]. Ceci pourrait indiquer que B.H. pourrait avoir le même système de respiration. En cultivant B.H. dans du bouillon nutritif dans une boîte de Petri avec une plus grande surface exposée à l'air et une agitation constante, les problèmes associés à un manque d'oxygénation qui auraient pu inhiber sa croissance sont donc écartés.

En ce qui concerne l'ajout d'acétate de calcium, il faut remarquer que dans cette manipulation, celui-ci a été ajouté juste après avoir inoculé B.H. et non après avoir obtenu une suspension de B.H. plus concentrée. Il est possible que B.H. ait eu des difficultés à s'acclimater à son nouvel environnement, ce qui a ralenti ou a arrêté sa croissance. Il est également possible que la concentration d'acétate de calcium ajoutée à la culture ait provoqué une inhibition de la croissance. La littérature suggère que l'utilisation de fortes concentrations d'acétate peut empêcher le développement bactérien, en raison de l'accumulation d'acétate dans les cellules ou de la formation d'acides faibles [3]. Il est également suggéré que l'ajout de l'acétate dans une culture dont la principale source de carbone est autre (comme le glucose) que l'acétate même, perturbe le métabolisme des bactéries, car elles doivent assimiler deux sources de carbone en même temps. Ceci ralentit sa croissance et peut entraîner un effet inhibiteur [3].

En conclusion, il est suspecté que l'ajout de l'acétate de calcium juste après l'inoculation de B.H., ainsi que sa concentration ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ait pu interrompre son développement. Sur la base de ce résultat, d'autres manipulations pourraient être mises en place pour déterminer : (i) le moment approprié auquel l'acétate de calcium doit être ajouté à la culture, et (ii) la quantité d'acétate de calcium idéale à utiliser, afin de ne pas inhiber la croissance de B.H. dans du bouillon nutritif. Cependant, avant de mettre en œuvre ces propositions, il a été décidé d'expérimenter la bioprécipitation sur gélose nutritive. Lorsque B.H. est cultivée sur une gélose, elle se développe de manière homogène en formant un biofilm ou tapis de biomasse. Si B.H. réussit à précipiter le CaCO₃ dans ces conditions, une couche homogène de CaCO₃ pourrait être obtenue. Ce qui correspond à l'objectif final de cette recherche. De plus, le fait de travailler sur une surface solide et non en suspension est plus proche des conditions réelles de travail sur les

gravillons recyclés. Dans la section suivante, on décrit donc les méthodologies développées pour l'analyse de la bioprécipitation sur gélose.

2. Production de CaCO_3 sur gélose

Cette section décrit les méthodologies mises en œuvre pour : (i) déterminer si B.H est capable de précipiter du CaCO_3 sur gélose (ii) développer une technique pour extraire et quantifier le CaCO_3 produit, et (iii) identifier certains paramètres qui pourraient éventuellement être déterminants pour l'optimisation du processus.

2.1. Création d'un protocole d'extraction de CaCO_3

La consistance gélatineuse des cultures solides peut rendre difficile l'extraction des CaCO_3 précipités. Afin de récupérer le plus de CaCO_3 possibles sans laisser de résidus dans la gélose, il a donc été décidé de créer un protocole pour faire refondre la gélose, et récupérer le CaCO_3 par sédimentation et centrifugation.

En reprenant la technique utilisée par Ferrer et al., [4] ils ont établi que pour extraire le CaCO_3 d'une gélose ($\varnothing 13.5$ cm et $m \approx 120$ g), il faut : (i) couper la gélose en différents morceaux (ii) déposer les morceaux dans un flacon avec 500 mL d'eau distillée, pour diluer la gélose et faciliter la sédimentation (iii) autoclaver à 121°C , 1 atm, pendant 15 min ; pour permettre non seulement de faire fondre la gélose, mais aussi de tuer B.H, (iv) retirer le flacon avec le milieu et laisser sédimenter le CaCO_3 pendant 25 minutes (v) ajouter 300 mL d'eau au culot, et effectuer un second autoclavage, pour enlever le plus d'agar possible (vi) récupérer le mélange et le centrifuger à (3000 g, 12 min), pour obtenir le culot de CaCO_3 (vii) sécher le culot à 40°C pendant 2 jours pour obtenir une poudre sèche et (ix) effectuer les analyses de caractérisation et de quantification.

Afin de s'assurer que l'acétate de calcium ne soit pas quantifié comme du CaCO_3 , une analyse ATG complémentaire de l'acétate de calcium seul a été réalisée, montrant un pic de déshydratation à 420°C . De plus, afin de vérifier que l'autoclavage ne précipite pas l'acétate de calcium sous forme de CaCO_3 , nous avons réalisé : (i) un autoclavage d'une gélose nutritive pH 11 avec 3mL d'acétate de calcium [$50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$] incubé pendant 17 jours, et (ii) l'autoclavage d'une solution d'acétate de calcium [$50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$].

Après autoclavage de la gélose avec de l'acétate de calcium, aucun précipité n'a été perçu, cela indique que l'interaction entre la gélose et l'acétate de calcium ne forme pas de CaCO_3 et ce même après 17 jours d'incubation (Figure 35-A). De même, la solution d'acétate de calcium est restée soluble, montrant que la température (121°C) ne provoque pas la précipitation de l'acétate de calcium (Figure 35-B).

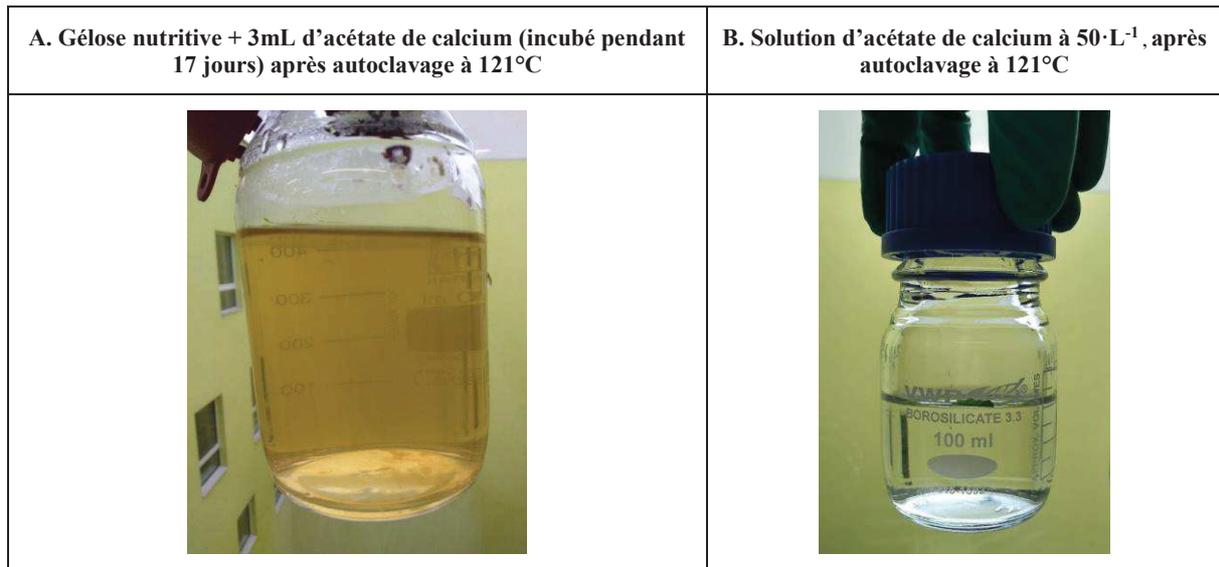


Figure 35. Gélose nutritive liquéfiée contenant de l'acétate de calcium après autoclavage et solution d'acétate de calcium après autoclavage.

En conclusion, si de l'acétate de calcium reste présent à la surface des géluses, il ne viendra pas biaiser les données obtenues sur la formation des CaCO_3 . Sur la base des résultats obtenus, il est possible d'affirmer qu'un procédé d'extraction séparant les éléments solubles des éléments non solubles des cultures a été créé. Ceci permet de séparer l'acétate de calcium résiduel, la gélose nutritive, la biomasse et le CaCO_3 bioprécipité. Cette méthodologie d'extraction est désormais utilisée dans les analyses de bioprécipitation décrites dans les sections suivantes.

2.2. Production de CaCO_3 sur gélose nutritive à pH 11

Les objectifs de cette manipulation sont de déterminer la quantité de CaCO_3 précipitée par B.H au cours du temps d'incubation, et de définir si la concentration microbienne joue un rôle dans la quantité de CaCO_3 produite. À cette fin, une cinétique de bioprécipitation de 17 jours sur gélose nutritive avec B.H a été réalisée.

Le fait de faire varier la concentration cellulaire dans cette analyse permet de : (i) mieux apprécier le développement des colonies de B.H et leur dispersion lors de la production de CaCO_3 (dans une culture avec une concentration microbienne plus faible, les colonies peuvent être appréciées séparément et bien définies), et (ii) d'établir si la concentration de l'inoculum affecte la production de CaCO_3 . C'est pourquoi deux conditions expérimentales ont été établies, pour la condition 1 une dilution en série 10^{-3} (1 : 1000) de la suspension mère a été utilisée, et une dilution 10^{-4} (1 : 10,000) pour la condition 2.

2.2.1. *Matériels et Méthodes spécifiques*

Pour la mise en place du protocole, 32 géloses nutritives (\varnothing 13,5 cm), ont été utilisées. Avant d'inoculer les géloses, un dénombrement de la suspension mère a été réalisé qui a donné $2,5 \times 10^7$ UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$. Ensuite pour chaque condition, 15 géloses ont été utilisées, sur lesquels 275 μl des suspensions correspondantes ont été inoculés conduisant pour la condition 1 à 48 UFC $\cdot\text{cm}^{-2}$ et 4,8 UFC $\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la condition 2. Ensuite, 3 mL (1×10^{-3} g $\cdot\text{cm}^{-2}$) d'une solution d'acétate de calcium [$50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] ont été ajoutés (Figure 36). La solution d'acétate de calcium a été stérilisée par filtration à $0.20\mu\text{m}$. Une fois toutes les géloses inoculées, elles ont été laissées dans la hotte microbiologique avec le couvercle ouvert, afin de sécher la solution d'acétate de calcium ajoutée en surface. Les 2 boîtes restantes ont été utilisées comme contrôles. 3 mL de la solution d'acétate de calcium ont été placés dans une gélose de contrôle, pour observer si l'acétate de calcium ne précipite pas ou pour écarter la contamination microbienne par cette solution. Dans la gélose restante, rien n'a été inoculé, servant de contrôle de contamination. Les boites ont été incubées à 30°C pendant 17 jours.

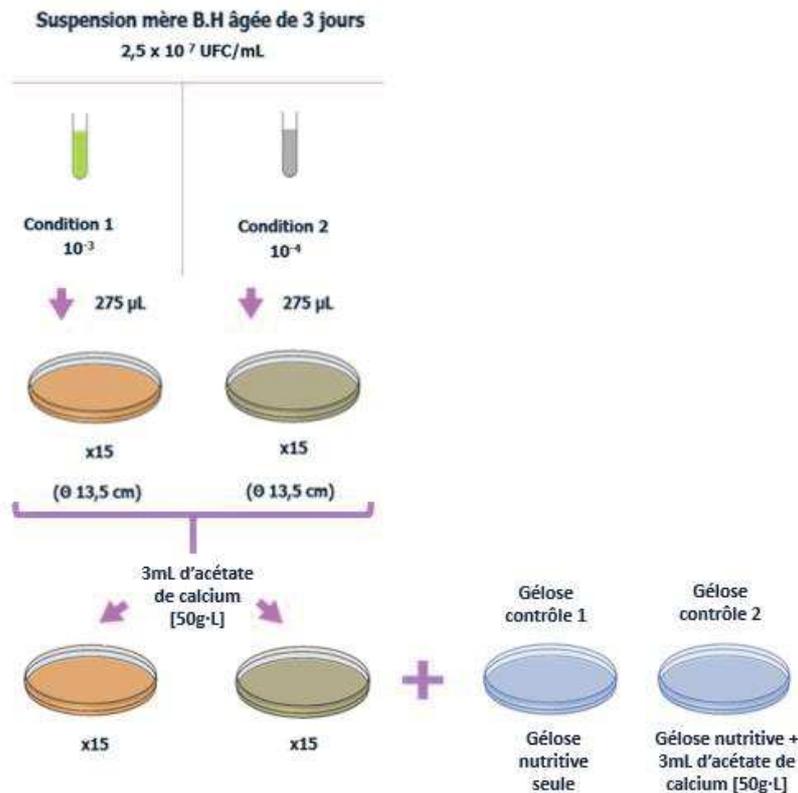


Figure 36. Processus d'inoculation des géloses nutritives avec B.H.

Toutes les 24 heures, une photographie de la surface des géloses a été prise. Les photographies ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J, afin de compter les colonies formées ou d'estimer la surface recouverte par la biomasse et/ou le CaCO_3 . Pour effectuer des observations microscopiques et extraire le CaCO_3 des géloses, 5 prélèvements ont été effectués pendant la période d'incubation, au 3e, 7e, 10e, 14e et 17e jours. À chaque échéance, 3 géloses de chaque condition ont été prélevées. Après extraction, les culots ont été cumulés par condition et ont d'abord été caractérisés par DRX et ensuite quantifiés par ATG.

2.2.2. Résultats

Les photographies des géloses témoins sont présentées dans la Figure 37. Aucun signe de contamination microbienne n'a été observé dans les deux géloses. Plus particulièrement, sur la gélose avec l'acétate de calcium, aucun précipité n'a été aperçu.

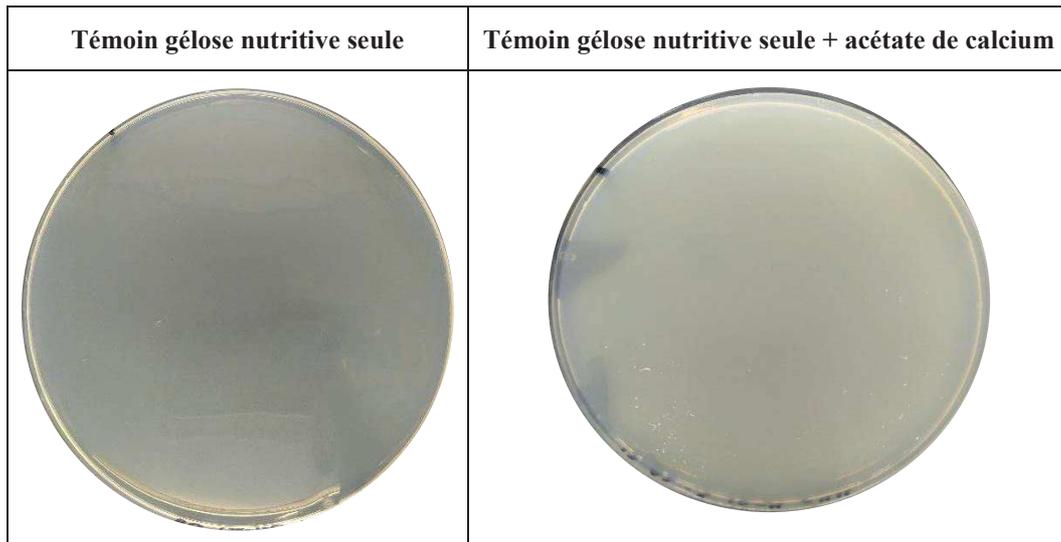


Figure 37. Géloses nutritives à pH 11 témoin avec et sans acétate de calcium après 17 jours d'incubation à 30°C

Les photographies de la Figure 38, correspondent à la cinétique de bioprécipitation. Celles-ci montrent le changement d'aspect de la surface des cultures à fur et à mesure que la biomasse la colonise.

Dès le premier jour, un tapis de biomasse avait déjà commencé à se former sur les géloses de la condition 1, alors que dans les géloses de la condition 2, les colonies se trouvaient dispersées sur toute la surface. Au 3^e jour, les géloses de la condition 1 étaient complètement couvertes par un tapis de biomasse. Entre le 4^e et le 17^e jour, aucun changement significatif dans le développement de la biomasse sur la surface n'a été observé, cependant, il est possible de remarquer que dans cette période la surface est devenue de plus en plus blanche.

Dans les cultures de la condition 2, entre le 4^e et 14^e jour, certains espaces des géloses, mais pas tous, ont été colonisés par la biomasse. Entre le 14^e et le 17^e jour, il n'y a pas eu de changements significatifs dans les cultures de cette condition.

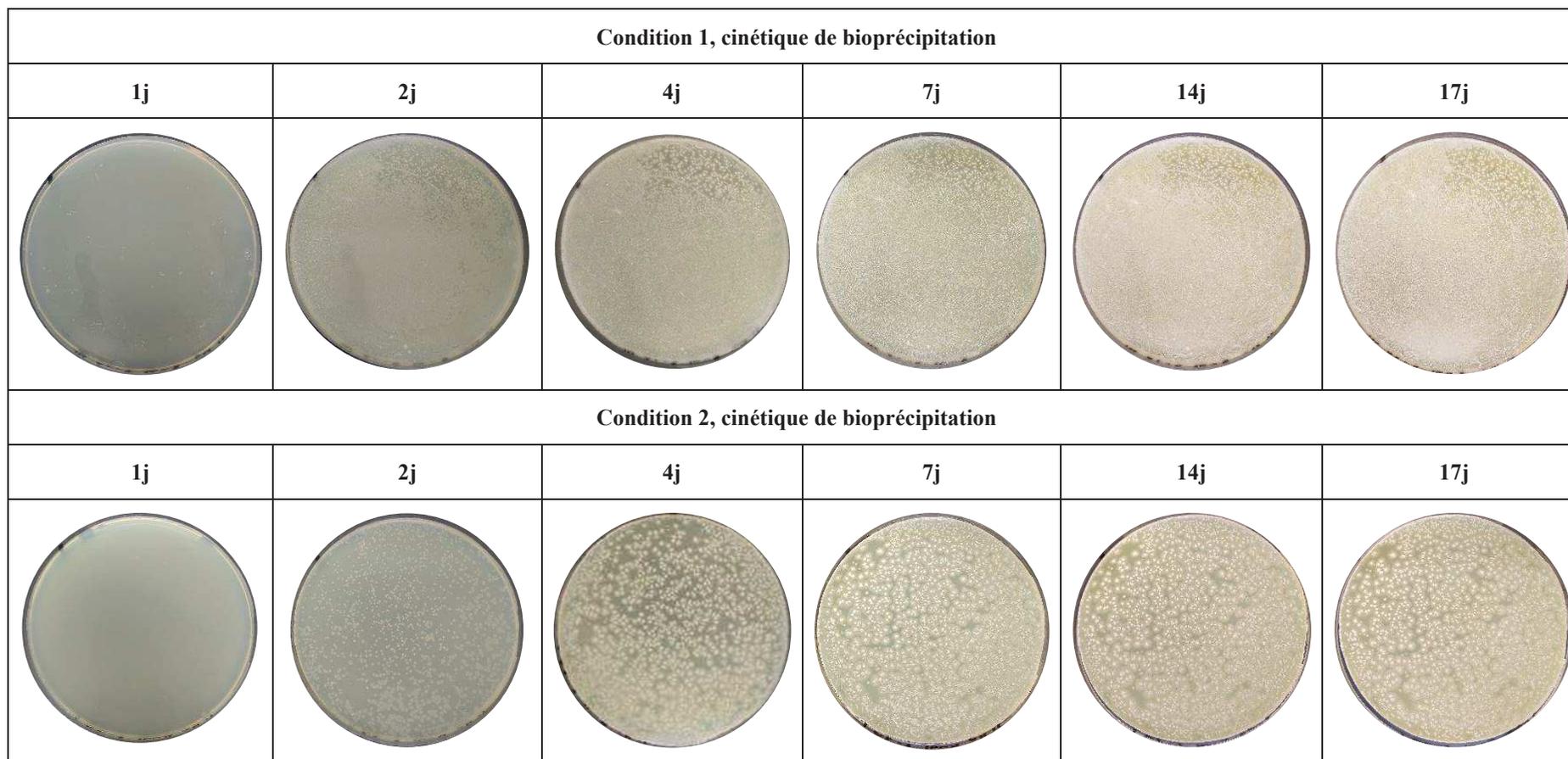
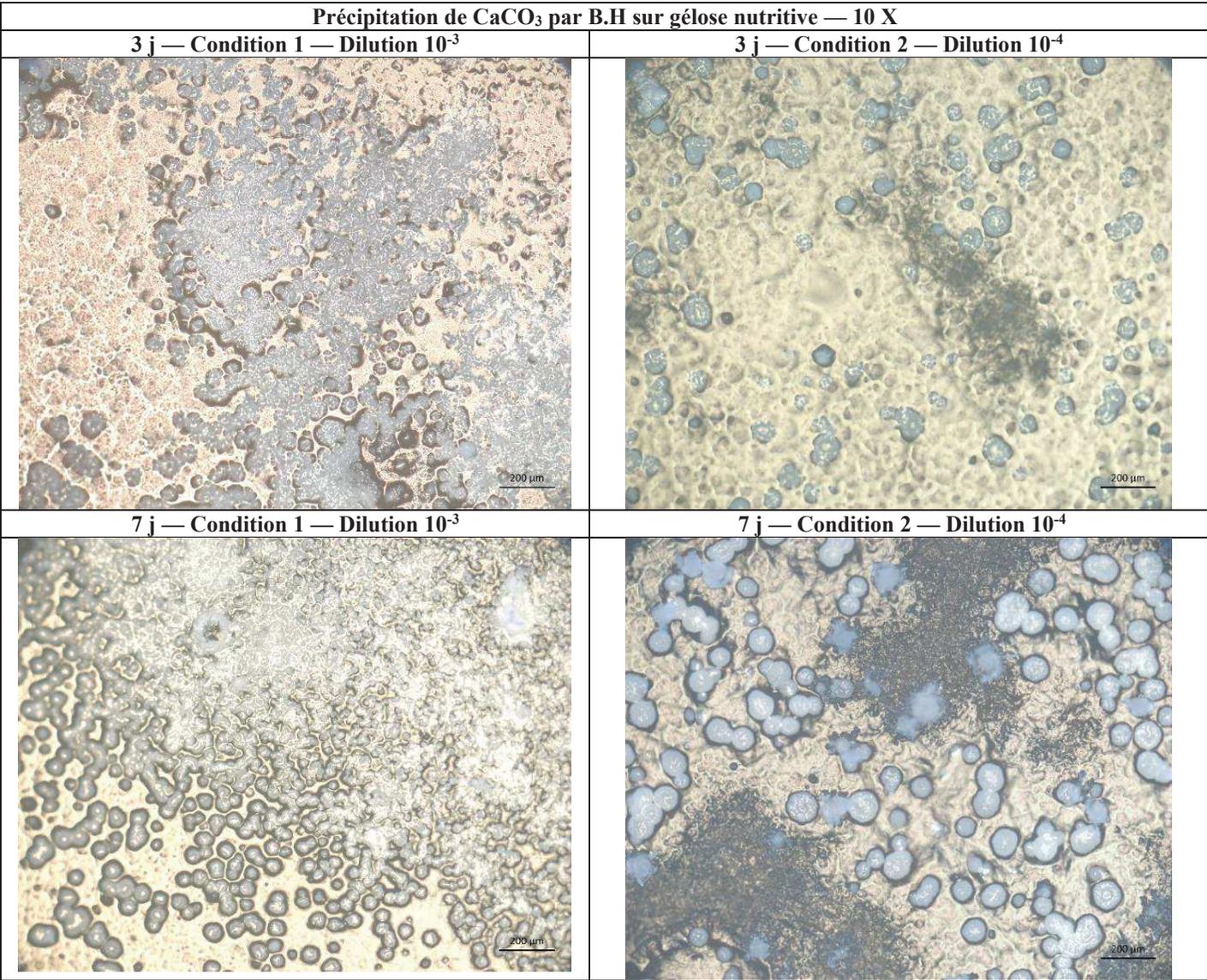
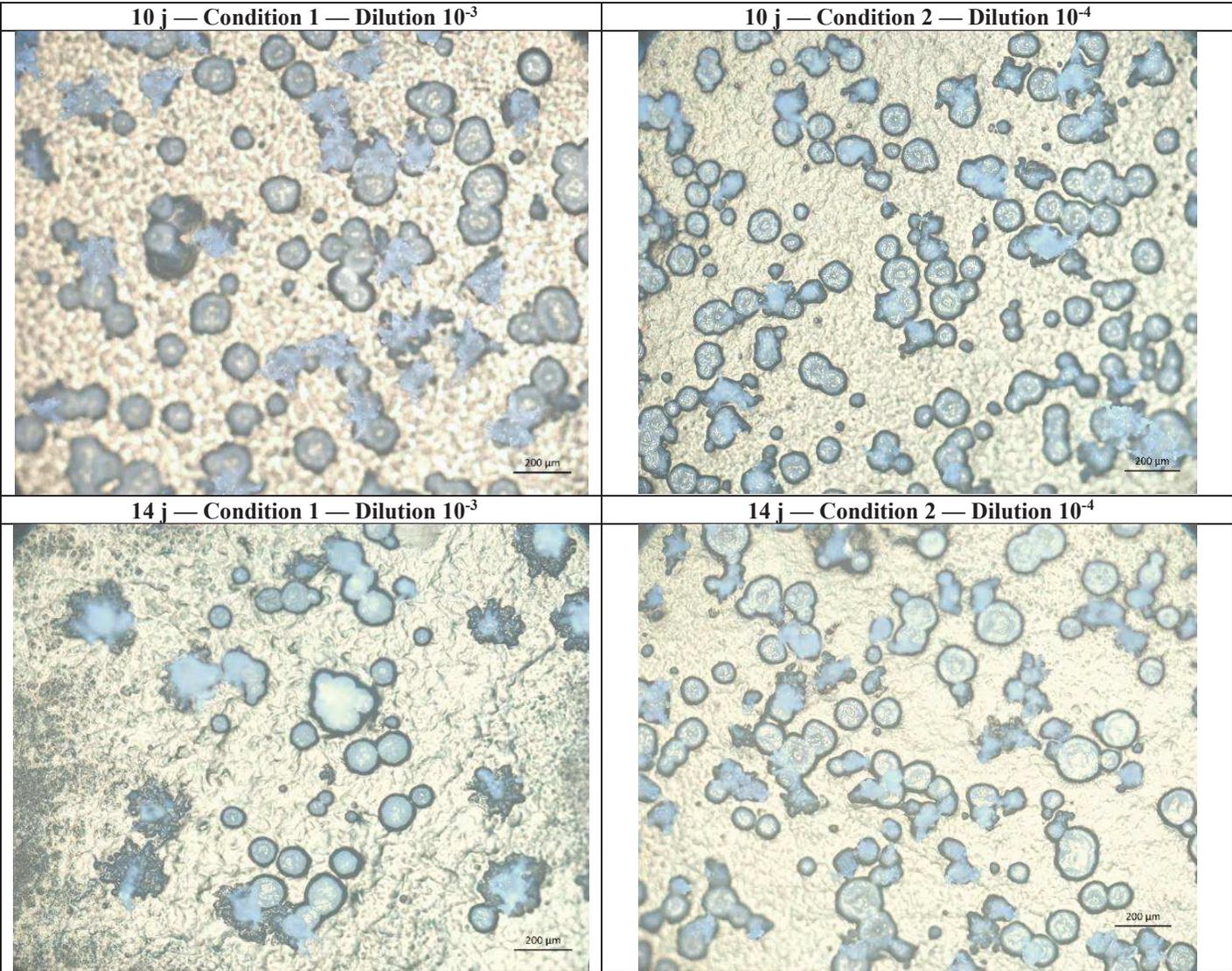


Figure 38. Cinétique de bioprécipitation des gélules des conditions 1 (ensemencé avec la dilution 10^{-3} ; $48 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) et 2 (ensemencée avec la dilution 10^{-4} ; $4.8 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$), montrant le développement de la biomasse et des formations de CaCO_3 pendant 17 jours d'incubation à 30°C .

Des structures blanches circulaires qui semblaient être des corps minéraux ont été observées à la surface de toutes les géloses dès le 3^e jour d'incubation. Cependant, il n'est pas certain que le processus de formation de ces structures n'ait eu lieu qu'au 3^e jour, car il est possible qu'il ait commencé avant. Les photographies de ces structures sont présentées dans la Figure 39 par condition.

Dans certaines zones des cultures de la condition 1, des plaques formées par l'agglomération de multiples cristaux circulaires étaient visibles. Dans les cultures de la deuxième condition, les cristaux étaient dispersés et bien isolés les uns des autres. Au 7^e jour, la surface recouverte par les cristaux semblait avoir augmenté et la morphologie de cristaux paraissait mieux définie. Dans les cultures de la condition 2, des structures en forme d'étoile ont commencé à apparaître, au-dessus des structures circulaires. Au 10^e jour, des structures en étoiles ont été observées dans les géloses de la condition 1. Qualitativement dans les géloses des deux conditions, les structures circulaires étaient plus abondantes que les cristaux étoilés. Entre le 10^e et le 17^e jour d'incubation, aucun changement significatif de la morphologie des cristaux n'a été observé.





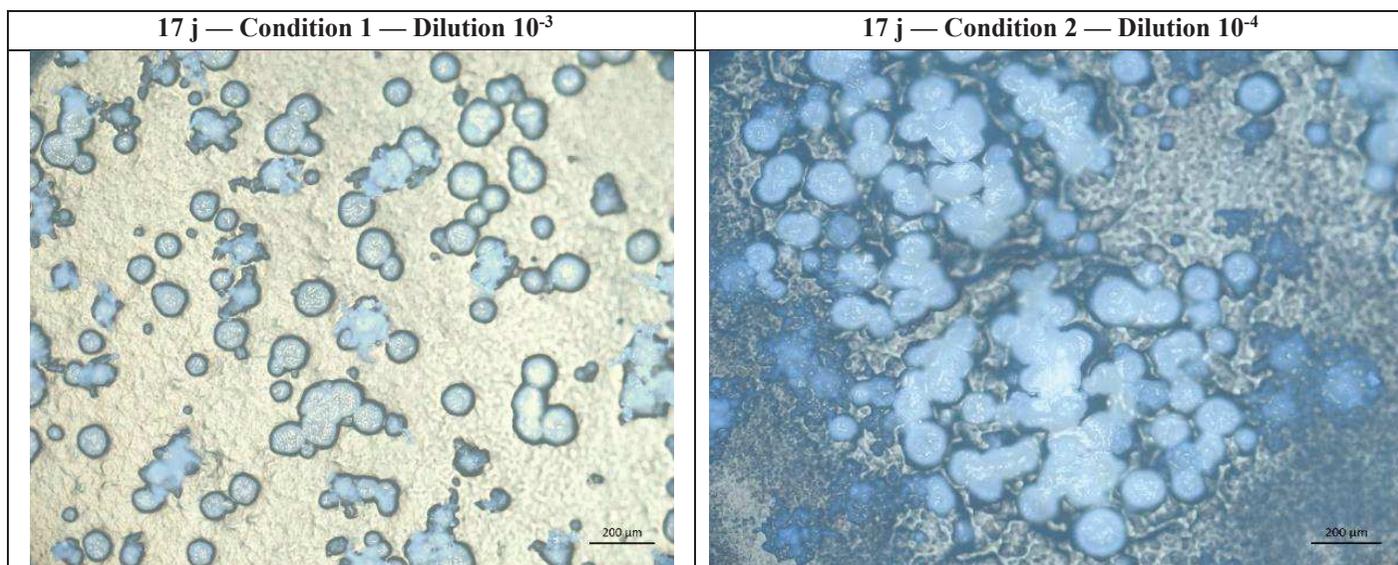


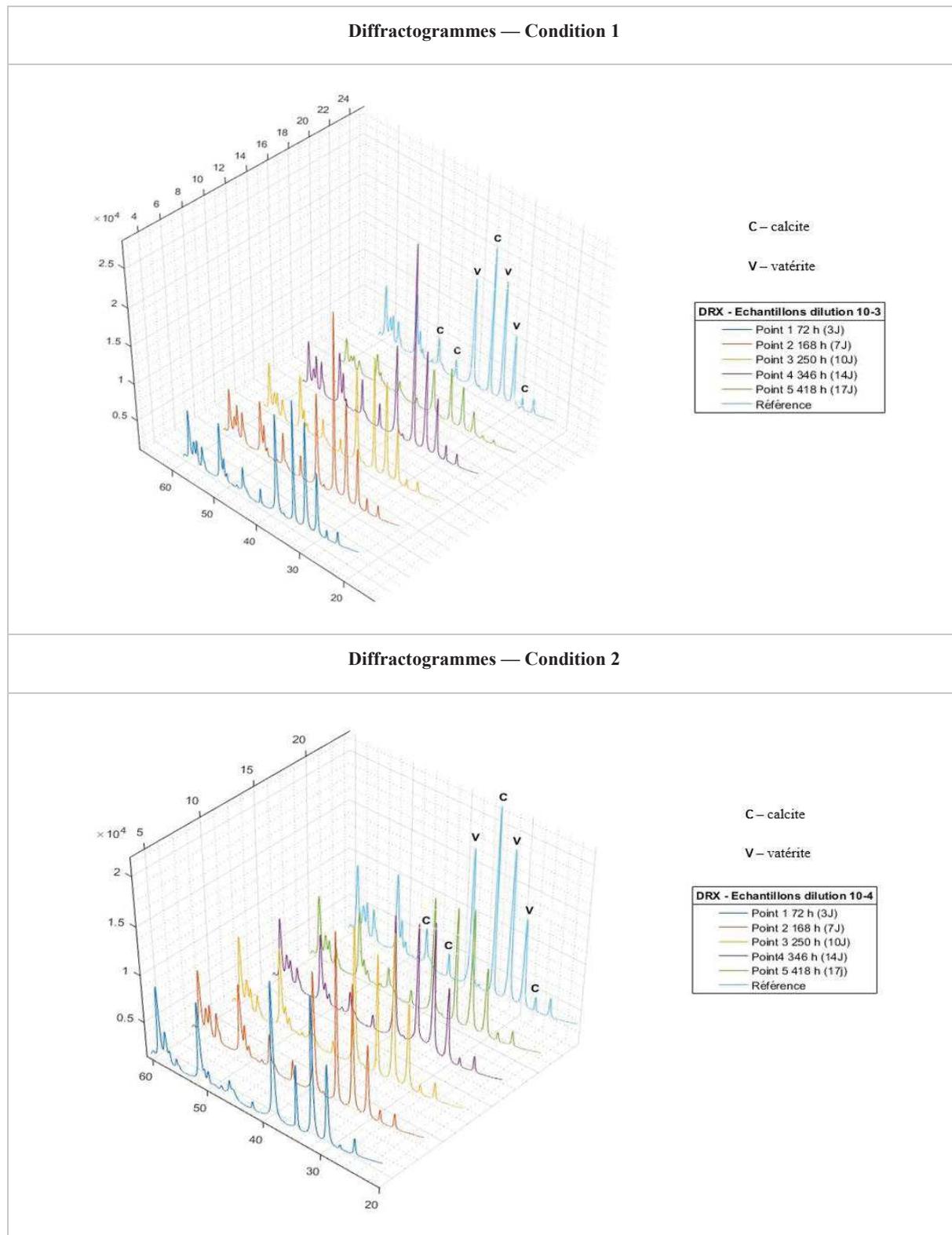
Figure 39. Photographies microscopiques de la surface des géloses des deux conditions.

À la suite la dernière extraction des structures, au 17ème jour, la matière extraite a été observée au microscope optique (10 X) (Figure 40). Les structures semblaient avoir une morphologie circulaire, et de côté, un aspect aplati avec un enfoncement au centre, comme une structure concave. À noter que les cristaux en forme d'étoile n'ont pas été observés.



Figure 40. Photographie des cristaux produits par B.H extraits par autoclavage au 17ème jour d'incubation.

L'analyse de DRX a mis en évidence la présence de calcite (C) (27° , 34° , 42° et 46°), et de vaterite (V) (29° , 31° et 38°) dans tous les échantillons (Figure 41).



La quantification du CaCO_3 a été effectuée après l'analyse DRX par ATG. La quantité de CaCO_3 extraite par cumul (3 boîtes de Petri) à différentes échéances de la cinétique est présentée dans la Figure 42. Les quantités de CaCO_3 obtenues au cours de l'essai sont très proches d'une échéance à l'autre. La moyenne des CaCO_3 formée est de $0,12 \pm 0,02$ g pour la condition 1 ($48 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) et $0,11 \pm 0,01$ g pour la condition 2 ($4,8 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$).

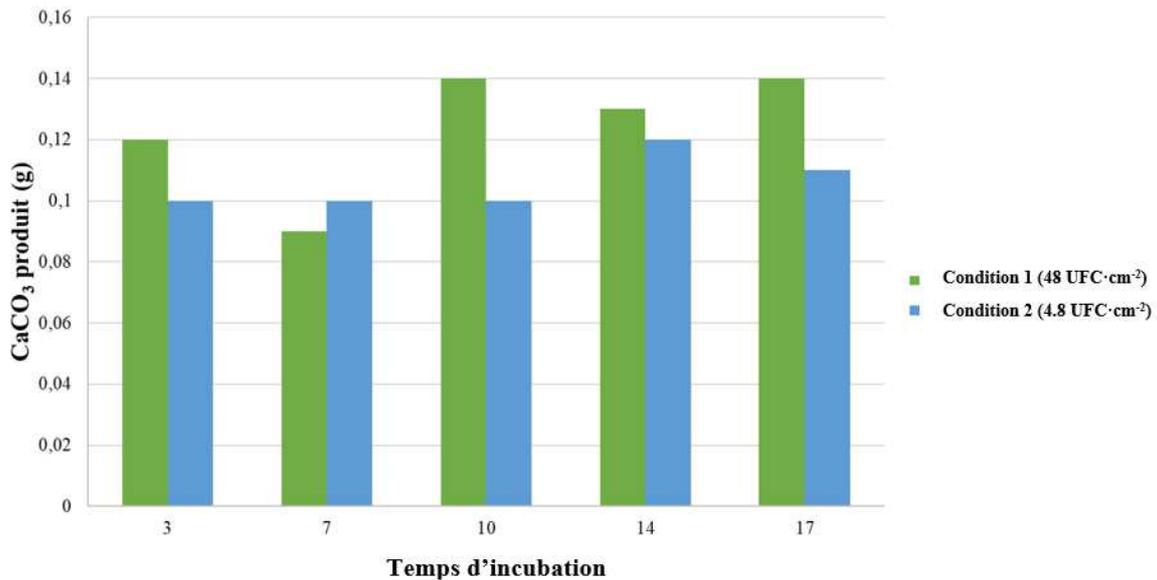


Figure 42. Quantité de carbonates produits par condition en fonction du temps pour la condition 1 ($48 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) et pour la condition 2 ($4,8 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Le rendement de production (R_p) a été calculé sur la base de la quantité théorique de CaCO_3 qui pouvait être produite, qui est égale à $0,27$ g (équation 19). Les rendements pour les conditions 1 et 2 sont respectivement de $44 \pm 7 \%$ et de $40 \pm 4 \%$.

$$R_p = \frac{\text{CaCO}_3 \text{ précipité}}{\text{CaCO}_3 \text{ théorique}} \times 100 \quad 19$$

2.2.3. Discussion et conclusion

Aucune contamination microbienne n'a été observée dans les cultures utilisées. Dans les photographies de la cinétique de bioprécipitation, nous avons pu constater le développement de la biomasse à la surface. Il a été observé que si environ 48 UFC sont déposés par cm^2 , un tapis de biomasse uniforme est obtenu après 1 jour d'incubation. En revanche si un inoculum contenant environ $4,8 \text{ UFC}$ par cm^2 estensemencé, une culture avec des colonies dispersées sur

toute la surface est obtenue. De plus il a été aperçu que malgré le fait que les colonies dispersées de la condition 2 ont augmenté en taille, après 17 jours d'incubation, le tapis de biomasse généré n'était pas uniforme.

Dans les deux conditions, l'apparition de précipités cristallins a été observée à partir du 3^e jour d'incubation. Cela ne signifie pas que la précipitation n'a eu lieu qu'à partir du 3^e jour ; elle a pu même commencer quelques heures après l'ajout de l'acétate de calcium dans les cultures. Ces cristaux sont apparus avec deux morphologies, l'une circulaire et concave, et l'autre en forme d'étoile. Via les analyses DRX, les cristaux extraits ont été caractérisés comme de la vaterite et de la calcite. Malgré leur caractérisation, il n'a pas été possible d'établir un rapport calcite/vaterite, en raison de la potentielle présence de cristaux amorphes [5][6]. Il convient de mentionner que la morphologie du CaCO₃ biologiquement formé ne dépend pas que de la température et du pH. D'autres facteurs tels que le type de bactérie (métabolisme, propriétés de paroi), le milieu de culture, le composé extracellulaire, etc., peuvent aussi influencer la morphologie du CaCO₃ [7].

Quant à la quantité de CaCO₃ formée, il a été constaté que la précipitation des cristaux à lieu au cours des 3 premiers jours d'incubation. Dans les deux conditions, la quantité de CaCO₃ obtenue est de l'ordre de 0,11-0,12g. Les variations au cours des différentes échéances peuvent s'expliquer par (i) le protocole d'extraction des CaCO₃ qui n'est peut-être pas optimisé pour s'assurer aucun CaCO₃ formé ne reste dans le surnageant liquide de la gélose et (ii) par la variabilité biologique.

Les rendements de production Rp de CaCO₃ sont respectivement de 44 et 40 % pour les conditions 1 et 2. C'est-à-dire qu'il y a plus de 50% du calcium ajouté qui n'est pas utilisé pour former du CaCO₃. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la faiblesse de ces rendements : (i) il n'y a pas assez de bactéries pour effectuer la biocarbonatation d'autant plus que celle-ci est réalisée pendant la phase de croissance exponentielle, ce qui pourrait empêcher la formation de nouvelles cellules et limiter par la suite, la précipitation de cristaux, et (ii) il y a une perte importante de CaCO₃ pendant l'extraction. En ce qui concerne la première hypothèse, lorsque les bactéries sont carbonatées, elles deviennent un facteur limitant, car une fois carbonatées elles meurent, diminuant la formation de nouveaux sites de nucléation pour la précipitation de CaCO₃[8]. Dans le cas de la deuxième hypothèse, il est possible que dans le processus de postsédimentation du protocole de récupération de cristaux, une quantité

importante de CaCO₃ ait été retirée avec le surnageant. Cette seconde hypothèse pourrait également expliquer en partie la dispersion des résultats observée après 3 jours.

En conclusion, B.H précipite le CaCO₃ sous forme de calcite et de vaterite, a priori avec deux morphologies : une circulaire et concave dont la présence est majoritaire, et une autre étoilée. Pour de futures analyses de quantification, il est recommandé d'utiliser de concentrations égales ou supérieures à 48 UFC·cm⁻² afin d'avoir un tapis de biomasse bien réparti et uniforme au bout de 1 jour d'incubation. De cette façon on assure l'interaction totale entre la biomasse et tout l'acétate de calcium ajouté à la surface.

Il est établi que la plus grande quantité de CaCO₃ est formée dès les 3 premiers jours d'incubation sur gélose nutritive avec un apport en acétate de calcium de 1.10⁻³ g cm⁻².

Comme mentionné dans le chapitre 1, le développement de B.H sur la gélose nutritive-MSgg s'avère équivalent en termes de colonisation à celle acquise sur la gélose nutritive seule. Afin de déterminer si la présence du milieu MSgg permet d'augmenter la quantité de CaCO₃ précipités, il a été décidé de réaliser, avant même que ne se pose la question de la fiabilité de l'extraction des carbonates de la gélose, une cinétique de bioprécipitation sur cette gélose en parallèle des essais présentés ci-dessus. Cette manipulation est décrite dans la section suivante.

2.3. Production de CaCO₃ sur gélose nutritive-MSgg

Dans la section 6 du chapitre 3, il a été conclu que la colonisation, mesurée en termes de surface couverte par B.H sur les géloses nutritives et nutritives-MSgg était équivalente au bout de 3 jours d'incubation. La gélose nutritive-MSgg pourrait permettre une plus grande quantité de CaCO₃ sera précipitée que celle obtenue avec la gélose nutritive. Pour vérifier cela, les objectifs de cette nouvelle expérimentation sont : (i) d'effectuer une cinétique de bioprécipitation de 17 jours, sur des géloses nutritives-MSgg, (ii) de calculer le rendement de production, et (iii) de comparer les résultats obtenus avec la gélose nutritive.

2.3.1. Matériels et méthodes spécifiques

Dans cette manipulation, le même protocole que dans la section précédente a été appliqué en utilisant des géloses nutritives-MSgg (Figure 43). La solution mère contenait cette fois-ci 3,4 x 10⁷ UFC·mL⁻¹. Les géloses de la condition « 1 », ont été inoculées avec 275 µl de

la dilution à 10^{-3} de la suspension mère (soit avec $65 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$), et les géloses de la condition « 2 » avec $275 \mu\text{l}$ de la dilution à 10^{-4} (soit avec ou $6.5 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$). Cette manipulation a été réalisée presque parallèlement à celle sur gélose nutritive, de sorte qu'un nouveau processus d'extraction n'a pas pu être mis en œuvre afin de réduire un éventuel risque de pertes de CaCO_3 . Le contraste et la luminosité des photographies présentées dans les résultats ont par contre été modifiés. Les photographies prises avec le microscope optique ont été réalisées en mode noir et blanc de l'appareil, afin de réduire les interférences causées par la réflexion de la lumière sur la gélose.

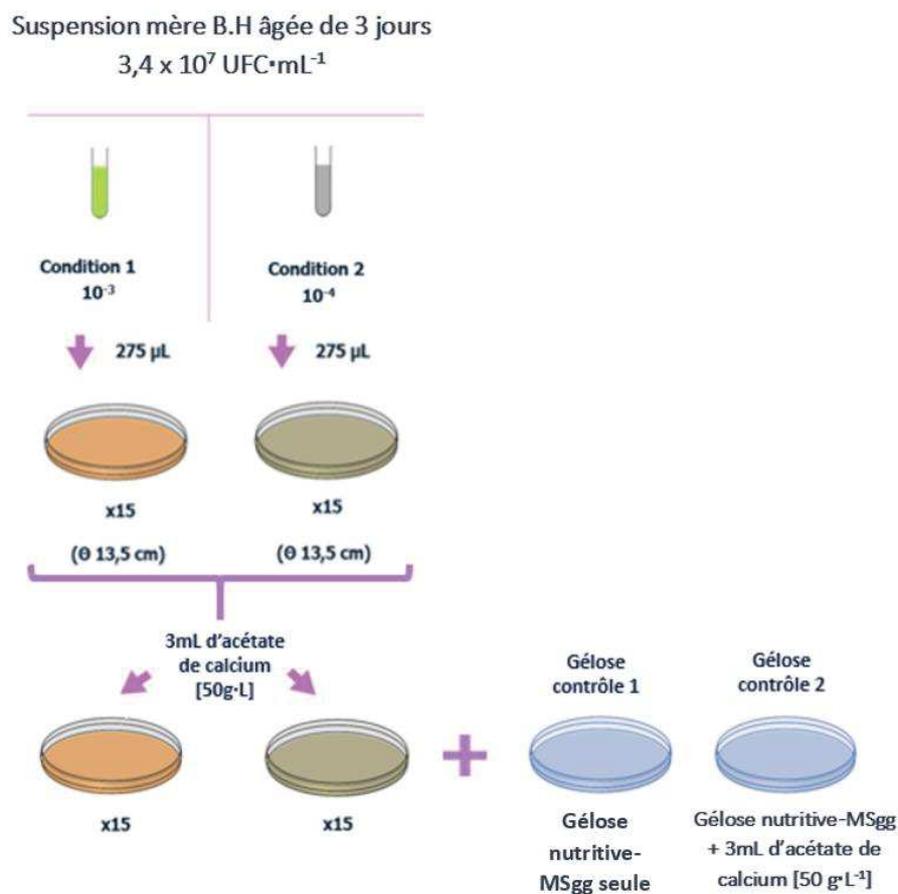


Figure 43. Méthodologie cinétique de bioprécipitation sur Gélose nutritive-MSgg.

Dans la Figure 44 sont présentées les photographies des géloses de contrôle au 17^e d'incubation. Aucune croissance microbienne ou précipitation de cristaux n'a été observée dans ces géloses. À noter que la gélose nutritive-MSgg avec de l'acétate de calcium a acquis une coloration blanche.

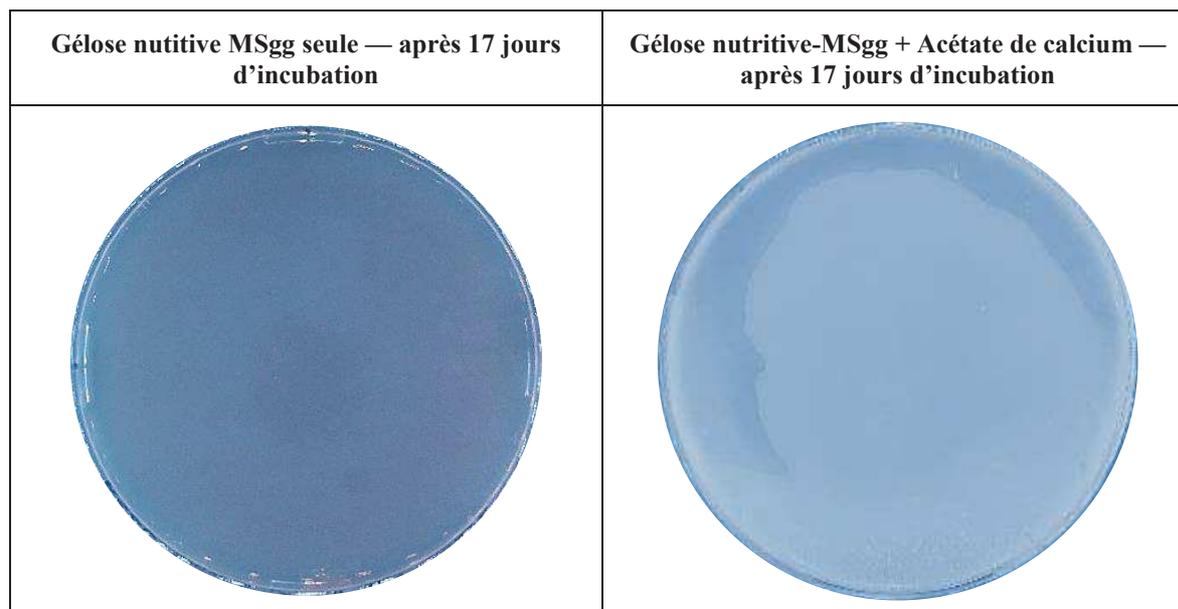


Figure 44. Géloses nutritives-MSgg, contrôles.

Les photographies d'une gélose par condition, qui ont suivi le processus d'incubation pendant 17 jours, sont présentées dans la Figure 45. Malheureusement, sur ces images, il n'a pas été possible d'observer le développement de la biomasse malgré la modification de la luminosité et le contraste, bien que cela ait été perceptible à l'œil.

Cependant, il est possible d'identifier des taches de couleur brune à la surface qui augmente en tonalité au fur et à mesure que le processus d'incubation progresse

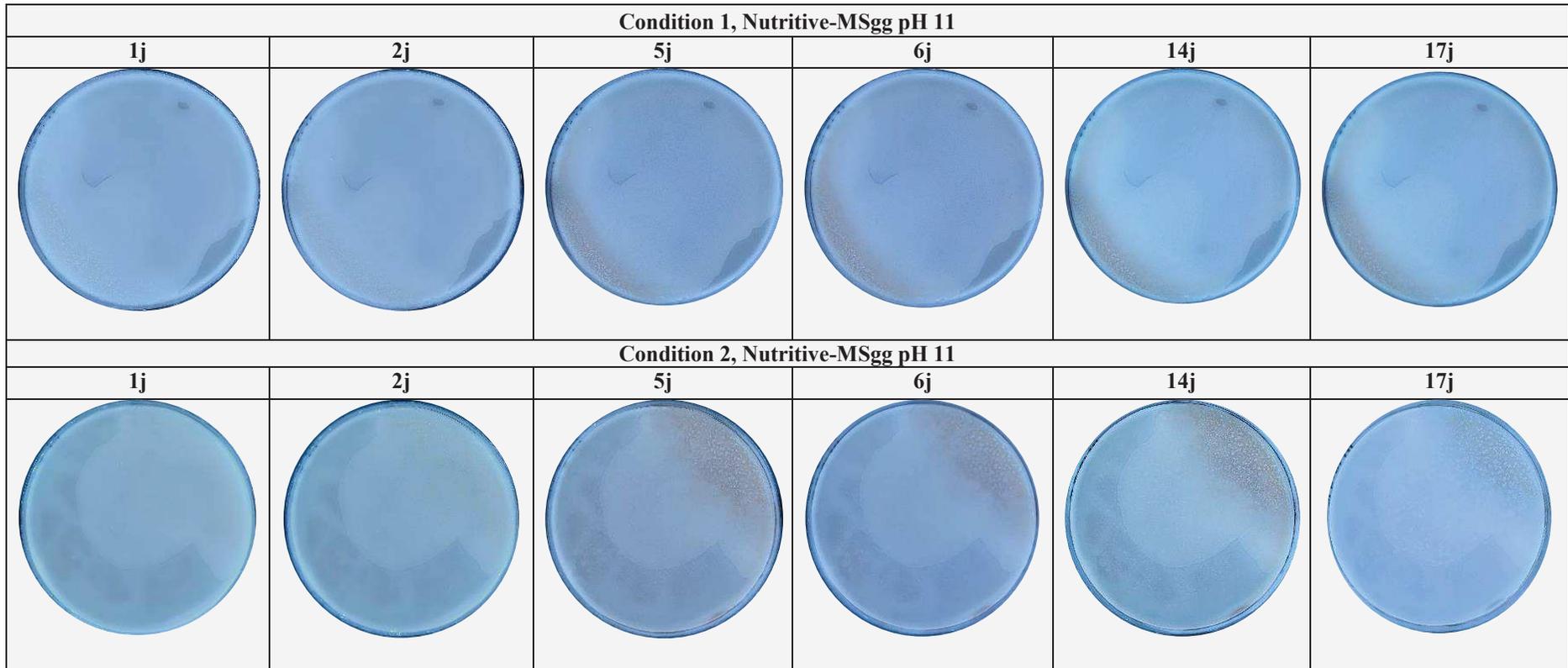


Figure 45. Cinétique de bioprécipitation des géloses nutritives-MSgg des conditions 1 ($65 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) et 2 ($6.5 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$), montrant le développement de la biomasse et des formations de CaCO_3 pendant 17 jours d'incubation à 30°C ..

Les observations effectuées au microscope optique à chaque échéance ont permis de confirmer la présence de biomasse à la surface des cultures. La Figure 46 montre 4 photographies de la surface des géloses des deux conditions prises au 3e et au 10e jour d'incubation. Elles montrent comment au 3e jour, les colonies se trouvent encore dispersées à la surface et comment au le 10e jour un tapis de biomasse uniforme est présent.

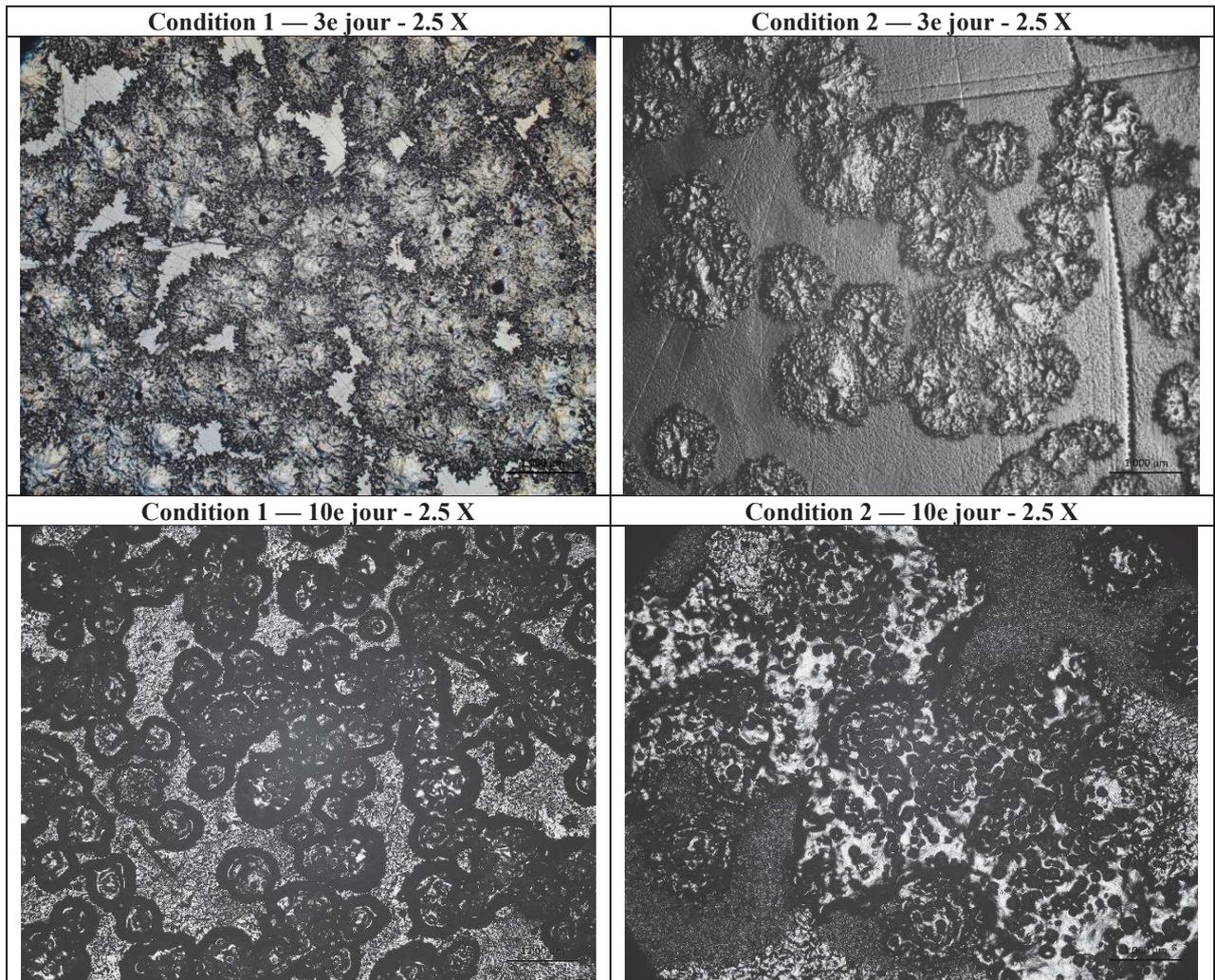
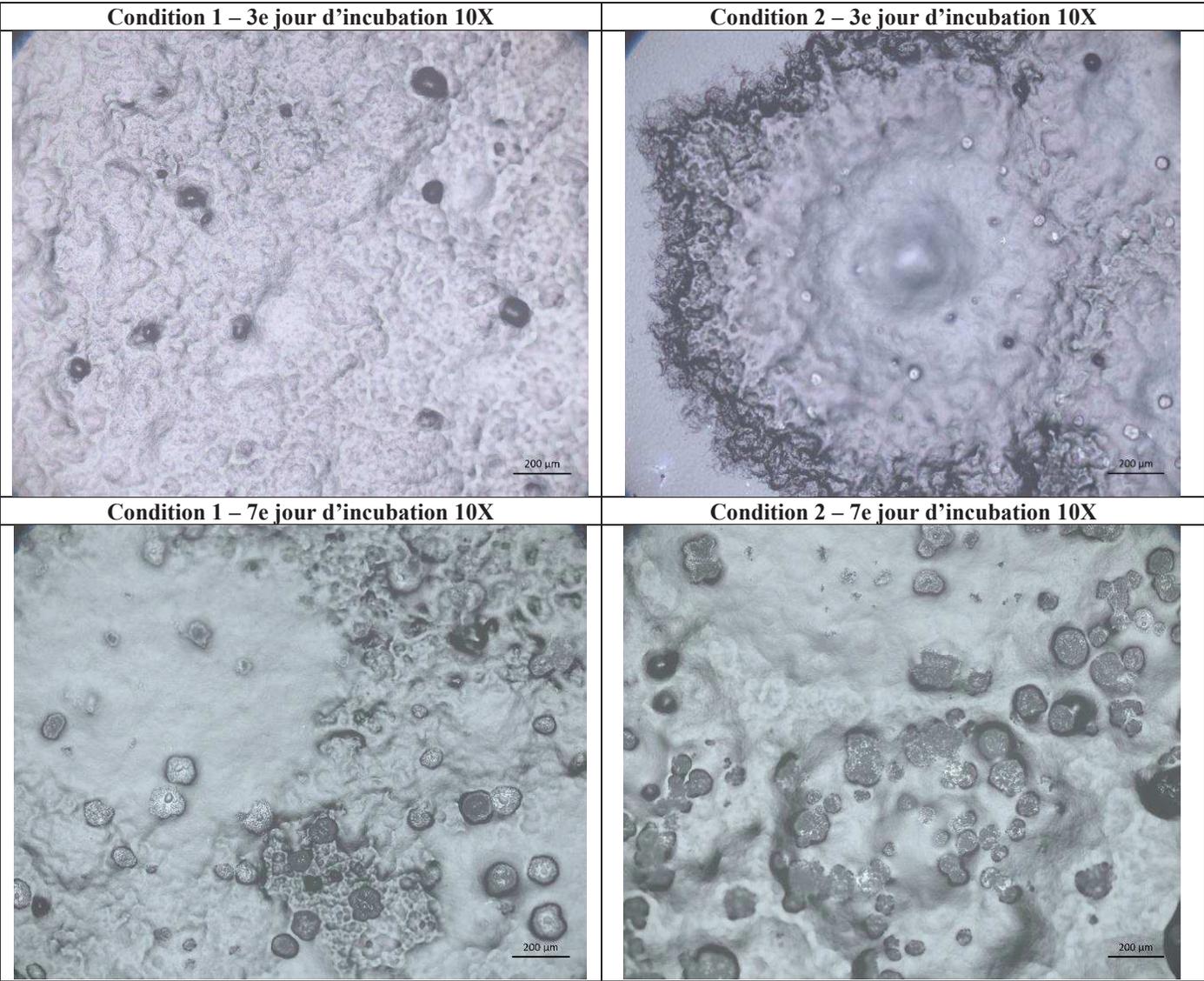
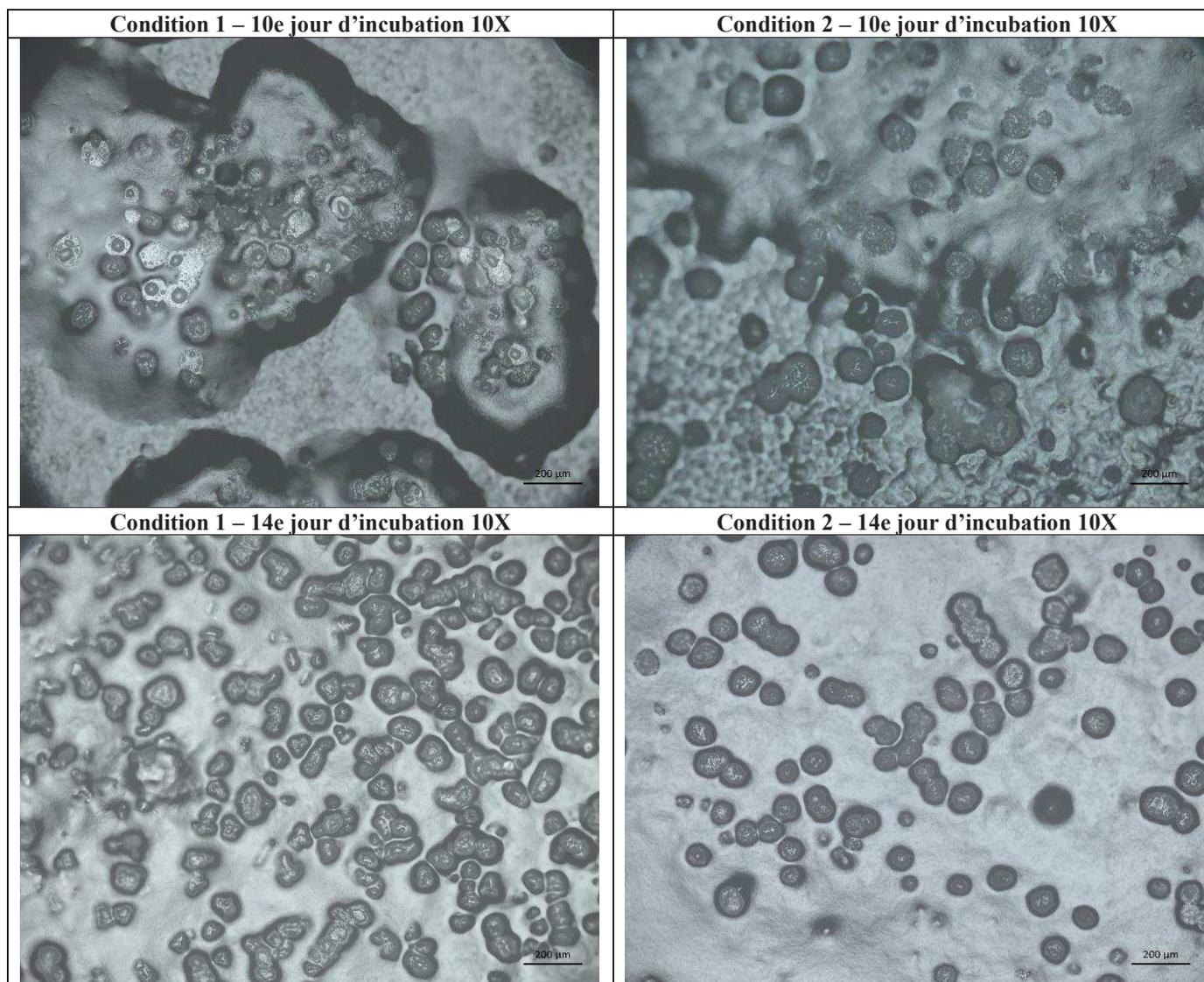


Figure 46. Observation de la biomasse présente à la surface des géloses nutritive-MSgg aux 3e et 17e jours

La Figure 47, présente les photographies des structures cristallines formées à la surface des géloses par condition. Ces structures ont été observées uniquement dans les régions de couleur brune des cultures. Les structures ont eu à tout moment une morphologie circulaire plate, leur diamètre était d'environ 100 µm. De plus, ceux-ci semblaient être immergés dans le tapis de biomasse. La quantité de cristaux a semblé, qualitativement, avoir augmenté avec le temps d'incubation.





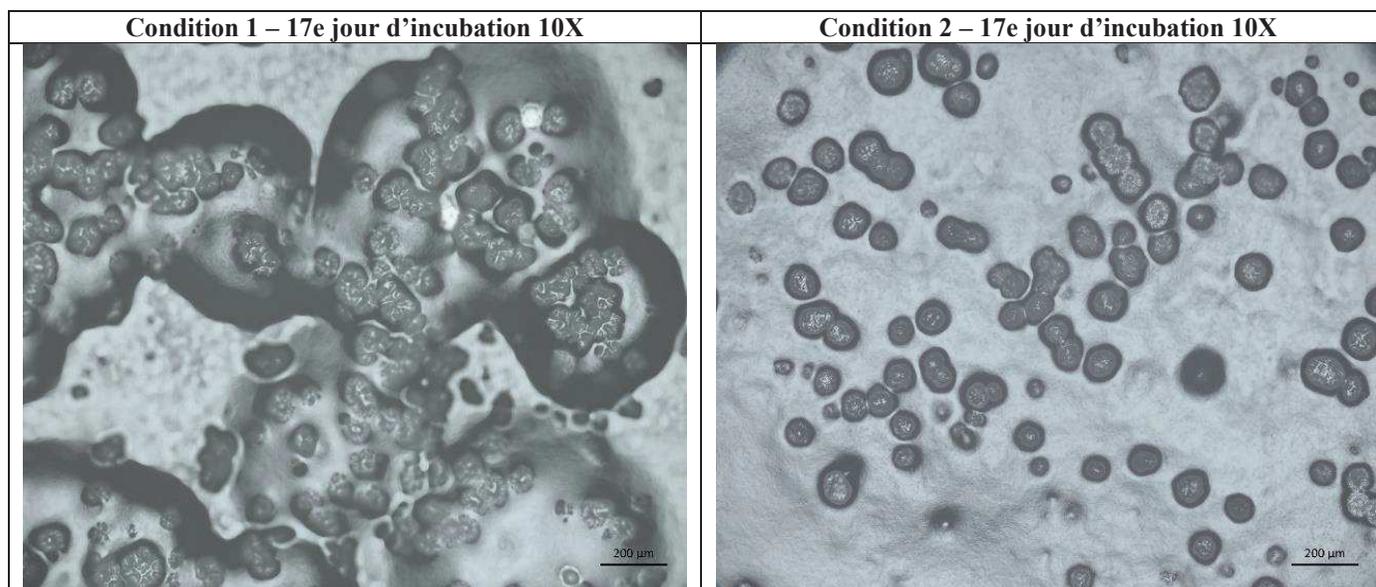


Figure 47. Cristaux formés dans les géloses nutritives –MSgg des conditions 1 et 2

Dans la Figure 48, les diffractogrammes de la matière récupérée lors du processus d'extraction sont présentés. La majorité des CaCO_3 extraits a été caractérisée comme étant de la calcite (C) avec des pics à 27° , 34° , 42° et 46° . Certains échantillons ont montré la présence de vatérite à faible intensité avec des pics à 29° , 31° et 38° .

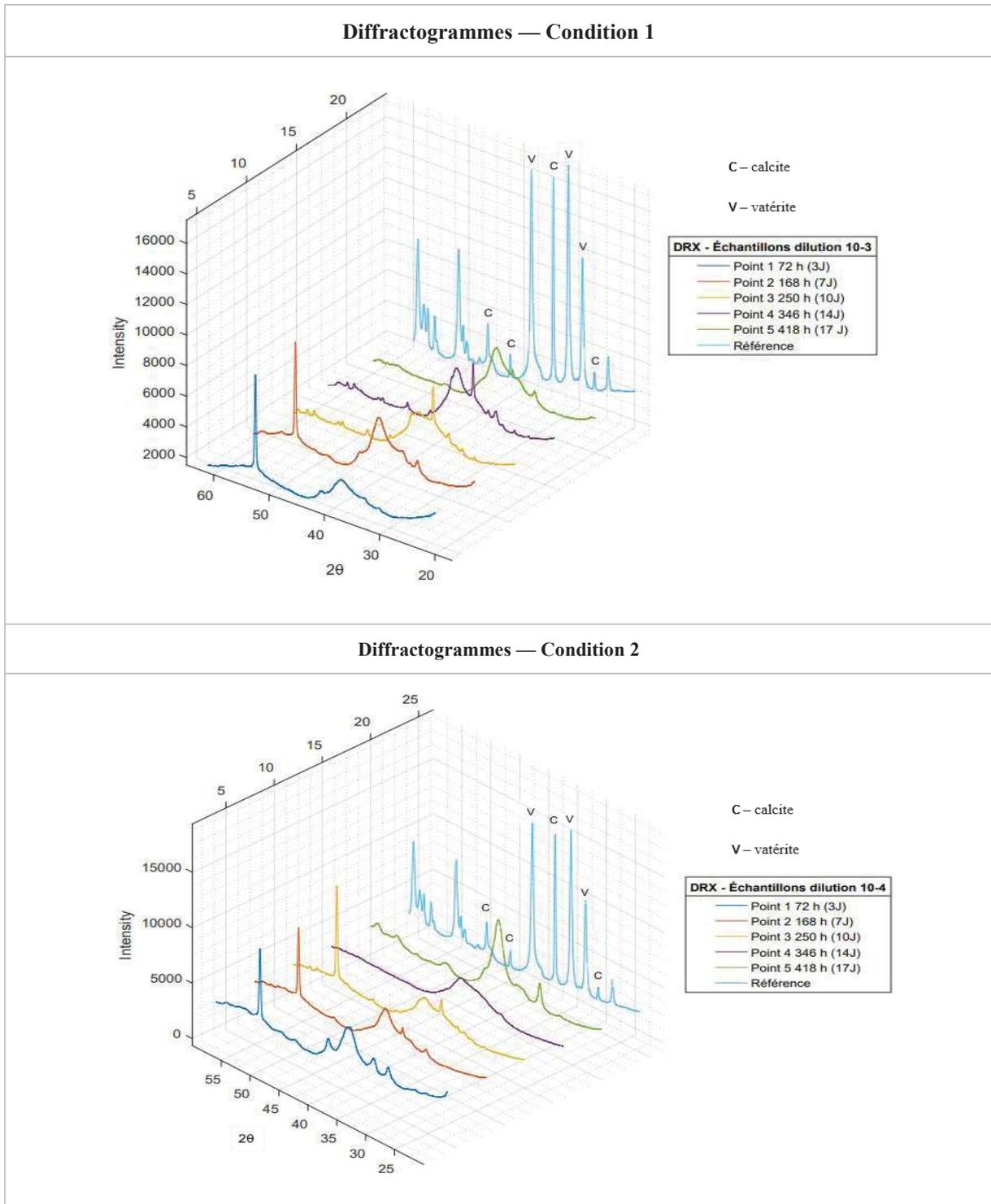


Figure 48. Diffractogrammes des échantillons extraits des gélules des conditions 1 et 2.

Le graphique de la Figure 49 indique la quantité de CaCO_3 extraite à chaque échéance au fil des jours.

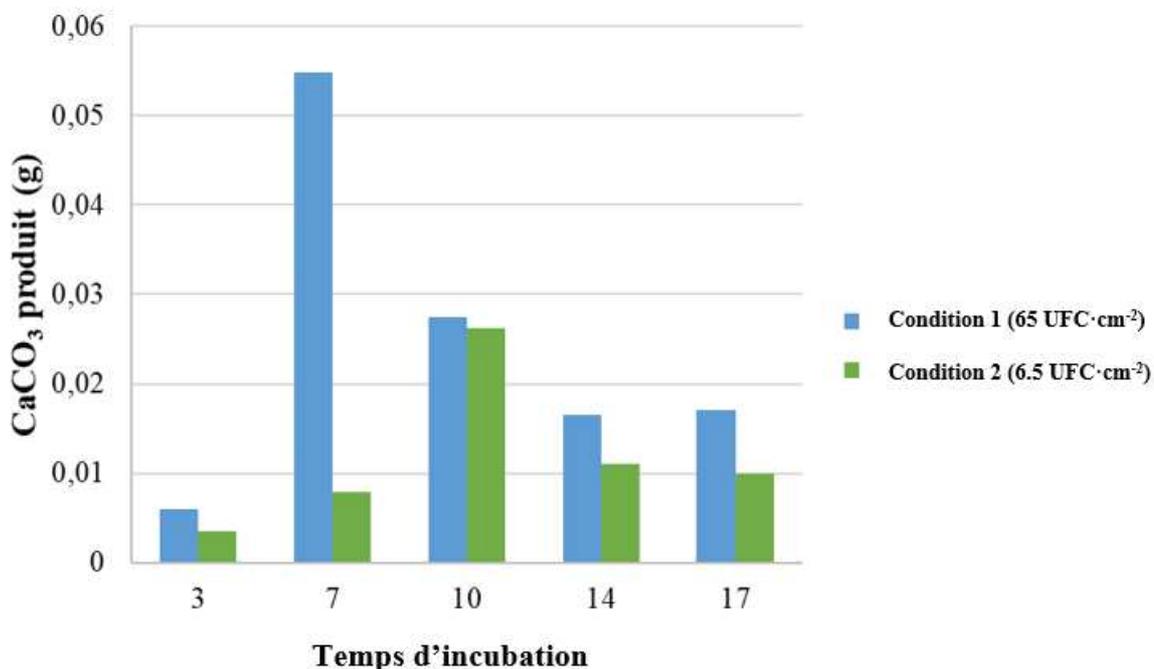


Figure 49. Quantité de carbonates produits par condition en fonction du temps pour la condition 1 (65 UFC. cm⁻²) et pour la condition 2 (6.5 UFC. cm⁻²).

2.3.2. Discussion et conclusion

Aucune contamination microbienne n'a été déterminée dans les cultures utilisées. Il a pu également être constaté que l'interaction entre la gélose nutritive-MSgg à pH 11 et l'acétate de calcium, n'induit pas la formation de précipités. Lors que l'acétate de calcium est ajouté à la surface des géloses, celle-ci prend une couleur blanche qui rend difficile le repérage des colonies et de la biomasse, car elles ont aussi une couleur blanchâtre. Par conséquent, il n'a pas été possible d'observer le développement de la biomasse dans les cultures, même en modifiant la lumière et le contraste. Cependant, grâce aux observations faites avec le microscope optique, il a été possible d'observer la présence de colonies et la formation du tapis de biomasse au début et à la fin de l'incubation respectivement.

Ce qu'il a été possible de percevoir dans les photographies de la cinétique, c'est la présence de certaines zones de couleur brune dans les cultures de deux conditions. Par la suite, il a été déterminé que c'est uniquement dans ces zones que l'on a retrouvé des précipités

cristallins ayant une morphologie circulaire. À aucun moment, la présence de précipités en forme d'étoile, tels que ceux observés dans la cinétique de précipitation sur gélose nutritive seule, n'a été observée. Il est donc possible de suggérer que la présence des composants du milieu MSgg pourrait influencer dans la morphologie du CaCO₃.

Dans les zones où les cristaux sont précipités, ils semblent être immergés dans la biomasse, contrairement aux cristaux précipités dans la gélose nutritive seule. Cela montre en même temps que dans ce type de gélose, le tapis de biomasse formé est plus épais. Les cristaux ont été ensuite caractérisés comme étant de la calcite et de la vatérite, cependant en raison de la présence de cristaux amorphes, il n'a été pas possible d'établir un rapport calcite/vatérite.

Quantitativement, et quel que soit le type de condition, la quantité et le Rp de CaCO₃ sur la gélose nutritive-MSgg sont nettement inférieurs à ceux obtenus sur gélose nutritive seule. Il est possible que les bactéries aient privilégié la sécrétion de composants extracellulaires au lieu de leur reproduction, et dès que le processus de carbonatation a commencé, les cellules bactériennes se sont carbonatées, limitant la précipitation de CaCO₃. Il est également possible de suspecter l'interaction d'un composant du milieu MSgg qui aurait pu interagir avec le Ca²⁺ ajouté, limitant son interaction avec la biomasse.

En conclusion, sur une gélose nutritive-MSgg avec de l'acétate de calcium, B.H forme des cristaux de CaCO₃, sous forme de calcite et de vatérite, ayant tous une morphologie circulaire. Il s'avère que la quantité de CaCO₃ précipitée à la surface de la gélose nutritive-MSgg est nettement plus faible par rapport à celle obtenue dans la gélose nutritive seule.

3. Conclusion du Chapitre

Conformément aux objectifs proposés au début de ce chapitre, à savoir déterminer le type de culture dans laquelle B.H. précipite le CaCO₃, ainsi que la quantification du CaCO₃ produit et l'identification des paramètres clés qui pourraient améliorer le processus de bioprécipitation, il est conclu que :

(i) B.H ne précipite pas de CaCO₃ quand elle est cultivée en suspension mais elle le précipite quand elle est cultivée en gélose ;

(ii) un protocole d'extraction des cristaux sur gélose a été créé, mais une perte de CaCO₃ pendant ce processus est suspectée ;

(iii) la biomasse sur la gélose nutritive-MSgg est transparente ce qui rend difficile la perception de sa colonisation sur la surface. Il est donc impossible d'évaluer l'influence de la gélose sur l'uniformité de la bioprécipitation dans ce cas ;

(iv) la gélose nutritive permet d'obtenir les plus grands rendements de production de CaCO₃. Il est donc recommandé d'utiliser ce milieu pour de futures expériences de bioprécipitation. De plus, le milieu nutritif est plus facile à préparer que le milieu nutritif-MSgg. Le Tableau 12 résume les conditions et les résultats les plus importants de la bioprécipitation dans les géloses nutritives et nutritives-MSgg.

Tableau 12. Résumé des résultats des analyses qualitatives et quantitatives de précipitation de CaCO₃ par B.H sur les milieux nutritives et nutritives-MSgg.

Croissance des colonies	Milieu nutritif		Milieu nutritif-MSgg	
	24h		72 h	
[UFC·cm ⁻²]	10⁻³	10⁻⁴	10⁻³	10⁻⁴
	48	4.8	65	6.5
Temps requis pour la formation d'un tapis uniforme de biomasse	48 h	168 h	168 h	240 h
Diamètre moyen des colonies au 3e jour	/	1,8 mm (σ=0,4 mm, n=20)	1,2 mm (σ=0,1 mm, n= 15)	
Taille moyenne de CaCO ₃ au 3e jour	0.1 mm (σ = 0.01 mm, n= 66)	0.09 mm (σ = 0.01 mm, n=74)	0.10 mm (σ = 0.03 mm, n= 71)	0.04 mm (σ = 0.006 mm, n= 61)
Quantité maximale de CaCO ₃ formé par 0.45 g d'acétate de calcium	0.14 g	0.12 g	0.05 g	0.03 g

Masse théorique formable (cumul 3 boîtes)	0.27 g			
Rendement de production	51 %	44 %	6 %	4%

Les rendements de production de CaCO₃ ne sont en moyenne que 40 à 44 % sur gélose nutritive. Il serait donc nécessaire de vérifier, dans un premier temps, si des pertes importantes ont lieu lors du processus d'extraction, puis d'explorer la modification des paramètres qui pourraient permettre d'augmenter le rendement (concentration de l'inoculum ou quantité d'acétate de calcium par cm²).

En préalable de la quantification de la production de CaCO₃ et de l'optimisation du rendement, il apparaît intéressant de localiser la formation de CaCO₃ afin de déterminer si la présence d'un tapis homogène garantit une répartition spatiale homogène de CaCO₃. C'est l'objet du chapitre suivant qui décrit les techniques utilisées pour mettre en évidence le CaCO₃ à la surface en utilisant l'épifluorescence.

4. [Références](#)

- [1] M. Medevielle, "Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé, Ph.D. dissertation, MAST," Université Bretagne Loire, 2017.
- [2] Y. Li, L. Mandelco, and J. Wiegel, "Isolation and characterization of a moderately thermophilic anaerobic alkaliphile, *Clostridium paradoxum* sp. nov.," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 43, no. 3, pp. 450–460, 1993, doi: 10.1099/00207713-43-3-450.
- [3] S. Pinhal, D. Ropers, J. Geiselmann, and H. de Jong, "Acetate Metabolism and the Inhibition of Bacterial Growth by Acetate," *J. Bacteriol.*, vol. 201, no. 13, 2019, doi: 10.1128/JB.00147-19.
- [4] M. R. Ferrer, J. Quevedo-Sarmiento, M. A. Rivadeneyra, V. Bejar, R. Delgado, and A. Ramos-Cormenzana, "Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations," *Curr. Microbiol.*, vol. 17, no. 4, pp. 221–227, 1988, doi: 10.1007/BF01589456.
- [5] G.-T. Zhou, Q.-Z. Yao, S.-Q. Fu, and Y.-B. Guan, "Controlled crystallization of unstable vaterite with distinct morphologies and their polymorphic transition to stable calcite,"

Chapitre 4 : Essais de bioprécipitation ; production de CaCO₃

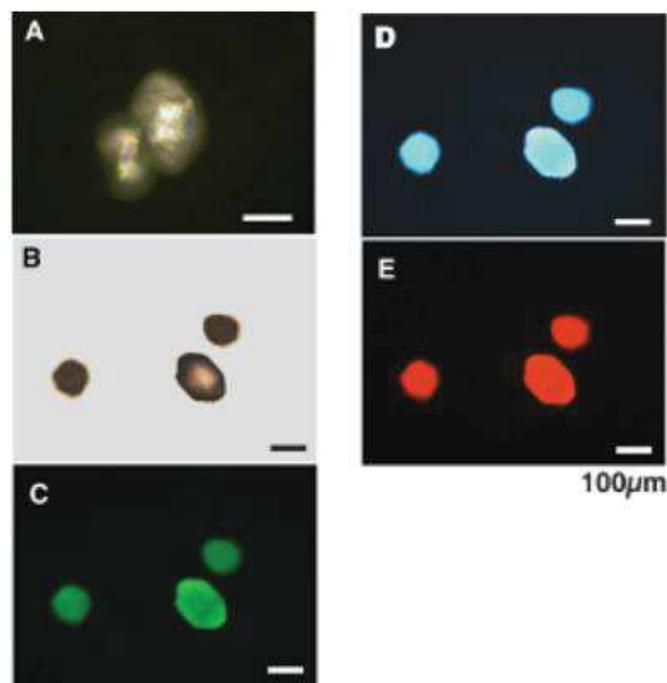
- Eur. J. Mineral.*, vol. 22, no. 2, pp. 259–269, 2010, doi: 10.1127/0935-1221/2009/0022-2008.
- [6] C. A. Weiss, “Influence of Temperature on Calcium Carbonate Polymorph formed from Ammonium Carbonate and Calcium Acetate,” *J. Nanotechnol. Smart Mater.*, vol. 1, pp. 1–6, 2014, doi: 10.17303/jnsm.2014.105.
- [7] C. Qian, H. Zhou, and K. Wang, “Factors affecting morphology of microbially induced calcium carbonate,” *J. Microbiol. Exp.*, vol. 7, no. 2, pp. 101–114, 2019, doi: 10.15406/jmen.2019.07.00249.
- [8] S. Douglas and T. J. Beveridge, “Mineral formation by bacteria in natural microbial communities,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 26, no. 2, pp. 79–88, 1998, doi: 10.1016/S0168-6496(98)00027-0.

Chapitre 5 : Suivi de la formation de CaCO_3

Le CaCO_3 d'origine biologique ou biogénique peut être différencié du CaCO_3 d'origine chimique, car il est capable de fluorescer grâce à sa morphologie particulière et à la présence de molécules organiques (propre à une bioprécipitation)[1]. Sur la base de cette idée, la fluorescence pourrait donc être utilisée pour cartographier le CaCO_3 bioprécipité avec de la fluorescence.

Yoshida & Higashimura [2] ont déterminé que le CaCO_3 biogénique produit par *Geobacillus thermoglucosidasius* était fluorescent lors de son repérage avec de filtres optiques UV. Les cristaux émettaient une fluorescence verte, bleue et orange-rouge lorsqu'ils étaient excités à 480 ± 20 nm, 365 ± 5 nm et 545 ± 15 nm, respectivement. (Figure 50). De la même manière Berg et al. [1], ont justifié que la fluorescence de CaCO_3 bioprécipité était due à la présence de minéraux tels que le sodium (Na), le soufre (S), le chlore (Cl), le phosphore (P) et le magnésium (Mg). Ces minéraux ne sont pas couramment présents dans le CaCO_3 d'origine chimique.

Figure 50. (A et B) Observation microscopique polarisée et lumineuse de CaCO_3 ; produit par *Geobacillus thermoglucosidasius*. (C à E) Image microscopique de fluorescence de cristaux excités à (C) 480 ± 20 nm, (D) 365 ± 5 nm, et (E) 545 ± 15 nm [2].



En se basant sur ces deux études qui stipulent que le CaCO_3 bioprécipité possède une fluorescence propre, il a été suggéré d'effectuer une première analyse pour observer la fluorescence du CaCO_3 produit par B.H.

1. Cartographie de CaCO_3 de B.H par épifluorescence

Les objectifs de cette manipulation sont : (i) d'observer la surface des cultures gélosées en présence d'acétate de calcium, par épifluorescence, et (ii) de déterminer si les CaCO_3 peuvent être distingués de la gélose et de la biomasse.

1.1. Matériels et méthodes spécifiques

Dans cette première analyse, 100 μl d'une dilution 10^{-3} ($5.9 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) d'une suspension mère ($3.4 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) de B.H ont été inoculés sur deux géloses nutritives à pH 11 ($\text{Ø}=8.5 \text{ cm}$). Les géloses nommées A et B sont identiques mais sur la gélose B, 1 mL d'une solution d'acétate de calcium à $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($8.8 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$) a été ajouté. Les cultures ont ensuite été incubées à $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 3 jours. Après la période d'incubation, les géloses ont été observées avec le microscope optique ZEISS à 10X en lumière blanche et en épifluorescence, en utilisant les filtres DAPI (λ_{ex} 340 nm ; λ_{em} 488 nm), GFP (λ_{ex} 305 nm ; λ_{em} 509 nm) et AF546 (λ_{ex} 556 nm ; λ_{em} 573 nm). En plus des observations microscopiques, une analyse RAMAN de la surface de la gélose B a été réalisée. L'analyse RAMAN devait être effectuée à la fin de l'incubation, mais en raison de la disponibilité de l'équipement et de problèmes de logistique, cette analyse a été effectuée deux semaines après l'incubation. De même, une observation MEB a été réalisée à la suite de l'analyse RAMAN. Pour l'observation au MEB, un échantillon de 1 cm^2 de la gélose B a été prélevé et placé sur une pastille de carbone auto-adhésive sur le support métallique du MEB.

1.2. Résultats et discussion

La Figure 51 présente les photographies de la gélose A, inoculée uniquement avec B.H. Sur la photographie A, prise en lumière blanche, on observe la biomasse à la surface de la gélose avec une couleur grise. Lorsque la même zone a été observée avec les filtres (photographies B, C et D), la biomasse et la gélose n'ont pas été perçues, donc elles ne fluorescent pas.

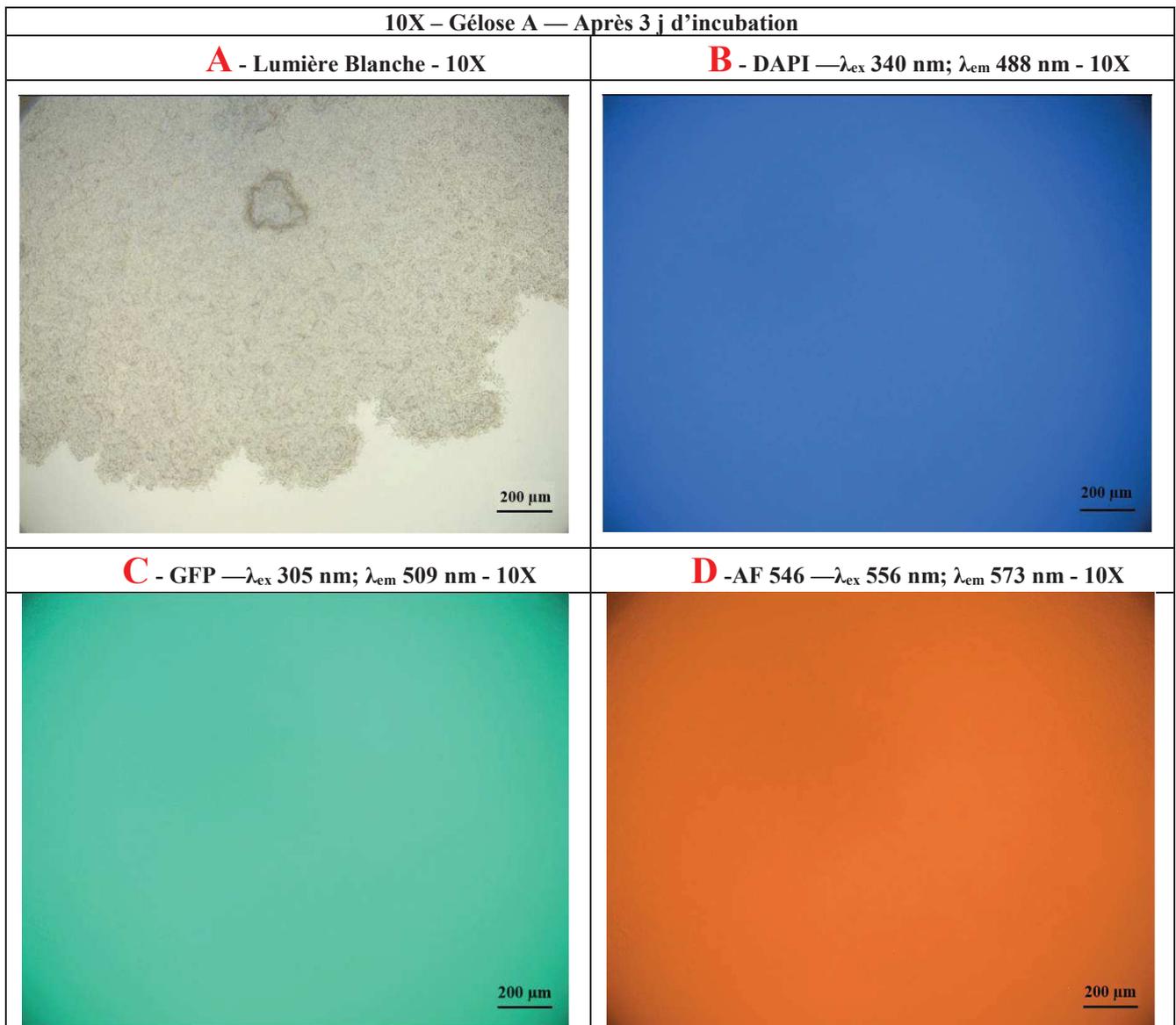


Figure 51. Gélose A avec B.H seule (A), observée avec les filtres UV, DAPI (B), GFP (C) et AF 456 (D).

La Figure 52 présente les photographies de la surface de la gélose B prises avec la lumière blanche (A), puis avec les 3 filtres UV (B, C et D). Dans la photographie A, il est possible de différencier deux types de structures : (i) les structures marrons semblent être des amas cellulaires avec un aspect brillant et gélatineux, et (ii) les structures circulaires blanches brillantes semblent être des cristaux de CaCO_3 (s'ils sont comparés avec les observations faites lors de la manipulation de bioprécipitation du Chapitre 4 : 2.2). Lorsqu'elles ont été observées avec les filtres UV, les structures blanches, présumées être du CaCO_3 , étaient visibles avec une couleur claire lumineuse. Dans le cas des structures marron, il a été observé que seules celles de plus grande taille (avec un diamètre proche à 0,094 mm, $\sigma = 0,01$ mm, $n=20$) étaient lumineuses. Les structures blanches et les structures marron semblent avoir la même

luminescence. Il y a cependant une différence : les structures circulaires blanches sont luminescentes sur toute leur surface, contrairement aux structures marrons qui fluorescent de manière hétérogène (la taille de la structure complète semble plus petite). Ceci permet de déduire que les structures de couleur marron sont possiblement des agglomérats cellulaires enrobant un cristal, de sorte que lorsqu'elles sont observées avec les filtres UV, seul le minéral intérieur est visible (et non la biomasse). Les structures marrons de plus petites tailles, ne fluorescent pas au filtre UV, cela signifierait qu'elles ne contiennent pas de minéral et ne sont composées que de biomasse, *a priori* non perceptible avec les filtres UV, comme dans les photographies de la Figure 51.

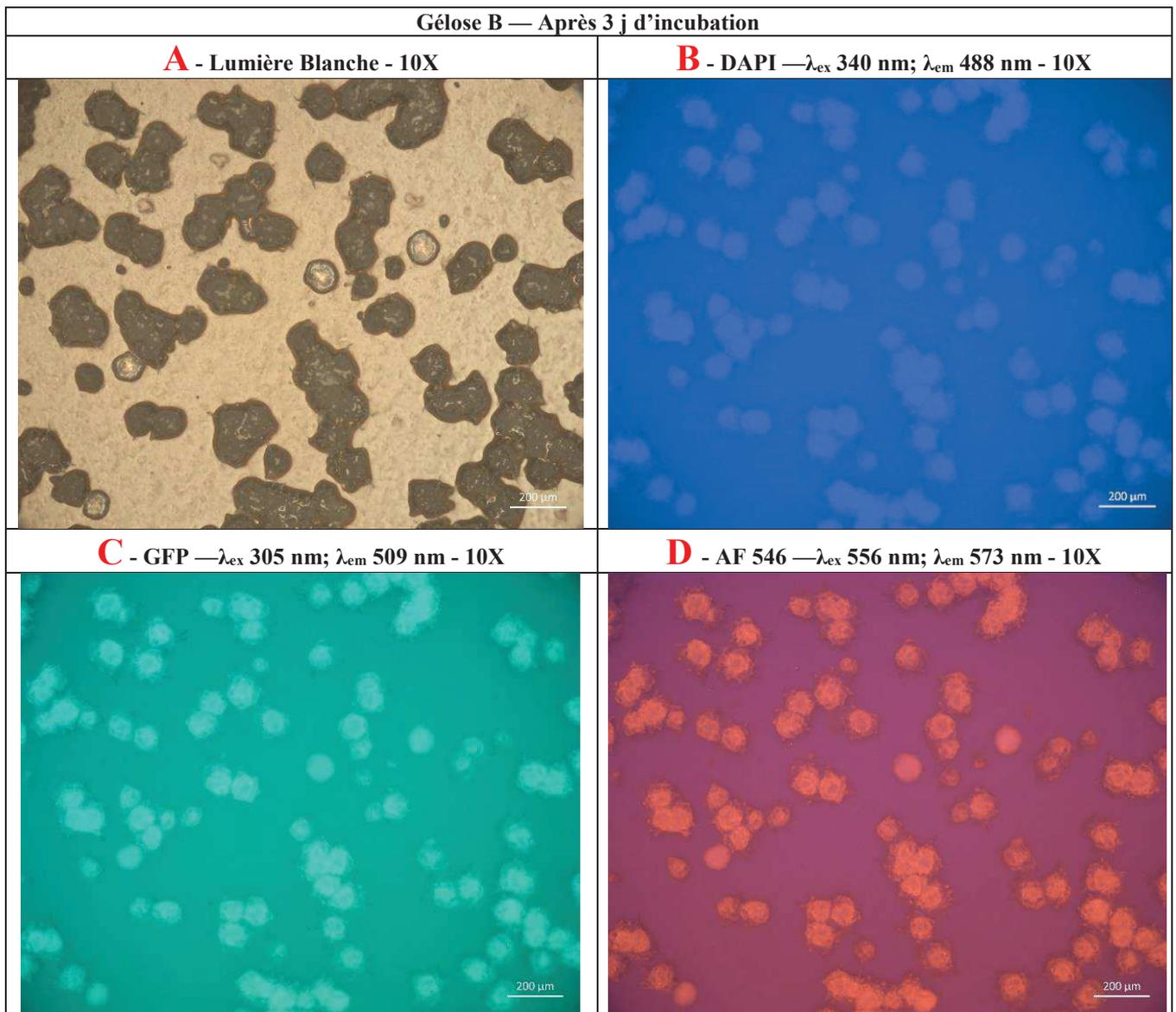


Figure 52. Observations microscopiques 10 X de la gélose inoculée avec B.H et 1 ml d'une solution d'acétate de calcium ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Photographie lumière blanche (A), DAPI (B), GFP (C) et AF 546 (D).

L'analyse RAMAN, effectuée sur 3 points, suggère que les précipités circulaires seraient de la vaterite (avec des pics à 1075 et 1091 cm^{-1} , Point 1 et 2 de la Figure 53) et ce qui sortaient des précipités circulaires, seraient de la calcite (avec un pic à 1086 cm^{-1}) (Point 3 de la Figure 53). Comme expliqué dans (section chapitre 1), il est possible que B.H favorise la formation de la vaterite, qui avec le temps se transforme en calcite.

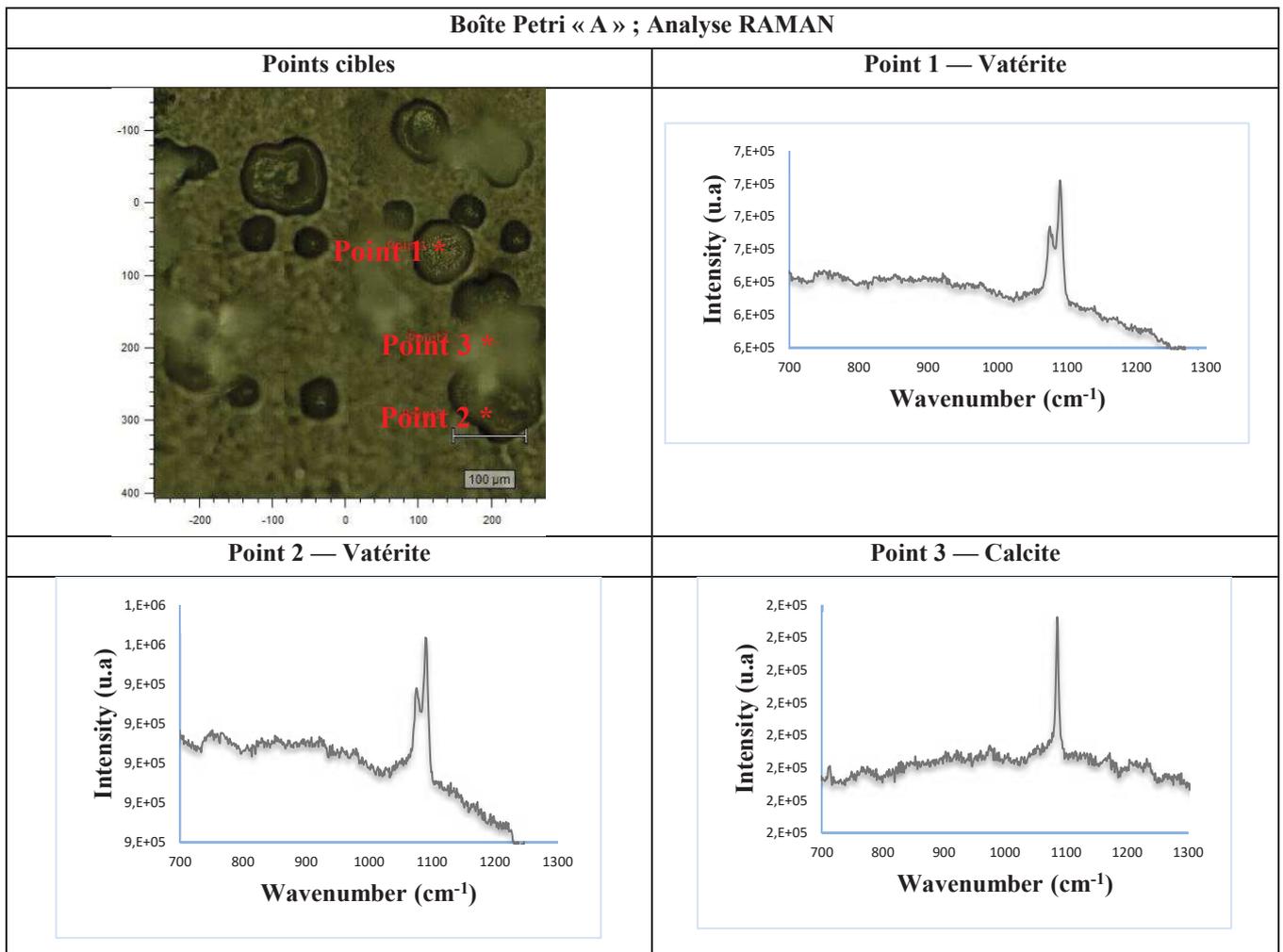


Figure 53. Analyse RAMAN des précipitants de la gélose B.

Les photographies prises avec le MEB sont présentées dans la Figure 54. Les photographies A, correspondent à la surface du tapis de biomasse, qui semble avoir un relief important avec des plis saillants prononcés. En observant la même zone avec un plus fort grossissement (photographie B), il a été possible d’apercevoir les cellules bactériennes de B.H intégrées au tapis. Sur la photographie C, on observe un des précipités d’aspect sphérique. En augmentant le grossissement pour observer le relief du précipitât, une importante présence de cellules de B.H a été observée dans la photographie D.

Après 3 semaines d’incubation, les cellules sont donc toujours présentes à la surface des cristaux, sans que l’on sache si elles sont encore vivantes ou non. La présence de biomasse ou de cellules BH autour de certains cristaux, observée au MEB, permet de conforter l’hypothèse donnée lors de l’observation de la Figure 52 : si la biomasse n’est pas perçue par les filtres UV

et que seul le cristal est observé, il est normal que la taille des structures semble plus petite lorsqu'elles sont observées par épifluorescence.

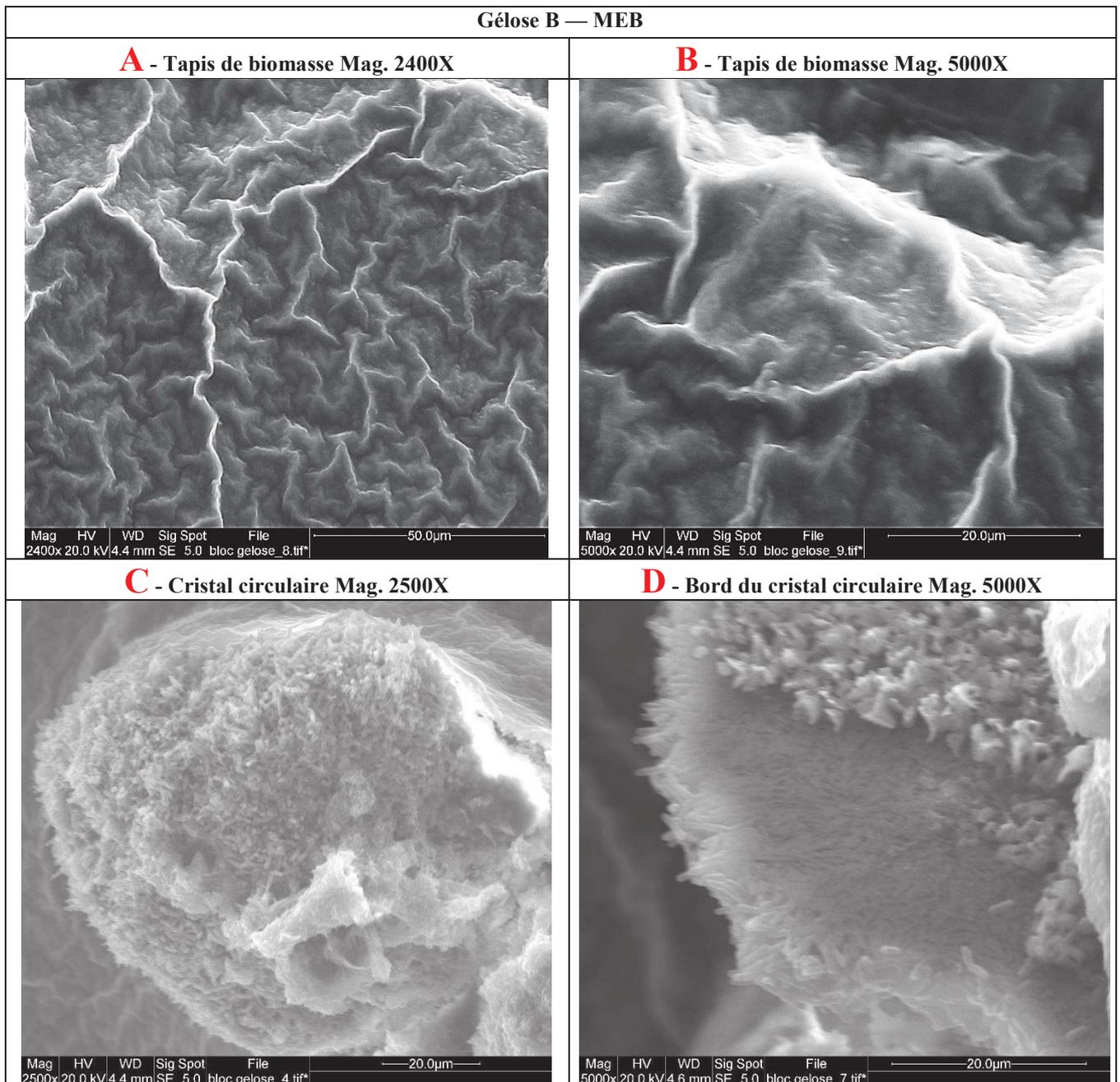


Figure 54. Images MEB de la biomasse (A et B), et d'un cristal précipité à la surface de la gélose (C et D).

1.3. Conclusion

Les résultats de cette manipulation permettent de conclure que les CaCO_3 de B.H sont fluorescents quand ils sont observés par épifluorescence. Ils peuvent être distingués de la biomasse et de la gélose avec des filtres UV : DAPI, GFP et AF. Les CaCO_3 sont perceptibles

avec une teinte luminescente claire. La couleur perçue dépend du filtre utilisé (bleu, vert et rouge). Il a été décidé de toujours se servir du filtre GFP pour le repérage du CaCO_3 sur gélose, car les images semblent plus claires et présentent un meilleur contraste avec le fond vert foncé. Comme le montrent les photographies MEB, il semble qu'après 3 semaines d'incubation, la biomasse soit encore présente à la surface le CaCO_3 , mais sa capacité à se multiplier peut-être mise en question. Ces résultats semblent encourageants pour cartographier le CaCO_3 bioprécipité, cependant, l'efficacité de cette technique doit encore être testée avant de pouvoir être pleinement utilisée.

L'objectif principal de la thèse est de former une couche de CaCO_3 à la surface des gravillons recyclés, il faut donc s'assurer que cette méthodologie fonctionne avec une plus grande quantité de CaCO_3 qui aurait tendance à s'agglomérer. C'est pourquoi dans la manipulation suivante, il a été décidé d'augmenter la concentration d'acétate de calcium dans les cultures gélosées de B.H, afin d'augmenter la quantité de CaCO_3 formée et de tester l'efficacité de la technique pour le repérage de CaCO_3 .

2. Évaluation de l'efficacité de la cartographie de CaCO_3 par épifluorescence

Dans cette manipulation, il a été décidé d'ajouter une concentration d'acétate de calcium 7 fois supérieure à celle utilisée dans les manipulations précédentes. L'hypothèse de cette analyse est que le CaCO_3 peut être distingué par sa fluorescence de la biomasse et de la gélose, lorsqu'il est en grande quantité, agglomérée ou en couches. L'objectif a été donc de former des dépôts de CaCO_3 , de les observer par épifluorescence et de déterminer s'ils sont encore différenciés de la biomasse et de la gélose. Il a également été décidé de travailler avec une concentration diluée de la suspension de B.H pour observer plus clairement le processus de formation de CaCO_3 dans la biomasse.

2.1. Matériels et méthodes spécifiques

Une gélose nutritive ($\varnothing=13.5$ cm) à pH 11 a été inoculée avec 275 μL ($7,2 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) d'une dilution à 10^{-4} d'une suspension mère ($3.8 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$) de B.H âgée de 3 jours. Ensuite 3 mL d'une solution d'acétate de calcium [$375 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $7.8 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$] ont été ajoutés. La gélose a ensuite été incubée à 30 ± 1 °C pendant 5 jours. Pour réaliser les

observations microscopiques, il a été décidé de choisir juste une colonie de B.H en l'observant d'abord en lumière blanche et ensuite par épifluorescence avec le filtre GFP. Cette analyse a été couplée à une analyse RAMAN afin de caractériser les éléments précipités. La caractérisation a été effectuée, tout d'abord, sur la colonie bactérienne, puis il a été décidé de choisir une zone de la gélose très abondante en précipités, pour les observer par épifluorescence et effectuer ensuite la caractérisation des précipités observés.

2.2. Résultats et discussion

Le diamètre de la colonie observée est d'environ 0,6 cm, sa surface d'aspect rugueux semble être composée d'éléments de couleur blanche, grise et noire (Figure 55). Visiblement, la colonie semble avoir de précipités circulaires et des plaques qui se regroupent, formant une sorte de croûte. Autour de la colonie, sur la gélose, des précipités blancs circulaires d'une taille de 20 à 50 μm sont également repérés. Avec le filtre GFP, différentes nuances de couleur verte sont aperçues, variant d'un vert clair luminescent à un vert foncé. Ces observations sont différentes des résultats obtenus avec de faibles concentrations d'acétate de calcium, dans lesquels les précipités, bien séparés les uns des autres, étaient visibles avec une couleur verte luminescente. Dans ce cas, en raison de l'hétérogénéité des couleurs vertes, il n'est pas directement assuré que tous les éléments vert clair et opaques soient du CaCO_3 .

Les analyses RAMAN de la surface de la colonie ont indiqué qu'à l'intérieur et à la périphérie de la colonie il y avait bien de la vaterite (pics à 1075 et 1091 cm^{-1}), ce qui indique que la colonie était complètement carbonatée. Bien que le RAMAN ait indiqué que la surface de la colonie soit entièrement recouverte de CaCO_3 , la finalité de l'utilisation de l'épifluorescence est d'avoir une technique macroscopique pour différencier rapidement les CaCO_3 de la biomasse ou la gélose. La question qui se pose à partir de cette observation est de savoir pourquoi, lorsque la colonie est observée avec le filtre GFP, elle n'apparaît pas entièrement en vert fluorescent clair si elle est entièrement couverte de CaCO_3 . La Figure 56 montre les photographies d'une zone de la gélose couverte de précipités. Les cristaux aperçus dans cette zone ont été d'abord observés avec le filtre GFP afin de déterminer les points où l'analyse RAMAN devrait être effectuée. Les points choisis se situaient au niveau des structures qui avaient différentes nuances de fluorescence verte. Les 42 points analysés sont affichés sur les images en bleu et en rouge. Il convient de noter que sur la photographie en lumière blanche, il peut être observé l'hétérogénéité des précipités où la plupart sont circulaires.

Les structures avec les points bleus ont été caractérisées comme de la vaterite (pics à 1075 et 1091 cm⁻¹), les points rouges, quant à eux, avaient des spectres différents de ceux des CaCO₃, qui pourraient correspondre à la gélose ou à la biomasse. Ce résultat permet d'établir que les CaCO₃ ne peuvent pas être facilement distingués par épifluorescence, car (i) ils ne sont pas toujours observés avec une couleur fluorescente vert clair et (ii) les structures de couleur vert foncé peuvent être ou ne pas être des CaCO₃. Il est soupçonné que l'agglomération et la morphologie des CaCO₃ formés affecte la perception de leur fluorescence.

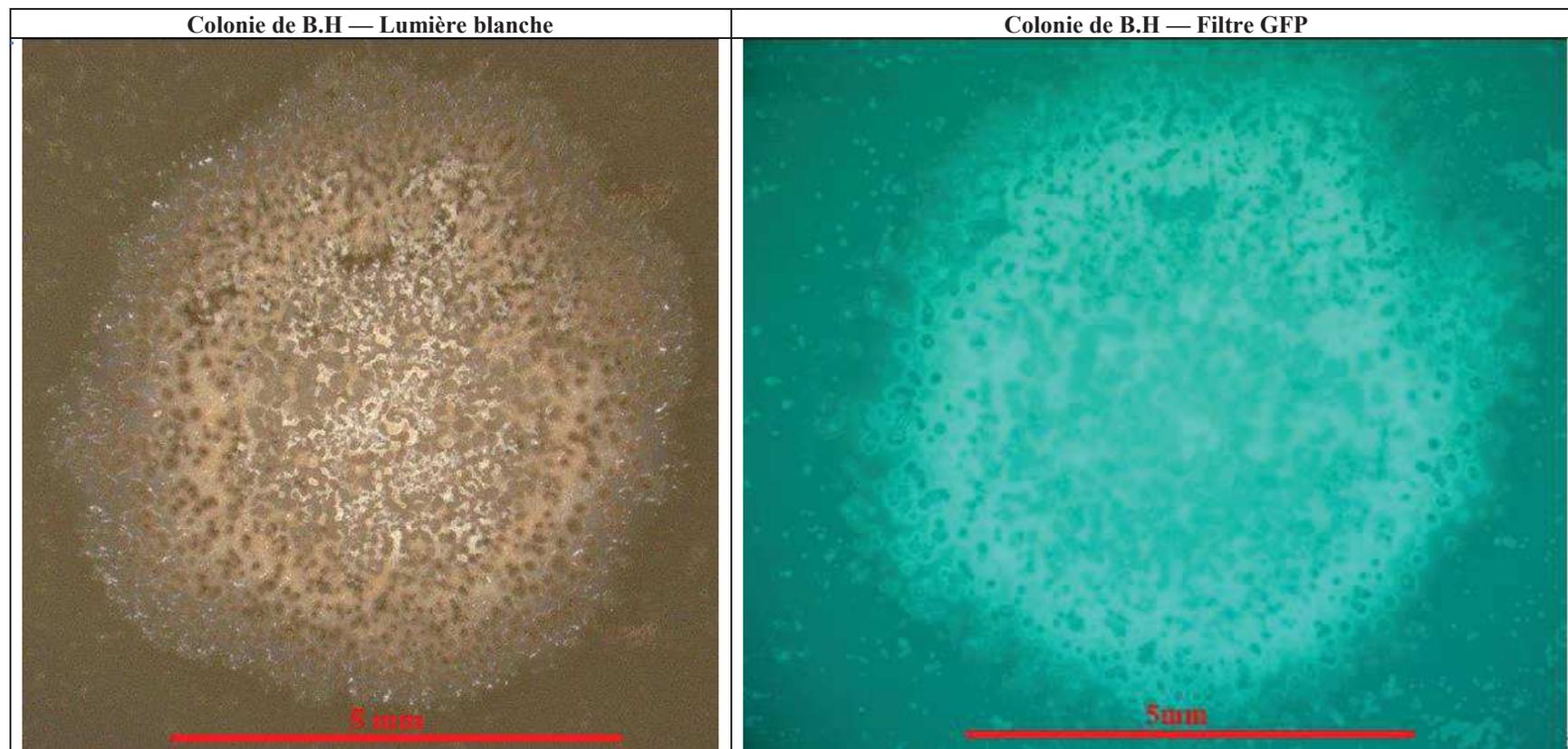


Figure 55. Colonie de B.H observé en lumière blanche et par épifluorescence avec le filtre GFP.

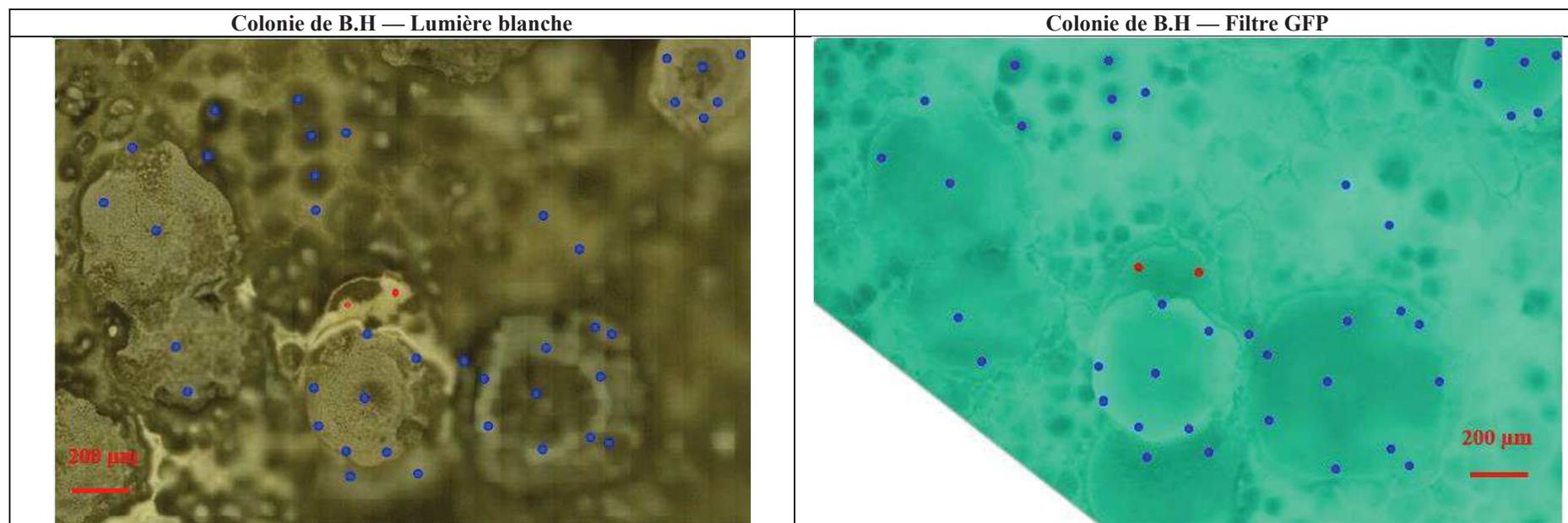


Figure 56. Zone de la gélose analysée par microscopie RAMAN, vue en lumière blanche et avec le filtre GFP

2.3. Conclusion

À travers cette manipulation, il est possible de conclure que les colonies de B.H peuvent être complètement calcifiées, de leur centre à leur périphérie, ce qui montre la capacité de cette bactérie à réaliser la bioprécipitation. En ce qui concerne la cartographie, lorsque la quantité de CaCO_3 précipité augmente en formant une sorte de couche, de croûte ou d'agglomérats de cristaux, elle ne peut pas être facilement distinguée par épifluorescence. La principale raison est liée au fait que certains cristaux de CaCO_3 sont perçus comme étant de couleur vert foncé et, comme cela a été démontré, toutes les structures de couleur vert foncé ne sont pas des CaCO_3 , ce qui rend impossible de distinguer les structures qui sont et qui ne sont pas de CaCO_3 .

Étant donnée l'impossibilité de tracer le CaCO_3 par épifluorescence seule, il a été décidé de mettre en place une nouvelle stratégie pour cartographier le CaCO_3 précipité par B.H, en utilisant à nouveau l'épifluorescence, mais cette fois, en ajoutant un composant fluorescent qui s'attache aux ions Ca^{2+} , visant à marquer uniquement le CaCO_3 .

3. Application d'un marqueur fluorescent pour suivre la précipitation de CaCO_3

Après avoir déterminé que le CaCO_3 ne pouvait pas être simplement distingué en utilisant l'épifluorescence naturelle des cristaux bioformés avec le filtre GFP, il a été décidé d'utiliser un marqueur fluorescent appelé calcéine ou fluorexon (Figure 57). Ce marqueur fluorescent est utilisé dans de nombreuses études qui essaient de distinguer le CaCO_3 au sein de micro et macro-organismes [3]–[5]. Ce marqueur est un composé polyanionique dérivé de la fluorescéine et qui présente une grande affinité pour les cations en milieu alcalin [6]. En raison de sa grande solubilité au pH alcalin et de son absence de réaction avec les composants du vivant [4], la calcéine semble être une molécule qui pourrait permettre de suivre la formation de CaCO_3 dans les cultures de B. H.

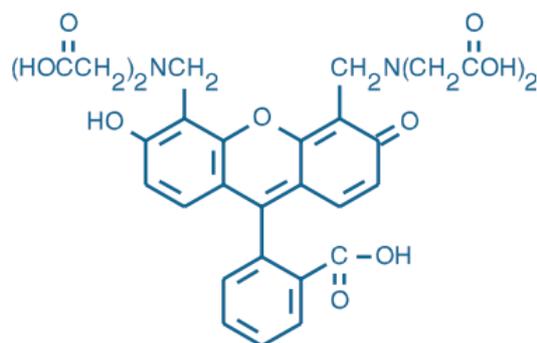


Figure 57. Molécule de fluorexon ou calcéine.

Bien que le mécanisme de marquage du CaCO_3 par la calcéine soit encore inconnu, les études dans lesquelles cette technique est utilisée supposent que la calcéine interagit d'abord avec les ions Ca^{2+} puis, lors de la formation du CaCO_3 , le composé serait piégé à l'intérieur [4][7]. À partir de cette hypothèse, il a été décidé de créer un protocole dans lequel le calcium est marqué en solution, avant d'être ajouté à la culture de B.H, de sorte que lorsque le CaCO_3 se formera, il contiendrait de la calcéine à l'intérieur provoquant la fluorescence du CaCO_3 . Cette molécule a son pic d'excitation à 501 nm et son pic d'émission à 521 nm, ce qui est compatible avec le spectre d'excitation et d'émission du filtre GFP (λ_{ex} 305 nm ; λ_{em} 509 nm).

3.1. Matériels et méthodes spécifiques

Une gélose nutritive (\varnothing 8.5 cm) à pH 11 a étéensemencée avec 100 μl d'une dilution 10^{-3} ($5.9 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) d'une suspension mère ($3.4 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) de B.H. Ensuite 1 mL d'une solution contenant de la calcéine [$5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $8.8 \times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$] et de l'Acétate de calcium [$50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $8.8 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$] a été ajouté et distribué à la surface. Cette solution de couleur orange a été stérilisée par filtration à 0.2 μm . La gélose a ensuite été incubée pendant 3 jours. Après l'incubation, la gélose a été observée au microscope optique en lumière blanche et à épifluorescence avec le filtre GFP. Afin de caractériser les précipités formés, une analyse RAMAN de la surface a été réalisée.

3.2. Résultats et discussion

Les photographies de la gélose prises avec le microscope sont présentées dans la Figure 58. Sur la photographie en lumière blanche, il est possible d'observer des précipités orange avec une morphologie circulaire (diamètre d'environ 101 μm , $\sigma = 12 \mu\text{m}$, $n = 20$). La couleur orange des cristaux peut être un indicateur de la présence de calcéine à l'intérieur, puisque comme mentionné ci-dessus, la solution d'acétate de calcium-calcéine était orange. Cependant, la gélose est également de couleur orange, elle a donc pu absorber de la calcéine. Il est aussi possible d'observer des structures qui semblent être des agglomérats cellulaires d'une couleur gris brillant.

Lorsque la même zone a été observée par épifluorescence avec le filtre GFP, les cristaux étaient visibles avec une teinte noire ou vert très foncé, la gélose avait quant à elle, une couleur verte fluorescente. Cette observation est en apparente contradiction avec ce qui était attendu, puisqu'en principe, ce sont les cristaux contenant de la calcéine qui devraient avoir la couleur verte fluorescente. Il a été suspecté que le fait que la gélose ait absorbé la calcéine sature l'image et, masque la perception de la fluorescence du CaCO_3 , malgré les ajustements qui auraient pu être faits avec le logiciel du microscope.

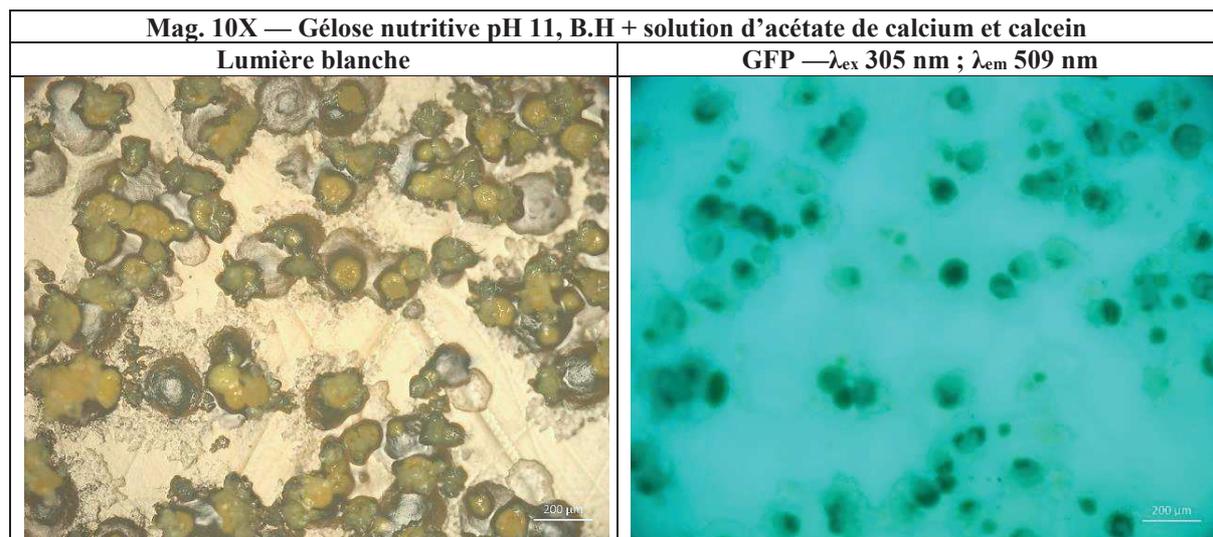


Figure 58. Précipités formés à partir de l'interaction de B.H avec une solution d'acétate de calcium avec de la calcéine.

Afin de vérifier ceci, il a été décidé d'effectuer deux manipulations : (i) de prélever un échantillon de précipités et de les observer sur un fond noir et (ii) d'introduire dans une partie de la gélose un colorant obscur (violet de gentiane), créant ainsi un contraste pour l'observation des cristaux.

Comme il est possible de le constater, lorsque les cristaux sont observés une fois extraite de la gélose, ils fluorescent (Figure 59-A) comme attendu. De même, lorsque le colorant violet de gentiane est introduit à la surface de la gélose, il sert de contraste pour observer la fluorescence des CaCO_3 (Figure 59-B). Ces observations ont permis de confirmer que l'absorption de la calcéine par la gélose affecte la perception de la fluorescence.

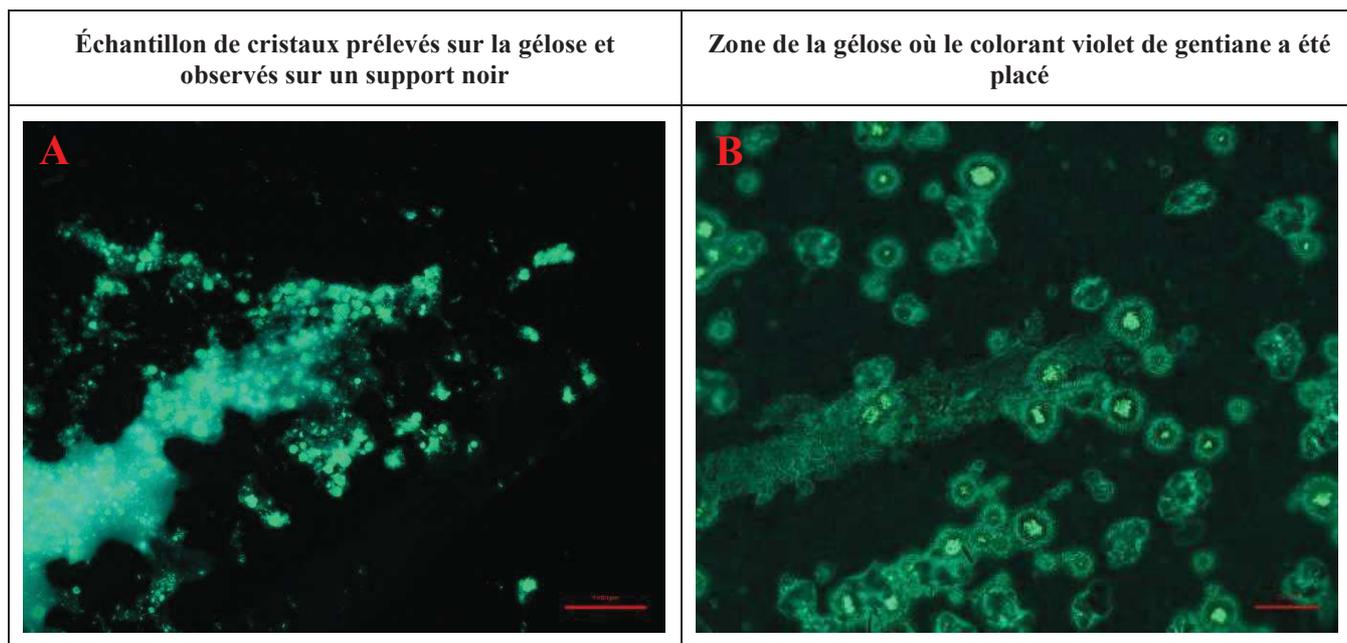


Figure 59. (A) Observation de la fluorescence des cristaux avec la calcéine à l'extérieur de la gélose et (B) observation de la surface de la gélose où le colorant violet de gentiane a été placé.

La Figure 60 montre les photographies des précipités analysés par microscopie RAMAN de cette gélose. Les cristaux ont été caractérisés comme étant de la calcite et de la vaterite.

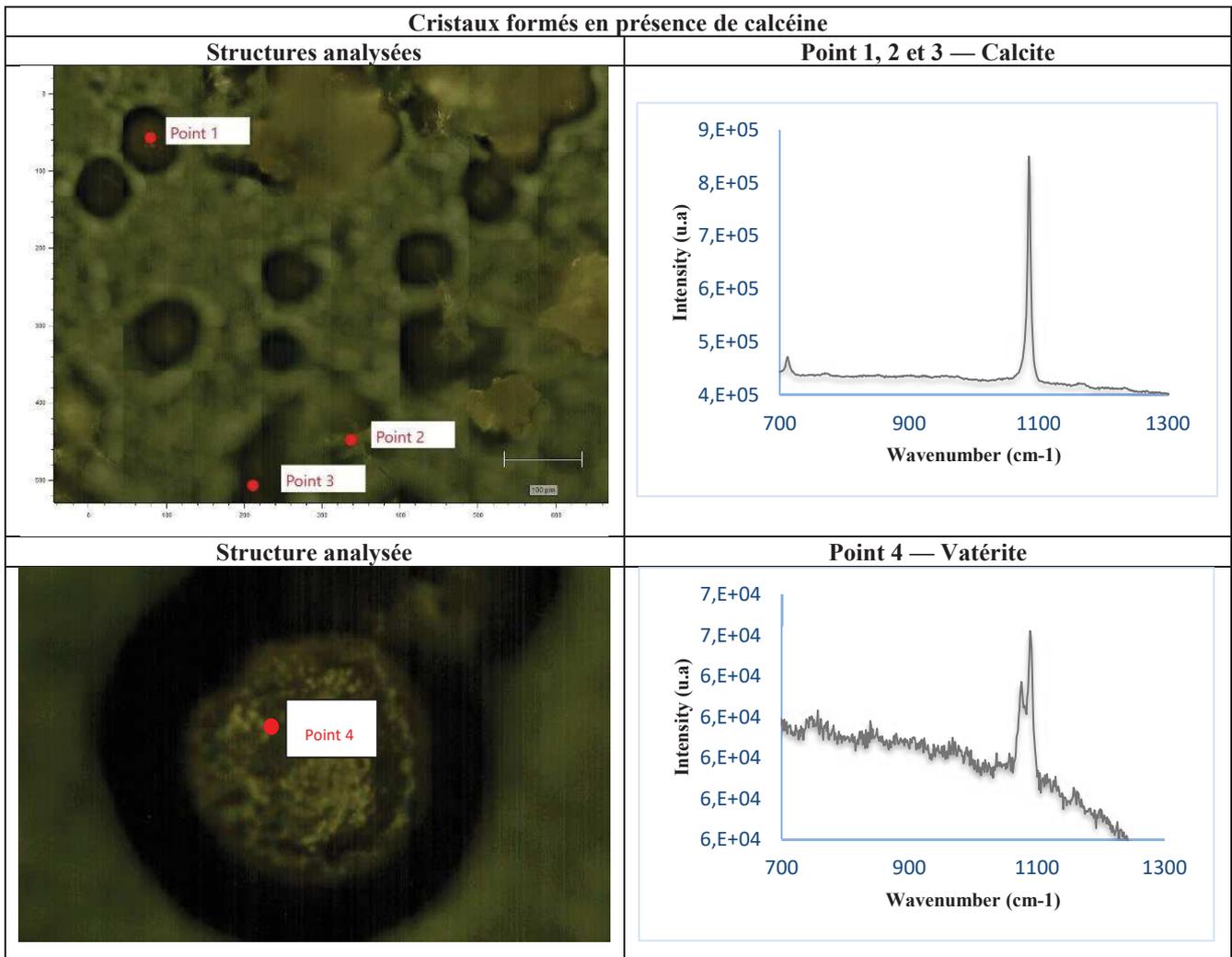


Figure 60. Analyse RAMAN des précipités formés en présence de calcéine.

3.3. Conclusion

Cette manipulation a permis de conclure que la calcéine n'interfère pas avec le développement de B.H et la formation de CaCO_3 (sous forme de vatérite et de calcite). Il a également été démontré que le CaCO_3 retient la calcéine et émet une fluorescence verte lorsqu'il est observé avec le filtre GFP. Cependant, si la gélose ou le support sur lequel la précipitation absorbe la calcéine, une interférence est générée qui masque la fluorescence des cristaux. Par conséquent, pour le moment, il n'est pas possible de cartographier le CaCO_3 sur la gélose.

Pour essayer d'empêcher la gélose d'absorber une quantité importante de calcéine et pour éviter qu'il n'interfère avec la fluorescence des cristaux, dans la manipulation suivante, la concentration de calcéine utilisée pour marquer le CaCO_3 a été diminuée.

4. Marquage des CaCO_3 avec une faible concentration de calcéine

Lors de la manipulation précédente, il a été observé, que la présence de calcéine dans la gélose posait un problème pour la perception de la fluorescence des CaCO_3 marqués avec la calcéine. Il a donc été décidé de créer un protocole dans lequel la concentration de calcéine dans les cultures est limitée afin d'éviter autant que possible que la gélose absorbe une quantité importante de ce marqueur. L'hypothèse de cette expérience est qu'en diminuant la quantité de calcéine ajoutée, la gélose absorbera moins de ce colorant et que lors de l'observation de la culture par épifluorescence avec le filtre GFP, la fluorescence des cristaux pourra être distinguée.

Initialement, il a été envisagé de calculer la quantité de calcéine à utiliser en fonction de la quantité de moles de Ca^{2+} présentes dans la solution d'acétate de calcium. L'idée était d'ajouter juste assez de calcéine pour marquer uniquement le Ca^{2+} qui serait précipité en CaCO_3 . Malheureusement, il n'existe aucune information sur le nombre de moles d'ions divalents tels que Ca^{2+} qui réagissent avec un certain nombre de moles de calcéine. Par conséquent, au lieu d'établir un rapport molaire de calcéine/calcium, il a été décidé d'utiliser la plus petite concentration de calcéine utilisée dans la littérature pour marquer le CaCO_3 , soit $4 \mu\text{M}$ [8]. Cette manipulation a été fait parallèlement à celle du Chapitre 6 : 2, dans laquelle la concentration d'acétate de calcium à ajouter aux cultures avait été modifiée, afin de vérifier si des colonies complètes de B.H pourraient être carbonatées. Ainsi la concentration d'acétate de calcium utilisé a été de $375 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.1. Matériels et méthodes spécifiques

Afin de mieux percevoir la formation de CaCO_3 dans les colonies de B.H, il a été décidé de travailler avec la dilution en serie 10^{-4} d'une suspension mère ($3.8 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$) de B.H. Sur une gélose nutritive ($\varnothing=13.5 \text{ cm}$) à pH 11, $275 \mu\text{L}$ ($3.8 \times 10^3 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ ou $7 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^2$) de la dilution 10^{-4} ont été inoculés. Ensuite 3 mL d'une solution d'acétate de calcium [$375 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $7,8 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$] et 3 mL d'une solution de calcéine [$4\mu\text{M}$, $5.2 \times 10^{-8} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$] ont été ajoutés. La gélose a été incubée pendant 5 jours. Pour réaliser l'observation microscopique, il a été décidé de choisir juste une colonie de B.H en l'observant d'abord en lumière blanche et ensuite par épifluorescence avec le filtre GFP. De plus, cette analyse a été couplée à une analyse RAMAN afin de caractériser les éléments précipités dans la colonie.

4.2. Résultats et discussion

La Figure 61 montre les photographies en lumière blanche et avec le filtre GFP de la colonie de B.H. La colonie possède un diamètre d'environ 6 mm, avec une surface qui semble être une sorte de croûte de couleur blanc orange, sur laquelle quelques précipités de couleur noirâtre sont aperçus. La surface de la gélose a également une couleur orange, ce qui indique en premier lieu que le fait de réduire la concentration de calcéine ajoutée n'a pas empêché la gélose d'absorber une quantité significative de ce marqueur pour avoir une couleur orange homogène. Lorsque la surface de la colonie a été regardée avec le filtre GFP, différentes nuances de couleur verte (entre le fluorescent, le clair, l'opaque et le foncé) ont été observées. Des structures fluorescentes ont été aperçues, seulement au centre de la colonie. Des observations au microscope RAMAN ont ensuite été réalisées sur 24 points dans des zones de couleurs différentes. Il a été observé aux 24 endroits la présence de CaCO_3 majoritairement sous la forme de vaterite (23 signaux) et un signal de calcite au centre de la colonie. Ces résultats suggèrent que toute la surface de la colonie était carbonatée et que la couleur de l'image observée avec le filtre GFP n'est pas corrélée à la présence de CaCO_3 .

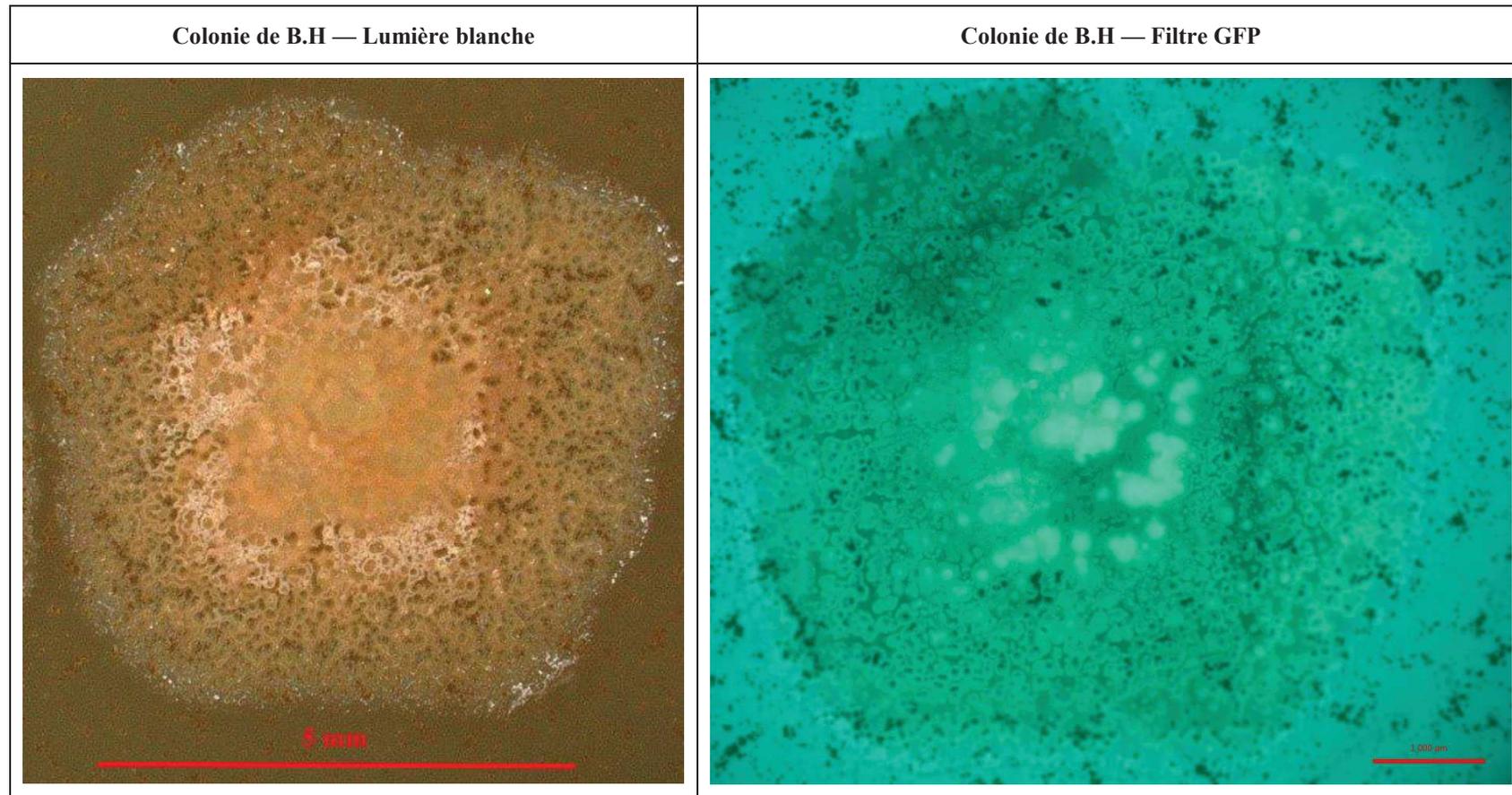


Figure 61. Colonie de B.H observé en lumière blanche et par épifluorescence avec le filtre GFP.

4.3. Conclusion

D'après ces observations, il est possible de conclure que même à de faibles concentrations de calcéine, la gélose absorbe encore le marqueur, ce qui limite l'appréciation de la fluorescence du CaCO₃ marqué à la calcéine et rend impossible le traçage spatial des carbonates. L'absorption du marqueur par la gélose est le principal facteur limitant de l'application de cette technique pour cartographier le CaCO₃. Ce résultat met également en évidence le rôle du support sur lequel est réalisée la précipitation pour distinguer le CaCO₃ par épifluorescence. Si le résultat obtenu sur la gélose est extrapolé sur un mortier, il pourrait être déduit qu'un mortier absorberait également le marqueur limitant la distinction du CaCO₃. C'est pourquoi l'utilisation de la calcéine n'est pas recommandée pour la cartographie du CaCO₃ sur le mortier ou autre matériau cimentaire.

5. Conclusion du chapitre

Disposer d'une technique permettant de cartographier spatialement le CaCO_3 précipité sur la gélose permettrait de caractériser quantitativement l'homogénéité du processus et la surface couverte par les cristaux, en la couplant avec des techniques d'analyse d'image. Cela permettrait par la suite d'évaluer l'impact de certains paramètres sur la qualité de ce recouvrement. Malheureusement, bien que l'épifluorescence seule se soit avérée être une technique prometteuse pour distinguer le CaCO_3 de la gélose et de la biomasse, il a été déterminé que cette technique n'est pas assez discriminante lorsque la concentration des dépôts de CaCO_3 augmente ou des agglomérats sont présents.

Une tentative a été faite pour contraster les images en introduisant de la calcéine pour marquer les carbonates bioformés. Malheureusement ce produit est également absorbé par le support sur lequel la bioprécipitation est réalisée, ce qui génère un bruit de fond qui masque la fluorescence des CaCO_3 .

Malheureusement, à ce stade, la cartographie du CaCO_3 telle que nous l'envisagions semble donc impossible et nécessiterait des investigations plus approfondies. Par manque de temps cela n'a pas été fait. Ceci n'est toutefois pas un point bloquant pour l'objectif principal de la thèse, car les observations RAMAN réalisées à l'occasion de chapitre ont montré que la biomasse semble assez uniformément recouverte de carbonates de calcium. Il semblerait donc que suivre le développement de la biomasse soit un bon indicateur de l'homogénéité de la couverture de la surface par les carbonates.

6. Références

- [1] B. L. Berg *et al.*, “Spectral features of biogenic calcium carbonates and implications for astrobiology,” *Int. J. Astrobiol.*, vol. 13, no. 4, pp. 353–365, 2014, doi: 10.1017/S1473550414000366.
- [2] N. Yoshida and E. Higashimura, “Catalytic biomineralization of fluorescent calcite by the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoglucosidasius*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 21, pp. 7322–7327, 2010, doi: 10.1128/AEM.01767-10.
- [3] D. E. Logsdon and B. J. Pittman, “Evaluation of osmotic induction of calcein treatments for marking juvenile walleyes,” *North Am. J. Fish. Manag.*, vol. 32, no. 4, pp. 796–805, 2012, doi: 10.1080/02755947.2012.690821.
- [4] E. Tambutté *et al.*, “Calcein labelling and electrophysiology: Insights on coral tissue permeability and calcification,” *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 279, no. 1726, pp. 19–27, 2011, doi: 10.1098/rspb.2011.0733.
- [5] X. Li, N. Lu, H. R. Brady, and A. I. Packman, “Biomineralization strongly modulates the formation of *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilms,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 92, no. 12, p. fiw189, 2016, doi: 10.1093/femsec/fiw189.
- [6] interchim, “Calceins.” [Online]. Available: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKewiXue3anNvqAhWNERQKHUOWA0oQFjABegQIAhAB&url=http%3A%2F%2Fwww.interchim.fr%2Fft%2F4%2F466251.pdf&usg=AOvVaw3ghht7RaYq03qR7iirKFah>.
- [7] X. Li, D. L. Chopp, W. A. Russin, P. T. Brannon, M. R. Parsek, and A. I. Packman, “Spatial patterns of carbonate biomineralization in biofilms,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 21, pp. 7403–7410, 2015, doi: 10.1128/AEM.01585-15.
- [8] G. Magnabosco, I. Polishchuk, J. Erez, S. Fermani, B. Pokroy, and G. Falini, “Insights on the interaction of calcein with calcium carbonate and its implications in biomineralization studies,” *CrystEngComm*, vol. 20, no. 30, pp. 4221–4224, Jul. 2018, doi: 10.1039/c8ce00853a.

Chapitre 6 : Optimisation des méthodologies de la bioprécipitation sur gélose

Ce chapitre décrit les modifications apportées aux manipulations de bioprécipitation afin d'améliorer l'extraction, la quantification et la production de CaCO_3 sur gélose.

1. Amélioration du processus d'extraction

Lors des essais de bioprécipitation sur gélose présentés dans le Chapitre 4, nous avons procédé à l'extraction des carbonates en faisant fondre la gélose au cours de deux cycles dilution + autoclavage, suivi d'une période d'attente de 25 minutes pour laisser les CaCO_3 sédimenter avant que la gélose ne fige à nouveau. A chaque cycle, le surnageant était retiré pour concentrer les CaCO_3 avant une centrifugation finale. Le temps de sédimentation était relativement court et aucune vérification n'avait été faite sur la quantité de CaCO_3 restants éventuellement piégés dans le surnageant. Ceci nous faisait craindre une sous-estimation de la masse de carbonates réellement produits. C'est pourquoi nous avons modifié notre méthodologie dans un second temps comme indiqué sur la Figure 62.

Le nouveau protocole est composé de deux étapes : le grattage et la resolubilisation. Dans la première, la surface de la gélose est soigneusement grattée avec un scalpel. On récupère alors la plupart des cristaux bioprécipités ainsi qu'une partie de biomasse et des résidus de gélose. La matière récupérée est conservée et séchée dans une étuve à 40°C pendant 3 jours, afin d'éliminer toute l'humidité possible et de pouvoir réaliser les essais de quantification par ATG. Dans l'étape de resolubilisation, la gélose issue du grattage est coupée en petits morceaux avec un scalpel, et placée dans une bouteille en pyrex avec 100 mL d'eau distillée (le scalpel a été rincé avec l'eau distillée afin d'éviter la perte de CaCO_3 sur les outils). L'ensemble est autoclavé puis la suspension est laissée à sédimenter pendant 1 jour à 85°C . En utilisant une température de 85°C , on s'assure que la gélose reste à l'état liquide pendant cette étape, et en réalisant ce processus en 1 jour, et non 25 minutes, les cristaux ont plus de temps pour sédimenter. Le fond de la bouteille est centrifugé après avoir enlevé le surnageant, et la matière ainsi récupérée dans le culot est séchée dans une étuve à 40°C pendant 3 jours, afin d'éliminer toute l'humidité pour réaliser les analyses ATG. Pour vérifier qu'il n'y avait pas de CaCO_3 dans le surnageant retiré, ceux-ci ont été centrifugés dans des flacons, vérifiant qu'il n'y avait pas de la matière ou culots déposés au fond des flacons.

Cette nouvelle méthodologie d'extraction est utilisée dans la suite de essais de bioprécipitation.

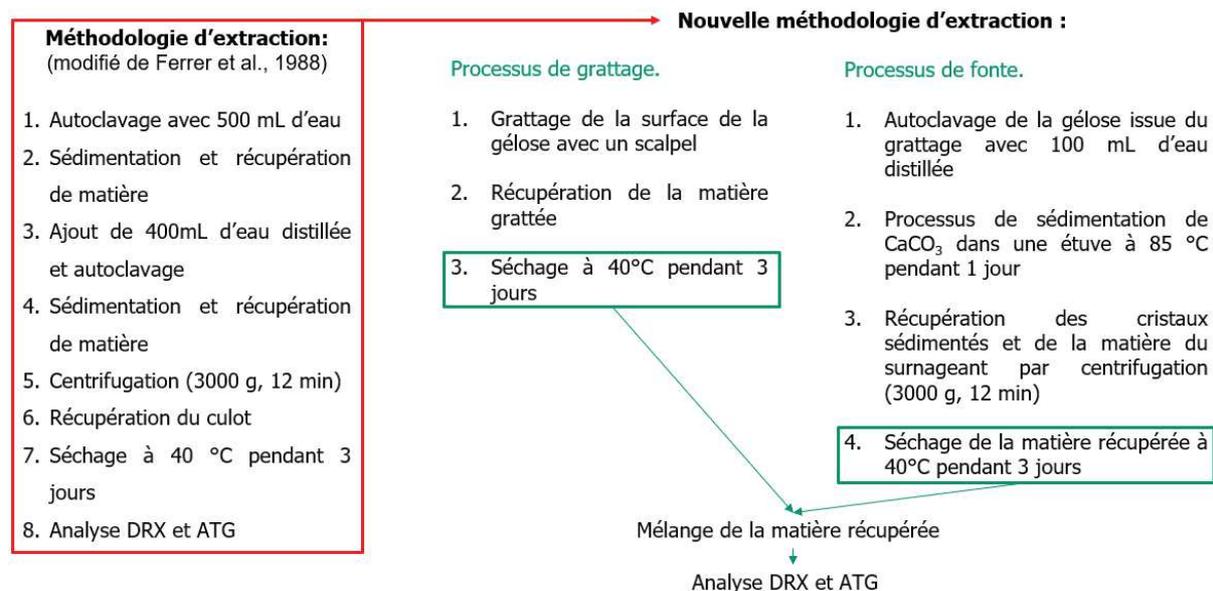


Figure 62. Étapes de la première méthodologie d'extraction et de la deuxième méthodologie d'extraction améliorée, diminuant le risque de perte de CaCO₃.

2. Capacité de bioprécipitation par un tapis de biomasse établi

Lors des manipulations précédentes sur des boîtes de Petri de 13,5 cm de diamètre, il a été observé qu'en ajoutant 3mL d'une solution d'acétate de calcium à 50g·L⁻¹ (1 x 10⁻³ g·cm⁻²) avec 275 μL (52.8 x 10² UFC·cm⁻²) de B.H, des CaCO₃ ont été précipités de façon hétérogène sur une gélose Chapitre 4 : 2. Cependant, l'objectif final de cette recherche est de former une couche homogène de CaCO₃ afin de créer une gangue uniforme autour des gravillons recyclés.

Pour essayer d'obtenir une précipitation plus homogène, il a décidé de réaliser un test préliminaire dans lequel on a ajouté de l'acétate de calcium, multiplié par 26 soit 0.026 g·cm⁻² (pour maximiser la quantité d'ion calcium disponible) sur des cultures en gélose de B.H âgées de 3 jours. Après 15 jours d'incubation, on a observé que les colonies de B.H avaient acquis une apparence de croûte blanche (Figure 63). Lorsque la surface de ces colonies a été analysée par microscopie RAMAN, il a été déterminé qu'elle était complètement carbonatée, avec de la vatérite.



Figure 63. Les colonies carbonatées après 15 jours d'incubation avec $0,026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium.

On vérifie ainsi que les bactéries ne sont pas perturbées par un fort dosage en acétate et peuvent localement, sur chaque colonie, former un tapis de carbonates conséquent. Partant de ce constat, on va donc maintenant chercher à former un tapis de biomasse uniforme avant d'ajouter l'acétate de calcium dans l'espoir d'obtenir un tapis uniforme de carbonates.

2.1.Méthodologie spécifique

Dans cette série d'essais, B.H a étéensemencée sur gélose dans des boîtes de Petri de 13,5 cm de diamètre. L'ajout de l'acétate de calcium a été réalisé à l'aide de 10,7 mL d'une solution à $350 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (soit $0.026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Il n'a été effectué que 3 jours après l'ensemencement, car il a été observé précédemment (voir Chapitre 3 : 6.2), que c'est le temps nécessaire pour qu'un tapis de biomasse homogène se forme.

Afin de déterminer l'influence de la concentration surfacique en bactéries lors de l'ensemencement initial sur la qualité du biofilm, 5 concentrations d'inoculum ont été testées, comme indiqué dans le Tableau 13. Pour chaque concentration (ou condition), 3 boîtes de Petri ont étéensemencées avec 275 μL d'inoculum. Le triplicata a permis d'évaluer la répétabilité des résultats. Ainsi, 15 boîtes de Petri ont donc été suivies.

Après l'ensemencement, les géloses ont été incubées pendant 3 jours et une photographie de la surface du biofilm a été prise au bout des 3 jours. L'ajout d'acétate a alors été réalisé (considéré comme l'instant T0)

Toutes les géloses ont été à nouveau incubées pour une période de 15 jours. Un suivi photographique de la surface des géloses a été réalisé tous les 3 ou 4 jours. Une analyse d'image

a été effectuée pour connaître le pourcentage de recouvrement de la biomasse. À la fin de la période d'incubation, la surface des boîtes de Petri a été récupérée en suivant la méthode présentée au paragraphe précédent. Les quantités de CaCO_3 produites ont ensuite été quantifiées par ATG. Les données acquises ont été utilisées pour calculer des rendements de production (Rp).

Tableau 13. Quantité de cellules bactériennes, inoculées par cm^2 dans chaque condition.

Condition	Inoculum	UFC·mL ⁻¹	UFC·cm ⁻²
A	Suspension mère	$1,9 \times 10^7$	$3,6 \times 10^4$
B	Dilution 10^{-1}	$1,9 \times 10^6$	$3,6 \times 10^3$
C	Dilution 10^{-2}	$1,9 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
D	Dilution 10^{-3}	$1,9 \times 10^4$	36
E	Dilution 10^{-4}	$1,9 \times 10^3$	3,6

2.2. Résultats et discussion

Le taux de recouvrement de chaque condition à T0 (avant dépôt de l'acétate de calcium) est affiché dans la Figure 64. Il est possible d'observer qu'il n'y a pas de différence significative entre le taux de recouvrement des conditions A, B et C. Il faut remarquer que dans les conditions B et C, l'inoculum a été dilué par un facteur de 10 et 100, par rapport à celle de la condition A. Ce résultat indique que le recouvrement achevé par une gamme d'inoculum entre 10^4 et 10^2 UFC·cm⁻², est supérieur à 95% après 3 jours d'incubation. Bien que A et C soient plus proches de la moyenne que B, cela peut être dû à la manière dont l'étalonnage de l'inoculum a été réalisé dans les géloses. De même, on peut observer que le recouvrement est inférieur à 95% et 90%, lorsque l'inoculum est égal à 36 et 3,6 UFC·cm⁻² respectivement.

Le taux de recouvrement après l'ajout d'acétate de calcium est difficile à déterminer, car l'acétate de calcium rend toute la surface blanche, ce qui ne permet pas de distinguer la biomasse de la gélose.

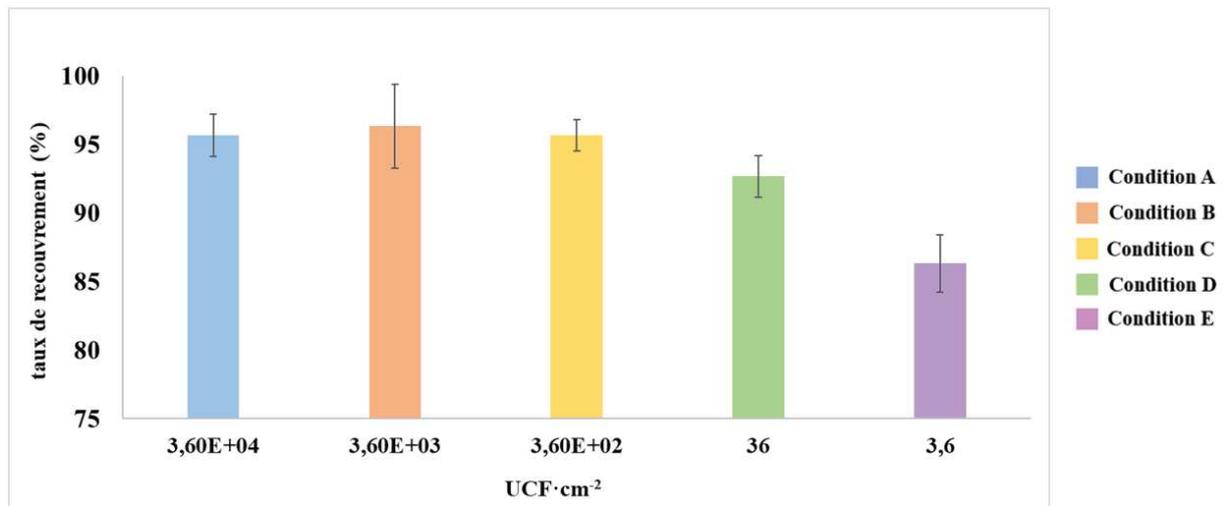


Figure 64. Taux de recouvrement moyen de la gélose après 3 jours d'incubation

La Figure 65 présente les photographies d'une des trois géloses utilisées par condition. La première colonne montre l'état des tapis de biomasse à T0 avant l'ajout de l'acétate. Les photographies des colonnes suivantes correspondent à la cinétique de bioprécipitation. Sur ces images, il est possible de percevoir le changement de la couleur du tapis au fil du temps, passant d'une couleur blanche crémeuse à une couleur marron-blanc. La tonalité blanchâtre a commencé à changer vers une teinte marronne à partir du 3e jour, celle-ci est devenue plus visible dans certaines zones à mesure que l'incubation avançait. Ce fait n'avait pas été observé auparavant sur de géloses nutritives, peut-être à cause de l'utilisation d'une concentration d'acétate de calcium 26 fois inférieure à celle utilisée dans cette manipulation. Cependant, ceci avait déjà été remarqué sur de cultures de géloses nutritives-MSgg (Chapitre 4 : 2.3) pour lesquelles on avait observé que le CaCO_3 était précipité uniquement dans les zones présentant cette coloration brunâtre. Il est donc possible que ce changement de couleur soit associé à la présence de CaCO_3 à la surface des géloses. Au fur et à mesure que la couleur de la gélose changeait, l'aspect de la surface changeait également, le tapis est passé d'une surface avec une consistance gélatineuse, vers une surface plus solide et sèche.

Cinétique de carbonatation d'un tapis de biomasse âgée de 3 jours avec l'ajout de $2.6 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium					
	T0 —Biomasse	3e jour	7e jour	10e jour	15e jour
A - Suspension mère (3.6×10^4)					
B - Dilution 10^{-1} (3.6×10^3)					
C - Dilution 10^{-2} (3.6×10^2)					

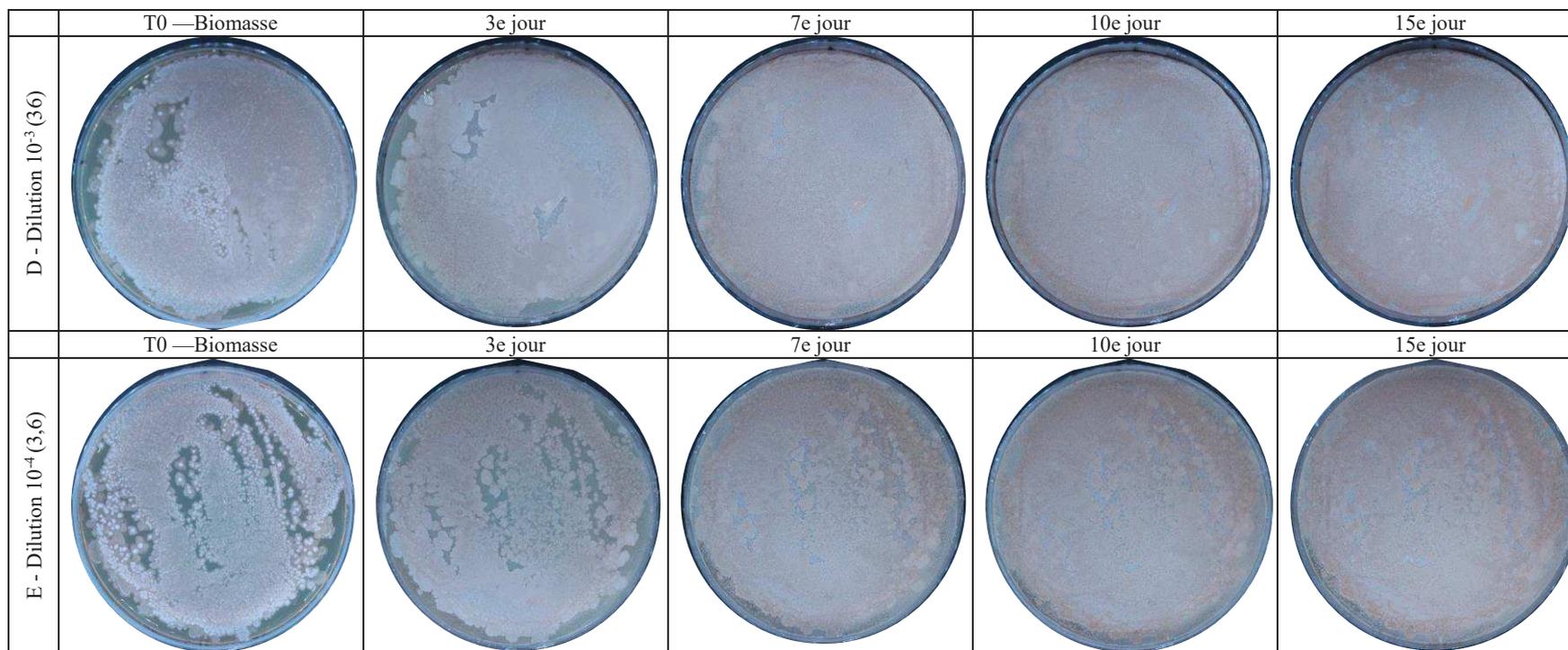


Figure 65. Suivi photographique de la bioprécipitation de CaCO_3 par B.H à différentes concentrations cellulaires, en présence d'acétate de calcium ($0.026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$)

La Figure 66 présente la masse moyenne de CaCO_3 produite par condition, avec ses écarts-types. Les géloses de la condition A ont précipité en moyenne 1,69 g avec un Rp de $72 \pm 6 \%$, pendant que les géloses de la condition E ont précipité en moyenne de 1.51 g avec un Rp de $63 \pm 6 \%$. Le Rp a été calculée comme dans le Chapitre 2 : 6.3. La production moyenne maximale a été de 1.69 g acquise dans la condition A, et la minimale de 1.48 g, acquis dans la condition D. Il semble que la quantité moyenne de CaCO_3 produite par gélose suit une tendance décroissante en fonction de la quantité d'inoculumensemencé, cependant, considérant les niveaux de dilutions étudiés et la dispersion des mesures, cette chute est toutefois modérée.

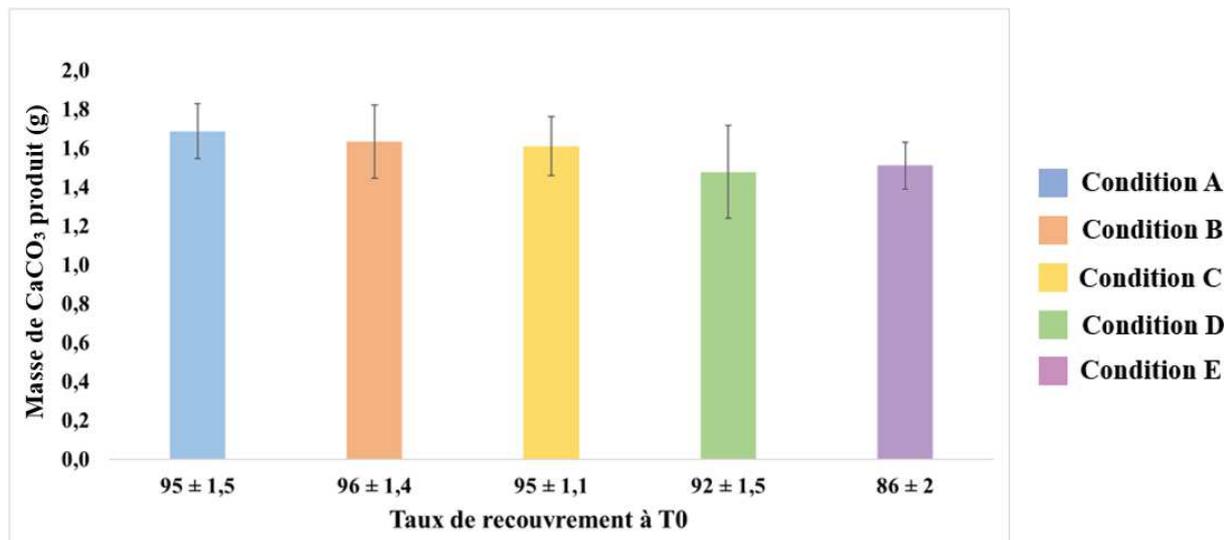


Figure 66. Quantité de CaCO_3 produit par condition après 15 jours d'incubation avec $0,026\text{g cm}^{-2}$ d'acétate de calcium.

2.3.Conclusion

En conclusion, l'interaction d'un tapis de biomasse âgée de 3 jours avec de l'acétate de calcium conduit bien à la précipitation de CaCO_3 . Au cours de ce processus, le tapis de biomasse se transforme en une croûte marron-blanc. Bien que la croûte néoformée semble visuellement se répandre sur toute la surface du biofilm, il n'est pas possible d'indiquer si le CaCO_3 était réellement réparti de façon homogène. A ce propos, il est possible que la couleur marronne soit un macro-indicateur de la présence de CaCO_3 .

On constate que jusqu'à une dilution par 1000 de la solution mère, c'est-à-dire jusqu'à un ensemencement de $3,6 \times 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, on observe des résultats assez proches en termes de couverture par le biofilm et de production de CaCO_3 . Pour des dilutions plus importantes (jusqu'à 10,000 et 100,000), la couverture devient moins homogène même si la production ne chute pas de façon drastique.

Pour la suite de ce chapitre, on choisit donc de continuer à travailler avec la solution mère pour maximiser la couverture de la gélose par le biofilm et ultérieurement par la croûte bio formée qui est l'objectif de ce travail. Si nécessaire et dans un second temps, le procédé pourra être optimisé pour en réduire le coût, en diluant l'inoculum.

Dans les expériences que nous venons de présenter, nous avons évalué la production de CaCO_3 après 15 jours d'incubation en présence d'acétate de calcium. Dans l'objectif d'améliorer le procédé, il est maintenant nécessaire de déterminer le temps nécessaire pour que le tapis précipite la quantité maximale de CaCO_3 .

3. Cinétique de production de CaCO_3 par un tapis de biomasse installé

Afin de connaître la durée nécessaire pour que le tapis de biomasse précipite la quantité maximale de CaCO_3 , il a été décidé de mettre en place une nouvelle mesure de cinétique de bioprécipitation. Le but de cette manipulation est donc de quantifier le CaCO_3 produit à différents moments de l'incubation.

3.1.Méthodologie spécifique

La manipulation a consisté à inoculer 15 géloses nutritives sur boîte de pétri de diamètres 13,5 cm avec 250 μL d'une suspension mère de B.H âgée de 3 jours, soit une concentration de $3.8 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Toutes les géloses ont été ensuite incubées. Au 3e jour d'incubation, considéré comme le T0 de l'expérience, une photographie de la surface de toutes les géloses a été prise. Puis 10.7 mL d'une solution d'acétate de calcium à $350 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (soit $0.026 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$) ont été ajoutés à leur surface. Les 15 géloses ont été ensuite incubées pendant 15 jours. Tous les 3 à 4 jours, toutes les boîtes de Pétri sont photographiées, puis 3 échantillons sont sélectionnés pour réaliser l'extraction de CaCO_3 et quantifier les cristaux précipités de chaque gélose par ATG.

3.2.Résultats

Comme attendu d'après les essais précédents, toutes les géloses présentaient un tapis de biomasse uniforme à T0 avec un taux de recouvrement de la biomasse supérieur à 98 %.

Des photographies de l'une des 15 géloses sont présentées dans la Figure 67. Après l'ajout d'acétate de calcium, les cultures sont devenues blanches, plus tard, au fur et à mesure de la période d'incubation, elles ont pris une coloration marronne. De plus, l'apparence du tapis

de biomasse semblait progressivement avoir une consistance plus solide, semblable à une croûte.

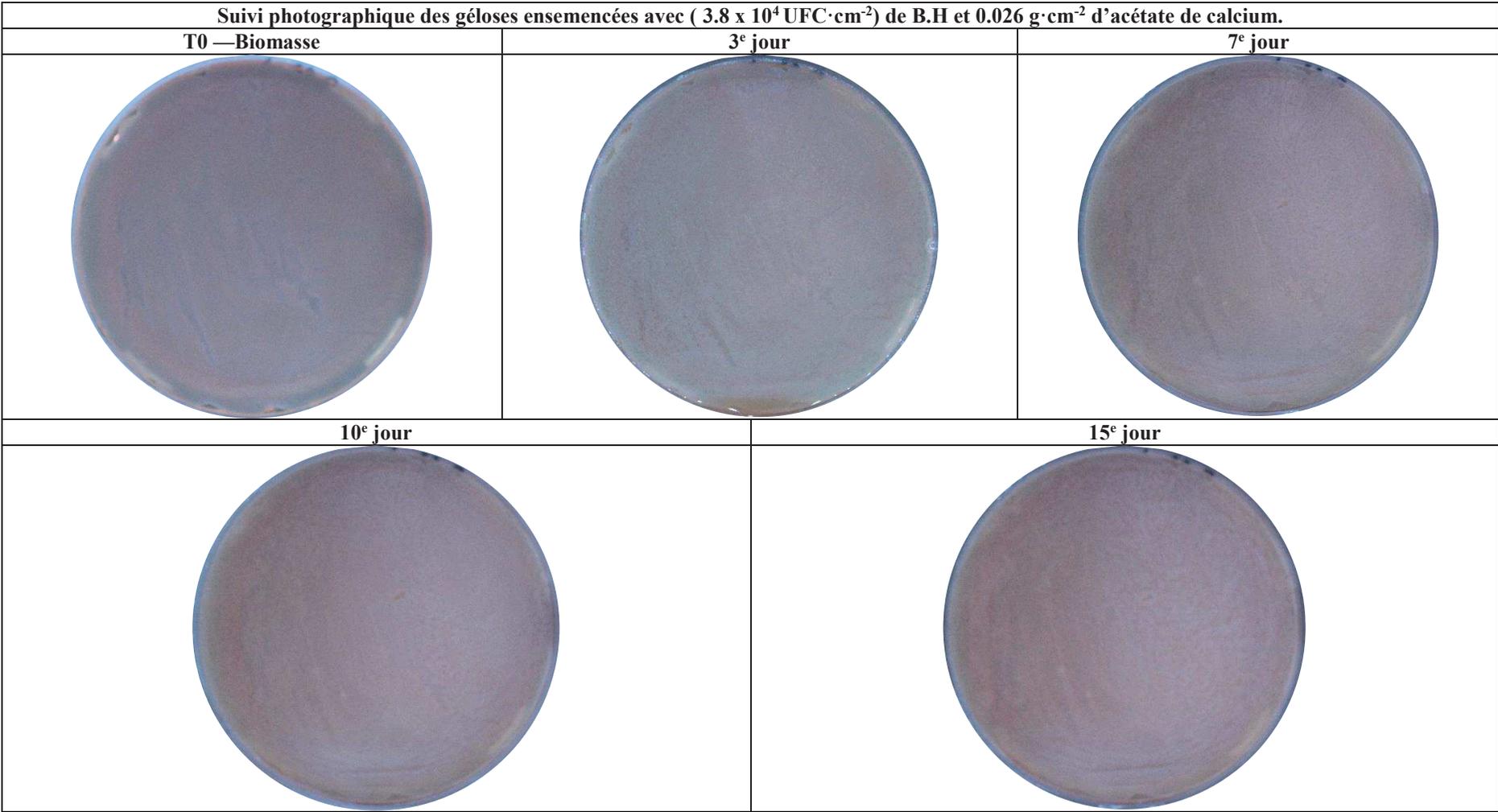


Figure 67. Suivi photographique de la cinétique de la bioprécipitation de B.H avec 0.026 g·cm⁻² d'acétate de calcium.

La Figure 68 montre la quantité moyenne de CaCO_3 produite exprimée en masse et en rendement Rp, les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n= 3$ boîtes). Le calcul de la masse maximale formable a été calculé comme dans le Chapitre 2 : 6.3. Il est possible de constater que la production augmente avec le temps d'incubation jusqu'au 10e jour où elle se stabilise.

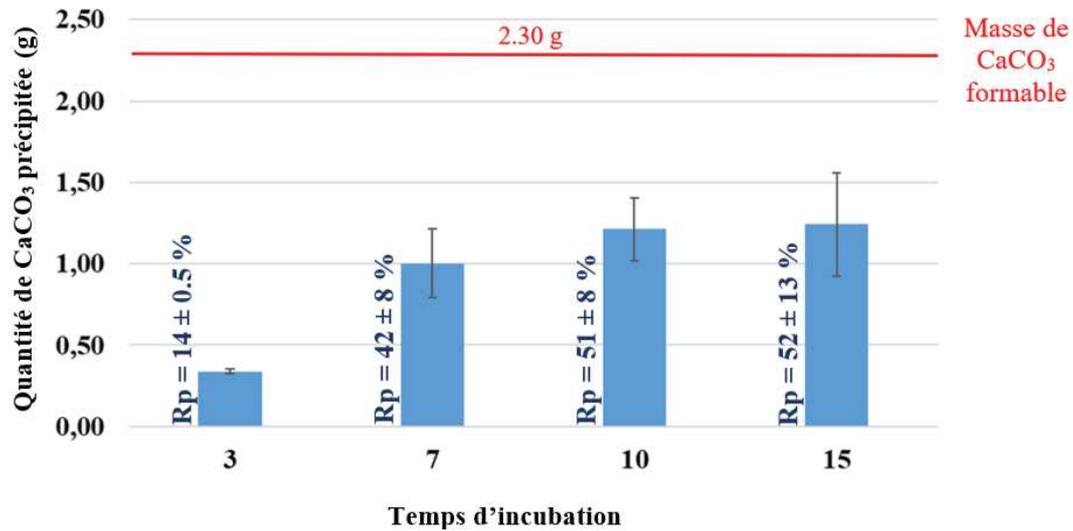


Figure 68. Quantité moyenne de CaCO_3 produit et Rp au cours de l'incubation à 30°C.

3.3. Discussion et conclusion

Le taux de recouvrement de toutes les géloses était de 98% comme attendu, avec l'ensemencement de l'inoculum de l'ordre de $10^4 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$.

À partir du suivi photographique, nous avons pu observer que l'évolution de la surface du biofilm était similaire à celle observée lors de la manipulation précédente. A T0, le biofilm a une couleur blanche et semble avoir une surface perceptiblement lisse. Après l'ajout d'acétate de calcium, les différentes zones commencent à prendre une couleur brune et la surface devient dure comme une croûte. Ces changements qualitatifs, perceptibles à l'œil nu, sont alors des indicateurs de précipitation de CaCO_3 , malheureusement cela ne donne aucune information sur la distribution des précipités ou l'uniformité du dépôt.

Il a été constaté que la production de CaCO_3 augmente à partir du 3e jour et se stabilise ensuite au 10e jour. La production moyenne de CaCO_3 au 10e et 15e jour a été de 1,21 et 1,24 g respectivement. Ces valeurs ne sont pas très éloignées des 1,7 g obtenus dans l'expérience précédente (voir section, condition A).

On constate qu'en ajoutant $0.026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium à la surface d'un biofilm, la majeure production de CaCO_3 est atteinte aux alentours du 10e et 15e jour, alors qu'il ne fallait que 3 jours dans les essais du Chapitre 4 : 2.2. Cependant, la quantité d'acétate de calcium dans cette expérience était beaucoup plus importante et elle peut être en excès. Précédemment (dans les essais du chapitre 2) $1 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium avait été ajouté, et dans ce cas $0.026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$, soit presque 26 fois de plus. Il a été suggéré que des concentrations élevées, l'acétate de calcium pourrait inhiber ou retarder la croissance bactérienne. Lorsqu'une bactérie est exposée à deux sources de carbone, l'une fournie par le milieu nutritif et l'autre par l'acétate de calcium, la bactérie ne sait pas quelle source de carbone elle préfère consommer, ce qui peut entraîner un ralentissement de son métabolisme et de sa croissance [1]. Par conséquent, l'excès d'acétate de calcium dans nos géloses pourrait être la cause du retard de la production maximale de CaCO_3 pendant les premiers jours.

En conclusion, en ajoutant $0,026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium à un biofilm dont le taux de couverture est supérieur à 98%, la plus grande quantité de CaCO_3 est précipité entre les 10e et 15e jours d'incubation.

Il semble que des concentrations élevées d'acétate de calcium puissent influencer la quantité de CaCO_3 précipité ou que la concentration étudiée est en excès, il a donc été décidé d'utiliser la méthode suivante, il a été décidé d'analyser, s'il y a un effet de la concentration d'acétate de calcium ajouté sur la quantité de CaCO_3 produite.

4. Effet de la concentration d'acétate de calcium sur la quantité de CaCO_3 précipité

Dans les manipulations précédentes, on constate que les rendements R_p maximales obtenues ne sont compris qu'entre 50 et 72%, même si le tapis bactérien recouvrait initialement plus de 98% de la surface de la gélose. Cela signifie par définition qu'il y a entre 38 et 50 % de l'acétate de calcium ajouté qui n'est pas utilisé pour former du CaCO_3 lorsque l'on utilise une concentration de $0,026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium. De plus comme on vient de le voir lors des essais de cinétique, on soupçonne qu'un excès d'acétate de calcium puisse affecter le développement bactérien et par conséquent la production de CaCO_3 . C'est pourquoi nous cherchons à mesurer l'effet de la diminution de la concentration en acétate sur les rendements.

L'étude précédente a été utilisée comme référence pour comparer la production qualitative et quantitative de CaCO_3 avec les résultats de cette manipulation, c'est pourquoi, pour des raisons pratiques, il a été décidé d'inclure à nouveau certains résultats.

4.1.Méthodologie spécifique

Neuf géloses nutritives ont étéensemencées avec $275\mu\text{L}$ d'une suspension mère de B.H (soit $3.8 \times 10^4 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^2$). Pour cette analyse, trois conditions (A, B et C) dictant l'ajout de l'acétate ont été établies. Chaque condition a été réalisée en triplicata. Dans les cultures de la condition A, $0.026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium ont été ajoutés. Dans celles de la condition B, on s'est limité à 70 % de cette concentration, soit $0.018 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$, et dans la condition C, à 50 % soit environ $0.013 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Après l'ajout de l'acétate de calcium, toutes les géloses ont été incubées pendant 15 jours, en prenant une photographie de leur surface chaque 3 ou 4 jours. À la fin de l'incubation, le CaCO_3 a été extrait par gélose et quantifié par ATG.

4.2.Résultats et discussion

Le suivi photographique de la cinétique est présenté dans la Figure 69. Comme dans les expériences précédentes, à T0, toutes les géloses contenaient un tapis de biomasse uniforme (recouvrement 98%), et après l'ajout d'acétate de calcium, les tapis ont pris une couleur blanchâtre, qui a progressivement viré au marron. A la fin de la période d'incubation, tous les tapis avaient une surface solide et croûtée.

Cinétique de bioprécipitation à différentes concentrations d'acétate de calcium					
	T0 —Biomasse	3 ^e jour	7 ^e jour	10 ^e jour	15 ^e jour
Condition A ; 0.026 g·cm ⁻²					
	3 ^e jour	7 ^e jour	10 ^e jour	13 ^e jour	15 ^e jour
Condition B ; 0.018 g·cm ⁻²					
	3 ^e jour	7 ^e jour	10 ^e jour	13 ^e jour	15 ^e jour
Condition C ; 0.013 g·cm ⁻²					

Figure 69. Suivi photographique de la bioprécipitation sur gélose nutritive à différentes quantités d'acétate de calcium par cm².

Dans le graphique de la Figure 70 on indique la quantité moyenne de CaCO_3 produits par concentration d'acétate de calcium utilisé, ainsi que le Rp et la quantité de maximale de CaCO_3 formable.

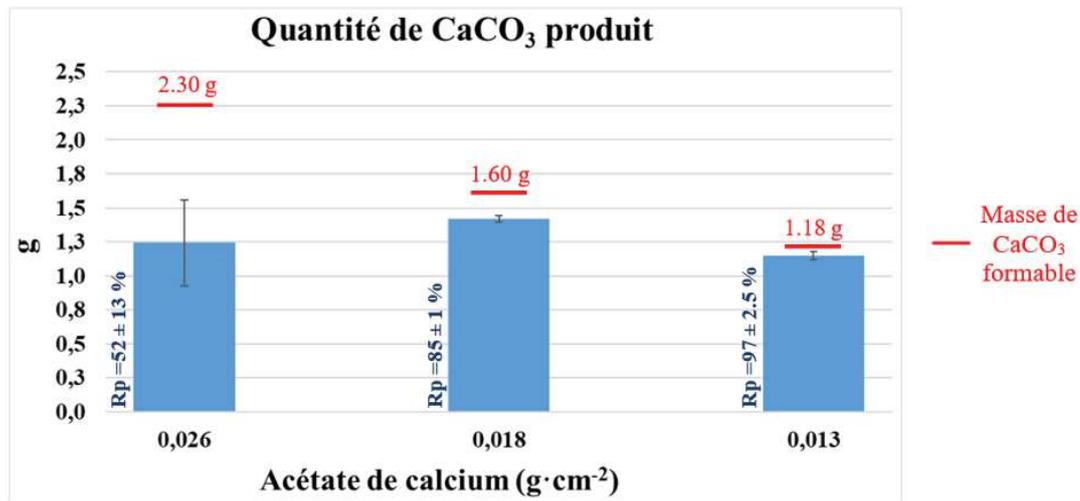


Figure 70. Quantité moyenne de CaCO_3 produit par condition, avec Rp et la masse idéale formable de CaCO_3 .

On constate sur ce graphe que la production en masse de CaCO_3 varie relativement peu (entre 1,2 et 1,4 g) alors que la concentration en acétate de calcium varie d'un rapport de 2. Dans le paragraphe précédent, on suggérait que l'utilisation de concentrations élevées d'acétate de calcium puisse affecter le développement de B.H et indirectement la quantité de CaCO_3 précipité. Ce phénomène n'est pas observé dans la gamme des concentrations étudiées ici (rappelons que la concentration étudiée dans le chapitre 2 était 10 fois moindre que celle de la condition C)

Par construction le rendement augmente de 52% à 97 % quand la concentration en acétate de calcium diminue de 0.026 à 0.013 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. D'un point de vue opérationnel et pour éviter de gaspiller la source de carbone qui ne serait pas transformé en CaCO_3 , il semble préférable de viser une concentration surfacique de l'ordre de 0,013 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

5. Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre nous avons cherché à optimiser la production de carbonates de calcium sur gélose par rapport aux premières expériences du Chapitre 4 : 2.2. Pour évaluer l'efficacité des différents paramètres étudiés, nous avons au préalable modifié la méthodologie d'extraction des CaCO_3 afin de minimiser les pertes lors des manipulations.

Contrairement à ce qui avait été réalisé précédemment, dans ce chapitre, nous avons laissé le tapis de biomasse se développer et coloniser la surface de la gélose pendant 3 jours avant d'introduire l'acétate de calcium. L'objectif était d'avoir une répartition homogène des bactéries. En effet, comme nous l'avons vu dans le Chapitre 5 : , nous ne sommes pas capables de faire une cartographie des carbonates précipités mais là où les colonies de bactéries sont installées la répartition des carbonates semble assez uniformes. En ayant un tapis de biomasse installé, nous faisons l'hypothèse que le tapis de carbonates sera homogène.

Dans un premier temps nous avons montré que l'inoculation avec des concentrations comprises entre environ 3.6×10^4 et $3.6 \times 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ permettent de recouvrir la surface après 3 jours d'incubation. Pour des concentrations plus faibles, le tapis de biomasse est moins homogène.

Après l'ajout d'acétate de calcium, la biocarbonatation modifie l'apparence d'un tapis de biomasse : (i) la couleur de la surface passe du blanchâtre au marron, et (ii) sa consistance semble passer de molle à croûteuse.

La quantité d'acétate de calcium ajoutée ne modifie pas de façon significative la masse de CaCO_3 précipité, dans une gamme de concentration comprise entre $0,013 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ et $0.026 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$. Cependant l'utilisation de $0,013 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ permet d'avoir un rendement R_p de 97 % qui traduit le fait que presque tout le calcium ajouté est converti en carbonate. Pour des concentrations plus élevées, une partie du calcium est non converti.

Dans la gamme de concentrations d'acétate de calcium étudiées, un tapis de biomasse âgé de 3 jours prend environ 10 jours pour générer la majeure quantité du CaCO_3 qu'il est capable de fournir après l'ajout d'acétate de calcium. Au bout de 7 jours, il en produit environ 81%.

Ainsi pour un ensemencement bactérien $3.6 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ suivi de l'apport de $0,013 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$, nous avons obtenu une production de 1,14 g de CaCO_3 sur une gélose de 13,5 cm de

diamètre. En considérant une densité de $2,71 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ pour les carbonates de calcium, cela représente une couche d'épaisseur moyenne de $30 \text{ }\mu\text{m}$.

Nous avons ainsi, sur la base de ces essais présentés dans ce chapitre, identifié les paramètres principaux pour maximiser la formation d'un dépôt de carbonates de calcium homogène à la surface d'une gélose. L'étape suivante consiste à vérifier que les résultats observés peuvent être extrapolés à des surfaces de mortier avant de passer à l'étape de l'application à des granulats de béton recyclé. C'est l'objet du chapitre suivant.

6. Références

- [1] S. Pinhal, D. Ropers, J. Geiselman, and H. de Jong, “Acetate Metabolism and the Inhibition of Bacterial Growth by Acetate,” *J. Bacteriol.*, vol. 201, no. 13, 2019, doi: 10.1128/JB.00147-19.

Chapitre 7 : Application de la biocarbonatation à la surface de mortier modèle

Les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence qu'il était possible de former une couche de CaCO_3 sur gélose si un tapis microbien était préalablement développé. L'objectif de ce chapitre est donc de former une couche de CaCO_3 sur mortier et d'en évaluer les performances en termes d'absorption en eau. Pour cela, dans un premier temps nous nous sommes attachés à développer un biofilm homogène à la surface des mortiers, puis à former des CaCO_3 et enfin à évaluer l'absorption d'eau des matériaux.

1. Développement d'un biofilm à la surface des mortiers

B.H se développe bien, sur un milieu nutritif gélosé à pH 11, cependant son comportement sur un mortier n'est sûrement pas le même, cela étant dû à l'état de surface et à l'apport de nutriments qui diffèrent.

Ces expériences ont été réalisées sur la surface de disques d'un diamètre de 6 cm et d'une épaisseur de 2 cm. Plusieurs paramètres ont été testés afin de former un biofilm homogène à la surface : (i) l'immersion des mortiers dans le bouillon nutritif, afin d'apporter une quantité de nutriment suffisant au bon développement de B.H, (ii) l'inoculation répétée de B.H au cours du temps et (iii) la périodicité de l'ajout de l'inoculum.

1.1. Test de survie –immersion des mortiers avant inoculation

Les objectifs de cette première manipulation ont été les suivants :

- (i) Évaluer l'apport de l'immersion des mortiers dans du bouillon nutritif avant l'ensemencement
- (ii) Déterminer comment évaluer au mieux la formation de biofilm.

1.1.1. Matériel et Méthodes spécifiques

Deux protocoles de conditionnement ont été évalués comme indiqué sur la Figure 71. L'incubation a été réalisée à 100% d'HR et à température ambiante. Les photographies des surfaces après 6 minutes de séchage de tous les mortiers sont présentées en échelle de gris afin de mieux percevoir les traces d'humidité. Une deuxième observation microscopique des disques a été réalisée après avoir appliqué 1mL d'une solution de violet de gentiane à leur surface afin de mieux repérer les amas de bactéries.

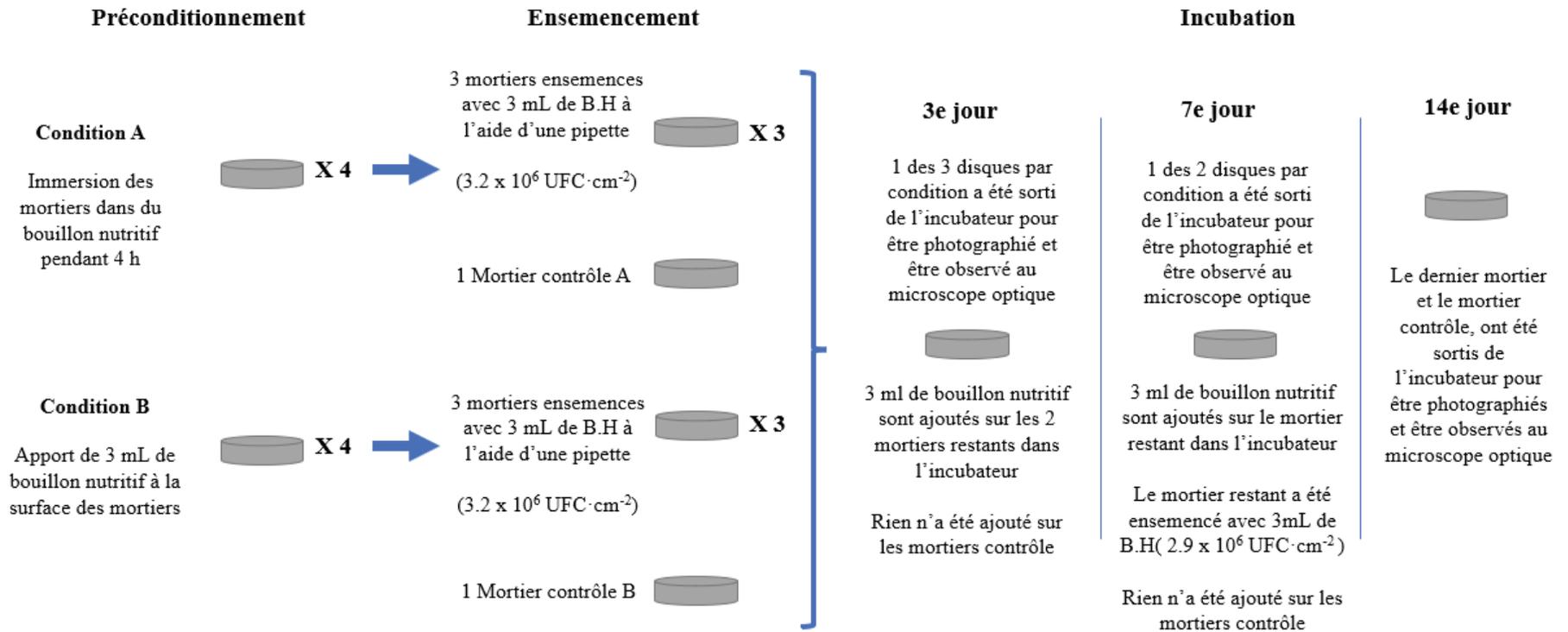


Figure 71. Protocole de formation de biofilm à la surface des échantillons de mortiers.

1.1.2. Résultats

Les photographies de la surface des mortiers, après séchage, des conditions A et B, ainsi que des images prises au microscope optique, sont présentées dans la Figure 72 et la Figure 73.

Dès le 3^e jour pour le mortier de condition A, certaines zones de sa surface ont retenu de l'humidité après avoir été sorties de l'incubateur, principalement autour des pores. Cette rétention d'eau a été de plus en plus visible au cours du temps pour les mortiers de la condition A (préconditionnement par immersion pendant 4h). Ainsi au 15^e jour, le dernier mortier de la condition A, a retenu l'humidité de manière uniforme pendant plus de 6 minutes après être sorti de l'incubateur. Lorsque le mortier contrôle A, a été retiré de l'incubateur (au 15^e jour), il était semi-humide, sa surface est devenue complètement sèche après 2 ou maximum 3 minutes après avoir été sortie de l'incubateur.

Aucune rétention d'humidité n'a été observée sur les mortiers de la condition B après 3 et 7 jours d'incubation. Ce n'est qu'à partir du 15^e jour que des zones d'humidité persistaient au-delà de 6 minutes à la surface du disque en dehors de l'incubateur. Au 15^e jour, la surface du contrôle B était semi-humide dans l'incubateur, mais a complètement séché après 2 ou 3 minutes.

L'observation au microscope optique des zones humides à la surface des mortiers a révélé la présence d'un type de biofilm d'aspect visqueux. Au 15^e jour d'incubation, le biofilm reflétait trop la lumière et n'a pas permis l'observation de la surface du mortier de la condition A, avec l'objectif 10X. Sur les deux mortiers, contrôle (Condition A et B), aucun biofilm n'a été observé.

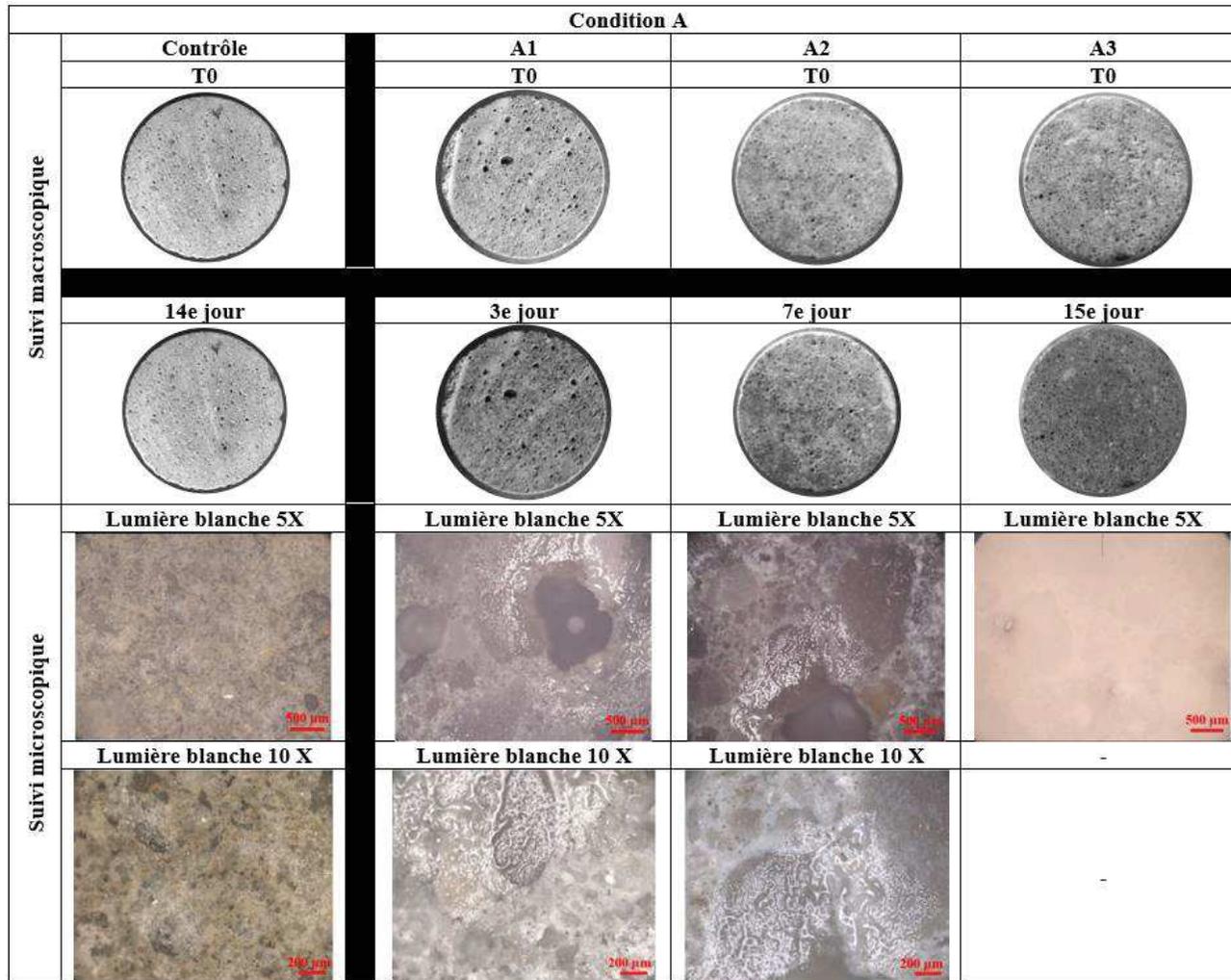


Figure 72. Suivi macroscopique et microscopique des mortiers préconditionnés par immersion dans du bouillon nutritif (condition A). La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.

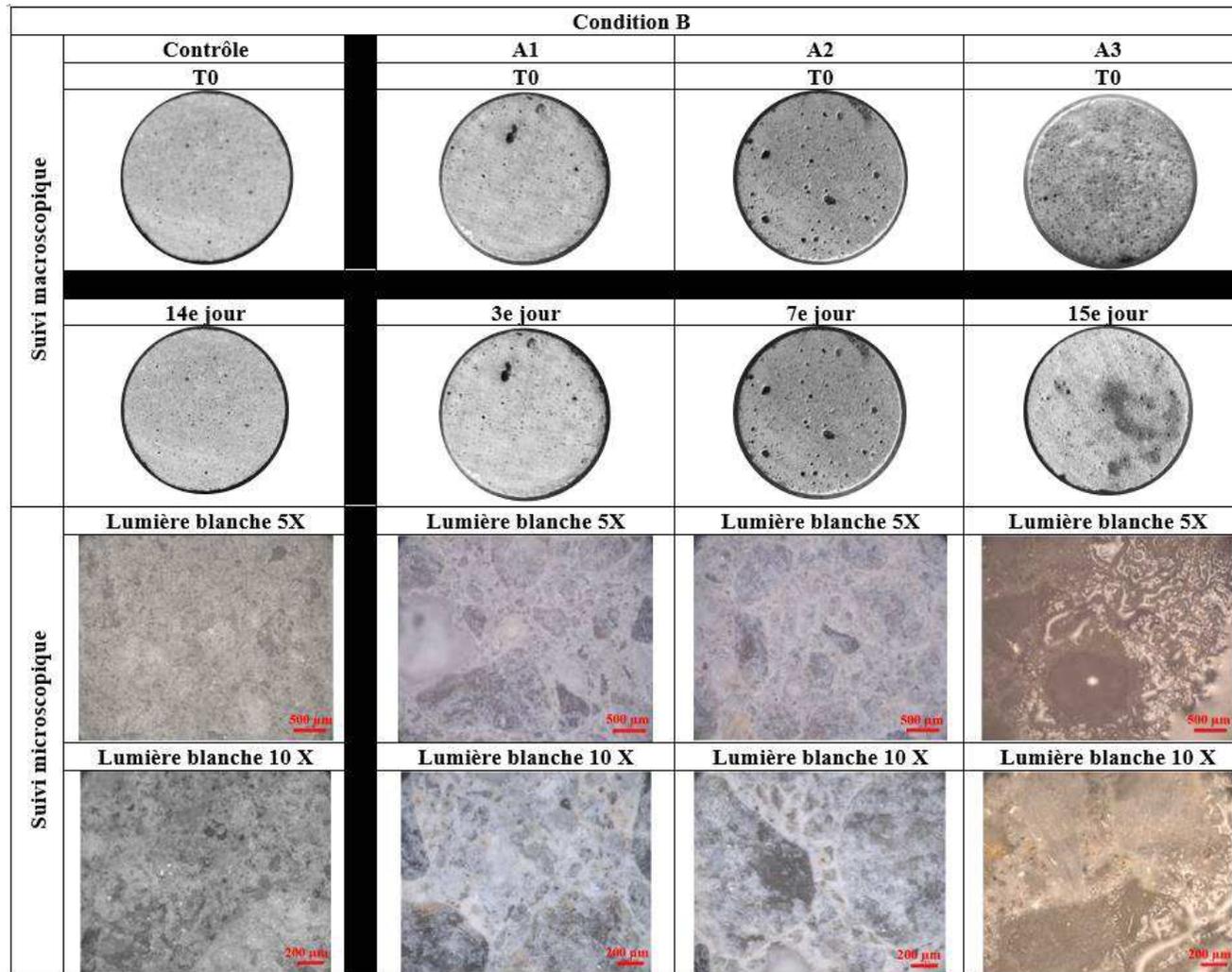


Figure 73. Suivi macroscopique et microscopique des mortiers préconditionnés par ajout de 3 mL de bouillon nutritif (condition B). La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.

À l'issue des observations microscopiques, 1 mL de violet de gentiane a été ajouté à la surface des disques (Figure 74 et Figure 75).

Le mortier contrôle a pris une couleur violet pâle, à peine visible avec la lentille du microscope à 5X. Pour les mortiers de la condition A et B, des points violet foncé ont été observés à partir du 3^e jour d'incubation. Le nombre de points a augmenté au fur et à mesure de l'allongement de l'incubation, ainsi les mortiers après 15 jours d'incubation présentent le plus grand nombre de points violet.

En observant les points de couleur violette au microscope optique avec l'objectif 100X, il a été observé que ceux-ci correspondent à des agglomérats cellulaires.

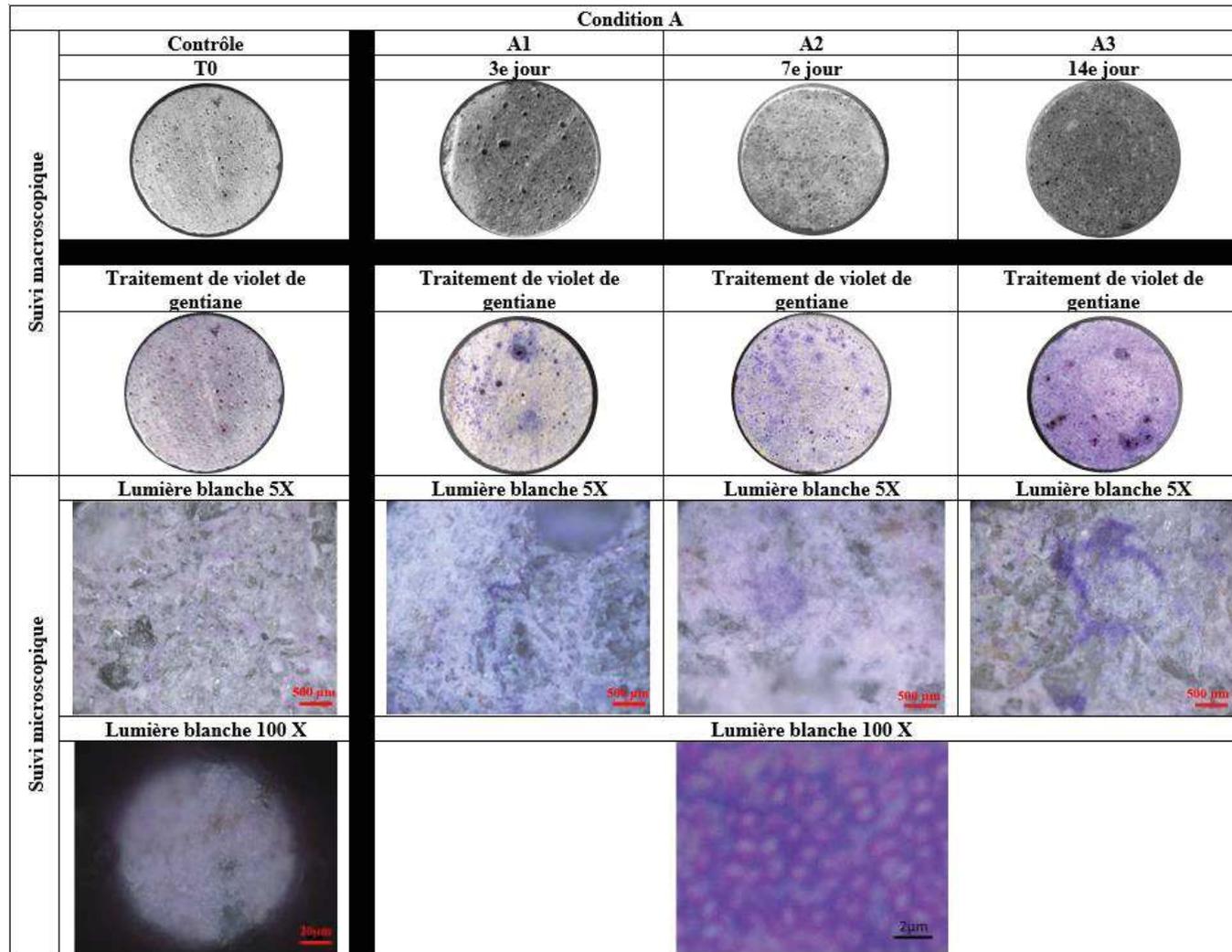


Figure 74. Mortiers préconditionnés par immersion dans du bouillon nutritif (condition A) traités avec du colorant violet de gentiane.

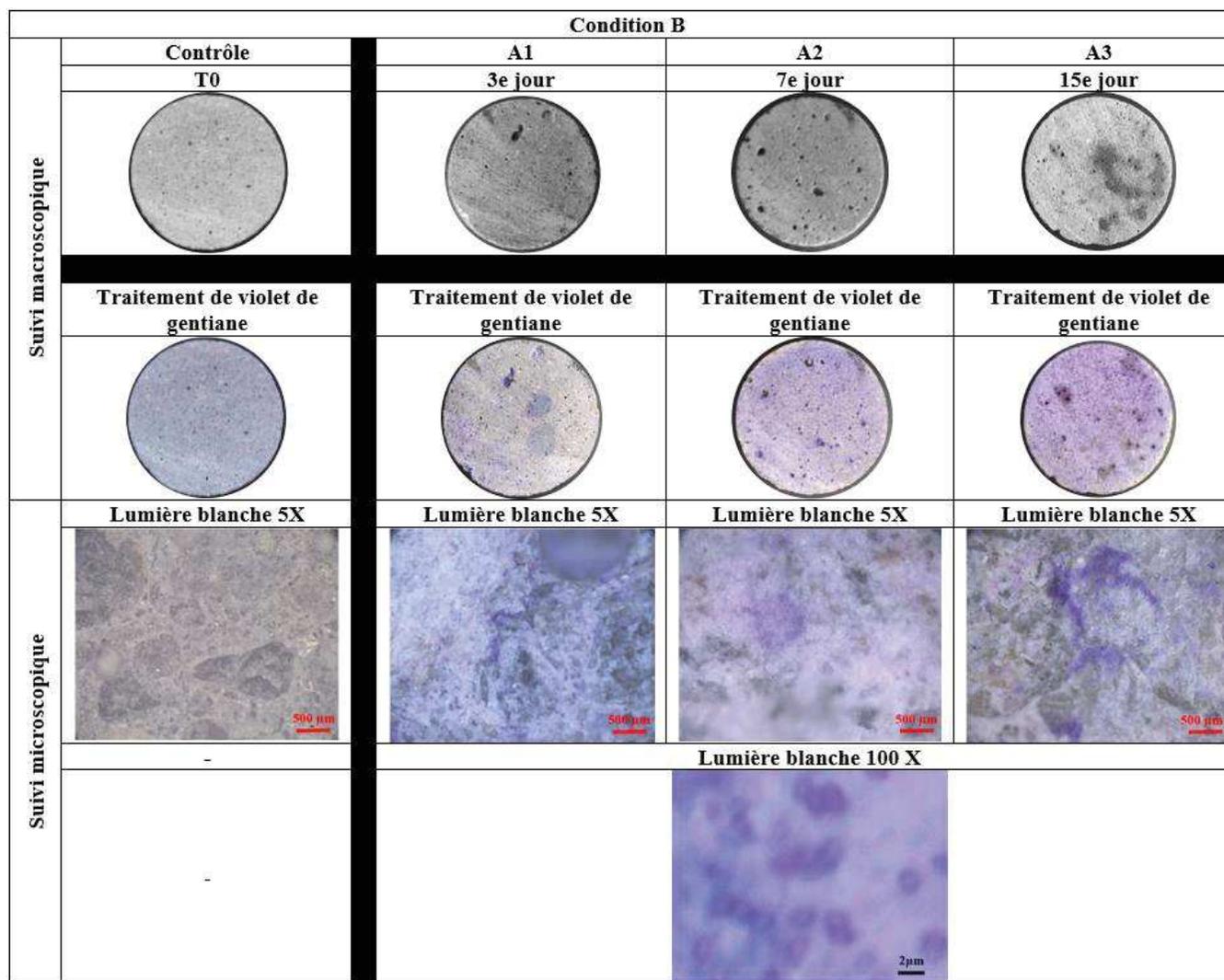


Figure 75. Mortiers préconditionnés par ajout de 3 mL de bouillon nutritif (condition B) traités avec du colorant violet de gentiane.

1.1.3. Discussion et conclusion

Seuls les mortiers inoculés avec B.H ont retenu l'humidité une fois sortis de l'incubateur. Cette rétention était de 6 minutes, tandis que la surface des mortiers témoins a séché en 2-3 minutes.

Les observations microscopiques ont permis de constater qu'un biofilm est présent dans les zones où l'humidité est retenue. Ce résultat provient d'une des propriétés du biofilm dont le rôle est de protéger les cellules de la dessiccation [1]. La rétention d'humidité peut donc être un moyen macroscopique simple et qualitatif d'identifier la présence d'un biofilm.

Les mortiers préconditionnés par immersion dans le bouillon nutritif ont présenté des zones de conservation d'humidité plus importantes et plus résistantes à la dessiccation que les mortiers ayant reçu que 3 mL de bouillon nutritif, cela indique a priori que la technique d'immersion permet d'apporter plus de nutriments essentiels au bon développement de B.H.

L'application du colorant, violet de gentiane, a permis d'observer des cellules bactériennes sur les mortiers inoculés après 3, 7 et 15 jours d'incubation. Cette coloration est plus importante lors des observations faites au 15e jour, ce qui peut être lié à l'ajout de B.H au 7e jour, cette piste doit être développée. En effet, les bactéries inoculées à T0 auraient pu conditionner la surface pour leur développement, de sorte que les bactéries inoculées plus tard au 7e jour ont étéensemencées sur une surface préconditionnée, ayant un environnement favorable à leur développement.

En conclusion, la rétention d'humidité des mortiers est un signe macroscopique de la présence de biofilm, cela permet dans un premier temps de déterminer le niveau et l'homogénéité de la colonisation sur les mortiers avant d'ajouter l'acétate de calcium. L'immersion des mortiers dans le bouillon nutritif permet de couvrir les besoins nutritionnels de B.H et ainsi permettre la formation d'un biofilm uniforme.

L'ajout au bout de 7 jours, de B.H semble avoir permis de couvrir la surface du mortier par un biofilm. L'ensemencement multiple de la surface des mortiers va être exploré dans la partie suivante.

1.2. Ensemencement répété de B.H sur mortier

Dans la section précédente, un biofilm homogène a été formé avec succès sur un disque de mortier. Nous avons souligné que le fait d'avoir immergé initialement l'ensemble du mortier avec du bouillon nutritif favorise la disponibilité des nutriments pour B.H. De plus, on a suggéré qu'il est possible que la première inoculation ait servi à conditionner la surface de telle sorte que lors de la deuxième inoculation (quelques jours plus tard), il y avait de meilleures conditions pour le développement microbien. Sur la base de ces deux hypothèses, il a été décidé de mettre en œuvre un nouveau protocole d'ensemencement respectant les points suivants :

- (i) Utiliser la technique d'apport de nutriments initial par immersion pour reproduire la formation d'un biofilm uniforme
- (ii) Augmenter le nombre d'inoculations de B.H pendant leur incubation pour observer si cette action accélère le processus de formation du biofilm
- (iii) Renouveler les nutriments en ajoutant 3mL du bouillon nutritif avant d'ensemencer B.H.

L'expérimentation a été réalisée en tenant compte du fait que :

- (i) la rétention d'humidité est un signe macroscopique de la présence de de biofilm
- (ii) le biofilm retient l'humidité à la surface d'un mortier pendant une période supérieure à 6 minutes
- (iii) les mortiers sans bactéries retiennent de l'humidité à leur surface pendant une période inférieure à 3 minutes.

1.2.1. Matériel et Méthodes spécifiques

Dans une hotte microbiologique, 6 disques (M1, M2, M3, M4, M5 et contrôle) ont été placés dans un récipient avec 2L de bouillon nutritif à pH 11. Après 4 h d'immersion, ils ont été retirés et placés sur un chiffon humidifié à l'eau distillée stérile. Immédiatement, 3mL d'une suspension mère de B.H ont été ensemencés sur les mortiers M1, M2, M3, M4 et M5. Après inoculation, tous les mortiers (le mortier contrôle inclus) ont été incubés pendant 15 jours. Tous les 3 ou 4 jours, les mortiers ont été retirés de l'incubateur et conservés à l'intérieur de la hotte pendant 6 minutes, ensuite une photographie de leur surface était prise. Avant de remettre les mortiers dans l'incubateur, 3mL de bouillon nutritif ont été ajoutés à leur surface, pour

renouveler les nutriments, et après 15 minutes ils ont été re-ensemencés avec 3 mL d'une suspension mère de B.H. Au total, B.H a été ajouté 4 fois (Tableau 14). Le suivi photographique est présenté en échelle de gris (outil Word, contraste : 0%, luminosité -20%) pour mieux apprécier la rétention d'humidité.

Tableau 14. Concentration cellulaire ajoutée à la surface des mortiers en 4 échéances.

Inoculation	Suspension mère (UFC·mL⁻¹)	Innoculum (UFC·cm⁻²)
T0	1,4 X 10 ⁸	1.5 X 10 ⁷
3e jour	1,5 X 10 ⁸	1.6 X 10 ⁷
7e jour	2,2 X 10 ⁸	2.3 X 10 ⁷
10e jour	6,3 X 10 ⁸	6.7 X 10 ⁷

1.2.2. Résultats

Le suivi de la rétention d'humidité des mortiers, après 6 minutes en dehors de l'incubateur, est représenté dans la Figure 76.

Comme attendu, le mortier de contrôle n'a montré aucun signe de rétention d'humidité pendant les 15 jours d'incubation.

Au 3e jour les mortiers M2 et M5 ont retenu l'humidité de manière presque uniforme, tandis que les mortiers M1, M3 et M4 ont retenu l'humidité de manière localisée, principalement autour des pores. La rétention d'eau est donc plus précoce que dans l'expérience précédente. Ceci peut être probablement expliqué par le fait que dans cette manipulation on a inoculé environ 5 fois plus de bactéries à la surface du mortier à T0 (1,5 x 10⁷ UFC·cm⁻² au lieu de 3,2 x 10⁶ UFC·cm⁻²).

À partir du 7e jour, une rétention quasi homogène des mortiers M2, M4 et M5 a été observée, alors que les mortiers M1 et M3 présentaient encore quelques zones sèches. On peut y voir l'effet conjugué d'un apport initial de bactéries à T0, mais également de l'apport secondaire de bactéries à 3 jours.

Dès le 10^e jour d'incubation avant la dernière inoculation, la rétention d'humidité était complètement uniforme indiquant que le biofilm avait recouvert l'ensemble de la surface des 5 mortiers. A 15 jours le biofilm semblait plus épais.

En conclusion, on a formé dans cette expérience un biofilm homogène en surface des mortiers plus rapidement (entre 7 et 10 jours) que dans la manipulation précédente et le biofilm paraissait plus épais à l'échéance des 15 jours. Toutefois il est difficile de savoir si cela est imputable à l'augmentation de la quantité d'UFC·cm⁻² inoculés initialement à T0, à l'augmentation de la quantité totale d'UFC inoculée ou à la répartition temporelle des inoculations, voire une combinaison de ces facteurs.

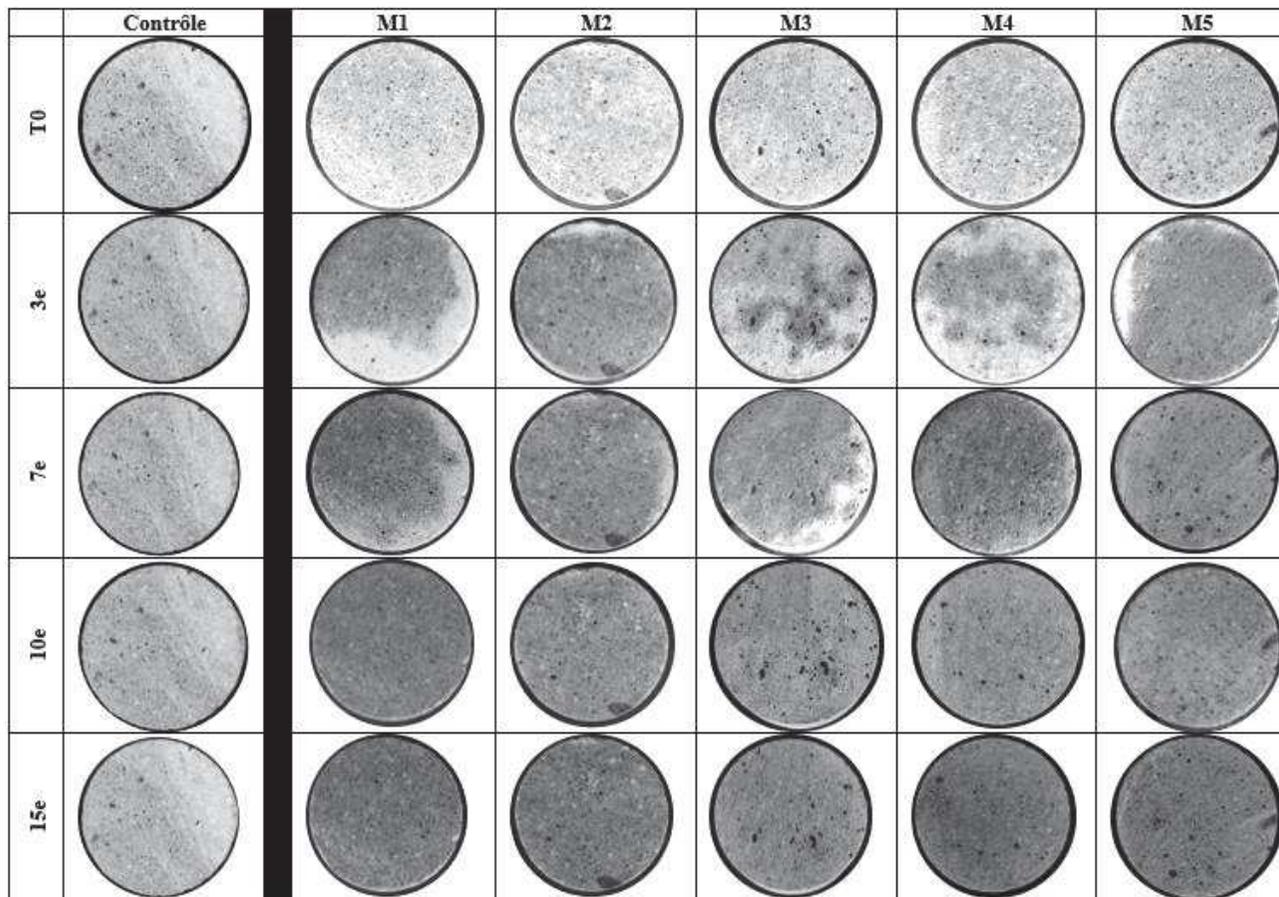


Figure 76. Suivi photographique de la rétention d'humidité. Les photos ont été prises 6 minutes après avoir la sortie des mortiers de l'incubateur. La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm

1.3. Optimisation de la technique d'inoculation de B.H sur les mortiers

Sur la base des résultats précédents, nous nous posons la question de savoir si pour une quantité de bactéries globalementensemencées constante, la temporalité des ensemencements, a une influence sur la vitesse de formation du biofilm.

1.3.1. Matériel et Méthodes spécifiques

Dans cette expérience, nous avons mis en place trois conditions. Dans chaque condition, 5 mortiers ont été utilisés. Tous les mortiers ont été préconditionnés en les immergeant dans du bouillon nutritif pendant 4h.

On a établi 3 conditions :

Dans la condition A, 12 mL (1×10^7 UFC·cm⁻²) d'une suspension mère ont été inoculés, en ajoutant 3 mL, 4 fois avec un intervalle de 30 minutes.

Dans la condition B, 6 mL (5×10^6 UFC·cm⁻²) de la suspension mère ont été inoculés à T0, en ajoutant 3 mL, 2 fois avec un intervalle de 30 minutes. Puis, au 6e jour d'incubation, 6 mL (2×10^5 UFC·cm⁻²) de B.H ont été re-inoculés. Au total, 5.2×10^6 UFC·cm⁻² ont été ensemencés.

Dans la condition C, la suspension mère de B.H a été inoculée en 4 fois (à T0 avec $2,5 \times 10^6$ UFC·cm⁻², puis 3 ajouts supplémentaires au 3e, 6e et 10e jour, avec 2×10^6 UFC·cm⁻², 1×10^5 UFC·cm⁻² et 8.3×10^5 UFC·cm⁻² respectivement). Au total 5.4×10^6 UFC·cm⁻² ont été ajoutés.

Pendant la période d'incubation, un suivi photographique journalier a été effectué 6 minutes après avoir sorti les disques de l'incubateur. Après avoir photographié les mortiers, et remarqué que leur surface était plus sèche que lorsqu'ils étaient dans l'incubateur, nous avons décidé que pour réincuber les mortiers, il fallait ajouter 3 ml de milieu nutritif à leur surface. Ceci, en plus de réhumidifier la surface, a renouvelé les nutriments. Dans le cas des conditions B et C, le bouillon nutritif a été ajouté après la prise de la photographie et avant l'inoculation avec B.H. Les photographies des mortiers sont présentées en échelle de gris. (Outil Word, contraste : 0%, luminosité - 40%).

1.3.2. Résultats

La Figure 77 montre les photographies d'un mortier parmi les 5 de chaque condition. Ce mortier montre de manière représentative ce qui est observé dans tous les mortiers dans leurs conditions respectives.

- (i) Au 3^e jour d'incubation : les mortiers de la condition A (inoculé à T0 avec 1×10^7 UFC·cm⁻²) présentaient un biofilm fin, mais uniforme à leur surface, les mortiers de la condition B (au T0, inoculé avec 5×10^6 UFC·cm⁻²) présentaient des traces de biofilm dans les pores et les mortiers de la condition C (au T0 inoculé avec $2,5 \times 10^6$ UFC·cm⁻²) avaient un biofilm distribué de façon hétérogène.
- (ii) Au 4^e jour d'incubation, les mortiers des conditions A et C ont retenu l'humidité de manière uniforme, alors que le mortier B l'a retenu à nouveau de manière hétérogène. Il convient de mentionner qu'à ce point, les mortiers de la condition C avaient été inoculés une deuxième fois avec 2×10^6 UFC·cm⁻².
- (iii) Au 7^e jour, les mortiers des conditions A et C renaient l'eau de façon marquée et homogène à la surface des mortiers. Sur le mortier B la rétention était nettement moins marquée bien qu'homogène également.
- (iv) Entre le 7^e et 14^e jour d'incubation, tous les mortiers ont retenu de l'humidité uniformément. Cependant, les mortiers de la condition A présentaient la plus forte humidité sur leur surface.

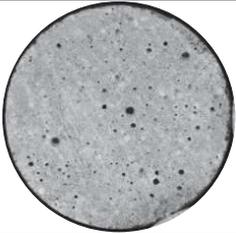
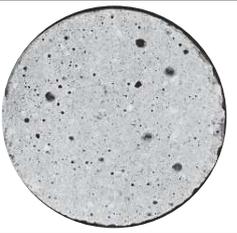
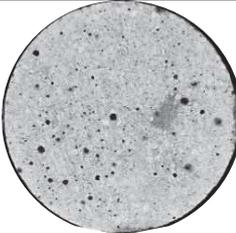
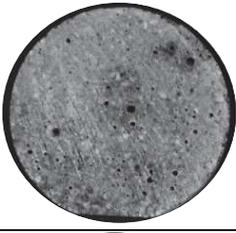
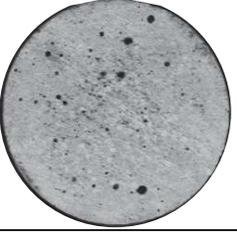
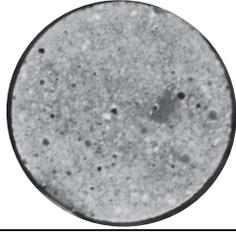
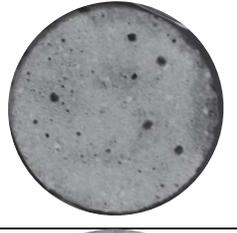
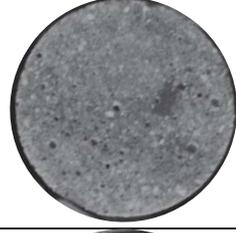
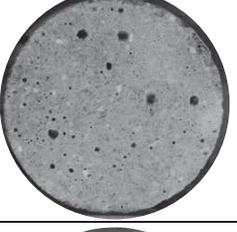
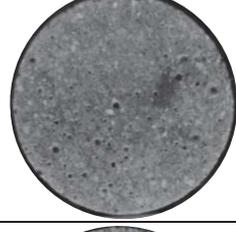
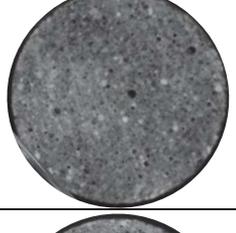
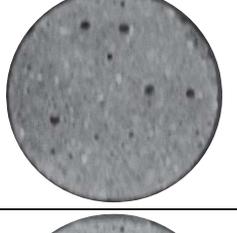
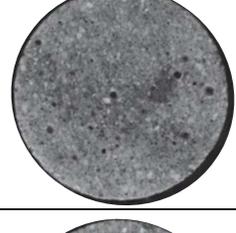
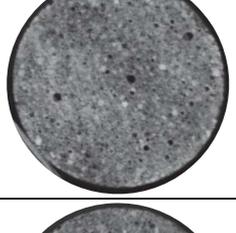
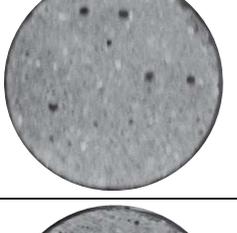
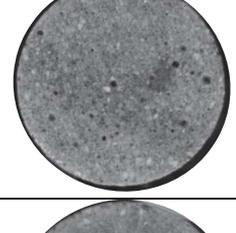
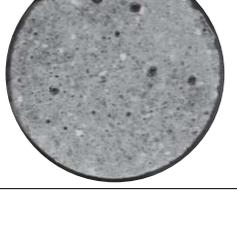
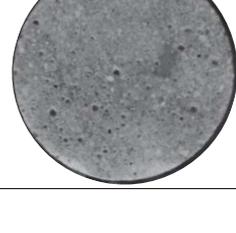
	Condition A	Condition B	Condition C
T0			
3e			
4e			
6e			
7e			
10e			
14e			

Figure 77. Suivi photographique de la rétention d'humidité d'un des mortiers des conditions A, B et C. La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm

1.3.3. Discussion et conclusion

Nous voulions ensemercer les mortiers des 3 conditions avec la même quantité d'innoculum total. Toutefois, la deuxième suspension mère s'est avérée anormalement moins concentrée qu'attendue. Nous avons donc obtenu des ensemencements globaux du même ordre de grandeur mais notablement différents : 1×10^7 UFC·cm⁻², $5,2 \times 10^6$ UFC·cm⁻² et $5,4 \times 10^6$ UFC·cm⁻² respectivement pour les contions A, B et C. Ceci rend la comparaison des 3 conditions difficiles.

Les résultats suggèrent néanmoins qu'il y a intérêt à privilégier une inoculation en une seule fois à T0 et non pas à répartir l'inoculation sur plusieurs échéances. En effet, la condition A, pour laquelle toutes les bactéries ont été inoculées à T0 a donné le biofilm homogène le plus précoce au bout de 3 à 4 jours, montrant une rétention d'humidité plus élevée que dans les autres conditions, au 14e jour d'incubation.

La précocité et l'épaisseur du biofilm semblent donc être favorisées par une forte teneur en UFC·cm⁻² à T0. Il est donc surprenant de constater que lors de la deuxième expérience dans laquelle on avait inoculé les mortiers à T0 avec $1,5 \times 10^7$ UFC·cm⁻², on constate un biofilm homogène plus tardif (entre 7 et 10 jours) que dans la condition A de la dernière expérience pour laquelle le biofilm homogène apparaît plutôt entre 4 et 7 jours alors que l'on n'a inoculé que 1×10^7 UFC·cm⁻², soit 1,5 fois moins d'UFC. L'explication se trouve peut-être dans le fait que dans la dernière expérience, du bouillon nutritif était ajouté chaque jour en surface, contrairement aux expériences précédentes.

Maintenant que nous sommes capables d'établir un biofilm uniforme à la surface d'un mortier, il faut tester sa capacité à produire des CaCO₃.

2. Précipitation de CaCO₃ à la surface des mortiers

Les objectifs généraux des manipulations de cette section sont : (i) de vérifier la formation de CaCO₃ à la surface des mortiers, et (ii) estimer l'apport d'un tel traitement sur l'absorption en eau des mortiers qui est l'objectif final et opérationnel de ce travail.

2.1. Essai préliminaire d'une couche de carbonate de calcium sur mortier

La première expérience s'est attachée à vérifier la présence et l'adhérence d'une couche de CaCO₃ à la surface d'un mortier.

2.1.1. Matériel et Méthodes spécifiques

À l'issue de la formation d'un biofilm homogène à la surface des mortiers de la condition A de la manipulation précédente, un des cinq mortiers a été utilisé pour mener à bien cet essai. À la fin de l'incubation de 14 jours, une fois le biofilm formé, 1.5 mL d'une solution d'acétate de calcium à $350 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0,019 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ont été ajoutés au mortier de la condition A. Ensuite le mortier a été incubé pendant 10 jours à 100% d'humidité relative et température ambiante.

La quantité d'acétate de calcium ajoutée était suffisante pour former idéalement une couche de $44 \mu\text{m}$ (équation 20 et 21). Rappelons que pour cela on fait l'hypothèse qu'une mole d'acétate de calcium produit une mole de CaCO_3 et que l'on considère qu'il y a assez de bactéries pour que tout l'acétate soit consommé, comme expliqué dans le chapitre 2, 6 .3).

$$F \text{ (g)} = \frac{A \cdot S_m}{MA} \times MC \quad 20$$

Où :

A représente la masse en grammes par cm^2 d'acétate de calcium ajouté

F représente la masse en grammes de CaCO_3 formable si toutes les moles d'acétate de calcium ajoutées sont utilisées pour former du CaCO_3

S_m représente la surface du mortier de 28.27 cm^2

MA représente la masse molaire de l'acétate de calcium ($158 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

MC représente la masse molaire du CaCO_3 égal à ($100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

$$E = \frac{F}{S_m \cdot (\rho \text{ CaCO}_3)} \times 10000 \quad 21$$

Où :

E représente l'épaisseur de la couche de CaCO_3 formable en μm

$\rho \text{ CaCO}_3$ représente la masse volumique du CaCO_3 de $2.71 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Pour déterminer si les précipités étaient bien adhérents au mortier, la surface traitée a été lavée avec de l'eau distillée à l'aide d'une brosse à dents, après incubation. On a ciblé au préalable une zone du mortier, afin de l'observer avant et après le lavage au MEB. Une caractérisation MicroRaman des précipités a également été faite après le lavage de la surface.

2.1.2. Résultats

Dans la Figure 78 on présente les photographies de la surface d'un mortier non traité et celle du mortier traité de la condition A. Sur le mortier non traité, il est possible de distinguer les granulats et la pâte cimentaire qui le composent, alors que sur le mortier A, on trouve des précipités qui recouvrent et opacifient la surface du mortier. On peut ainsi constater que lorsqu'on ajoute de l'acétate de calcium sur un mortier avec un biofilm homogène, on obtient un dépôt de CaCO_3 qui semble être uniforme.

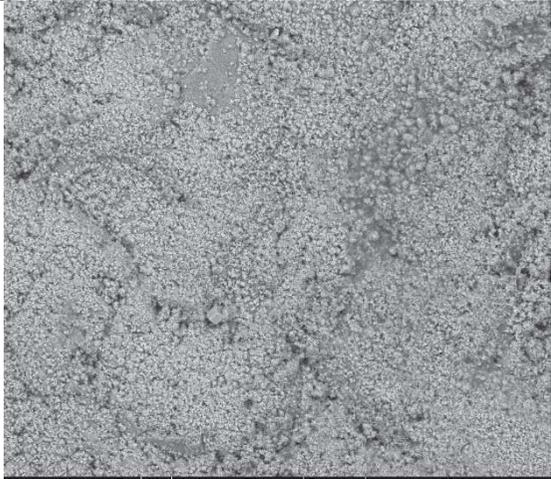


Figure 78. Comparaison de la surface d'un mortier non traité et de celle du mortier A traité avec B.H et de l'acétate de calcium.

Sur la Figure 79 on présente une zone du mortier A, observée avant et après lavage. On constate que le lavage élimine une partie des précipités de la surface, cependant une quantité non négligeable continue d'adhérer au mortier. Le fait qu'une partie du CaCO_3 ait été enlevée nous fait réfléchir sur le fait que le biofilm, spécifiquement son épaisseur, pourrait être un obstacle à l'adhésion du CaCO_3 bioprécipité.

Après le lavage, on a observé la présence de structures en forme d'aiguille, visibles sur les images aux grossissements 600X et 2400X. Il n'est pas possible de dire si ces structures se

sont formées au contact de l'eau distillée (pendant le lavage) ou s'elles se trouvaient en dessous des précipités éliminés par le lavage. En utilisant l'analyse Micro RAMAN, on a pu déterminer que ces structures en aiguille sont de la calcite mais accompagné une phase minérale inconnue (avec des pics à 1086, 714 et 280 cm^{-1}).

Observations MEB du Mortier A	
Grossissement 80X – Avant lavage	Grossissement 80X – Après lavage
 <p>Mag HV WD Sig Spot File Pressure 1.0mm 80x 20.0 kV 13.0 mm BSE 5.0 mortier C1_1.tif 0.75 Torr</p>	 <p>Mag HV WD Sig Spot File Pressure 500.0µm 80x 20.0 kV 13.0 mm BSE 5.0 mortier C1_rincer_1.tif 0.75 Torr</p>
Grossissement 600X – Avant lavage	Grossissement 600X – Après lavage
 <p>Mag HV WD Sig Spot File Pressure 100.0µm 600x 20.0 kV 13.0 mm BSE 5.0 mortier C1_3.tif 0.75 Torr</p>	 <p>Mag HV WD Sig Spot File Pressure 100.0µm 600x 20.0 kV 13.0 mm BSE 5.0 mortier C1_rincer_3.tif 0.75 Torr</p>

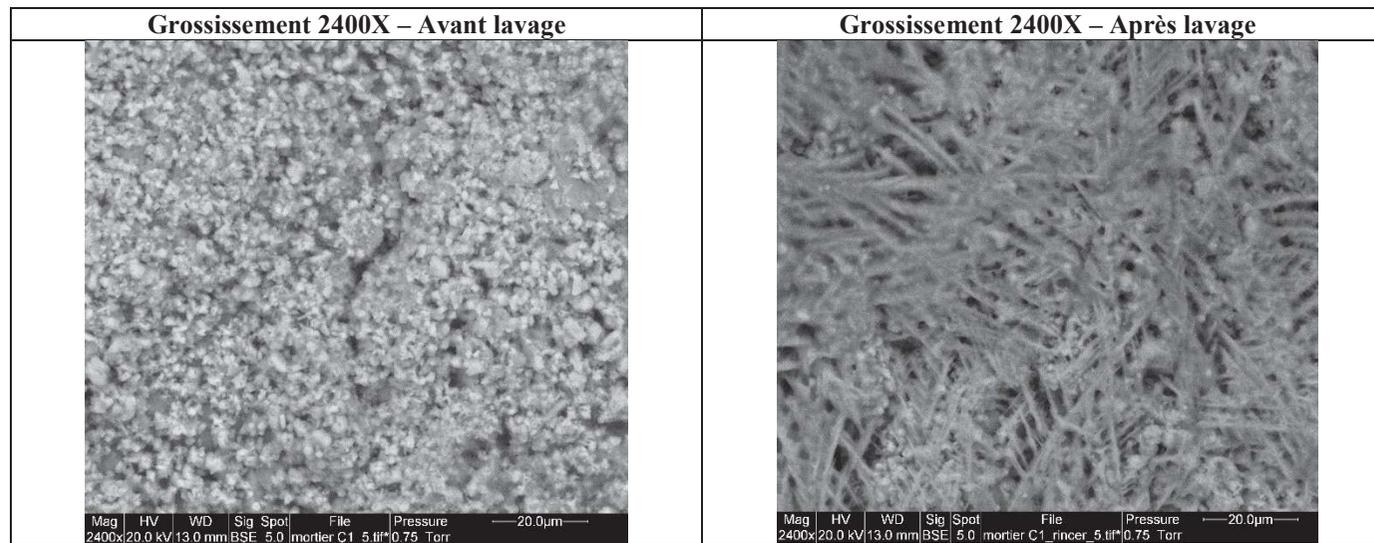


Figure 79. Images MEB à différentes amplitudes de la surface du mortier A, avant et après avoir été lavée avec de l'eau distillée et une brosse à dents.

2.1.3. Conclusion

En conclusion, nous avons pu constater qu'après avoir ajouté de l'acétate de calcium ($0,019 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) à un biofilm uniforme de B.H, sur mortier, on a obtenu un dépôt important de CaCO_3 .

Bien que qualitativement, une quantité significative de CaCO_3 ait été enlevée de la surface par le lavage, les précipités restant attachés semblent répartis de façon assez uniforme à la surface. Ceci est encourageant quant à la possibilité de créer une couche homogène en réalisant plusieurs fois le traitement.

Sur la base des résultats de ce test préliminaire, nous pouvons maintenant nous concentrer sur la mise au point d'un protocole pour optimiser la formation de la couche de CaCO_3 à la surface des mortiers, et mesurer son efficacité pour diminuer leur absorption.

2.2. Essai d'application de multicouches de CaCO_3 sur gélose

Comme suggéré dans la manipulation précédente et dans la bibliographie [5], compte tenu du fait qu'une quantité notable de CaCO_3 précipitée sur le mortier est été enlevée lors du lavage, la répétition du traitement pourrait permettre d'accumuler suffisamment de CaCO_3 pour former une couche homogène. Cependant, avant de travailler sur mortier, nous avons décidé de réaliser une première analyse sur gélose, pour évaluer la production effective de CaCO_3 au cours de quatre traitements successifs.

2.2.1. Matériel et Méthodes spécifiques

Au total, 12 géloses nutritives de 13,5 cm de diamètre ont été utilisées. Elles ont dans un premier temps toutes été inoculées avec 275 μL ($3,8 \times 10^4 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) d'une suspension mère de B.H ($2 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$) puis ont été incubées 1 jour à 30°C jusqu'à apparition d'un biofilm homogène. Ensuite, 12,5 mL d'acétate de calcium à 175 g L^{-1} ($1,5 \times 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ont été ajoutés et les géloses ont été incubées pendant 5 jours supplémentaires. La quantité d'acétate de calcium ajoutée était celle nécessaire pour former théoriquement 1,4 g de carbonate de calcium par gélose (soit $1 \times 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$, soit une couche de 28 à 30 μm), considérant un rendement de production de 97% comme démontré dans le chapitre 6, 4. À la fin du premier cycle, 3 cultures ont été prélevées pour quantifier le CaCO_3 réellement précipité par ATG. Le traitement a été répété sur les géloses restantes jusqu'à l'application du quatrième cycle. La concentration du dépôt bactérien est resté constante lors des cycles 2, 3 et 4, à savoir $2 \times 10^7 \text{ CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$.

2.2.2. Résultats et discussion

Dans le graphique de la Figure 80, on peut voir que lors de l'application du premier cycle, 0,7 g de CaCO_3 a été produit en moyenne (alors que l'on attendait 1,4 g théoriquement), ce qui était suffisant pour former une couche théorique de 18 μm . On obtient alors un rendement d'environ 50%. Ce résultat contraste avec celui obtenu au chapitre 6.4, où avec la même quantité d'acétate de calcium, 97% de celui-ci était transformé en CaCO_3 . Après l'application du 2e traitement, la production de CaCO_3 a baissé de 25 %, conduisant à une couche théorique de 13 μm supplémentaire. Lors du 3e cycle, la production a de nouveau baissé de 38 % par rapport au 1e cycle, ce qui a formé une couche théorique supplémentaire 11 μm . Il a été observé que la production semble se stabiliser dans la quatrième application. Cette perte de production pourrait être due aux points suivants:

- Le temps de formation du biofilm était de 1 jour au lieu de 3 jours (comme dans les expériences précédentes).
- Les déchets de bactéries produits au cours de leur développement dans le 1^{er} cycle ont limité la croissance des autres inoculats ajoutés ultérieurement. On suggère de laver la surface après l'application de chaque cycle, afin d'éliminer les éventuels contaminants.
- Les couches néoformées de CaCO_3 ont limité l'accès aux nutriments de la gélose lors des nouveaux traitements. Cela pourrait être compensé par l'ajout de nutriments lors de l'ensemencement.

En cumulé le CaCO_3 produit à l'issue de la deuxième, troisième et quatrième application, est suffisant pour former des couches théoriques de 31 μm , 42 μm et 54 μm respectivement.

Malgré une diminution de la production, l'application de traitements multiples permettrait donc bien d'augmenter la quantité de CaCO_3 précipité, aidant à homogénéiser la couche formée.

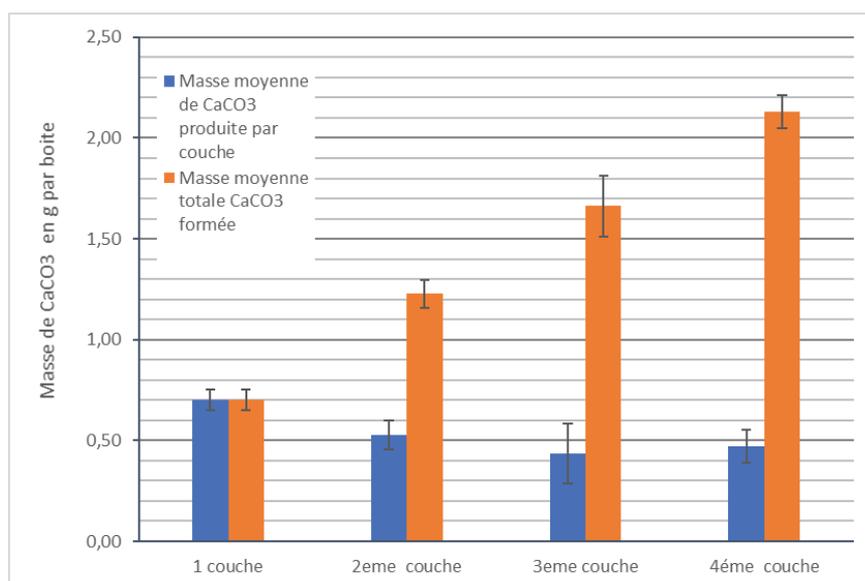


Figure 80. Quantité de CaCO₃ produite en moyenne par gelose de 13,5 cm de diamètre, lors des 4 traitements de bioprécipitation. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type observé sur les 4 triplicats respectivement.

2.3. Estimation de l'efficacité du traitement de bioprécipitation sur mortier modèle

Les objectifs de cette manipulation sont de:

- (i) Évaluer l'efficacité du traitement pour former une couche homogène de CaCO₃ suite à l'application de 1 ou 2 traitements.
- (ii) Effectuer une mesure de l'absorption d'eau, sur les mortiers traités, pour voir si elle est réduite après le traitement et ainsi apprécier l'efficacité du traitement.

2.3.1. Matériel et Méthodes spécifiques

2.3.1.1. Disques de mortier résinés pour l'analyse d'absorption d'eau

Un des moyens macroscopiques de qualifier l'efficacité du traitement par les bactéries sur les granulats recyclés est de mesurer la diminution de leur absorption d'eau telle que mesurée par la norme NF EN 196-1 2016 [2]. Si l'on veut qualifier au préalable cette efficacité sur des disques de mortier, il est donc nécessaire de mettre en place un protocole d'absorption pertinent adapté à ce type d'échantillon.

Il est difficile d'assurer des conditions d'exposition à l'environnement des bactéries identiques sur les deux surfaces d'un disque de mortier, à moins de le mettre sur la tranche,

mais ceci pose des problèmes pratiques. Il semble donc nécessaire que les disques de mortier ne soient traités que sur leur face supérieure.

L'absorption d'un granulat mesure la quantité d'eau absorbée par unité de masse sèche du granulat. On considère que lors d'essai d'absorption, le granulat est saturé jusqu'au cœur. On considère que c'est également le cas pour le disque de mortier. Dans ces conditions, un disque d'épaisseur h exposé sur une seule de ces faces, est représentatif d'un granulat de diamètre $2h$. Avec les moyens à notre disposition au laboratoire, il était difficile de scier des disques avec une épaisseur inférieure à 4 mm. Une telle épaisseur est d'après ce qui précède représentative d'un granulat de 8 mm. Ceci est raisonnable pour une première évaluation du traitement que l'on souhaite *in fine* appliquer plutôt à des sables de béton recyclé.

Afin d'avoir une seule surface exposée des disques, le reste de la surface est donc recouvert de résine. Pour nous assurer que la résine n'absorbe pas d'eau et ne perturbe pas les mesures d'absorption d'eau du mortier lui-même, nous avons vérifié que :

- une pastille de résine n'absorbe pas d'eau,
- un disque de mortier entièrement recouvert de résine n'absorbe pas d'eau,
- la résine couvrant un mortier ne se dégrade pas pendant les périodes de séchage à 60 °C nécessaires à la mesure de l'absorption d'eau, et qu'elle n'absorbe pas d'eau après un tel traitement.

Les cylindres utilisés pour la fabrication de ces disques ont été préparés comme décrit dans le Chapitre 2 : 7. Après la période de cure de 28 jours, les cylindres ont été séchés pendant 1 semaine à 60°C, puis ils ont été complètement résinés. Le séchage avait pour but d'assurer une bonne adhérence avec les mortiers. Deux couches fines de résine ont été appliquées à 3 h d'intervalle à l'aide d'un pinceau, permettant la formation d'une couche d'environ 100 μm sur l'ensemble de l'éprouvette (Figure 81). La résine est préparée en mélangeant 25 g de résine époxy (EpoFix, Struers) avec 3 g de durcisseur.

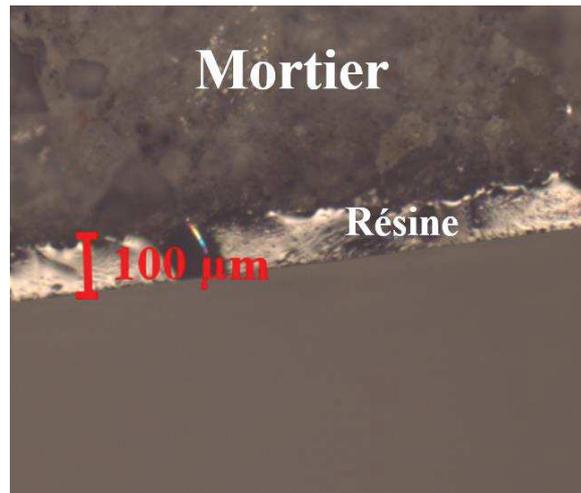


Figure 81. Couche de résine appliquée sur différentes surfaces du mortier. Observé au microscope optique 5X.

Nous avons résiné d'un seul bloc les cylindres pour des raisons de facilité, mais également pour éviter que des bavures ne viennent couler sur les surfaces planes des cylindres et ainsi modifier l'exposition de ces surfaces à l'eau. Les cylindres ainsi résinés ont été laissés à sécher pendant 2 jours, puis ont été sciés à l'eau pour former des disques. Les disques sont ensuite mis dans une enceinte à 60°C pendant 1 jour et jusqu'à masse constante. La masse obtenue à ce stade est notée M_1 (masse des mortiers secs avec juste la tranche résinée).

Ensuite, deux couches de résine sont appliquées au pinceau sur l'une des surfaces du disque, de cette façon, les disques n'ont ainsi qu'une seule surface exposée sans résine. La résine sur les mortiers est laissée à durcir à température ambiante pendant 2 jours. Les disques sont alors séchés à 60°C pendant 3 jours, jusqu'à masse constante. Afin de s'assurer de la constance de la masse, les disques sont pesés 5 fois à un intervalle de 1h. Selon la norme NF EN 196-1 2016, les valeurs ne doivent pas varier de plus de 0,1 g. La dernière valeur est notée M_2 (masse des mortiers avec une face et la tranche résinées).

On déduit α la masse moyenne de résine ajoutée par unité de surface à l'aide de l'équation (22). On obtient ainsi $\alpha=1,46 \cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{mm}^{-2}$.

$$\alpha = \text{moyenne} \left(\frac{M_2 - M_1}{\frac{\pi D^2}{4}} \right) \quad 22$$

Où ;

M_1 est la masse du mortier résiné sur la tranche (g)

M_2 est la masse du mortier résiné sur la tranche et sur une face (g)

h est la hauteur du disque (mm)

D est le diamètre du disque (60 mm)

α est la masse moyenne de résine ajoutée par unité de surface $\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$. Cette valeur a été

La masse sèche de chaque disque de mortier hors résine M_m en grammes est finalement calculée avec l'équation 23.

$$M_m = M_1 - \alpha \pi h D \quad 23$$

Après avoir calculé la masse M_m des disques secs, ceux-ci sont immergés dans l'eau. On vérifie que la surface de l'eau soit toujours environ à 1 cm de la surface des disques, car on veut une pression constante pour ne pas introduire de biais dans la mesure d'absorption d'eau. En effet, plus la pression est élevée, plus l'eau pénètre le matériau.

Après 2 jours, les mortiers sont retirés de l'eau, puis à l'aide d'un chiffon, l'eau de la surface est essuyée jusqu'à avoir une surface d'aspect mat. À ce moment-là on est en condition saturée surface sèche comme définie dans la norme NF EN 196-1 2016 [2]. Les mortiers sont immédiatement pesés, ce qui permet d'obtenir la masse M_3 du mortier en condition saturée surface sèche (g). L'absorption de l'eau est alors calculée avec l'équation (24).

$$\% \text{ Absorption d'eau} = \frac{(M_3 - M_2)}{M_m} \cdot 100 \quad 24$$

2.3.1.2. Application du traitement de bioprécipitation

Lors des expériences de bioprécipitation sur gélose nutritive du Chapitre 6 : 4, il a été déterminé que l'ajout de $0,013 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium donnait un rendement de production de 97 %. C'est pourquoi il a été décidé d'ajouter la même quantité dans cette manipulation. Cette quantité d'acétate conduit théoriquement à une épaisseur de $30 \mu\text{m}$ de CaCO_3 . Deux conditions ont été établies (X et Y). Dans chaque condition, on a utilisé 5 mortiers pour le traitement de biocarbonatation, numérotés X1 à X5 et Y1 à Y5. La condition Y consistait à

répéter une seconde fois le traitement appliqué dans la condition X. Pour chaque condition, 4 mortiers de contrôle étaient réalisés pour s'assurer que d'éventuels effets sur l'absorption étaient dus à la bioprécipitation et non à un artefact. Sur le 1er mortier contrôle (noté CX-BH ou CY-BH), on a ajouté B.H seul, sur le 2e (noté CX-BN ou CY-BN) du bouillon nutritif, sur le 3e (noté CX-AC ou CY-AC) de l'acétate de calcium et sur le 4e (noté CX-SR ou CY-SR) rien n'a été ajouté.

Après avoir calculé l'absorption d'eau des mortiers X, Y et contrôles (avant de les traiter par bioprécipitation), la manipulation a commencé par la formation d'un biofilm homogène à la surface des mortiers X, Y et les contrôlesensemencés avec B.H seule. D'abord, on a d'abord préconditionné les mortiers résinés en les immergeant dans du bouillon nutritif pendant 4 h, puis en inoculant 12 mL (9.1×10^6 UFC \cdot cm⁻²) de la suspension mère de B.H (4 fois 3 mL à un intervalle de 30 minutes). Si et seulement si un biofilm homogène était présent à la surface, après 7 jours d'incubation, 2,1 mL de solution d'acétate de calcium à 175 g \cdot L⁻¹ (0,013 g \cdot cm²) étaient ajoutés aux mortiers X et Y, ainsi que sur les mortiers contrôle acétate de calcium. À cette occasion, la concentration d'acétate de calcium utilisée était de 175 g \cdot L⁻¹, car elle est plus facile à manipuler que celle à 350 g \cdot L⁻¹, qui est assez visqueuse.

Après l'ajout d'acétate de calcium, tous les mortiers ont été incubés pendant 10 jours. Ce premier traitement visait à former une couche de 30 μ m. À l'issue de ces 10 jours, les échantillons de la condition X et ses contrôles, ont été analysés. Pour cela, la surface des mortiers X et ses contrôles, ont été lavées avec de l'eau distillée et une brosse à dents, pour éliminer le carbonate de calcium non adhérent, la biomasse et l'acétate de calcium excédentaire. Le même traitement a ensuite été répété sur les mortiers de la condition Y après lavage à l'eau distillée la brosse à dent, afin d'essayer de former une couche supplémentaire d'épaisseur théorique de 30 μ m. Le deuxième ensemencement correspondait à une concentration cellulaire de 7.6×10^6 UFC \cdot cm⁻².

Des photographies de la surface des mortiers ont été prises 6 minutes après leur sortie de l'incubateur. À la fin du traitement, les mortiers X5 et Y5 ont été utilisés pour faire des observations au microscope optique. Le MEB a quant à lui été utilisé pour déterminer l'épaisseur de la couche de CaCO₃ déposée. Les observations au MEB du mortier X5 ont été faites 3 semaines et 4 jours après la formation de la couche de CaCO₃, en raison d'une panne du MEB. Afin de stopper l'activité microbienne à sa surface pendant cet intervalle de temps, la

surface du mortier X5 a été exposé à l'éthanol à 50 %, ensuite on l'a exposé à l'éthanol à 70 %, et une troisième fois avec de l'éthanol à 99 %, pendant une période de 30 secondes à chaque fois. Les observations du mortier Y ont été faites 4 jours après la formation de la couche de CaCO_3 , donc on a appliqué le même traitement à l'éthanol sur sa surface. Pour observer latéralement le dépôt de CaCO_3 , les mortiers ont été cassés en morceaux, à l'aide d'un marteau. Les morceaux de mortier d'une taille comprise entre 1 et 2 cm ont été récupérés et fixés à un support en métal (diamètre de 2 cm) avec de la colle au carbone. Ces échantillons ont été séchés pendant 2 h avant d'être observés au MEB. L'analyse des images pour estimer l'épaisseur des dépôts de CaCO_3 a été effectuée avec Image J. La matière retirée de la surface des mortiers après le lavage à la brosse à dent a été caractérisée par DRX.

Les mortiers restants ont servi à évaluer l'absorption d'eau.

2.3.2. Résultats et discussion

On présente ici des photographies des mortiers X5 et Y5, qui sont représentatives de ce qui a été observé sur tous les mortiers dans les mêmes conditions respectives.

Avant l'ajout d'acétate de calcium à la surface des mortiers X et Y, on a observé qu'à 7 jours d'incubation, ceux-ci avaient bien une rétention d'humidité uniforme de plus de 6 minutes en dehors de l'incubateur (Figure 82), y compris les mortiers de contrôle avec B.H. Ceci traduit, comme expliqué précédemment dans le paragraphe 1 du présent chapitre, la présence d'un biofilm homogène. Les photographies des mortiers de contrôle X et Y avant d'être lavés, sont affichées dans la Figure 83. On constate bien l'absence de biofilm sauf en présence de BH.

T0	Mortier X5 Biofilm uniforme au 7e jour d'incubation avant d'ajouter l'acétate de calcium dans le 1e cycle du traitement
	
T0	Mortier Y5 Biofilm uniforme au 7e jour d'incubation avant d'ajouter l'acétate de calcium dans le 2e cycle du traitement
	

Figure 82. Rétention d'humidité des mortiers X5 (avant d'ajouter l'acétate de calcium dans le 1e cycle) et Y5 (avant d'ajouter l'acétate de calcium dans le 2e cycle). La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.

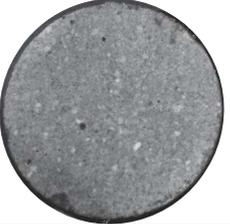
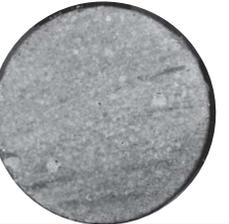
	Mortiers contrôle – Condition X		Mortiers contrôle – Condition Y	
	T0	À la suite du 1e cycle du traitement	T0	À la suite du 2e cycle du traitement
Control – B.H				
Control – Bouillon nutritif (BN)				
Control – Mortier sans inocula (SI)				
Control – Acétate de calcium (AC)				

Figure 83. Photographies à 6 minutes des mortiers témoins des conditions X et Y, après l'application du 1e et du 2e cycle de traitement. La couleur sombre de la surface des mortiers dénote la présence du biofilm.

Dans la Figure 84 sont présentées les photographies des mortiers X5 et Y5, après application du 1e et 2e cycle de traitement respectivement, avant et après lavage de leur surface, avec de l'eau distillée et la brosse à dents.

Pour le mortier X5, on peut observer le dépôt homogène d'une couche de CaCO_3 de couleur blanche et poudreuse à la suite du premier cycle. Après lavage, macroscopiquement, on a observé qu'une grande partie de la couche a semblé avoir été éliminée, mais une partie reste visiblement adhérente à la surface.

Pour le mortier Y5, lors de la fin du 1e cycle, on avait obtenu un résultat similaire à celui du mortier X5, mais après l'application du 2e cycle, on n'a pas aperçu la présence de cette couche poudreuse.

Les précipités éliminés par le rinçage de la surface des mortiers X5 (1e) et Y5 (1e et 2e cycle), ont été caractérisés comme étant de la calcite et de la vatérite.

Aucune précipités ou formation d'une couche blanche et poudreuse n'a été obtenu sur les mortiers de contrôle X et Y avec l'acétate de calcium.

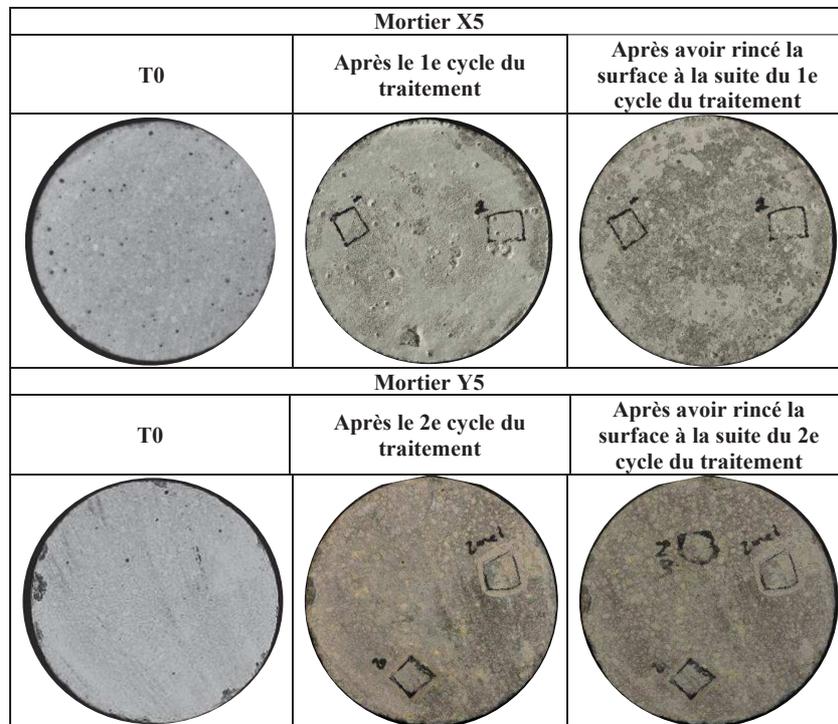


Figure 84. Photographie des mortiers X5 (issue de 1 cycle de traitement) et Y5 (issue de 2 cycles de traitement), avant et après le lavage de leurs surfaces.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de la manipulation précédente dans la section 2.1. Grâce aux observations faites au microscope optique (Figure 85), nous pouvons réaffirmer que malgré l'élimination d'une partie des précipités par plaques, une partie importante reste adhérente au mortier. Il reste à déterminer pourquoi l'adhérence de la couche de CaCO_3 est plus importante dans certaines zones.

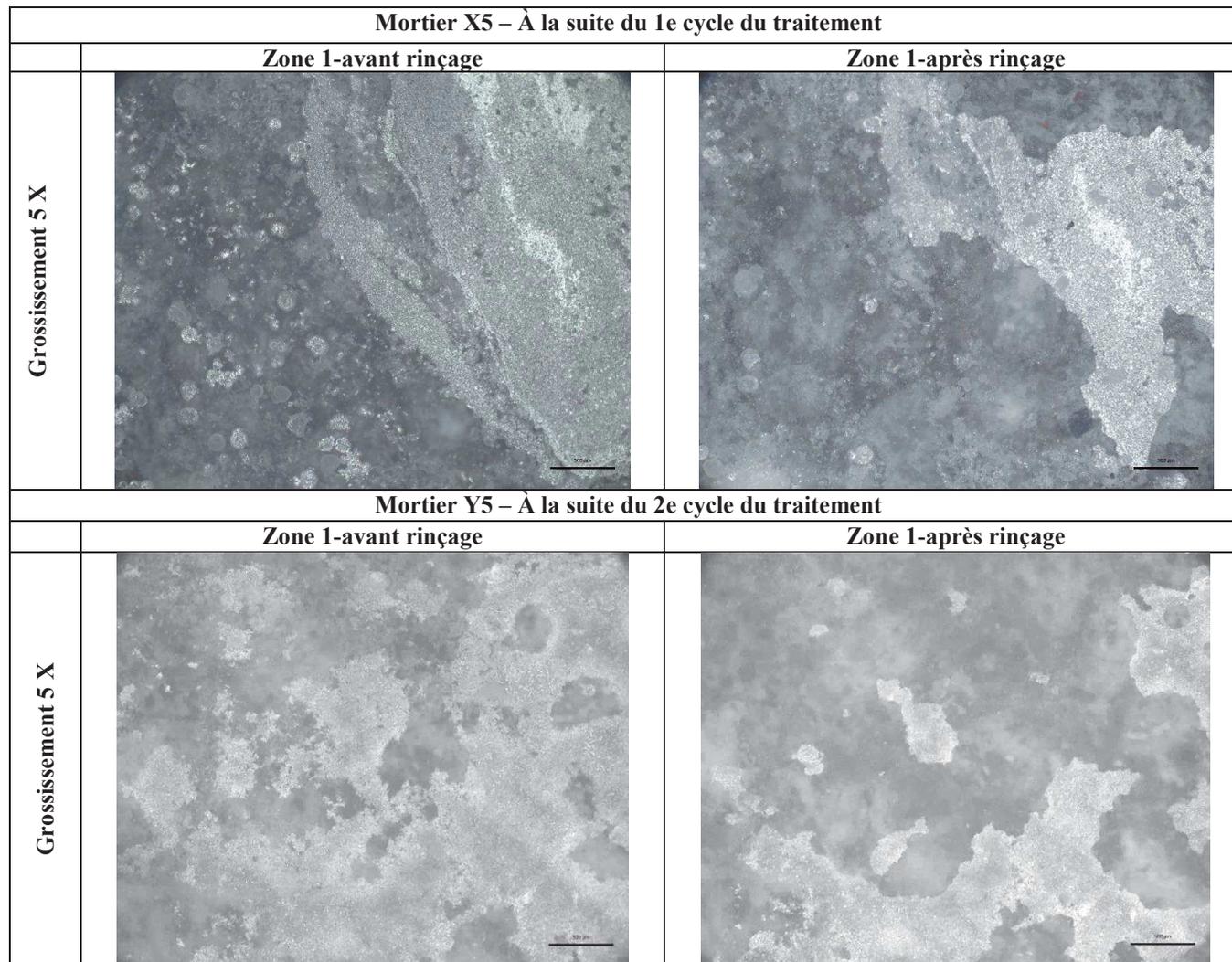


Figure 85. Photographies des mortiers X5 (issue de 1 cycle de traitement) et Y5 (issue de 2 cycles de traitement), prises avec le microscope optique (5X) avant et après le lavage de leur surface.

Dans les vues en coupe au MEB des mortiers X5 et Y5 (Figure 86), on peut apprécier la présence de la couche de CaCO_3 qui s'est formée. On peut estimer l'épaisseur de cette couche même s'il est difficile d'en évaluer l'uniformité. Dans le cas du mortier X5, après le lavage de sa surface, 20 mesures sur la Figure 86 montrent localement une couche d'une épaisseur d'environ $13 \pm 1,3 \mu\text{m}$. C'est 2,3 fois moins que la couche de $30 \mu\text{m}$ théoriquement attendue. Sur le mortier Y5, on observe dans les mêmes conditions une couche locale d'environ $21 \pm 1,9 \mu\text{m}$. C'est 2,9 fois moins que la couche de $60 \mu\text{m}$ attendue et seulement 39 % plus épais que sur mortier X5 et non deux fois plus comme attendu. Comme expliqué au chapitre 7, 2.2, cela pourrait être dû à une baisse du rendement lié au plus faible accès aux nutriments absorbés lors de l'immersion initiale du fait de la première couche.

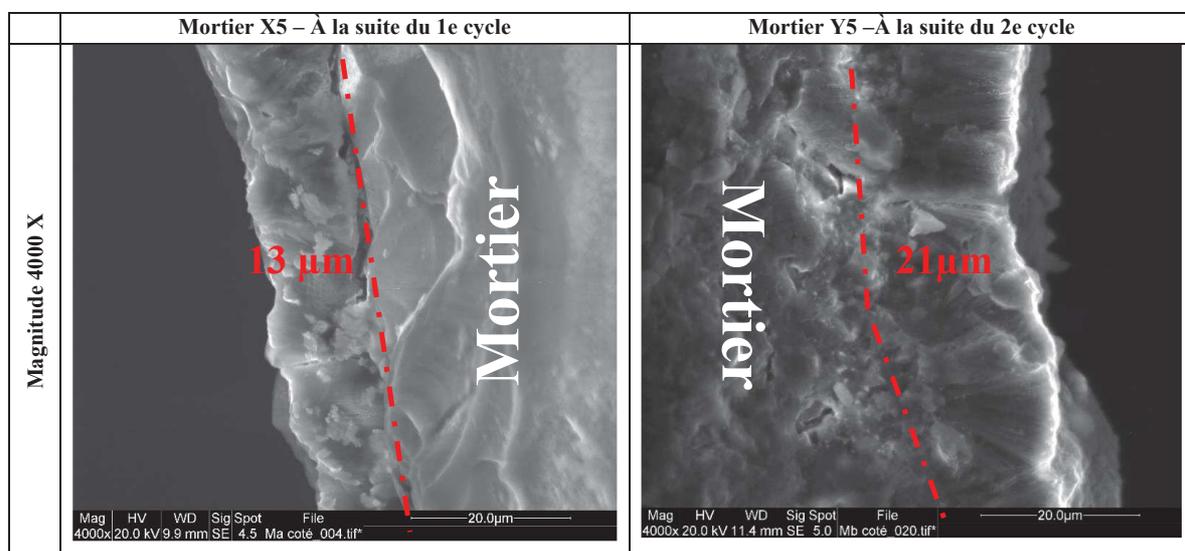


Figure 86. Photographies latérales des mortiers X5 (issue de 1 cycle de traitement) et Y5 (issue de 2 cycles de traitement), prises avec le MEB. La ligne pointillée délimite la surface du mortier et la couche de CaCO_3 précipitée.

Pour les essais d'absorption, les mesures avant traitement ont été réalisées par un premier opérateur. A l'issue du traitement (simple dans la condition X et double dans la condition Y), il a été demandé à un second opérateur de refaire les mesures d'absorption pour s'assurer de la qualité des résultats.

Le Tableau 15 résume les résultats individuels obtenus par le premier opérateur, sur chaque disque avant traitement.

Tableau 15. Résultats obtenus par l'opérateur 1 avant tout traitement des disques de mortiers de 60 mm de diamètre. M_1 est la masse du disque sec avec seulement la tranche résinée, M_2 est la masse du disque entièrement résiné sec, h est la hauteur du disque et M_m la masse du disque seul sec (hors résine), M_3 est la masse du disque entièrement résiné saturé surface sèche.

	Mortier	M_1 (g)	M_2 (g)	h (mm)	M_m (g)	M_3 (g)	Eau abs (g)	Abs (%)	Densité ($\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Condition X	X 1	24,54	24,95	4,32	24,42	26,34	1,38	5,67	2,00
	X 2	22,42	22,83	4,17	22,30	24,20	1,37	6,12	1,89
	X 3	23,80	24,21	4,26	23,68	25,64	1,43	6,03	1,97
	X 4	22,95	23,36	4,14	22,84	24,81	1,44	6,32	1,95
Condition Y	Y 1	28,16	28,57	4,98	28,02	30,16	1,59	5,67	1,99
	Y 2	18,81	19,22	3,56	18,71	20,36	1,14	6,11	1,86
	Y 3	32,20	32,62	5,67	32,04	34,34	1,73	5,39	2,00
	Y 4	29,62	30,03	5,18	29,47	31,65	1,62	5,49	2,01
Contrôle X	CX-BH	24,86	25,27	4,44	24,74	26,69	1,42	5,73	1,97
	CX-BN	25,81	26,22	4,67	25,68	27,55	1,33	5,17	1,94
	CX-AC	29,29	29,70	5,17	29,14	31,65	1,95	6,70	1,99
	CX-SR	38,22	38,63	6,46	38,04	40,62	1,99	5,23	2,08
Contrôle Y	CY-BH	21,76	22,18	3,85	21,66	23,47	1,30	5,99	1,99
	CY-BN	18,42	18,83	3,38	18,33	19,96	1,12	6,13	1,92
	CY-AC	22,26	22,67	3,99	22,15	24,12	1,44	6,52	1,96
	CY-SR	33,21	33,63	5,65	33,06	35,47	1,84	5,57	2,07

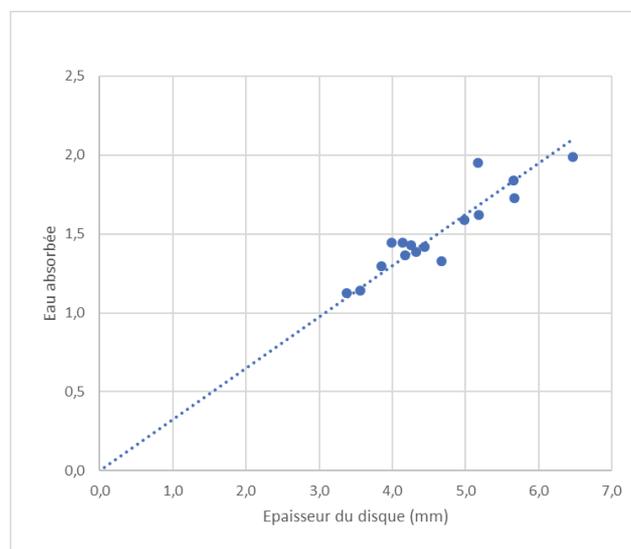


Figure 87. Quantité d'eau absorbée sur l'ensemble des disques en fonction de l'épaisseur des disques.

Chapitre 7 : Application de la biocarbonatation à la surface de mortier modèle

On constate dans un premier temps, sur la Figure 87, que la quantité d'eau absorbée est proportionnelle à la hauteur des disques. Ceci confirme que les disques sont bien saturés d'eau de façon homogène sur leur épaisseur et donc que l'absorption mesurée sur disque est bien représentative de celle de granulats de 8 à 10 mm de diamètre environ.

On constate également sur le Tableau 15 que les quantités d'eau mesurées sont très faibles, ce qui pourrait rendre la mesure de l'absorption sensible à la qualité des essais et dépendante de l'opérateur. Néanmoins, l'écart-type moyen des valeurs d'absorption obtenues sur l'ensemble des disques avant traitement (quand tous les disques sont dans les mêmes conditions) est satisfaisant avec une valeur absolue de 0,45%, pour une absorption moyenne de 5,9%.

Dans le futur, et pour limiter les risques d'erreurs liés notamment à l'estimation de l'état saturé surface sèche qui peut modifier la quantité d'eau absorbée entrant dans l'évaluation de la masse totale contenue d'eau contenu dans le disque, il serait souhaitable d'augmenter l'épaisseur des disques. Il faut toutefois s'assurer que les disques restent bien saturés dans toute leur masse après 24 heures.

Tableau 16. Résultats obtenus par l'opérateur 1 après traitement des disques de mortiers de 60 mm de diamètre. M_m est la masse du disque seul sec (hors résine), h est la hauteur du disque, M_2 est la masse du disque entièrement résiné sec et M_3 est la masse du disque entièrement résiné saturé surface sèche

	Mortier	M_m (g)	h (mm)	M_2 (g)	M_3 (g)	Eau abs (g)	Abs (%)
Condition X	X 1	24,42	4,32	24,95	26,47	1,52	6,21
	X 2	22,30	4,17	22,90	24,24	1,33	5,97
	X 3	23,68	4,26	24,26	25,81	1,55	6,54
	X 4	22,84	4,14	23,46	24,97	1,51	6,60
Condition Y	Y 1	28,02	4,98	28,91	29,35	0,44	1,57
	Y 2	18,71	3,56	19,47	19,89	0,42	2,25
	Y 3	32,04	5,67	33,05	33,66	0,61	1,91
	Y 4	29,47	5,18	30,50	30,82	0,33	1,10
Contrôle X	CX-BH	24,74	4,44	25,29	26,78	1,49	6,02
	CX-BN	25,68	4,67	26,22	27,63	1,41	5,49
	CX-AC	29,14	5,17	29,86	31,60	1,74	5,98
	CX-SR	38,04	6,46	38,64	40,68	2,04	5,36
Contrôle Y	CY-BH	21,66	3,85	22,20	23,57	1,37	6,32
	CY-BN	18,33	3,38	18,87	20,01	1,14	6,23
	CY-AC	22,15	3,99	22,75	24,25	1,50	6,79
	CY-SR	33,06	5,65	33,89	35,64	1,74	5,28

Tableau 17. Résultats obtenus par l'opérateur 2 après traitement des disques de mortiers de 60 mm de diamètre. M_m est la masse du disque seul sec (hors résine), h est la hauteur du disque, M_2 est la masse du disque entièrement résiné sec et M_3 est la masse du disque entièrement résiné saturé surface sèche

	Mortier	M_m (g)	h (mm)	M_2 (g)	M_3 (g)	Eau abs (g)	Abs (%)
Condition X	X 1	24,42	4,32	24,88	26,50	1,62	6,64
	X 2	22,30	4,17	22,92	24,40	1,48	6,64
	X 3	23,68	4,26	24,22	25,87	1,65	6,98
	X 4	22,84	4,14	23,41	25,01	1,61	7,04
Condition Y	Y 1	28,02	4,98	28,62	29,30	0,68	2,43
	Y 2	18,71	3,56	19,41	20,52	1,11	5,95*
	Y 3	32,04	5,67	32,67	33,39	0,72	2,25
	Y 4	29,47	5,18	30,06	30,56	0,49	1,67
Contrôle X	CX-BH	24,74	4,44	25,17	26,79	1,63	6,57
	CX-BN	25,68	4,67	26,16	27,65	1,49	5,79
	CX-AC	29,14	5,17	29,75	31,62	1,86	6,39
	CX-SR	38,04	6,46	38,21	40,73	2,52	6,62
Contrôle Y	CY-BH	21,66	3,85	22,13	23,61	1,48	6,83
	CY-BN	18,33	3,38	18,81	20,04	1,23	6,69
	CY-AC	22,15	3,99	22,97	24,42	1,45	6,55
	CY-SR	33,06	5,65	33,71	35,37	1,66	5,03

* Valeur aberrante non prise en compte

Tableau 18. Synthèse des absorptions moyennes suivant les conditions

Absorption (%)	Avant traitement (opérateur 1)		Après traitement (opérateur 1)		Après traitement (opérateur 2)		Ecart moyen interopérateur après traitement
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
Condition X	6,03	0,27	6,33	0,30	6,83	0,22	0,49
Condition Y	5,67	0,32	1,71	0,49	2,12	0,40	0,41
Contrôle X	5,71	0,70	5,71	0,34	6,34	0,38	0,63
Contrôle Y	6,05	0,39	6,15	0,63	6,28	0,84	0,12

Les Tableau 16 et Tableau 17 résument les résultats obtenus par le premier opérateur et le second opérateur respectivement, sur chaque disque après traitement. Enfin, le Tableau 18 résume les moyennes et écarts-type par condition d'essai pour les 2 opérateurs.

Le Tableau 18 montre que les écart-types obtenus par les deux opérateurs après traitement sont très similaires et que l'écart moyen interopérateur sur les absorptions est en valeur absolue de 0,41%, soit du même ordre de grandeur que l'écart-type de l'essai pour un opérateur. Ces données permettent de conclure que les essais sont répétables et reproductibles. Pour plus de lisibilité, les résultats du Tableau 18 sont représentés graphiquement sur la Figure 88.

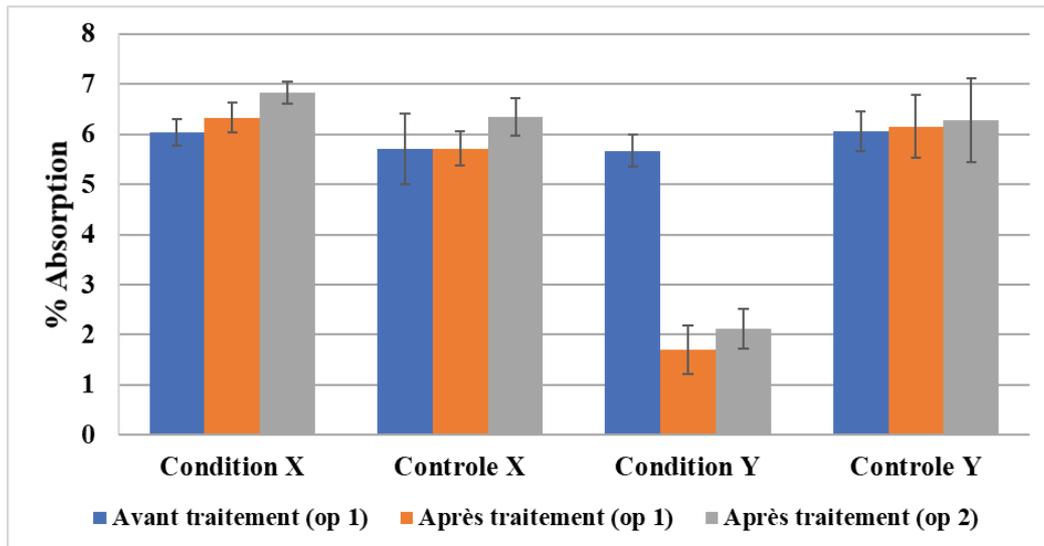


Figure 88. Résultats d'absorption moyenne avant et après traitement (données du Tableau 18). Les barres d'erreur représentent l'écart type (en + et en -)

La Figure 88 montre clairement qu'un seul traitement (condition X) de bioprécipitation ne permet pas de diminuer l'absorption des mortiers. Cela semble confirmer les observations microscopiques sur l'échantillon X5 ; une partie importante de la couche de CaCO_3 ne résiste pas au lavage à l'issue du traitement. Or ce lavage représente l'attrition probable qu'auront à subir les granulats de béton recyclés lors de leur manipulation après le traitement. La gangue ne peut donc pas réellement étancher la surface du mortier. On observe même une légère augmentation de l'absorption.

Dans [2], il est suggéré que la porosité propre du CaCO_3 bioprécipité pourrait conduire à une augmentation du taux d'absorption des gravillons recyclés ou mortier traités. Afin de vérifier cela, nous avons évalué par DVS (sorption dynamique de vapeur) la quantité de prise d'eau des CaCO_3 de B.H (lors des expériences menées dans le chapitre 6). Ces valeurs ont été comparées à celle d'une pâte de ciment CEM I. Les diagrammes DVS sont affichés dans

l'Annexe D. La prise maximale de masse à 95% d'humidité est comprise entre 6.2% et 9.1 % pour les échantillons de CaCO₃ de B.H, contre 15.5% pour la pâte de ciment CEM I. Ce résultat suggère que les CaCO₃ précipités pourraient absorber moins que la pâte de ciment. Il ne semble donc pas raisonnable d'imputer cette légère augmentation d'absorption aux CaCO₃ néoformés en surface et restant adhérents. Comme on peut également conserver la même augmentation sur les mortiers de contrôle X, il faut plutôt y voir l'effet de la présence de matières résiduelles qui ont pu être absorbées par le mortier (bouillon nutritif, acétate ou résidus organiques de bactéries suivant les cas).

Par contre, on a constaté que lorsque l'on double le traitement (condition Y) on a une diminution importante de l'absorption qui passe de 5,7% à 1,9% en moyenne (1,7 et 2,1% pour l'opérateur 1 et 2 respectivement). Étant donnés les écarts-types observés, cette diminution est significative et forte. Elle ramène l'absorption à des valeurs généralement observées sur de granulats naturels. On peut considérer que cette diminution est bel et bien due à la biocarbonatation car les mortiers de contrôle de la condition Y n'ont quant à eux pas vu leur absorption modifiée par les différents apports (séparément bouillon nutritif, acétate ou bactéries suivant les cas). Ceci peut être attribué, comme suggéré précédemment, au fait que le dépôt de CaCO₃ s'homogénéise au fur et à mesure de l'application des traitements, limitant de plus en plus l'absorption.

Dans la littérature récente, [3] et [7] rapportent des baisses de l'ordre de 0,2% (en valeur absolue) de l'absorption de GBR de granulométrie 6,3 mm/20mm issus de chantier pour un traitement par immersion avec des bactéries uréolytiques (*Bacillus sphaericus*) pendant 5 jours. Dans [6], deux mortiers de laboratoire sont concassés en deux fraction 6mm/8mm et 12mm/16mm. Un mortier a un rapport E/C de 0,45 et le second de 0,70. Un traitement par immersion pendant 6 jours, avec un autre type de bactéries uréolitiques (*Sporosarcina pasteurii*) conduit aux baisses d'absorption suivantes : pour E/C=0,45 baisse de 0,8% et 0,5%, pour E/C=0,70 baisse de 1,1% et 0,5%, pour la fraction la plus fine et la plus grossière respectivement.

Avec des bactéries non uréolytiques (*B. pseudofirmus*) Wu et al. [2] obtiennent sur des GBR de démolition séparée en 3 fractions 0mm-5mm, 5mm-10mm et 10mm-20mm des réductions d'absorption d'eau de 1,4%, 1,2% et 0,7% respectivement en valeur absolue. Dans ce cas, le traitement se fait par immersion et dure 21 jours. Dans une étude plus récente [4], les mêmes auteurs obtiennent sur un sable (<5mm) issu de concassage de mortier, des réductions

de 2,9% et 3,6% en valeur absolue pour un traitement par immersion et par aspersion respectivement. Les bactéries sont non uréolytiques (bacille H4) et le traitement dure, comme dans le cas précédent, 21 jours. Ce résultat est le plus important que l'on ait relevé dans la littérature mais il faut noter que l'absorption initiale du GBR non traité était particulièrement élevée (12,7%). Il est probablement plus facile d'améliorer un granulat à forte absorption qu'un granulat présentant déjà une absorption modérée.

Ces résultats semblent confirmer qu'en général, les bactéries non uréolytiques capables de précipiter le CaCO_3 (principalement de la calcite) ont de meilleurs rendements de production que les bactéries uréolytiques [3], même si dans les exemples cités le temps de traitement intervient également.

Comme on l'a vu précédemment, les résultats dans [2] et [6] montrent que la baisse d'absorption est plus marquée pour un même traitement quand la taille de la fraction traitée diminue. On pourrait associer cela au fait que l'absorption avant traitement est plus grande mais ce n'est pas vérifié dans [2]. Il semble donc que les traitements soient plus efficaces sur les sables que sur les gravillons, ce qui est intéressant pour l'objectif que l'on s'est fixé dans cette étude. Une rugosité plus importante des sables permettant une meilleure fixation des carbonates pourrait être une explication.

Enfin, on a constaté l'intérêt de doubler le traitement sur nos disques de la condition Y. Un fait similaire a été observé dans [4] : un premier traitement par immersion dans une culture de *B. sphaericus* LMG22257 a diminué l'absorption d'un GBR de 0,2% , un second traitement a permis de doubler cette baisse. De même, sur un granulat contenant une proportion plus forte d'impuretés (bois, tuiles, briques, tuiles...) un second traitement a permis de passer d'une baisse de 0,5% à 1,7%.

2.3.3. Conclusion

En conclusion, nos résultats semblent donc être très encourageants car nous avons observé une chute maximale de 3,8% de l'absorption sur des disques de mortier de hauteur comprise entre 4 et 6 mm, qui sont supposés avoir une absorption d'eau représentative de granulats de 8 à 12 mm de diamètre. La performance semble d'autant plus intéressante que l'on est parti d'une valeur d'absorption d'eau initiale modérée et que d'après ce qui précède on pourrait s'attendre à une efficacité supérieure sur sable.

Chapitre 7 : Application de la biocarbonatation à la surface de mortier modèle

Ces résultats prometteurs sont sans doute la conjonction de plusieurs faits ;

- Dans nos expériences, nous avons remarqué que lorsqu'on applique un conditionnement de mortiers (en les immergeant dans un milieu nutritif avant de les mettre en contact avec B.H), on favorise la formation d'un biofilm uniforme en 7 jours. Il semble donc que la saturation du matériau en milieu, avant l'inoculation, aide les bactéries à mieux le coloniser, ce qui peut augmenter et homogénéiser le dépôt de CaCO_3 et diminuer l'absorption.
- La bactérie B.H que l'on a sélectionnée n'utilise pas la voie de l'urée même si nous ne connaissons pas la voie métabolique exacte privilégiée dans notre traitement. Or les bactéries uréolytiques semblent moins performantes comme on vient de le voir ([2], [4]–[8]). De plus cela nous permet d'éliminer la nécessité d'ajouter de l'urée aux cultures pour réaliser la bioprécipitation
- Le traitement a été doublé et dure environ 34 jours, ce qui est plus long que les procédés exposés ci-dessus. Cette durée pourrait sans doute être raccourcie.

Il faut néanmoins rester prudents car nos expérimentations ont été réalisées sur des disques de mortier. Le matériel biologique, le milieu nutritif ainsi que la source de calcium sont en quelque sorte ainsi forcés de se répandre sur la surface par la gravité, ce qui favorise sans doute la performance de notre traitement alors que ceux cités dans la littérature ont été appliqués directement à des GBR par immersion ou aspersion générant des conditions de contact avec le GBR très différentes.

Compte tenu de nos résultats très encourageants, il aurait donc été souhaitable de les confirmer sur d'autres mortiers, et d'appliquer la méthodologie à des granulats de béton recyclé. Par manque de temps et à cause de la situation sanitaire, il n'a pas été possible de poursuivre dans le cadre de cette étude les essais.

3. Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons cherché à appliquer les protocoles de biocalcification obtenus dans les chapitres précédents sur gélose, à des disques de mortier modèle, avant de passer aux granulats de béton recyclé. Le choix de disques de mortier a été fait afin de mieux maîtriser les conditions d'ensemencement et de faciliter les observations en surface.

Nous avons confirmé à l'issue de ces essais que la bactérie B.H survit bien à la surface des mortiers et qu'elle est capable de former un biofilm homogène dans une période de l'ordre

Chapitre 7 : Application de la biocarbonatation à la surface de mortier modèle

de 7 jours. Nous avons montré qu'une rétention d'eau pendant plus de 6 minutes à la surface des mortiers sortis de l'incubateur à 100% d'HR, se manifestant par une couleur plus sombre, est un signe macroscopique de la présence du biofilm. Ceci permet d'identifier le moment où le biofilm recouvre bien la surface du mortier et à partir duquel on peut introduire l'acétate de calcium pour démarrer la biocalcification.

Pour former un biofilm homogène sur un disque de mortier, il semble favorable de l'immerger dans du bouillon nutritif à pH 11 pendant une période de 4 heures avant l'inoculation de B.H, pour que les nutriments pénètrent bien la surface du mortier et soient disponibles pour les bactéries. Ce procédé semble préférable à une simple aspersion. Nous avons également constaté que pour accélérer la formation du biofilm, il est souhaitable que l'inoculum initial soit d'au moins 1×10^7 UFC·cm⁻² et qu'il n'y a pas d'intérêt particulier à déposer d'autre inoculum à 3 jours par exemple.

L'intérêt d'un ajout de bouillon nutritif supplémentaire par aspersion lors des premiers jours n'apparaît pas clairement. En effet dans la 3^{ième} expérience de ce chapitre (paragraphe 1.3) l'apport quotidien de bouillon nutritif semble avoir accéléré l'apparition d'un biofilm homogène sur toute la surface du mortier (en 4 à 7 jours) par rapport à la deuxième expérience (paragraphe 1.2) dans laquelle l'inoculum était deux 1,5 fois plus concentré, mais pour laquelle du bouillon n'a été rajouté qu'à 3 jours (biofilm homogène à 7 jours). Pourtant dans la dernière expérience (2.3) aucun apport supplémentaire de bouillon nutritif n'a été effectué et le biofilm homogène est apparu aussi vite que dans la deuxième expérience avec un inoculum 1,5 fois moins concentré.

Pour tester l'efficacité du traitement de biocalcification nous avons effectué des mesures d'absorption sur des disques minces de mortier (épaisseur de l'ordre de 4 à 6 mm) dont une seule face était accessible à l'eau, la tranche et l'autre face étant résinées. Nous avons montré que ces mesures sont relativement répétables (écart type de l'ordre de 0,45% d'absorption d'eau en absolu) et même reproductibles. Toutefois, dans le futur, pour améliorer la précision des mesures et que les essais soient moins dépendants de la définition de l'état saturé surface sèche qui reste assez subjective, il serait souhaitable d'augmenter l'épaisseur des disques tout en s'assurant que l'eau pénètre bien dans tout le volume du disque.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'absorption d'eau des mortiers avant traitement, puis nous avons formé un biofilm homogène à leur surface en 7 jours à l'aide d'un

inoculum d'environ 1×10^7 UFC·cm⁻². On a alors introduit une solution d'acétate de calcium à $175 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (soit $0,013 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) qui a permis d'obtenir en surface une couche poudreuse de CaCO₃, après 10 jours d'incubation. Une partie de cette couche semble être faiblement adhérente au mortier car elle est éliminée assez facilement par plaques à l'aide d'une brosse à dents sous eau. Les CaCO₃ restant en surface formaient des amas d'une épaisseur de l'ordre de 13 µm. Ce traitement n'a pas permis de diminuer l'absorption des mortiers. Le traitement a été renouvelé une seconde fois et cette fois-ci, malgré le brossage sous eau, l'absorption est passée de 5,7% sans traitement à 1,9% avec traitement soit une baisse en valeur absolue de 3,8%, le traitement global a duré 34 jours. Ce résultat est très encourageant comparé aux résultats de la littérature sur granulats de béton recyclé, même s'il est obtenu à ce stade sur des mortiers. En effet, dans les articles examinés, il a été constaté qu'en moyenne, l'absorption des gravillons recyclés traités par bioprécipitation est diminuée en général de moins de 1% (en valeur absolue). Un procédé proposé par [6] a permis d'obtenir une baisse de 3,6% mais sur un matériau dont l'absorption était particulièrement élevée (12,7%)

Il aurait été souhaitable de confirmer ces résultats sur d'autres disques de mortier, voire d'améliorer le procédé et d'appliquer la méthodologie à des granulats de béton recyclé. Par manque de temps, et à cause de la situation sanitaire liés au COVID 19 qui a fortement perturbé les expérimentations qui souvent s'étendent sur plusieurs semaines, il n'a pas été possible de poursuivre les essais dans le cadre de cette étude.

4. Références

- [1] H. C. Flemming, "Biofilms and environmental protection," *Water Sci. Technol.*, vol. 27, no. 7–8, pp. 1–10, 1993.
- [2] M. Medevielle, "Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé, Ph.D. dissertation, MAST," Université Bretagne Loire, 2017.
- [3] I. Justo-Reinoso, A. Heath, S. Gebhard, and K. Paine, "Aerobic non-ureolytic bacteria-based self-healing cementitious composites: A comprehensive review," *J. Build. Eng.*, vol. 42, p. 102834, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.JOBE.2021.102834.
- [4] J. Wang, B. Vandevyvere, S. Vanhessche, J. Schoon, N. Boon, and N. De Belie, "Microbial carbonate precipitation for the improvement of quality of recycled aggregates," *J. Clean. Prod.*, vol. 156, pp. 355–366, 2017, doi:

10.1016/j.jclepro.2017.04.051.

- [5] C. R. Wu, Y. G. Zhu, X. T. Zhang, and S. C. Kou, “Improving the properties of recycled concrete aggregate with bio-deposition approach,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 94, pp. 248–254, 2018, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2018.09.012.
- [6] C. R. Wu, Z. Q. Hong, J. L. Zhang, and S. C. Kou, “Pore size distribution and ITZ performance of mortars prepared with different bio-deposition approaches for the treatment of recycled concrete aggregate,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 111, no. April, p. 103631, 2020, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2020.103631.
- [7] J. García-González *et al.*, “Quality improvement of mixed and ceramic recycled aggregates by biodeposition of calcium carbonate,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 154, pp. 1015–1023, 2017, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2017.08.039.
- [8] A. M. Grabciec, J. Klama, D. Zawal, and D. Krupa, “Modification of recycled concrete aggregate by calcium carbonate biodeposition,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 34, pp. 145–150, 2012, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2012.02.027.

Conclusion générale et Perspectives

Les déchets inertes à base de béton peuvent être utilisés pour produire après tri, concassage et criblage des granulats de béton recyclé (GBR). Ces GBR sont par essence composés des granulats naturels et de la pâte de ciment du béton d'origine. La pâte de ciment étant nettement plus poreuse que les granulats naturels, les GBR ont une absorption d'eau plus importante que les granulats conventionnels. Ce phénomène est nettement plus marqué pour les sables qui contiennent plus de pâte de ciment résiduelle. Si les gravillons de GBR sont relativement bien recyclés dans les bétons, l'absorption des sables de GBR représente aujourd'hui le principal frein technique à leur recyclage. Afin d'explorer de nouvelles solutions pour améliorer la qualité des gravillons, la présente étude propose d'étudier la « biocarbonatation » comme alternative.

Les objectifs principaux de cette étude visaient à établir un protocole de bioprécipitation pour former une couche homogène de CaCO_3 à la surface de gravillons recyclés. Ces objectifs ont dû être revus à la baisse en raison des difficultés engendrées par la crise sanitaire. Pour cette raison, les objectifs de l'étude se sont limités à :

- (i) Développer un protocole visant à former une couche homogène de CaCO_3 à la surface de disques de mortier modèles. Ces disques sont supposés représentatifs des GBR mais permettent de bien contrôler les conditions de traitement bactérien et facilitent l'observation optique ou microscopique des surfaces traitées
- (ii) Déterminer si la formation d'une couche uniforme de CaCO_3 diminue l'absorption d'eau des mortiers traités.

Les principaux enseignements apportés dans chaque chapitre par ce travail de thèse sont résumés dans les paragraphes suivants

Synthèse bibliographique

L'étude bibliographique a permis de souligner que la porosité de la couche de mortier résiduelle attachée au GBR est responsable de sa faible performance et que la fabrication des GBR conduit à avoir plus de pâte dans les particules les plus fines. Ainsi l'effet est plus marqué sur les sables de béton recyclé ce qui leur confère des porosités plus importantes et des performances mécaniques moins bonnes. De plus, il a été remarqué l'importance de diminuer l'absorption de ces gravillons, en diminuant la porosité de la pâte résiduelle. Il a été démontré que la carbonatation naturelle diminue l'absorption dans ces graviers, mais cette technique prend des mois, voire des années, ce qui pose des problèmes logistiques.

En proposant la bioprécipitation comme technique alternative ou complémentaire à la carbonatation naturelle, on a mis en évidence les différents processus par lesquels les microorganismes la réalisent, ainsi que l'importance de l'utilisation de bactéries alcalino-tolérantes. Nous avons également remarqué l'importance de la formation de biofilm par les microorganismes.

Chapitre 3 : Isolement, sélection et identification de microorganismes présents à la surface de gravillon de béton recyclé

Avant de commencer les différentes expériences, nous nous sommes concentrés sur l'analyse du problème du dépôt hétérogène de CaCO_3 avec *Bacillus halodurans* C-125, qui a été obtenu sur des gravillons recyclés et sur des mortiers modèles dans l'étude qui avait été faite précédemment à l'université G. Eiffel [1]. Nous avons donc décidé d'analyser génétiquement *B. halodurans* C-125 afin d'identifier si elle possédait des gènes présents dans la bactérie *B. subtilis* str 18 (bactérie homologue de *B. halodurans* C-125 capable de produire des biofilms robustes). Les résultats ont indiqué que ces gènes étaient absents, ce qui permet de penser que la bactérie de l'étude précédente ne serait pas en mesure de produire un biofilm similaire à celui de son homologue. Sur la base de ce résultat, il a été souligné l'importance de trouver de nouvelles espèces bactériennes capables de former un biofilm homogène sur la surface des mortiers et de précipiter CaCO_3 .

Pour trouver de nouvelles bactéries candidates, nous avons isolé, à partir d'échantillons de gravillons recyclés, trois bactéries capables de se développer à pH alcalin. Ensuite, leur capacité à produire un biofilm a été testée sur un milieu spécifique (MSgg à pH 11). Les résultats ont montré que les 3 souches formaient un biofilm bien constitué, et ont confirmé que *B. halodurans* C-125 n'en était pas capable. Une étude de l'ANRr 16s1, nous a permis d'associer une des bactéries à *Bacillus haynesi*, et les deux autres à *B. licheniformis*. L'association des bactéries isolées avec *B. haynesi* et *B. licheniformis* nous a permis de déterminer qu'elles n'étaient pas pathogènes. La souche proche de *B. haynesi* s'est avéré être la bactérie produisant le biofilm le plus robuste, on a donc choisi de travailler avec cette bactérie et nous l'avons nommée B.H.

Nous avons ensuite voulu déterminer le milieu gélosé optimal pour former un biofilm uniforme, pour cela nous avons testé 3 milieux de culture : le milieu nutritif, le milieu MSgg et un milieu combinant les deux milieux, le milieu nutritifs-MSgg. Il a été déterminé que la

Conclusion générale et Perspectives

colonisation sur les géloses nutritives et nutritives-MSgg, étaient équivalentes, couvrant plus de 90% de la surface disponible en 3 jours. Il a été également constaté que le milieu MSgg seul ne permettait pas à une colonisation uniforme de sa surface. C'est pourquoi il a été recommandé d'utiliser les géloses nutritives et nutritives-MSgg dans les futures expériences de bioprécipitation, afin de réaliser des analyses comparatives.

Chapitre 4 : Essais de bioprécipitation ; production de CaCO₃

Après avoir sélectionné les milieux sur lesquels B.H se développait de manière le plus homogène, des analyses de bioprécipitation ont été réalisées sur géloses nutritives et nutritives-MSgg. Sur ces deux types de gélose, les cristaux que B.H précipitait ont été caractérisés comme étant de la calcite et de la vaterite. Afin de quantifier le CaCO₃, un premier protocole d'extraction a été développé. Il a été observé une grande dispersion dans la quantité de CaCO₃ précipitée par gélose. On a donc suspecté qu'une quantité significative de CaCO₃ était perdue en utilisant cette technique. Le protocole d'extraction a donc ensuite été amélioré en ajoutant des étapes qui réduisent le risque de perte de CaCO₃. L'utilisation de cette nouvelle technique a permis de réaliser d'autres essais de bioprécipitation afin de déterminer quel milieu favorisait la production de CaCO₃. Les résultats ont montré que la gélose nutritive permettait d'obtenir les plus grands rendements de production de CaCO₃, c'est pourquoi il a été décidé de réaliser les études de bioprécipitation uniquement dans des géloses nutritives.

Chapitre 5 : Suivi de formation de CaCO₃

Afin de s'assurer que la couche de CaCO₃ obtenue est homogène (condition sine qua non pour obtenir une couche étanche), nous avons d'essayer de tracer le CaCO₃ par l'épifluorescence car ce dernier présente une fluorescence naturelle. Nous avons constaté que l'épifluorescence n'était pas assez discriminative avec des agglomérats de CaCO₃, car certaines parties fluoresçaient et d'autres non. Nous avons décidé d'essayer de marquer les CaCO₃ précipités avec une molécule fluorescente, la calcéine, à différentes concentrations ($8.8 \times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ et $5.2 \times 10^{-8} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Malheureusement, même à de faibles quantités, il a été constaté que la calcéine était absorbée par la gélose, générant un bruit de fond qui masque la fluorescence des CaCO₃.

Chapitre 6 : Optimisation des méthodologies de la bioprécipitation sur gélose

Bien que nous n'ayons pas pu cartographier le CaCO₃ précipité, nous avons constaté que lorsque nous avons ajouté $0,0026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium aux cultures de B.H, les colonies

Conclusion générale et Perspectives

se sont carbonatées de façon homogène. Ce résultat nous a encouragés à essayer la carbonatation d'un biofilm complet de B.H. Dans une première analyse, nous avons ajouté de l'acétate de calcium ($0,0026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) à des cultures inoculées avec différentes $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Le fait de faire varier les concentrations en inoculum sur les géloses nous a permis d'observer la carbonatation dans des biofilms homogènes et semi-homogènes, âgés de 3 jours. Lors de ces manipulations, nous avons pu observer des changements qualitatifs de la surface de la biomasse, indiquant la présence de CaCO_3 . Nous avons déterminé que sur une période d'incubation de 15 jours, la production de CaCO_3 est la même lorsque la concentration cellulaire des B.H inoculés se situe entre 10^4 et $10^6 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Nous avons, cependant, décidé de continuer à travailler avec les solutions mères de B.H ($10^6 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) pour assurer une couverture par le biofilm de 98% de la surface des gels après 3 jours d'incubation. Par la suite, en effectuant à nouveau la cinétique de bioprécipitation, nous avons déterminé qu'en ajoutant $0,026 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'acétate de calcium, la plus grande quantité de CaCO_3 produite a été obtenue entre 10 et 15 jours d'incubation. Dans cette manipulation, nous soupçonnons que la concentration d'acétate de calcium est trop élevée et que cela pourrait ralentir le processus de bioprécipitation, et ainsi diminuer la production de CaCO_3 . Par conséquent, dans une autre manipulation, nous avons décidé d'évaluer la bioprécipitation à différentes concentrations d'acétate de calcium. La quantité de $0,013 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ semble suffisante.

Chapitre 7 : Application de la biocarbonatation à la surface de mortier modèle

Dans ce chapitre, nous avons cherché à appliquer les protocoles de biocalcification obtenus dans les chapitres précédents sur gélose, à des disques de mortier modèle, avant de passer aux granulats de béton recyclé. Le choix de disques de mortier a été fait afin de mieux maîtriser les conditions d'ensemencement et de faciliter les observations en surface.

Nous avons confirmé à l'issue de ces essais que la bactérie B.H survit bien à la surface des mortiers et qu'elle est capable de former un biofilm homogène dans une période de l'ordre de 7 jours. Nous avons montré qu'une rétention d'eau pendant plus de 6 minutes à la surface des mortiers sortis de l'incubateur à 100% d'HR, se manifestant par une couleur plus sombre, est un signe macroscopique de la présence du biofilm. Ceci permet d'identifier le moment où le biofilm recouvre bien la surface du mortier et à partir duquel on peut introduire l'acétate de calcium pour démarrer la biocalcification.

Conclusion générale et Perspectives

Pour former un biofilm homogène sur un disque de mortier, il semble favorable de l'immerger dans du bouillon nutritif à pH 11 pendant une période de 4 heures avant l'inoculation de B.H, pour que les nutriments pénètrent bien la surface du mortier et soient disponibles pour les bactéries. Ce procédé semble préférable à une simple aspersion. Nous avons également constaté que pour accélérer la formation du biofilm, il est souhaitable que l'inoculum initial soit d'au moins 1×10^7 UFC·cm⁻² et qu'il n'y a pas d'intérêt particulier à déposer d'autre inoculum à 3 jours par exemple. L'intérêt d'un ajout de bouillon nutritif supplémentaire par aspersion lors des premiers jours n'apparaît pas clairement dans ces essais.

Pour tester l'efficacité du traitement de biocalcification nous avons effectué des mesures d'absorption sur des disques minces de mortier (épaisseur de l'ordre de 4 à 6 mm) dont une seule face était accessible à l'eau, la tranche et l'autre face étant résinées. Nous avons montré que ces mesures sont relativement répétables (écart type de l'ordre de 0,45% d'absorption d'eau en absolu) et même reproductibles. Toutefois, dans le futur, pour améliorer la précision des mesures et que les essais soient moins dépendants de la définition de l'état saturé surface sèche qui reste assez subjective, il serait souhaitable d'augmenter l'épaisseur des disques tout en s'assurant que l'eau pénètre bien dans tout le volume du disque.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'absorption d'eau des mortiers avant traitement, puis nous avons formé un biofilm homogène à leur surface en 7 jours à l'aide d'un inoculum d'environ 1×10^7 UFC·cm⁻². On a alors introduit une solution d'acétate de calcium à $175 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (soit $0,013 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$) qui a permis d'obtenir en surface une couche poudreuse de CaCO₃, après 10 jours d'incubation. Une partie de cette couche semble être faiblement adhérente au mortier car elle est éliminée assez facilement par plaques à l'aide d'une brosse à dents sous eau. Les CaCO₃ restant en surface formaient des amas d'une épaisseur de l'ordre de 13 µm. Ce traitement n'a pas permis de diminuer l'absorption des mortiers. Le traitement a été renouvelé une seconde fois et cette fois-ci, malgré le brossage sous eau, l'absorption est passée de 5,7% sans traitement à 1,9% avec traitement soit une baisse en valeur absolue de 3,8%, le traitement global a duré 34 jours.

En conclusion, les travaux de cette thèse représentent une avancée encourageante pour diminuer l'absorption des granulats de béton recyclé et en particulier les sables. Il reste toutefois un certain nombre de points à approfondir.

Ainsi, nous avons pu isoler une souche bactérienne proche de *Bacillus haynessi* capable de former un biofilm à pH 11 et de produire des CaCO_3 . Lors de ces travaux nous avons pu développer une méthodologie pour l'extraction du CaCO_3 sur gélose. Nous avons essayé de cartographier la formation des CaCO_3 par épifluorescence avec ou sans marqueur. Il serait intéressant de poursuivre cette étude en essayant de cartographier une colonie bactérienne lors de sa calcification par cartographie micro-raman pour mieux caractériser son homogénéité.

Les études réalisées sur gélose, ont permis de démontrer le rôle fondamental de la formation d'un biofilm, avant l'ajout de la source de calcium pour favoriser une formation homogène du CaCO_3 . L'application répétée deux fois de ce protocole sur la surface de disques de mortier a permis d'en diminuer l'absorption d'eau de 3,8% en valeur absolue. Ce résultat est très encourageant comparé aux résultats de la littérature sur granulats de béton recyclé, même s'il est obtenu à ce stade sur des mortiers. En effet, dans les articles examinés, il a été constaté qu'en moyenne, l'absorption des gravillons recyclés traités par bioprécipitation est diminuée en général de moins de 1% (en valeur absolue). Un procédé proposé par [1] a permis d'obtenir une baisse de 3,6% mais sur un matériau dont l'absorption était particulièrement élevée (12,7%).

Il serait dans un premier temps souhaitable de confirmer ces résultats. Puis, en utilisant la même méthodologie sur disques de mortier, on pourrait essayer d'améliorer le procédé pour gagner en temps de traitement, voire en efficacité en répétant 3 ou 4 fois le traitement (ajout de bactéries + ajout de la source de Ca^{2+}). Il serait nécessaire au préalable nécessaire d'optimiser l'épaisseur des disques de mortiers, pour fiabiliser les mesures d'absorption.

Lorsque ce protocole prometteur sera ainsi confirmé, il devra être adapté aux granulats de béton recyclés et en particulier les sables, qui sont plus spécifiquement visés. Une fois un traitement de laboratoire efficace identifié, il faudra envisager d'utiliser des sources alternatives au bouillon nutritif et d'acétate de calcium, afin de réduire les coûts, en cas d'industrialisation du procédé.

Enfin certaines études ([1],[2]), montrent que la résistance des bétons incluant des GBR traités par bioprécipitation est notablement plus élevée que lorsque les GBR ne sont pas traités (des gains de l'ordre de 5 à 20MPa sont évoqués). De la même façon, la porosité de ces bétons est plus basse. Il faudra vérifier si on fait les mêmes constats avec les granulats traités avec le procédé proposé dans ce travail. Le cas échéant, ce sera un argument supplémentaire pour valoriser la bioprécipitation dans le cadre du recyclage du béton.

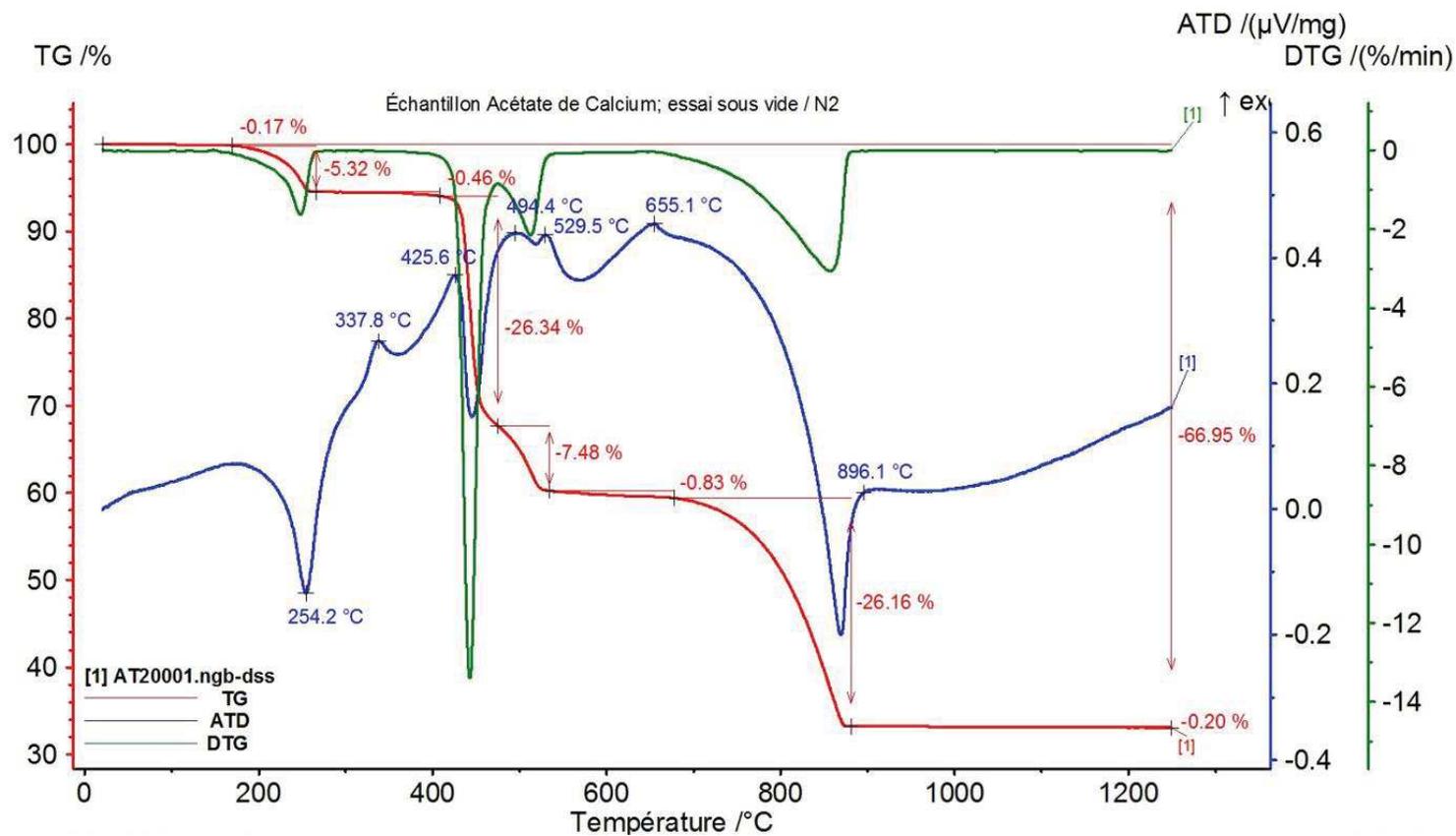
1. Références

- [1] C. R. Wu, Z. Q. Hong, J. L. Zhang, and S. C. Kou, “Pore size distribution and ITZ performance of mortars prepared with different bio-deposition approaches for the treatment of recycled concrete aggregate,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 111, no. April, p. 103631, 2020, doi: 10.1016/j.cemconcomp.2020.103631.
- [2] J. Wang, B. Vandevyvere, S. Vanhessche, J. Schoon, N. Boon, and N. De Belie, “Microbial carbonate precipitation for the improvement of quality of recycled aggregates,” *J. Clean. Prod.*, vol. 156, pp. 355–366, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.04.051.

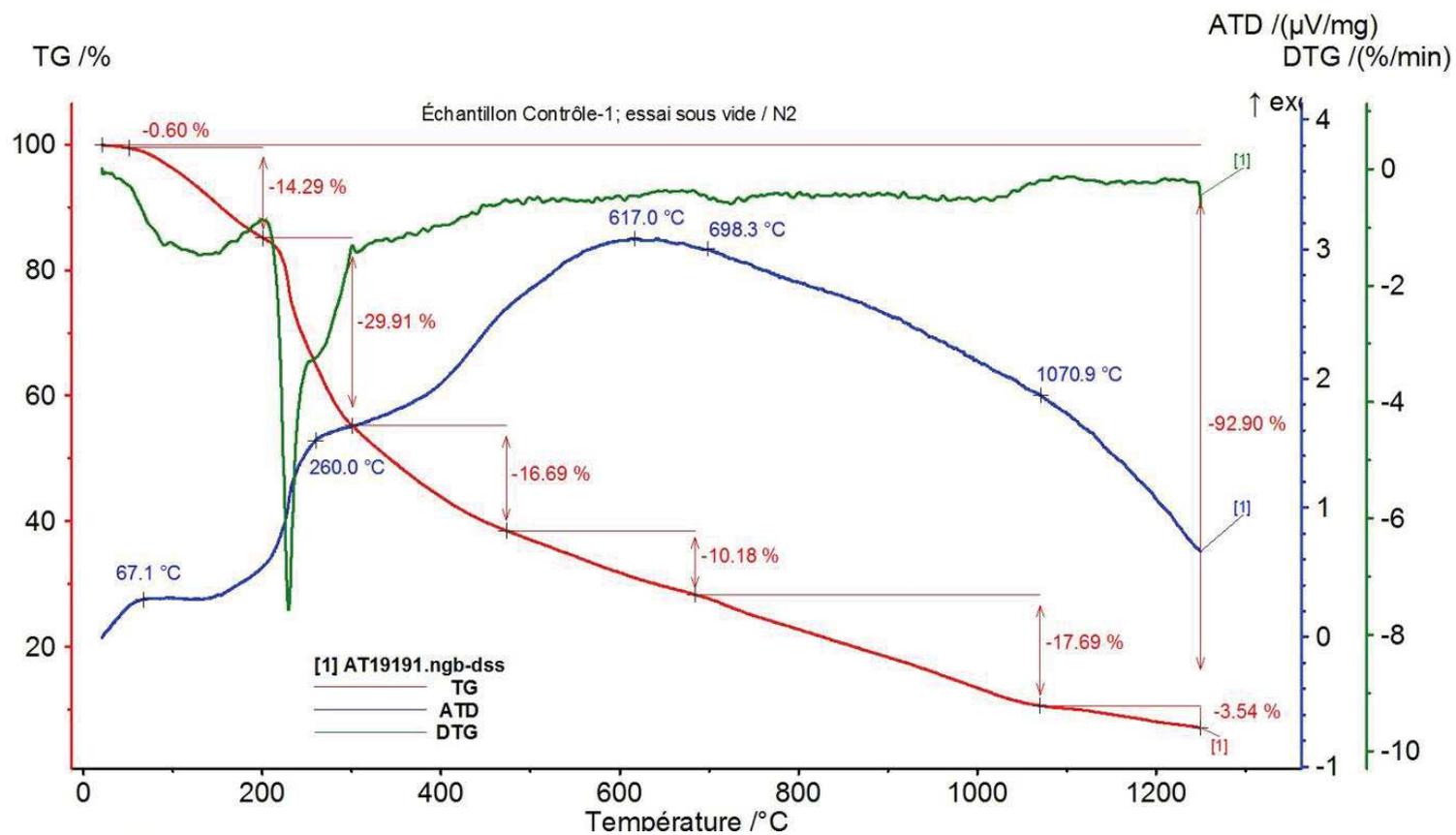
Annexes

Annexe A : Analyse Thermogravimétrique de l'acétate de calcium seul et de la gélose nutritive seule

Acétate de calcium seul



Gélose nutritive seule



Annexe B : Séquences génétiques des protéines TAS A et TAP A de la bactérie *Bacillus subtilis* str. 168

Tas A protéine

>NC_000964.3:c2553866-2553081 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 complete genome

ATGGGTATGAAAAGAAATTGAGTTTAGGAGTTGCTTCTGCAGCACTAGGATTAG
CTTTAGTTGGAGGAGGAACATGGGCAGCATTAAACGACATTAATCAAAGGATG
CTACTTTTGCATCAGGTACGCTTGATTTATCTGCTAAAGAGAATTCAGCGAGTGTG
AACTTATCAAATCTAAAGCCGGGAGATAAGTTGACAAAGGATTTCCAATTTGAAA
ATAACGGATCACTTGCGATCAAAGAAGTTCTAATGGCGCTTAATTATGGAGATTT
TAAAGCAAACGGCGGCAGCAATACATCTCCAGAAGATTTCTCAGCCAGTTTGAA
GTGACATTGTTGACAGTTGGAAAAGAGGGGCGGCAATGGCTACCCGAAAAACATT
ATTTTAGATGATGCGAACCTTAAAGACTTGTATTTGATGTCTGCTAAAAATGATG
CAGCGGCTGCTGAAAAAATCAAAAAACAAATTGACCCTAAATTCTTAAATGCAA
GCGGTAAAGTCAATGTAGCAACAATTGATGGTAAAACCGCTCCTGAATATGATGG
TGTTCCAAAAACACCAACTGACTTCGATCAGGTTCAAATGGAAATCCAATTCAAG
GATGATAAAACAAAAGATGAAAAGGGCTTATGGTTCAAATAAATATCAAGGC
AACTCCATTAAGCTTCAATTCTCATTCGAAGCTACACAGTGGAAACGGCTTGACAA
TCAAAAAGGACCATACTGATAAAGATGGTTACGTGAAAGAAAATGAAAAAGCGC
ATAGCGAGGATAAAAATTAA

Tap A protein

>NC_000964.3:c2555247-2554486 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 complete genome

ATGTTTCGATTGTTTCACAATCAGCAAAAGGCGAAGACGAAACTGAAAGTTCTGC
TTATCTTTCAGCTTTCAGTCATTTTCAGTCTGACTGCCGCAATATGCTTACAATTTT
CCGATGATAACAAGCGCTGCTTTTCATGATATTGAAACATTTGATGTCTCACTTCAA
ACGTGTAAAGACTTTCAGCATAACAGATAAAAACCTGCCATTATGATAAACGCTGGG
ATCAAAGTGATTTGCACATATCAGATCAAACGGATACGAAAGGCACTGTATGCTC
ACCTTTCGCCTTATTTGCTGTGCTCGAAAATACAGGTGAGAACTTAAGAAATCA
AAGTGGAAGTGGGAGCTTCATAAGCTTGAAAATGCCCGCAAACCGTTAAAGGAT
GGGAACGTGATCGAAAAAGGATTTGTCTCCAATCAAATCGGCGATTCACTTTATA
AAATTGAGACCAAGAAAAAATGAAACCCGGCATTATGCATTTAAAGTATATA
AACCGGCAGGCTACCCGGCAAACGGCAGTACATTTGAGTGGTCGGAGCCTATGA
GGCTTGCAAATGCGATGAAAAACCGACAGTCCCTAAAAAAGAAACAAAGTCGG
ACGTCAAAAAGGAGAATGAAACAACAAAAAGATATACCGGAAAAACAATG
AAAGAAGAAACATCTCAAGAAGCTGTAACCAAAGAAAAAGAACTCAATCAGAC
CAGAAGGAAAGCGGGGAAGAGGATGAAAAAAGCAATGAAGCTGATCAGTAA

Annexe C: Séquences de ARN ribosomique 16S des bactéries B.H (A2-3), A1-5 et B1-6

B.H (A2-3) associé à *Bacillus haynesii* strain NRRL B-41327

TCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGNTGTTAGCGGCGGACGGGTGNNNN
NNNNNNNNACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAANNNNNNNNNNNTAC
CGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCA
CTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTG
TTGTTTRGGRARGAACAAKTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGNCNNTWYYTTA
NCCAGAAAGCCACGGCTNAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTNCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGCGGTTTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACT
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
GCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCNCTT
CGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGNTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAAC
AAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTC
GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACNCNCCNCCCGTCACACCA
CGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTANCCNNTNGAGCCNCCNC

A1-5 associé à *Bacillus licheniformis* strain DSM 13

NGCAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTANCNNNNGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCNNTCNTAAAAGGGGGNTTTT
ANCTACCNCTTNCNNTATGGNCCCGCGGCGCATTAACTANTTGGNGANGNAACGG
NTCNCNANGNACNANGCNANCCNANCNANAGGGNGANCNGNCNCTGG
GACTGANACNCGGNCCANANTCCTACGGGAGGNNNNANTAGGGAATCTTCCNCA
ATGGACNAAAGTCTGACNGAACACGCCNCNNGANNNGATGAANGNTTTCNGATC

GNAAAANTCTGTTGNTANGGAANAACAAGTWCCGNTCGAATAGGGNGGNNCCTT
GNCNGTACCTAACCNAGNAAAGCCNCNGCTAANTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGC
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGARGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCNTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGRAARNNCGTGGGGNAGCGAACAGGNATTAGATACCCT
GGTANGYCCACGCCCGKTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCT
TTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGNAGTACNGGTCGCAA
GACTGAAACTCAAAGGAANTTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGNTGGAGCATG
TGGTTAANTTCGAAGCAACGNCCGAAGAACCTTWMMCGGTCTTGACATCCTCT
GACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGYGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAA
GCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT
GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACNCNNNNNNNGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGG
TGAGGTAACCT

B1-6 associé à *Bacillus licheniformis* strain DSM 13

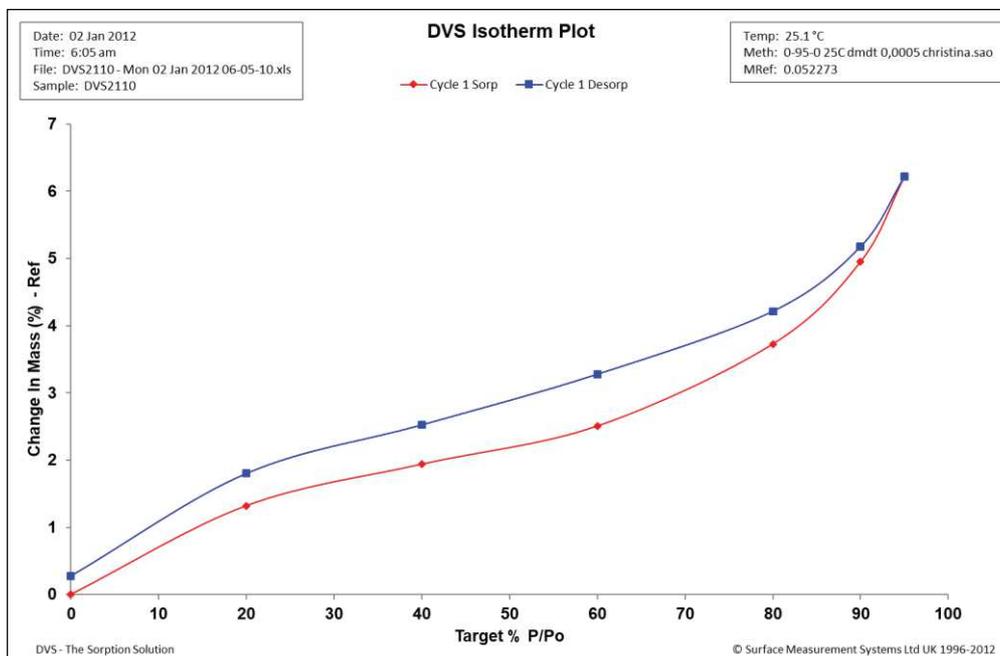
TGCAGTCGAGCGGNNCGACGGGNGCTTGCTCCCTTANGTCAGCGGCGGACGGGT
GANTNNNNNNNGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCNNTCNTNAAAGGTGGCTTTT
AGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACNCTGGGA
CTGANACACGGCCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCAGCACCTTGAC
GGTACCTAACCNRRRAAGCCACGGCTNAACTACGTGCCAGCAGNCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAANTWATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGANAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCYTNTTAGTG
CTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCNGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGAT
AGGGCTTNCCTTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT

Annexes

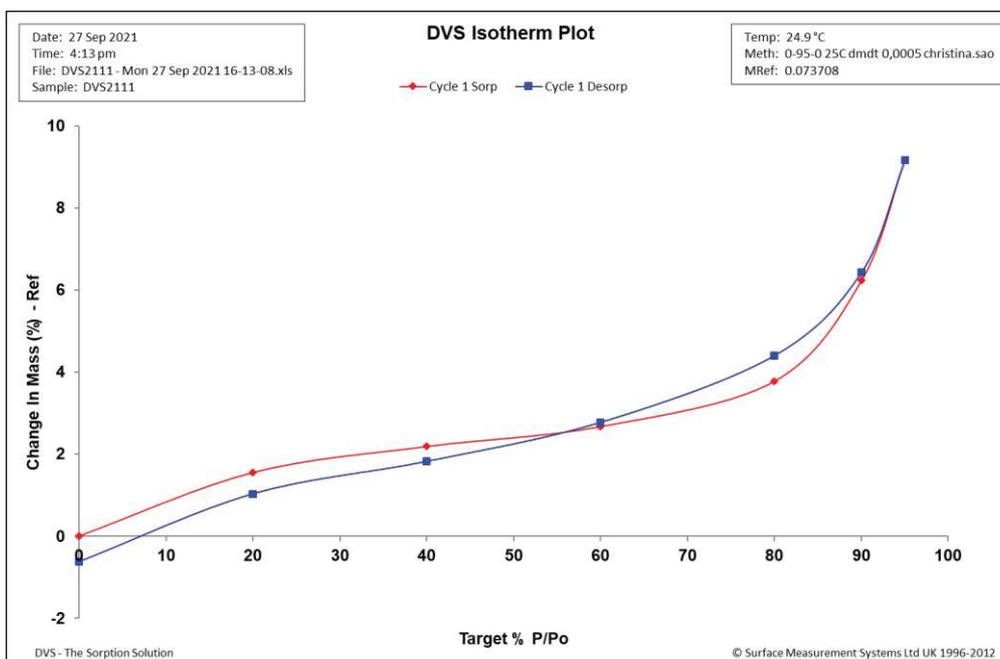
GCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA
CAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGNTAAGCCAATCCCACAAAT
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGNCCTTGNNCNNN
NCNNCGTCACACCACGAGAGTTTNTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTANCNNN
NNGAGCCNNC

Annexe D: diagrammes DVS de CaCO₃ bioprécipité B.H de la pâte de ciment CEM I

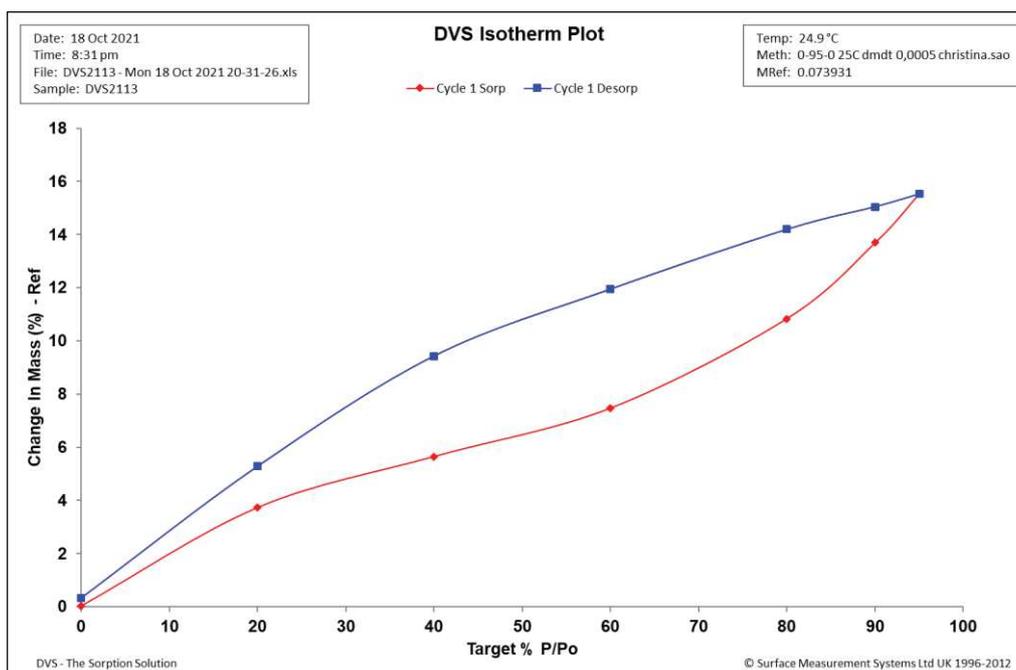
Echantillon B8 - (CaCO₃ bioformé)



Echantillon B10 - (CaCO₃ bioformé)



Pate de ciment (CEM I)



Annexe E :Sommaire des inoculations par manipulation

	Section	Sous-section	Condition dans les manipulations	Stock	Inocula UFC·cm ⁻²				Volume de l'inoculât	Support	Acétate de calcium g·cm ⁻²
Chapitre 3	6	6.2	/	Dilution 10 ⁻³	51.8				275 µL	Gélose Ø 13.5 cm	/
		6.3	/		38						
Chapitre 4	2	2.2	1	Dilution 10 ⁻³	48				275 µL	Gélose Ø 13.5 cm	1 x 10 ⁻³
			2	Dilution 10 ⁻⁴	4.8						
		2.3	1	Dilution 10 ⁻³	65						
			2	Dilution 10 ⁻⁴	6.5						
Chapitre 5	2	2.1	/	Dilution 10 ⁻³	5.9				100 µL	Gélose Ø 8.5 cm	8.8 x 10 ⁻⁴
	3	3.1	/	Dilution 10 ⁻⁴	7				275 µL	Gélose Ø 13.5 cm	7.8 x 10 ⁻³
	4	4.1	/	Dilution 10 ⁻³	5.9				100 µL	Gélose Ø 8.5 cm	8.8 x 10 ⁻⁴
	5	5.1	/	Dilution 10 ⁻⁴	7				275 µL	Gélose Ø 13.5 cm	7.8 x 10 ⁻³
Chapitre 6	2	2.1	A	Suspension mère	3.6 x 10 ⁴				275 µL	Gélose Ø 13.5 cm	2.6 x 10 ⁻²
			B	Dilution 10 ⁻¹	3.6 x 10 ³						
			C	Dilution 10 ⁻²	360						
			D	Dilution 10 ⁻³	36						
			E	Dilution 10 ⁻⁴	3.6						
	3	3.1	/	Suspension mère	3.8 x 10 ⁴				275 µL	Gélose Ø 13.5 cm	2.6 x 10 ⁻²
	4	4.1	/	A	Suspension mère	3.8 x 10 ⁴				275 µL	Gélose Ø 13.5 cm
B				1.8 x 10 ⁻²							
C				1.3 x 10 ⁻²							
Chapitre 7	1	1.1	A	Suspension mère	T0		7j		3 mL	Mortier Ø 6 cm	/
			B		3.2 x 10 ⁶		2.9 x 10 ⁶				
		1.2	/		T0	3j	7j	10j	Par échéance		
			/		1.5 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷	2.3 x 10 ⁷	6.7 x 10 ⁷	3 mL		
		1.3	A		T0				T0		

Annexes

				$1 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$				12 mL			
				T0		6j		Par échéance			
				5×10^6		2×10^5		6 mL			
				T0	3j	6j	10j	Par échéance			
2	2.1	/		2×10^6	2×10^6	2×10^5	8.3×10^5	3 mL		2.1×10^{-2}	
				T0				T0			
	2.2	/		1×10^7				12 mL	Gélose Ø 13.5 cm	1.3×10^{-2}	
				T0	6j	11j	17j	T0			
	2.3	X		Y	2×10^7	2×10^7	2×10^7	2×10^7	275 µL	Mortier Ø 6 cm	1.3×10^{-2}
					T0				T0		
					9.1×10^6				12 mL		
					T0 – 1 cycle		T0 – 2 cycle		Par échéance		
						9.1×10^6	7.6×10^6	12 mL			

Titre : Amélioration de granulats de béton recyclé par bioprécipitation

Mots clés : béton, recyclage, sable de béton recyclé, biocarbonatation, absorption d'eau

Résumé : Les granulats de béton recyclé (GBR) contiennent, de par leur origine, de la pâte de ciment résiduelle qui leur confère une forte porosité et des performances modérées. La porosité conduit à une absorption d'eau forte. C'est une difficulté importante sur le plan industriel car elle complique l'ajustement de l'eau dans les bétons qui permet de maîtriser leur ouvrabilité en production. Le processus de fabrication des GBR conduit à avoir plus de pâte dans les particules les plus fines et donc plus d'absorption. En conséquence, si aujourd'hui l'industrie recycle relativement bien les gravillons de GBR dans les bétons, elle utilise peu les sables de GBR, du fait de leur plus grande porosité. Or, lors de la fabrication des GBR, on obtient environ 50 % de sables et 50 % de gravillons. En conséquence, la porosité des sables de GBR est un frein à l'économie circulaire du béton.

Un certain nombre de techniques ont été proposées pour éliminer ou améliorer la pâte de ciment résiduelle mais elles posent des problèmes de coût. La carbonatation naturelle des GBR par le CO₂ atmosphérique contribue à diminuer leur absorption d'eau en obstruant leur porosité, mais c'est une réaction qui dure plusieurs mois. Des recherches sont en cours pour faire de la carbonatation accélérée (en concentrant le CO₂ par exemple) à l'échelle industrielle.

Le présent travail explore une idée alternative qui consiste à former en quelques jours, à l'aide de bactéries biocalcifiantes, une gangue de CaCO₃ autour des GBR et surtout de la partie sableuse, afin de limiter l'accès de l'eau à leur porosité. Dans un premier temps, des bactéries candidates non pathogènes ont été identifiées, sélectionnées, adaptées au milieu alcalin des GBR, puis nous avons vérifié leur aptitude à produire du CaCO₃. Dans un second temps, nous avons déterminé les conditions qui favorisent une croissance des bactéries et une production de CaCO₃ homogènes sur la surface de milieux gélosés modèles. L'homogénéité est en effet une condition sine qua non pour obtenir une bonne étanchéité à l'eau. Nous avons ainsi confirmé l'intérêt de sélectionner des bactéries capables de produire du biofilm. Enfin, les procédés développés ont été appliqués à des disques de mortier modèles facilitant les observations visuelles. Les résultats préliminaires confirment qu'il est possible de faire baisser l'absorption de ces mortiers de façon notable à l'échéance d'un mois.

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats encourageants sur sable de GBR.

Title : Enhancement of recycled concrete aggregates by bioprecipitation

Keywords : concrete, recycling, recycled concrete sand, biocarbonation, water absorption

Abstract : Recycled concrete aggregates (RCA) contain, due to their origin, residual cement paste which gives them high porosity and moderate performance. The porosity leads to a strong water absorption. This is a major difficulty on the industrial level because it complicates the adjustment of water in concrete batches, which allows to control their workability in production. The RCA manufacturing process results in having more paste in the finer particles and therefore more absorption. As a result, while the industry today recycles coarse RCA into concrete relatively well, it uses small amounts of RCA sand because of their greater porosity. Yet, during the manufacture of RCA, about 50% sand and 50% coarse aggregates are obtained. Consequently, the porosity of RCA sand hinders the circular economy of concrete.

A number of techniques have been proposed for removing or improving the residual cement paste, but they are expensive. The natural carbonation of RCA by atmospheric CO₂ helps with decreasing their water absorption by obstructing their porosity, but this is a several month reaction. Research is ongoing to make

accelerated carbonation (by concentrating CO₂, for example) on an industrial scale.

The present work explores an alternative idea, which consists in forming in a few days, using biocalcifying bacteria, a matrix of CaCO₃ around the RCA and especially the sand part, in order to limit the access of water to their porosity. First, candidate non-pathogenic bacteria were identified, selected, adapted to the alkaline medium of RCA, then we checked their ability to produce CaCO₃. In a second step, we determined the conditions, which favor uniform bacterial colonization and production of CaCO₃ on the surface of model agar media. Homogeneity is indeed mandatory to obtain good water tightness. We thus confirmed the value of selecting bacteria capable of producing biofilm. Finally, the methods developed were applied to model mortar disks facilitating visual observations. Preliminary results confirm that it is possible to significantly lower the absorption of these mortars within one month.

Further work is needed to confirm these encouraging results on sand part of RCA