

N° d'ordre : 41644



## THÈSE

Présentée en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR

spécialité : Géosciences

Par

Jean DUCASSE-LAPEYRUSSE

Doctorat délivré conjointement par  
l'ENSM Douai, l'Université de Lille 1 et l'Université de Sherbrooke

# Étude du potentiel d'autocicatrisation et de biocicatrisation de matériaux cimentaires fissurés

Soutenue le 18 décembre 2014 devant le jury d'examen :

Directeur	Richard GAGNÉ	(Professeur, U. Sherbrooke)
Co-Directrice	Christine LORS	(Professeur, ENSM Douai)
Rapporteur	Arezki TAGNIT-HAMOU	(Professeur, U. Sherbrooke)
Rapporteur	Alexandra BERTRON	(HDR, UPS Toulouse)
Examineur	Hubert CABANA	(Professeur, U. Sherbrooke)
Examineur	Farid BENBOUDJEMA	(HDR, ENS Cachan)
Président du jury	Denis DAMIDOT	(Professeur, ENSM Douai)

Laboratoires d'accueil : Département GCE, ENSM Douai  
et Faculté de Génie Civil de l'Université de Sherbrooke

Ecole Doctorale SMRE 104 (Lille I)



À mes parents.



# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier du fond du cœur Angela Jang pour son soutien moral et de sa présence précieuse à mes côtés durant cette thèse.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse M. Richard Gagné qui m'a fait confiance et m'a offert la formidable opportunité de faire cette thèse en co-tutelle entre le Québec et la France. Je tiens également à le remercier pour toute son aide, son investissement et tout le savoir scientifique qu'il a mis au service de cette thèse, sans oublier l'enthousiasme qu'il a su me communiquer. Je tiens à remercier ma co-directrice de thèse, Mlle Christine Lors, pour les précieux enseignements et savoirs que j'ai pu retirer grâce à elle. Je la remercie aussi pour son investissement et son appui tout au long de cette thèse.

Je souhaite témoigner de ma reconnaissance à M. Denis Damidot pour son implication, l'appui et l'expertise scientifique indispensable qu'il a apportés à ce projet. Je remercie Mme Alexandra Bertron, M. Hubert Cabana, M. Arezki Tagnit-Hamo et M. Farid Benboudjema qui ont accepté de faire partie de mon jury. Je les remercie pour toutes leurs remarques, leurs avis et leurs éclairages forts constructifs.

La réalisation de cette thèse repose sur l'aide et le savoir-faire inestimables de toute une équipe, ou plutôt de deux équipes. Je tiens donc à remercier vivement les professionnels de recherche et les techniciens de la faculté de Sherbrooke : M. Olivier Bonneau, M. Claude Faucher, M. David Harbec, Mme. Ghislaine Luc, M. Rajko Vojnovic, M. Denis Bolduc et Mme Josée Bilodeau. L'équipe de l'école des mines de Douai a pareillement fortement contribué à la bonne réalisation de cette thèse. Je remercie Mme Johanna Caboche (un très grand merci), M. Ghislain Louis, M. Guillaume Potier, M. Damien Bétrancourt, M. Dominique Dubois, M. David Bulteel, M. Sébastien Raymond, M. Yannick Mamindy-Pajany, M. Michael D'Helft, Mme Carole Delcambre et Mme Jacqueline Woitrain.

Pour le soutien moral et l'entraide, je me dois de remercier les collègues stagiaires et doctorants de Douai : Coralie Deparis, Thomas Valeyre, Kévin Clarke, Romain Tessier, Thomas Deschamps, Moussa Dia, Maxime Renaut, Florimond Delobel, Emminence Dorelle, Alexandra Bourdot, Cyril Scribot, Abdelfeteh Sadok, Zengfeng Zhao, Kai Wu, Coralie Hamiez, Thang Le, Adolphe Kimbonguila, Issameddine Khezami, Abdelhafid Kasmi, Hassane Azrar, Raouf Achour. Du côté de Sherbrooke, c'est " la gang " du groupe béton à qui je dois d'avoir autant apprécié Sherbrooke. Un grand merci à Behrouz Esmailkhanian, Masoud Hosseinpoor, Aurélien Perez-Schell, Maryna Danilova, Ana Balaguer Pascual, Tanya Davidenko, Baudouin Aissoun, Ailing Xie, Jing Pan, Kelly Olivier, Salma Fattahi, Daddy Kabagire Kibenga, Magali Suc, Josep Aliques Granero, Fabien Fromara, Ali Hussein, Sihem Chekireb, Alexandre Schwartz, Emeline Kaluszynski, Maël Thevenot, Lionel Muraz, Dimitri Feys, Paco Diederich, Pauline Segui, Régis Bouchard, Jules Morin, Jean-Philippe Faubert, William Wilson, Yves Ablam Zidol et Rami Khatib.

Enfin, je remercie ma famille, ma soeur Alice et mes parents, Isabelle et Alain Ducasse-Lapeyrusse, qui ont toujours cru en moi et m'ont toujours soutenu.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>État de l'art</b>	<b>5</b>
2.1	Introduction à l'état de l'art . . . . .	5
2.2	Phénomène d'autocicatrisation naturelle . . . . .	6
2.2.1	Définition . . . . .	6
2.2.2	Mise en évidence du phénomène de l'autocicatrisation naturelle . . . . .	6
2.2.3	Mécanismes de l'autocicatrisation naturelle . . . . .	12
2.2.4	Techniques de mesure et modélisation . . . . .	18
2.2.5	Cinétique de l'autocicatrisation naturelle et paramètres d'influence . . . . .	20
2.3	Amélioration du phénomène naturel d'autocicatrisation . . . . .	25
2.3.1	Bétons hautes performances et bétons fibrés . . . . .	25
2.3.2	Additions minérales et autres ajouts . . . . .	28
2.3.3	Capsules et système vasculaire . . . . .	34
2.3.4	Matériaux à mémoire de forme . . . . .	35
2.3.5	Synthèse des différentes stratégies d'améliorations de la cicatrisation . . . . .	37
2.4	Phénomène de biocicatrisation . . . . .	39
2.4.1	Mécanismes de la précipitation microbienne de carbonate de calcium . . . . .	39
2.4.2	Paramètres d'influence . . . . .	44
2.4.3	Sélection des souches bactériennes . . . . .	47
2.4.4	Objectifs de la biocicatrisation . . . . .	49
2.4.5	Biominéralisation sur différents matériaux . . . . .	50
2.5	Biocicatrisation des matériaux cimentaires . . . . .	54
2.5.1	Injection dans les fissures . . . . .	54
2.5.2	Immersion et traitement de surface . . . . .	57
2.5.3	Bactéries incluses dans le matériau cimentaire . . . . .	61
2.5.4	Biotraitement inertes dans le matériau cimentaire . . . . .	64
2.5.5	Influence de la composition du matériau . . . . .	69
2.5.6	Biotraitement avec capsules et système vasculaire . . . . .	70
2.6	Conclusion de l'état de l'art . . . . .	73
<b>3</b>	<b>Objectifs de la thèse et démarche expérimentale</b>	<b>77</b>
3.1	Problématique . . . . .	77
3.2	Objectifs de l'étude . . . . .	79
3.3	Choix des variables . . . . .	81
3.3.1	Composition du mortier . . . . .	81
3.3.2	Ouvertures des fissures . . . . .	81
3.3.3	Conditionnement des éprouvettes . . . . .	81
3.3.4	Fissures fraîches et fissures carbonatées . . . . .	81
3.3.5	Souches bactériennes . . . . .	82
3.3.6	Nutriments . . . . .	82

---

3.3.7	Précurseurs de précipitation . . . . .	83
<b>4</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>85</b>
4.1	Préparation des mortiers fissurés . . . . .	85
4.1.1	Composition du mortier . . . . .	85
4.1.2	Réalisation et fissuration des éprouvettes de mortier . . . . .	86
4.1.3	Éprouvettes fraîchement fissurées et éprouvettes avec fissures carbonatées . . . . .	88
4.2	Essais de cicatrisation abiotique sur mortiers fissurés . . . . .	89
4.2.1	Mode d'application des solutions de précurseur dans les fissures . . . . .	89
4.2.2	Conditionnement des éprouvettes de mortier . . . . .	90
4.2.3	Mesures et suivi de la cicatrisation . . . . .	90
4.3	Essais de croissance bactérienne dans différents milieux de culture . . . . .	94
4.3.1	Méthodes d'analyses microbiologiques . . . . .	94
4.3.2	Essais de croissance bactérienne en erlenmeyers . . . . .	96
4.3.3	Essais de croissance bactérienne avec le système Oxitop <sup>®</sup> . . . . .	97
4.4	Essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés. . . . .	98
<b>5</b>	<b>Résultats des essais de cicatrisation abiotique de mortiers fissurés</b>	<b>101</b>
5.1	Résistance en compression du mortier . . . . .	101
5.2	Autocicatrisation naturelle . . . . .	102
5.2.1	Évolution de l'ouverture apparente avec l'autocicatrisation naturelle	102
5.2.2	Observations au microscope électronique à balayage des mortiers fissurés autocicatrisés naturellement . . . . .	103
5.3	Cicatrisation en présence de précurseurs . . . . .	106
5.3.1	Évolution de l'ouverture apparente en présence de précurseurs . . . . .	106
5.3.2	Observations au microscope électronique à balayage des mortiers fissurés imprégnés de précurseurs . . . . .	111
5.4	Cicatrisation sur des fissures pré-carbonatées . . . . .	120
5.5	Précipitation du lactate de calcium sur mortier . . . . .	121
5.6	Discussion sur les essais de cicatrisation abiotiques des mortiers . . . . .	126
5.6.1	Évolution des ouvertures apparentes des fissures fraîches . . . . .	126
5.6.2	Évolution des ouvertures apparentes des fissures pré-carbonatées . . . . .	132
5.6.3	Observations des produits de cicatrisation . . . . .	133
5.7	Conclusion des essais abiotiques sur mortier . . . . .	137
5.7.1	Autocicatrisation naturelle . . . . .	137
5.7.2	Cicatrisation des fissures fraîches avec précurseur . . . . .	137
5.7.3	Cicatrisation des fissures pré-carbonatées . . . . .	138
<b>6</b>	<b>Résultats des essais de croissance bactérienne</b>	<b>139</b>
6.1	Phase 1 : Croissance dans le milieu recommandé . . . . .	140
6.1.1	Première partie : effet de la température et de la solution d'ajustement du pH initial . . . . .	140
6.1.2	Seconde partie : effet du pH sur la croissance des deux souches bactériennes testées . . . . .	150

---



6.1.3	Conclusion de la phase 1 . . . . .	152
6.2	Phase 2 : Croissance bactérienne en présence de précurseur . . . . .	154
6.2.1	Essais en erlenmeyers . . . . .	156
6.2.2	Essais en Oxitop . . . . .	160
6.2.3	Mécanisme de dégradation du lactate . . . . .	170
6.2.4	Conclusion de la phase 2 . . . . .	173
6.3	Phase 3 : Croissance en présence de lactate de calcium avec différents ajustements du pH . . . . .	174
6.3.1	Essais en présence de lactate de calcium et de différents ajustements du pH . . . . .	175
6.3.2	Conclusion de la phase 3 . . . . .	185
6.4	Phase 4 : Croissance de <i>B. pseudofirmus</i> dans les milieux sélectionnés . . .	186
6.4.1	Croissance bactérienne dans le milieu LN75 . . . . .	188
6.4.2	Croissance bactérienne dans le milieu LN75 avec différentes concentrations de nitrate de calcium . . . . .	192
6.4.3	Croissance bactérienne dans le milieu LNCa,ensemencé à partir d'une préculture classique . . . . .	195
6.4.4	Croissance bactérienne dans le milieu LNCa,ensemencé à partir d'une préculture avec nitrate de calcium . . . . .	199
6.5	Conclusion sur l'étude de la croissance bactérienne . . . . .	206
<b>7</b>	<b>Résultats des essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés</b>	<b>207</b>
7.1	Évolution des ouvertures de fissures . . . . .	207
7.2	Suivi de l'activité bactérienne au cours des essais de biocicatrisation . . . .	210
7.3	Observations microscopiques des mortiers fissurés . . . . .	211
7.3.1	Observations à la loupe binoculaire . . . . .	211
7.3.2	Analyse par DRX des phases formées sur la surface interne des fissures	217
7.3.3	Observations au microscope électronique à balayage des surfaces internes des fissures . . . . .	218
7.3.4	Observations au microscope électronique à balayage d'une coupe transversale à la fissure . . . . .	225
7.4	Discussion sur les essais de biocicatrisation . . . . .	230
7.5	Conclusion des essais de biocicatrisation . . . . .	231
<b>8</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>233</b>
8.1	Essais de cicatrisation abiotique de mortiers fissurés . . . . .	234
8.2	Essais de croissance bactérienne . . . . .	236
8.3	Essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés . . . . .	239
<b>A</b>	<b>Notation cimentière</b>	<b>243</b>
<b>B</b>	<b>Validation du modèle de régression entre le débit d'air et l'ouverture de la fissure</b>	<b>245</b>
B.1	Ajustement des données par des régressions non linéaires . . . . .	247
B.2	Validation du modèle . . . . .	249

---

---

B.2.1	Normalité des résidus . . . . .	249
B.2.2	Homoscédasticité des résidus . . . . .	250
<b>C</b>	<b>Évolution théorique lors d'une croissance bactérienne</b>	<b>253</b>
<b>D</b>	<b>Méthodes de stérilisation</b>	<b>255</b>
<b>E</b>	<b>Utilisation d'un biocide</b>	<b>257</b>
<b>F</b>	<b>Milieux de culture</b>	<b>259</b>
F.1	Milieu de culture, phase 1 . . . . .	259
F.2	Milieux de culture, Phase 2 . . . . .	261
F.3	Milieux de culture, Phase 3 . . . . .	262
F.3.1	Milieux de culture avec lactate de calcium et ajout de calcium à faible concentration, Phase 3 . . . . .	262
F.4	Milieux de culture, Phase 4 . . . . .	262
F.4.1	Milieux de culture à différentes concentrations en nitrate de calcium, Phase 4 . . . . .	262
F.4.2	Milieux de culture sélectionnés, Phase 4 . . . . .	263
<b>G</b>	<b>Système d'humidification des mortiers, conditions stériles</b>	<b>265</b>
<b>H</b>	<b>Milieux d'immersion pour les essais de biocicatrisation</b>	<b>267</b>
	<b>LISTE DES RÉFÉRENCES</b>	<b>269</b>

---

# LISTE DES FIGURES

2.1	Produits d'hydratation au sein d'une bulle . . . . .	13
2.2	Concentrations à saturation des ions $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{CO}_3^{2-}$ et $\text{HCO}_3^-$ . . . . .	15
2.3	Processus de précipitation de carbonate de calcium au sein des fissures . . . . .	16
2.4	Observation au microscope électronique à balayage de carbonate de calcium . . . . .	16
2.5	Schéma explicatif de l'autocicatrisation naturelle . . . . .	17
2.6	Schéma du cœur expansif . . . . .	21
2.7	Évolution de la perméabilité dans la fissure en fonction de la température . . . . .	22
2.8	Débit normalisé au cours du temps, en fonction de la température . . . . .	23
2.9	Fréquence de résonance en fonction du temps pour le Béton Ductal <sup>®</sup> FM exposé à différents environnements agressifs . . . . .	26
2.10	Relation entre l'endommagement "D" et l'autocicatrisation "A" . . . . .	28
2.11	Capacité de déformation normalisée pour chaque mélange . . . . .	31
2.12	Influences de la teneur en SBR dans les bétons et de la durée de cicatrisation sur les vitesses de propagation de ondes ultrasonore (% de cicatrisation). . . . .	34
2.13	Influences de la teneur en ACR dans les bétons et de la durée de cicatrisation sur les vitesses de propagation de ondes ultrasonore (% de cicatrisation). . . . .	34
2.14	Schéma du principe d'autocicatrisation avec microcapsules . . . . .	35
2.15	Observation au microscope électronique des microcapsules . . . . .	35
2.16	Courbes de flexion pour des poutres avec fibre à mémoire de forme . . . . .	36
2.17	Ouverture de la fissure avant et après l'activation de la fibre à mémoire de forme . . . . .	37
2.18	Réaction d'ammonification des acides aminés . . . . .	39
2.19	Diagramme des différents groupes fonctionnels associés aux SPE . . . . .	44
2.20	Schéma de l'action du $\zeta$ potentiel des cellules bactériennes sur la précipitation de carbonate de calcium . . . . .	45
2.21	Représentation schématique de l'activité bactérienne en milieu alcalin . . . . .	46
2.22	Distribution volumique des particules en fonction de leur tailles, sans et après traitement au milieu de culture contenant du $\text{CaCl}_2$ . . . . .	51
2.23	Changement relatif des vitesses ultra-sonores en fonction des différents techniques de réparation des fissures . . . . .	55
2.24	Coefficients de perméabilité à l'eau pour différentes tailles de fissures, après les différents techniques de réparation des fissures . . . . .	56
2.25	Observation des fissures après les différents traitements . . . . .	57
2.26	Absorption capillaire relative après les différents traitements de surface . . . . .	59
2.27	Perméabilités à l'oxygène . . . . .	59
2.28	Observations au microscope électronique de la morphologie des cristaux de calcite exposés aux différents milieux . . . . .	60
2.29	Estimation du nombre le plus probable de spores bactériennes viables dans le béton en fonction du temps . . . . .	61
2.30	Résistance en compression en fonction du temps pour les bétons contenant les différents précurseurs, sans bactéries. . . . .	62

2.31	Résultats des essais mécaniques pour les différents traitements . . . . .	64
2.32	Résistances en compression des différents mortiers incorporant des protéines	67
2.33	Taux de survie de <i>B. megaterium</i> dans le temps, en fonction du taux de remplacement en cendre volante dans les mortiers (M) et les bétons (C) . .	69
2.34	Eau absorbée dans les différents échantillons contenant différents taux de remplacement en cendre volantes en fonction du temps . . . . .	70
2.35	Pourcentage de fissures totalement cicatrisées, pour deux catégories d'ouverture de fissures . . . . .	71
3.1	Facteurs d'influence du processus de biocicatrisation . . . . .	78
3.2	Descriptif du programme expérimental . . . . .	80
3.3	Paramètres étudiés lors des différentes phases du programme expérimental	84
4.1	Dispositif du cœur expansif et une éprouvette de mortier . . . . .	86
4.2	Schéma de l'éprouvette et du cœur expansif . . . . .	87
4.3	Moule pour la réalisation des éprouvettes de mortier . . . . .	87
4.4	Schéma de la cellule de perméabilité à l'air . . . . .	91
4.5	Relation entre le débit expérimental et l'ouverture initiale d'une fissure . .	92
4.6	Système Oxitop® . . . . .	98
4.7	Schématisation des découpes pour l'observation au MEB de la fissure . . .	100
5.1	Moyennes des résistances en compression du mortier au cours du temps . .	101
5.2	Évolution de fissures soumises à l'autocicatrisation naturelle . . . . .	102
5.3	Calcite dans une fissure large à 6 mois, gros plan . . . . .	103
5.4	Calcite dans une fissure large à 6 mois, vue d'ensemble . . . . .	103
5.5	Ettringite dans le centre d'une fissure fine à 6 mois . . . . .	104
5.6	Ettringite tapissant le centre d'une fissure fine à 6 mois . . . . .	104
5.7	Analyse EDS des cristaux de calcite dans une fissure autocicatrisée . . . .	104
5.8	Analyse EDS des cristaux d'ettringite dans une fissure autocicatrisée . . .	105
5.9	Évolution de fissures avec lactate de calcium . . . . .	107
5.10	Évolution de fissures avec gluconate de calcium . . . . .	108
5.11	Évolution de fissures avec urée . . . . .	110
5.12	Ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 6 mois .	111
5.13	Ettringite dans une fissure fine imprégnée de lactate de calcium à 6 mois .	111
5.14	Analyse EDS de l'ettringite dans la fissure large présentée en figure 5.12 . .	112
5.15	Calcite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 6 mois . .	112
5.16	Analyse EDS de la calcite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 6 mois . . . . .	112
5.17	Ettringite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois	113
5.18	Ettringite dans une fissure fine imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois	113
5.19	Calcite dans une fissure large (192 $\mu\text{m}$ d'ouverture initiale) imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois . . . . .	113
5.20	Analyse EDS de la calcite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois . . . . .	113
5.21	Calcite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois .	114
5.22	Ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois	114

---

5.23	Analyse EDS de la calcite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois . . . . .	115
5.24	Analyse EDS de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois . . . . .	115
5.25	Calcite et ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois . . . . .	115
5.26	Analyse EDS de la calcite et de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois . . . . .	116
5.27	Portlandite et ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois . . . . .	116
5.28	Analyse EDS de la portlandite et de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois . . . . .	116
5.29	Calcite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois	117
5.30	Ettringite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois	117
5.31	Calcite et ettringite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois . . . . .	117
5.32	Analyse EDS de la calcite et de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois . . . . .	118
5.33	Calcite dans une fissure large imprégnée d'urée à 11 mois . . . . .	119
5.34	Ettringite dans une fissure large imprégnée d'urée à 11 mois . . . . .	119
5.35	Évolution des ouvertures apparentes de fissures carbonatées . . . . .	120
5.36	Observation au MEB du lactate de calcium précipité sur une feuille d'aluminium et analyse EDS correspondante . . . . .	122
5.37	Lactate de calcium précipité sur mortier carbonaté . . . . .	122
5.38	Lactate de calcium précipité sur mortier fraîchement fracturé . . . . .	122
5.39	Analyse EDS du lactate de calcium précipité sur mortier carbonaté . . . .	123
5.40	Analyse EDS du lactate de calcium précipité sur mortier fraîchement fracturé	123
5.41	Cristaux d'ettringite sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium . . . . .	123
5.42	Analyse EDS des produits formés sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium . . . . .	124
5.43	Formation de structures en aiguilles sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium . . . . .	124
5.44	Analyse EDS des structures en aiguilles sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium . . . . .	125
5.45	Corrélation entre les différents types de mesures de l'ouverture des fissures	127
5.46	Épaisseur apparente de la couche de cicatrisation à 6 mois . . . . .	128
5.47	Taux apparents de cicatrisation à 6 mois . . . . .	129
5.48	Taux apparents de cicatrisation des fissures fines à 6 mois . . . . .	130
5.49	Taux apparents de cicatrisation des fissures larges à 6 mois . . . . .	130
5.50	Taux apparents de cicatrisation des fissures larges à 11 mois . . . . .	130
5.51	Cinétique de cicatrisation au cours du temps . . . . .	131
5.52	Épaisseur apparente de la couche de cicatrisation, moyennes à 3 mois . . .	133
5.53	Changement de morphologie des cristaux d'ettringite en fonction du pH . .	134
5.54	Domaine de stabilité de l'ettringite selon les auteurs . . . . .	135

---

6.1	Schéma des essais menés en phase 1, première partie . . . . .	141
6.2	Suivi de la préculture ensemencée avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	142
6.3	Évolution de la densité optique dans les milieux de culture avec <i>B. pseudo-</i> <i>firmus</i> , phase 1 . . . . .	143
6.4	Évolution du nombre de bactéries <i>B. pseudofirmus</i> dans les milieux de culture, phase 1 . . . . .	144
6.5	Comparaison des mesures de comptage bactérien et des mesures de densité optique . . . . .	145
6.6	Évolution du pH dans les milieux de culture avec <i>B. pseudofirmus</i> , phase 1	145
6.7	Suivi de la préculture avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	146
6.8	Évolution de la densité optique dans les milieux de culture avec <i>B. cohnii</i> , phase 1 . . . . .	147
6.9	Évolution de la densité optique dans les milieux de culture avec <i>B. cohnii</i> avec NaOH, phase 1 . . . . .	148
6.10	Évolution du nombre de bactéries <i>B. cohnii</i> dans les milieux de culture, phase 1 . . . . .	149
6.11	Évolution du pH dans les milieux de culture avec <i>B. cohnii</i> , phase 1 . . . .	149
6.12	Schéma des essais menés en phase 1, seconde partie . . . . .	150
6.13	Demande biologique en oxygène de <i>B. pseudofirmus</i> dans des milieux Nu- trient Broth à différents pH . . . . .	151
6.14	Demande biologique en oxygène de <i>B. cohnii</i> dans des milieux Nutrient Broth à différents pH . . . . .	151
6.15	Schéma des essais menés en phase 2 . . . . .	155
6.16	Concentration en précurseurs avec <i>B. pseudofirmus</i> , milieux avec et sans nutriments . . . . .	156
6.17	Concentration en précurseurs avec <i>B. cohnii</i> , milieux avec et sans nutriments	157
6.18	Concentration en précurseurs avec <i>B. pseudofirmus</i> , évaluation de la concen- tration en extrait de levure . . . . .	158
6.19	Concentration en précurseurs avec <i>B. cohnii</i> , évaluation de la concentration en extrait de levure . . . . .	159
6.20	Diffraction aux rayon X du précipité formé dans le milieu de culture avec extrait de levure et gluconate de calcium, ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i>	159
6.21	Demande biologique en oxygène, milieux NB (3 g/L) avec <i>B. pseudofirmus</i>	160
6.22	Évolution de la concentration en précurseurs, milieux NB (3 g/L) avec <i>B.</i> <i>pseudofirmus</i> . . . . .	161
6.23	Évolution de la concentration de bactéries vivantes, milieux NB (3 g/L) avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	161
6.24	Évolution du pH, milieux NB (3 g/L) avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	162
6.25	Demande biologique en oxygène, milieux NB (3 g/L) avec <i>B. cohnii</i> . . . .	163
6.26	Évolution de la concentration en lactate, milieux NB (3 g/L) avec <i>B. cohnii</i>	163
6.27	Évolution de la concentration bactérienne, milieux NB (3 g/L) avec <i>B. cohnii</i>	164
6.28	Demande biologique en oxygène, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	165
6.29	Évolution de la concentration en précurseurs, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	166

---

6.30	Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	166
6.31	Évolution du pH, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	167
6.32	Demande biologique en oxygène, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	168
6.33	Évolution de la concentration en précurseurs, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	168
6.34	Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	169
6.35	Évolution du pH, milieux avec NB et extrait de levure avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	169
6.36	Analyse à la chromatographie ionique d'un milieu de culture avec lactate partiellement dégradé par les bactéries . . . . .	170
6.37	Schéma de décomposition possible du lactate . . . . .	171
6.38	Analyse par chromatographie ionique du milieu prélevé avec ajouts dosés . . . . .	172
6.39	Schéma des essais de croissance menés en phase 3 . . . . .	174
6.40	Évolution du pH, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	175
6.41	Évolution de la densité optique, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	176
6.42	Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	177
6.43	Évolution de la concentration en lactate, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	177
6.44	Évolution de la concentration en lactate et du calcium en solution, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	178
6.45	Évolution de la concentration en lactate, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. cohnii</i> pour filtration . . . . .	179
6.46	Analyse thermogravimétrique du précipité recueilli dans le milieu LN avec <i>B. cohnii</i> . . . . .	181
6.47	Évolution du pH, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	182
6.48	Évolution de la densité optique, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	183
6.49	Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	183
6.50	Évolution de la concentration en lactate, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	184
6.51	Schéma des essais menés en phase 4 . . . . .	187
6.52	Évolution du pH dans le milieu LN75ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	188
6.53	Évolution de la densité optique dans le milieu LN75ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	189
6.54	Évolution de la taille de la population bactérienne dans le milieu LN75ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	190
6.55	Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LN75ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	190

---

6.56	Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LN75 ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	191
6.57	Évolution du pH, milieux à différentes concentrations en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	192
6.58	Évolution de la densité optique, milieux à différentes concentrations en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	193
6.59	Évolution de la taille de la population de <i>B. pseudofirmus</i> dans les milieux avec différentes concentrations en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . . . . .	194
6.60	Évolution de la concentration en lactate, milieux à différentes concentrations en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	194
6.61	Évolution du pH dans le milieu LNCa ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	195
6.62	Évolution de la densité optique dans le milieu LNCa ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	196
6.63	Évolution de la taille de la population bactérienne dans le milieu LNCa ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	197
6.64	Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LNCa ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	198
6.65	Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LNCa ensemencé avec <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	198
6.66	Évolution du pH dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium . . . . .	199
6.67	Évolution de la densité optique dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium . . . . .	200
6.68	Évolution de la taille de la population bactérienne dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium . . . . .	201
6.69	Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium . . . . .	201
6.70	Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium . . . . .	202
6.71	Évolution du pH dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium) . . . . .	203
6.72	Évolution de la concentration bactérienne dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium) . . . . .	203
6.73	Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium) . . . . .	204
6.74	Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de <i>B. pseudofirmus</i> avec calcium) . . . . .	205
7.1	Évolution des ouvertures apparentes de fissures immergées dans le milieu LN75, avec et sans <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	208
7.2	Évolution des ouvertures apparentes de fissures immergées dans le milieu LNCa, avec et sans <i>B. pseudofirmus</i> . . . . .	209
7.3	Comptages bactériens dans l'eau des systèmes de stockages . . . . .	210
7.4	Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure avant immersion dans le milieu LN75 avec bactéries . . . . .	212



---

7.5	Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure avant immersion dans le milieu LNCa avec bactéries . . . . .	212
7.6	Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LN75 avec bactéries . . .	213
7.7	Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LN75 sans bactéries . . .	214
7.8	Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LNCa avec bactéries . .	215
7.9	Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LNCa sans bactéries . .	216
7.10	Analyse par diffraction des rayons X de la surface interne de la fissure biocicatrisée . . . . .	217
7.11	Observation de la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LN75 et bactéries . . . . .	218
7.12	Observations du biofilm et de cristaux de calcite enchevêtrés à la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LN75 et bactéries . . . . .	219
7.13	Cristaux de calcite et de fragments de biofilm à la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LN75 et bactéries . . . . .	219
7.14	Observation de la surface interne d'une fissure avec le milieu LN75 sans bactéries . . . . .	220
7.15	Observation de la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries . . . . .	221
7.16	Cristaux de calcite et biofilm sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries . . . . .	222
7.17	Biofilm sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries . . . . .	222
7.18	Cristaux de calcite et une portion de biofilm enchevêtrés sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries . . . . .	223
7.19	Cristaux de calcite dans une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries	223
7.20	Cristaux de calcite dans une fissure traitée avec le milieu LNCa sans bactéries	224
7.21	Analyses EDS de la zone proche du bord de la fissure . . . . .	226
7.22	Analyses EDS d'une zone au centre de la fissure . . . . .	227
7.23	Couche de calcite formée au cœur de la fissure . . . . .	227
7.24	Couche de calcite formée de part et d'autre de la fissure . . . . .	228
7.25	Observations de la fissure dans une zone proche du bord de l'éprouvette de mortier . . . . .	228
7.26	Observations de la couche de calcite dans une zone proche du bord de l'éprouvette de mortier . . . . .	229
B.1	Modèles de régression du débit d'air en fonction de l'ouverture des fissures par un polynôme de degrés 3 et un polynôme de degrés 2 . . . . .	247
B.2	Nouvelle courbe de corrélation entre le débit expérimental et l'ouverture initiale d'une fissure . . . . .	248
B.3	Résidus en fonction de l'ouverture de la fissure . . . . .	249
B.4	Droite de Henry des résidus . . . . .	250

---

C.1	Schéma de l'évolution théorique d'une croissance bactérienne . . . . .	253
E.1	Formule topologique du bronopol . . . . .	257
G.1	Système d'humidification des mortiers . . . . .	265

---

# LISTE DES TABLEAUX

2.1	Tableau de composition des bétons . [58] . . . . .	8
2.2	Durabilité et capacité d'autocicatrisation des bétons soumis aux cycles de gel/dégel. [58] . . . . .	9
2.3	Composition des mortiers pour l'étude de la cinétique de l'autocicatrisation	20
2.4	Tableau de composition des bétons Ductal <sup>®</sup> . [92] . . . . .	25
2.5	Tableau de la composition des bétons contrôle et BHP. (unité : kg/m <sup>3</sup> ). [137]	27
2.6	Caractéristiques des bétons : 040-00 sans fumée de silice, 040-05 avec 5 % de fumée de silice. [58] . . . . .	29
2.7	Proportion des mélanges des bétons avec sous-produits industriels. [93] . .	31
2.8	Avantages et inconvénients des différentes stratégies d'ingénierie de cicatrisation . . . . .	38
2.9	Bactéries impliquées dans le processus de biocicatrisation. . . . .	48
2.10	Synthèse des injections de colonnes de l'étude de Harkes et al. [46] . . . . .	52
2.11	Différentes techniques de réparation des fissures. [123] . . . . .	54
2.12	Résistance en compression des cubes de mortier avec les différents traitements de fissures. [9] . . . . .	57
2.13	Tableau des différents traitements appliqués. [25] . . . . .	58
2.14	Présentation des différents traitements de cicatrisation [132] . . . . .	63
2.15	Résistances en compression des différents mortiers incorporant des bactéries. [10] . . . . .	66
2.16	Tableau de composition des bétons autocicatrisants. [130] . . . . .	71
2.17	Composition des différents mortiers de l'étude de Sierra-Beltran et al. [108]	72
3.1	Analyses du Carbone Organique Total des nutriments utilisés. . . . .	83
3.2	Formules chimiques des précurseurs sélectionnés. . . . .	83
4.1	Analyses chimiques du ciment sur les différents oxydes présents . . . . .	85
4.2	Composition minéralogique du ciment en notation cimentière . . . . .	85
4.3	Concentration des solutions de précurseur. . . . .	89
5.1	Ouvertures apparentes des fissures au sein de mortiers avant et après 6 mois d'autocicatrisation naturelle. . . . .	103
5.2	Évolution des ouvertures apparentes des fissures imprégnées de lactate de calcium. . . . .	106
5.3	Évolution des ouvertures apparentes des fissures imprégnées de gluconate de calcium. . . . .	109
5.4	Évolution des ouvertures apparentes des fissures imprégnées d'urée. . . . .	110
5.5	Évolution des ouvertures apparentes des fissures carbonatées. . . . .	121
5.6	Tableau de synthèse des mesures des ouvertures apparentes. . . . .	126
5.7	Tableau de synthèse des mesures des ouvertures apparentes des fissures carbonatées. . . . .	132

6.1	Tableau récapitulatif de la première partie de la phase 1, avec <i>B. pseudofirmus</i> .	153
6.2	Tableau récapitulatif de la première partie de la phase 1, avec <i>B. cohnii</i> .	153
6.3	Résultats des filtrations et de l'analyse thermogravimétrique des précipités formés dans les milieux avec <i>B. cohnii</i> .	180
6.4	Quantification et analyse du précipité formé dans le milieu LN75.	189
6.5	Quantification et analyse du précipité formé dans le milieu LNCa.	196
6.6	Quantification et analyse du précipité formé dans le milieu LNCa, (préculture avec calcium).	205
7.1	Évolution des ouvertures apparentes de fissures imprégnées du milieu LN75 avec et sans bactéries.	208
7.2	Évolution des ouvertures apparentes de fissures imprégnées du milieu LNCa avec et sans bactéries.	209
7.3	Comptage bactérien et proportion de bactéries vivantes dans l'eau des systèmes de stockage.	211
A.1	Notations cimentières.	243
B.1	Ouvertures initiales des fissures observées au vidéomicroscope et les mesures du débit d'air correspondantes.	246
B.2	Coefficients des deux polynômes de régression et leurs écarts-types.	248
B.3	Tableau d'analyse statistique des résidus pour les trois groupes constitués.	251
F.1	Composition du milieu de la phase 1 à pH recommandé.	259
F.2	Composition des milieux à différents pH.	260
F.3	Composition des milieux avec précurseurs : phase 2.	261
F.4	Composition des milieux avec précurseurs (concentrations faibles) : phase 3.	262
F.5	Composition des milieux avec deux précurseurs : lactate de calcium et nitrate de calcium.	262
F.6	Composition finale des milieux avec précurseurs.	263
H.1	Composition des milieux d'immersion pour les essais de biocicatrisation.	267

# LEXIQUE

<b>Terme employé</b>	<b>Définition</b>
Cicatrisation	Processus de fermeture d'une fissure.
Autocicatrisation	Faculté de cicatrisation autonome, capacité naturelle ou apportée par des modifications du matériau.
Autocicatrisation naturelle	Capacité de cicatrisation intrinsèque des matériaux cimentaires classiques dans les conditions de température et d'humidité favorables.
Biocicatrisation	Cicatrisation utilisant l'action des bactéries.
Ouverture apparente	Ouverture d'une fissure estimée par mesure de perméabilité à l'air.
Taux apparent de cicatrisation	Réduction de l'ouverture apparente d'une fissure par rapport à son ouverture apparente initiale ; exprimée en %.
Épaisseur apparente de cicatrisation	Épaisseur de la couche de produits de cicatrisation formés sur la surface interne d'une fissure, dans le cas théorique d'une cicatrisation homogène.



# CHAPITRE 1

## Introduction

Soigner le béton, donner au minéral les capacités de guérison du vivant, c'est ce que pourrait offrir le monde microscopique au génie civil. Un ouvrage qui referme ses fissures comme le corps peut cicatriser ses plaies ; les possibilités que peuvent conférer les bactéries constitueraient une avancée considérable dans la construction d'un monde plus durable.

Le béton est le premier matériau de construction dans le monde. Il est au cœur de nos sociétés, dans les infrastructures et les bâtiments supportant les activités humaines. Sa durabilité est plus que jamais un impératif essentiel. Chaque année, de significatives ressources financières et techniques sont dévolues à la maintenance, à la réparation et à la reconstruction de structures en béton. Il est estimé qu'en Europe la moitié du budget annuel de construction est dépensé pour la réhabilitation et la réparation des structures existantes ([13] via [122]). Selon l'OCDE, au Canada, ce sont 8 milliards de dollars canadiens qui ont été dépensés en 2011 pour la seule maintenance des infrastructures routières. D'un point de vue environnemental, la reconstruction d'ouvrages prématurément endommagés amène à d'importantes émissions de gaz à effet de serre et à des dépenses en énergies qui auraient dû être évitées. La fabrication du ciment Portland libère de grandes quantités de dioxyde de carbone, qui font de l'industrie cimentière l'un des principaux émetteurs de CO<sub>2</sub>. Tous ces facteurs ont poussé la communauté scientifique à développer des solutions innovantes pour apporter une durabilité accrue à ce matériau.

La recherche s'est notamment intéressée à l'un des paramètres clés de la durabilité des ouvrages en béton : la fissuration. Telle une plaie ouverte, une fissure constitue un chemin préférentiel pour la pénétration des agents agressifs. Les ions sulfate, chlorure ou la simple circulation de l'eau peuvent mener à des pathologies aiguës du béton pouvant aboutir à la ruine de la structure : formation de produits expansifs, corrosion des armatures, lixiviation de la pâte de ciment.

Les traitements classiques pour colmater une fissure consistent à injecter des résines d'époxy ou de polyuréthane. Ces matériaux organiques sont polluants et leurs propriétés physiques les rendent peu compatibles avec les matériaux cimentaires sur le long terme [26].

Des scientifiques sont allés puiser dans le gigantesque réservoir à idées qu'est la nature pour développer une technique de réparation audacieuse : l'utilisation de bactéries pour former de la calcite (carbonate de calcium) dans le matériau de construction [42, 118]. Une grande partie des roches calcaires naturelles provient de l'activité des bactéries [15]. Cette capacité des bactéries à promouvoir la précipitation de carbonate de calcium est appelée carbonatogénèse bactérienne.

Initialement, l'utilisation de bactéries pour produire de la calcite a été appliquée au traitement des pierres calcaires [62, 74, 100]. Le matériau produit par les bactéries est identique au support à traiter, permettant une parfaite compatibilité. De plus, le processus étant biologique, cette méthode de réparation s'inscrit pleinement dans une démarche de développement durable.

Ayant un fort potentiel, la méthode a été transposée au béton. Le béton est un matériau qui a des caractéristiques physico-chimiques compatibles et proches de la pierre calcaire : composition minérale, porosité, coefficient de dilatation thermique. À la différence de la pierre calcaire, le béton est un matériau artificiel où l'humain contrôle la composition et la fabrication. Ainsi, des chercheurs ont inclus le traitement bactérien directement dans le matériau lors de sa fabrication [41, 65, 75, 130]. L'objectif est de conférer des capacités autonomes de cicatrisation au matériau, les bactéries venant refermer les fissures dès leur apparition. Cet ambitieux projet a néanmoins plusieurs défis à relever :

- La croissance des bactéries au sein du matériau et leur survie sur le long terme,
- Le maintien des performances mécaniques du matériau,
- Le coût de fabrication du matériau autocicatrisant.

Si quelques études sont encourageantes pour l'utilisation des bactéries incluses dans la matrice cimentaire [65, 130], d'autres pistes sont envisagées. Les bactéries peuvent être appliquées comme traitement post-fissuration en injection dans les fissures [9, 27, 123]. Contrairement aux traitements organiques classiques, les bactéries permettent une cicatrisation par un procédé biologique, écologique dont le produit de colmatage est complètement compatible avec le matériau endommagé.

Développer ces techniques de réparation nécessite de suivre leur influence sur l'évolution des fissures. Toutefois, de nombreux phénomènes influent sur les changements de géométrie et de propriétés de transport dans les fissures. Les bétons, dans des conditions de température et d'humidité favorables, sont capables naturellement d'autocicatrisation. Ce mécanisme inhérent aux matériaux cimentaires contribue à la fermeture des fissures, qui

---



---

peut être complète pour des ouvertures fines ( $< 50 \mu\text{m}$ ) [7, 40]. Évaluer le potentiel des traitements avec bactéries implique de distinguer la part de chaque mécanisme dans le processus de cicatrisation global.

Les méthodes de mesure, tout en permettant une estimation fiable de la cicatrisation, ne doivent pas interférer avec le phénomène mesuré. Les travaux sur l'autocicatrisation naturelle de Gagné et Argouges [40] ont utilisé un protocole reposant sur les mesures de débit d'air pour suivre l'évolution de l'ouverture des fissures. Le flux d'air, à des pressions limitées (50 kPa), n'affecte que très peu la cinétique de cicatrisation.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux. Elle s'appuie sur les connaissances de l'autocicatrisation naturelle apportée par l'étude de Gagné et Argouges [7, 40] et réutilise le protocole élaboré pour la mesure de l'ouverture apparente des fissures. Cet outil offre la possibilité d'étudier les différents mécanismes de cicatrisation pouvant affecter une fissure dans un matériau cimentaire. Le présent projet scientifique va s'attacher à étudier les mécanismes de la cicatrisation induite par l'activité bactérienne, la biocicatrisation. Cependant, afin de pouvoir identifier la contribution intrinsèque des bactéries dans la cicatrisation des fissures, il convient d'isoler la part due à l'autocicatrisation naturelle. L'étude de cette dernière est primordiale pour comprendre l'action des bactéries, elle est trop souvent négligée et sous-estimée dans les études portant sur la biocicatrisation. Une première partie de la recherche est consacrée à l'étude de ce phénomène sur des mortiers fissurés. À partir des connaissances acquises, une technique de biocicatrisation a été élaborée et évaluée. L'approche adoptée consiste à immerger une éprouvette de mortier fissurée dans une suspension bactérienne en phase de croissance optimale, puis de la placer dans des conditions environnementales contrôlées. Le développement de cette technique requiert de sélectionner une souche bactérienne et un milieu de culture compatibles avec le matériau. L'activité bactérienne dans les fissures doit promouvoir la formation de produits de cicatrisation permettant de cicatrifier de façon durable le matériau. L'objectif de la thèse est de proposer une solution de biocicatrisation tout en identifiant et en comprenant l'impact de chaque facteur, environnemental, chimique, biologique, sur le processus de biocicatrisation.

---



# CHAPITRE 2

## État de l'art

### 2.1 Introduction à l'état de l'art

La thématique de recherche de cette thèse axée sur l'autocicatrisation et la biocicatrisation de matériaux cimentaires fissurés exige la meilleure compréhension possible de ces deux phénomènes interdépendants. La découverte du phénomène d'autocicatrisation naturelle a ouvert le chemin à de nombreuses études afin de comprendre et d'améliorer ce potentiel prometteur de réparation des matériaux cimentaires. Différentes approches ont été alors développées afin de leur conférer un pouvoir d'autocicatrisation accru. Mais ces mises au point nécessitent de bien maîtriser et de comprendre l'influence des nombreux paramètres qui affectent l'autocicatrisation des fissures. L'approche retenue pour améliorer l'autocicatrisation naturelle dans le cadre de cette thèse consiste à mettre à profit l'extraordinaire potentiel du vivant et plus particulièrement des bactéries. Ce mode de cicatrisation a été baptisé "biocicatrisation". Les solutions de biocicatrisation sont en elles-mêmes complexes, indépendamment des interactions avec le matériau à traiter. Elles peuvent offrir un vaste éventail de modes d'action qui n'est pas réductible aux traitements appliqués sur les matériaux cimentaires. Les bactéries ont été également utilisées pour le renforcement des sols ou comme traitement de surface des pierres calcaires. Cependant, les matériaux cimentaires possèdent leurs propres spécificités et requièrent des solutions de biocicatrisation qui en tiennent compte. Ainsi ce chapitre portant sur l'état de l'art est articulé en quatre parties :

- Autocicatrisation naturelle
- Amélioration du phénomène naturel d'autocicatrisation
- Phénomène de biocicatrisation
- Biocicatrisation des matériaux cimentaires

## 2.2 Phénomène d'autocicatrisation naturelle

### 2.2.1 Définition

Selon Jacobsen [57], l'autocicatrisation se définit comme le rétablissement, au sein de structures cimentaires, de certaines propriétés, telles que la résistance mécanique, la résilience, la porosité, la perméabilité, etc... La matrice cimentaire est capable de cicatriser et de reboucher partiellement voire totalement les fissures dans les matériaux cimentaires fracturés [47]. Sukhotskaya [115] mentionne, dans la définition de l'autocicatrisation naturelle, l'existence de conditions particulières d'humidité et de température nécessaires à l'apparition de ce processus.

Observé la première fois en 1836 par l'Académie des Sciences en France, le phénomène a d'abord été étudié sur des canalisations et des structures en béton en contact avec l'eau [124]. Depuis cette date, l'origine du mécanisme, voire des mécanismes de l'autocicatrisation naturelle ont fait l'objet de nombreuses études [47, 57]. En effet, l'intérêt est grand de maîtriser ce processus capable d'améliorer fortement la durabilité des bétons.

### 2.2.2 Mise en évidence du phénomène de l'autocicatrisation naturelle

Les fissures ont un impact immédiat et important sur les propriétés mécaniques et physico-chimiques des matériaux cimentaires. L'autocicatrisation naturelle, en permettant la fermeture des fissures dans le matériau, impacte fondamentalement la durabilité et les performances mécaniques des structures et des ouvrages. C'est en constatant ses effets bénéfiques, parfois par hasard, que les scientifiques ont cherché à mieux comprendre ce phénomène.

#### **Propriétés de transfert : Diffusion et perméabilité**

La capacité de pénétration des agents agressifs dans le milieu poreux du béton définit en grande partie sa durabilité selon Olliver et Torrenti [86]. En ce sens, l'autocicatrisation, en refermant partiellement ou complètement les fissures, contribue directement à la durabilité des matériaux cimentaires.

L'intrusion d'agents agressifs au cœur du matériau se fait selon deux mécanismes distincts : la perméabilité et la diffusion. Le premier mécanisme, la perméabilité, décrit un transport de matière par un écoulement sous gradient de pression. Le second mécanisme, la diffusion, décrit un transport de matière au niveau moléculaire sous gradient de concen-

---

tration. Ces deux mécanismes ont été abordés dans la littérature pour mettre en évidence l'autocicatrisation naturelle, notamment la perméabilité à l'eau et la diffusion aux ions chlorure.

**Perméabilité à l'eau** Les premières études sur l'autocicatrisation naturelle ont observé le phénomène via la perméabilité à l'eau.

Concrètement, ces études consistent à faire passer un débit d'eau à travers un échantillon de béton à l'aide d'un gradient de pression. Clear [20] et Edwardsen [35] mesurent le débit d'eau passant à travers une fissure dont la largeur est maîtrisée. Les études relatées par Hearn [47] ne présentent pas de bétons véritablement fissurés, c'est la perméabilité du matériau cimentaire qui est directement évaluée. Dans tous les cas d'étude [20, 35, 47], il a été observé une nette diminution du débit d'eau au cours des premiers jours. Hearn [47] définit les divers mécanismes à l'origine de cette diminution. Ils concourent à la réduction des pores et fissures du matériau, jusqu'à réduire presque totalement l'écoulement de l'eau. Ces mécanismes seront définis plus en détail par la suite dans la partie 2.2.3. Les cinétiques de ces mécanismes suivent un comportement similaire, une baisse rapide de la perméabilité à l'eau est observée dans les premiers jours, puis la diminution est plus lente.

L'autocicatrisation naturelle est l'un de ces mécanismes, contribuant en grande partie à l'apparition de cette imperméabilisation des échantillons de béton et à la réduction du passage de l'eau dans les fissures.

**Diffusion des ions chlorure** L'influence de l'autocicatrisation naturelle sur la diffusion des ions chlorure a été traité notamment par Jacobsen [56].

Les échantillons de béton avec ou sans entraîneur d'air sont soumis à un nombre variable de cycles de gel-dégel conduisant à la formation de micro-fissures. Une immersion dans l'eau durant 90 jours permet ensuite une autocicatrisation naturelle.

La migration des ions chlorure à travers une éprouvette cylindrique de béton est accélérée à l'aide d'un gradient électrique, entraînant la migration des ions chlorure, ainsi que des autres anions vers l'anode. Le dosage en ions chlorure des solutions permet de quantifier l'ampleur de la migration. En plus de la migration des ions, il est également mesuré sur les bétons la résistance mécanique, la vitesse de propagation des ondes ultrasonores et la densité de fissures. L'autocicatrisation naturelle permet d'observer une diminution de 28 % à 35 % du taux de migration des ions chlorure en comparaison de la migration au sein des échantillons fraîchement fissurés. Le temps de pénétration, c'est à dire le temps

---

que met le flux d'ion chlorure à se stabiliser, a également diminué significativement. La résistance à la compression augmente aussi, mais seulement de 0 à 10 % en comparaison des 50 à 100 % d'accroissement de la vitesse des ondes ultrasonores. Ceci suggère que les micro-fissures ont bien cicatrisées contrairement aux plus grosses fissures qui ne doivent être que partiellement comblées.

### Cycles de gel-dégel

L'effet de l'autocicatrisation naturelle sur des échantillons de béton et de mortier soumis à des cycles de gel-dégel est abordé par certains auteurs comme Sukhotskaya [115] et Jacobsen [59]. Comme les cycles de gel-dégels provoquent une forte micro-fissuration sur les éprouvettes, l'impact de l'autocicatrisation naturelle sur leurs performances est étudié.

Les deux études tendent à montrer que la détérioration causée par les cycles de gel-dégel peut être en partie corrigée par l'autocicatrisation naturelle. Sukhotskaya et al. [115], ont soumis des échantillons de mortier et de béton à des cycles de gel-dégel entrecoupés par des périodes d'immersion dans l'eau. L'évolution de la résistance en compression, des modules d'élasticité et le coefficient de résistance au gel des bétons démontrent une meilleure tenue au gel grâce aux périodes d'immersion. Il apparait clairement que l'autocicatrisation naturelle, favorisée par ces périodes d'immersion, a ralenti la détérioration des matériaux. Après 200 cycles de gel-dégel suivis d'une période d'immersion, une augmentation de 90 % à 95 % du module d'élasticité est constatée sur des échantillons soumis à l'autocicatrisation naturelle comparativement aux échantillons témoins. De même, suite aux phases d'immersion, la détérioration des performances mécaniques n'est que de 7 % après 300 cycles au lieu de 18 % pour les témoins sans périodes d'immersion.

Jacobsen et Sellovold [59] procèdent à l'immersion des éprouvettes mais en une seule fois, à la fin des cycles de gel-dégel. Ces cycles ont été effectués selon la norme ASTM C666 procédure A. Dans cette étude, différentes compositions de béton sont utilisées pour mieux comprendre leurs influences sur la détérioration après le gel-dégel et sur l'autocicatrisation naturelle (tableau 2.1).

Mélange	$\frac{E}{C + FS}$ <sup>(1)</sup>		Ciment		fc début Mpa	Air (vol-%)	Granulat	
	$\frac{FS}{C + FS}$ <sup>(1)</sup>		kg/m <sup>3</sup>	type			kg/m <sup>3</sup>	Type
030-08QD	0,30	0,08	469	HS	141	2,0	1650	quartzdiorite
030-08LS	0,30	0,08	469	HS	111	2,1	1738	limestone
035-00	0,35	0	387	OP1	73	2,7	1921	granitic
040-00	0,40	0	432	OP2	74	1,6	1799	granitic
040-05	0,40	0,05	409	OP2	83	2,0	1782	granitic
040-05A	0,40	0,05	411	OP2	73	5,1	1703	granitic

(1) E=Eau, C=Ciment et FS=Fumées de Silice

Tableau 2.1 Tableau de composition des bétons . [58]

Le niveau de détérioration est déterminé au moyen du facteur de durabilité (suivant la norme ASTM C666), de la résistance en compression, de la fréquence de résonance et des variations de poids et de volume. L'autocicatrisation naturelle permet le recouvrement presque total de la fréquence de résonance des bétons, mais de seulement 4 à 5 % de la résistance en compression (tableau 2.2). Il semble donc que les deux paramètres ne soient pas corrélés entre eux. La réduction de la fréquence de résonance est un bon indicateur de la perte de résistance en compression, mais à l'inverse, l'augmentation de cette fréquence ne prouve pas une amélioration significative de la résistance. La mesure d'augmentation de volume et de poids des échantillons est due, respectivement, à l'apparition des fissures et à l'absorption de l'eau. La nette augmentation du poids atteste de la présence d'eau dans les pores des échantillons, l'eau y accédant via les fissures nouvellement créées. Ces diverses observations et mesures mettent en évidence le mécanisme de détérioration par les cycles de gel-dégel et le rôle bénéfique de l'autocicatrisation naturelle dans la durabilité des bétons. Le degré d'autocicatrisation naturelle apparaît influencé, à la fois, par la composition des bétons et par le degré de détérioration. Cependant, ces deux facteurs sont liés. En effet, la composition d'un béton influence sa résistance à la détérioration au gel. Ainsi, pour chacun d'eux, il n'est pas possible de conclure de leur influence intrinsèque sur l'autocicatrisation naturelle. Seule, l'influence de la fumée de silice sur l'autocicatrisation naturelle partait ressortir. Les bétons 040-00 et 040-05 ont subi une détérioration comparable, suivi d'une période d'autocicatrisation identique. Le béton sans fumée de silice (040-00) recouvre 98% de la fréquence de résonance, contre 85% pour le béton avec fumée de silice (040-05). La fumée de silice semble donc défavorable au processus d'autocicatrisation naturelle.

Mélange	Déterioration		Autocicatrisation Jours dans l'eau à 20°C	Recouvrement par autocicatrisation	
	ASTM C666 DF (1)	proc A No de cycles		Fréquence de résonance (%)	Résistance en compression (%)
030-08QD	79	300	52	99	-
030-08LS	50	275	52	97	-
035-00	9	60	52	93	-
040-00	11	70	114	98	4
040-05	10	70	114	85	5
040-05A	23	144	99	89	5

(1) Durability Factor : variant de 0 pour des bétons très détériorés à 100 pour des bétons résistants

Tableau 2.2 Durabilité et capacité d'autocicatrisation des bétons soumis aux cycles de gel/dégel. [58]

### Corrosion des armatures de bétons armés

L'autocicatrisation naturelle et son impact sur la corrosion des armatures ont été traités par Ramm et Biscopig [96]. L'étude menée cherche à observer l'influence de la dimension des fissures, de la pression de l'eau et de son acidité sur l'autocicatrisation naturelle et sur la

corrosion des armatures de bétons armés. Durant deux ans, des spécimens de bétons armés sont traversés par un flux d'eau passant à travers des fissures artificielles. Ces dernières sont créées par des plaques d'acier dans le béton que l'on retire après la prise. Les fissures ainsi obtenues ont des dimensions maîtrisées. Les résultats obtenus montrent une grande importance de la largeur de fissure et de l'acidité de la solution sur l'avancement de la corrosion. L'autocicatrisation naturelle est rendue plus difficile voire inexistante quand le pH de l'eau est acide : les fissures s'agrandissant avec la dissolution des phases de la pâte cimentaire. Allant de pair avec ce phénomène, la corrosion des armatures est plus importante dans un milieu acide. En plus de l'augmentation de la largeur de la fissure, l'eau lixivie les alcalis et dissout les phases, telles que la portlandite. Ce qui mène à la perte de la basicité de la pâte de ciment et finalement à la corrosion des barres d'acier qui sont dépassivées. L'ampleur de la corrosion semble ainsi directement liée à l'ouverture de la fissure et à la pénétration de l'eau.

Sur la base d'observations de fissures d'un poteau en béton, Hosoda et al. [51] ont étudié la corrosion en lien avec le phénomène d'autocicatrisation. Un poteau en béton ayant un rapport eau sur ciment E/C de 0,35 a été soumis pendant 34 ans à un environnement rigoureux avec des cycles de gel-dégel et aux intempéries. L'eau accumulée dans le centre creux du poteau a offert les conditions favorables au processus d'autocicatrisation naturelle. Le processus a permis la cicatrisation de fissures de 100 et 50  $\mu\text{m}$  et ainsi d'éviter la corrosion des armatures exposées par la fissuration. Les fissures de 200  $\mu\text{m}$  ne sont pas complètement refermées. L'étude montre également que les produits présents dans les fissures sont de la calcite et de l'ettringite. Ces produits de cicatrisation sont surtout observés aux interfaces entre la fissure et la pâte de ciment, mais moins aux interfaces entre la fissure et les granulats.

### Propriétés mécaniques

L'autocicatrisation naturelle a également un effet sur les propriétés mécaniques. Certaines études comme celles de Granger [44], de Zhong [137] ou encore de Yang [133] avaient pour but de mesurer la capacité de recouvrement des caractéristiques mécaniques d'échantillons de béton grâce à l'autocicatrisation naturelle. Les essais effectués sur les échantillons se déroulent en trois phases : 1<sup>re</sup> phase de fissuration et d'endommagement ; 2<sup>de</sup> phase d'autocicatrisation et 3<sup>e</sup> phase de mesures des propriétés mécaniques. Granger [44] a soumis à un essai en flexion trois points une poutre entaillée en son milieu pour s'assurer de la position de la fissure. L'essai a été calibré, via un capteur, pour obtenir un écartement de la fissure de 10  $\mu\text{m}$ . Suite à une période d'immersion dans l'eau, les poutres sont à nouveau soumises à un essai de flexion 3 points. En plus des mesures classiques sur la force appliquée

---



---

à la poutre, des transducteurs piézoélectriques permettent la mesure et la localisation des micro-fissurations. L'étude démontre clairement l'apport de l'autocicatrisation naturelle sur la rigidité, et, dans une moindre mesure, sur la résistance des matériaux cimentaires. Les mesures des niveaux d'énergie par les transducteurs piézoélectriques montrent que les produits de cicatrisation ont des performances mécaniques inférieures aux produits d'hydratation initiaux. Ceci peut être la conséquence du processus de formation des produits de cicatrisation, avec une porosité importante et une adhésion à la pâte initiale moins bonne.

---

### 2.2.3 Mécanismes de l'autocicatrisation naturelle

#### Contexte

L'identification des mécanismes impliqués dans l'autocicatrisation naturelle a été le sujet de nombreux articles, comme celui de Clear [20], de Hearn [47] ou de Edvardsen [35].

Clear [20] en 1985 a été l'un des premiers auteurs à identifier les processus en œuvre dans l'autocicatrisation naturelle. Des mesures de débit d'eau ont été effectuées à travers une fissure, dont les dimensions initiales étaient bien connues. C'est la diminution du débit au cours du temps, qui a permis de mettre en évidence le phénomène de l'autocicatrisation naturelle. Le principal mécanisme semble être la déposition de carbonate de calcium (sous forme de calcite), identifiée en examinant la surface des fissures. Cependant, ces dépôts de calcite sont inexistantes dans les premiers jours durant lesquels une baisse du débit se produit. Clear [20] suggère alors l'existence d'un autre mécanisme. L'auteur impute cette diminution initiale de débit au colmatage mécanique des pores par des particules en suspension.

L'étude de Hearn [47] cherche aussi à identifier la cause de la baisse du débit d'eau observé lors des tests de perméabilité. Parmi les précédents travaux mentionnés dans la littérature, Hearn [47] distingue plusieurs causes potentielles, dont les trois suivantes :

- Le gonflement de la pâte de ciment hydraté ;
- le colmatage mécanique des pores par des particules en suspension ;
- les interactions entre l'eau et la pâte de ciment, dont les trois types de réactions envisagées sont :
  - L'hydratation du ciment anhydre résiduel ;
  - la dissolution et la déposition d'hydrates, tels que l'hydroxyde de calcium, ou la portlandite ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ;
  - la carbonatation du  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dissous, conduisant à la formation de carbonate de calcium.

Des observations par Jacobsen [57] montrent la présence de dépôts d'hydroxyde de magnésium  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  qui remplissent les fissures. Ce produit ne se formerait que dans des conditions particulières, en présence d'eau de mer par exemple qui contient des quantités notables de magnésium.

---

Parmi tous ces mécanismes proposés, certains sont réversibles, et d'autres n'offrent pas d'amélioration des caractéristiques mécaniques. Ainsi, le gonflement de la pâte de ciment hydratée ne résulterait, selon Hearn [47], que du processus de saturation des échantillons, causant l'expansion des couches de gel de C-S-H. Le phénomène serait donc de courte durée et n'offrirait pas de meilleures propriétés mécaniques. De même, le colmatage mécanique des pores par des particules en suspension ne se traduit que par une diminution de la perméabilité, sans apport de résistance.

L'autocicatrisation naturelle, qui permet un recouvrement, même partiel, des propriétés mécaniques, semble être principalement le résultat de deux phénomènes :

- L'hydratation du ciment anhydre résiduel ;
- la carbonatation du  $\text{Ca(OH)}_2$  dissous.

### Hydratation secondaire

Jacobsen [58], en procédant à des observations au microscope électronique à balayage, a identifié des produits de ré-hydratation dans les fissures en cours de cicatrisation. Les produits identifiés sont des silicates de calcium hydraté, (C-S-H), et, dans une moindre mesure, de la portlandite ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) et de l'ettringite. La thèse de Ismail [55] confirme ces observations. Les produits d'hydratation forment des ponts entre les deux lèvres de la fissure. Les caractéristiques mécaniques du C-S-H, sa compatibilité avec le matériau existant, expliquent la restauration de la résistance et de la rigidité des bétons autocicatrisés. Son apparition résulte de l'hydratation du ciment anhydre résiduel présent dans la matrice cimentaire. La fissuration a rendu possible l'exposition à l'eau des grains de ciment. Ismail [55] a en effet observé ces produits nouvellement formés dans des bulles d'air, où l'eau a pu se loger facilement (Figure 2.1).

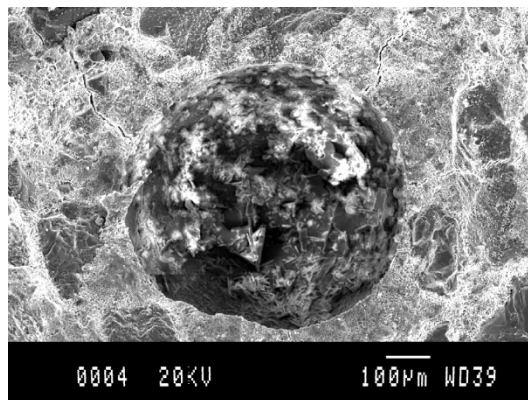


Figure 2.1 Produits d'hydratation, ettringite et portlandite, au sein d'une bulle d'air. [55]

## Carbonatation

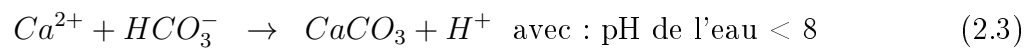
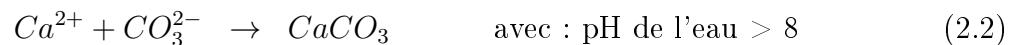
Les observations au microscope et par diffraction aux rayons X ont révélé, en plus des produits d'hydratation du ciment, la présence de carbonate de calcium,  $\text{CaCO}_3$ . Selon Edvardsen [35], il s'agirait du principal mécanisme de l'autocicatrisation naturelle.

La formation de carbonate de calcium résulte de la réaction entre les ions calcium et des ions carbonate ou bicarbonate.

Les ions bicarbonate,  $\text{HCO}_3^-$ , et carbonate,  $\text{CO}_3^{2-}$  proviennent de la dissolution du dioxyde de carbone dans l'eau, comme l'indique l'équation (2.1). L'équilibre de la réaction est fortement dépendant du pH.



La précipitation de carbonate de calcium, selon la valeur du pH, provient de l'une des deux réactions suivantes, décrites dans les équations (2.2) et (2.3) :



Ces réactions chimiques permettent d'ores et déjà de déterminer des facteurs susceptibles de favoriser la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  :

- Le pH de l'eau,
- L'augmentation de la température de l'eau,
- La chute de la pression partielle de  $\text{CO}_2$  dans l'eau.

Des mesures chimiques ont permis à Edvardsen [35] d'identifier le réactif limitant dans la précipitation du  $\text{CaCO}_3$ . Les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$  n'étant pas tous consommés, ce sont les ions calcium qui vont limiter la réaction.

La figure 2.2 présente les concentrations à l'équilibre à saturation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$  en fonction du pH. Elle permet de déterminer la valeur optimale du pH pour laquelle la concentration en d'ions calcium nécessaire pour la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  est la plus basse.

Cette valeur de pH, d'environ 9,8 est à comparer avec le pH de la pâte de ciment hydratée, de l'ordre de 13, et le pH de l'eau en circulation dans les fissures, entre 5,5 et 7,5. Ces valeurs

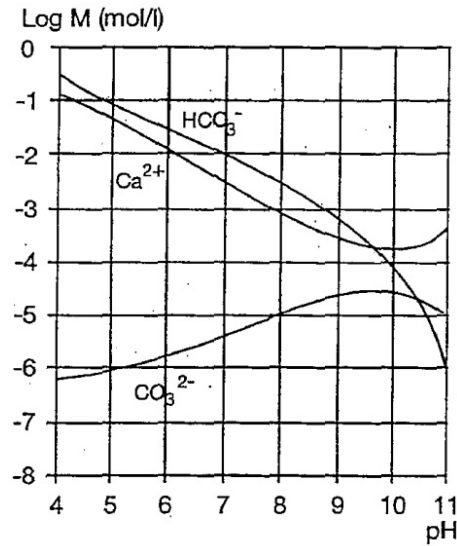


Figure 2.2 Concentrations à saturation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$  en fonction du pH. [35]

montrent qu'il est susceptible d'exister des conditions optimales pour la précipitation de carbonate de calcium au niveau de l'interface entre la pâte de ciment et l'eau. De plus, lors de son étude sur l'autocicatrisation naturelle, Edvardsen [35] montre que la dureté de l'eau et donc sa quantité en ions calcium n'a que peu d'influence sur les dépôts de  $\text{CaCO}_3$ . En effet, les ions calcium proviennent principalement de la dissolution des hydrates contenus dans la matrice cimentaire, tels que la portlandite,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , ou même en partie des silicates de calcium hydraté, C-S-H.

En fonction de tous ces éléments, l'auteur parvient à décrire le processus de précipitation en deux phases :

- 1<sup>ère</sup> phase liée à la surface de contact entre l'eau et la matrice cimentaire,
- 2<sup>de</sup> phase liée à la diffusion des ions calcium à travers la pâte de ciment.

Lors de la première phase, les zones avec un débit d'eau faible, proches des lèvres de la fissure, favorisent les conditions de sursaturation et de nucléation des premiers cristaux de carbonate de calcium. Lors de la seconde phase, la cinétique de précipitation est régie par la diffusion des ions calcium à travers la matrice cimentaire.

La figure 2.3 résume le processus de précipitation en cours au milieu d'une fissure.

Ismail [55], par des observations au microscope électronique à balayage, a montré la part importante de la précipitation de carbonate de calcium dans le phénomène de l'autocicatrisation naturelle (figure 2.4).

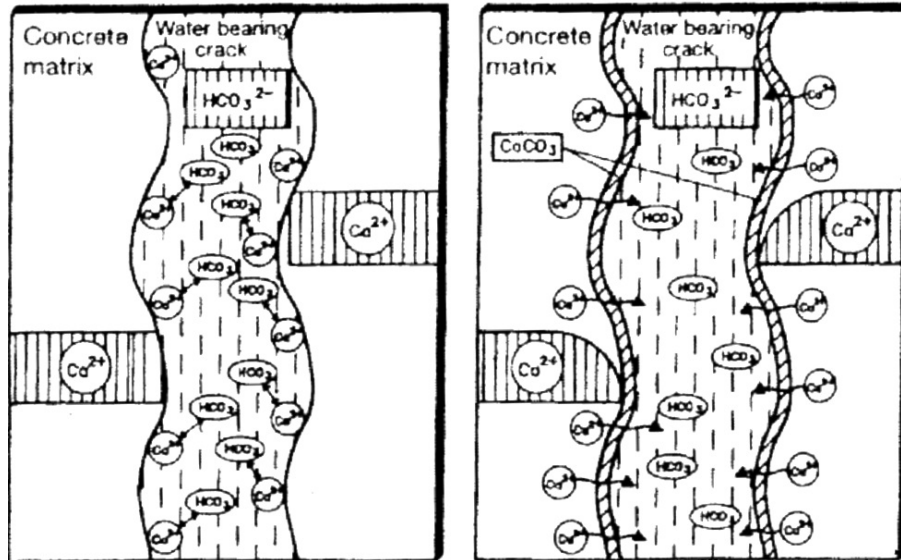


Figure 2.3 Processus de précipitation de carbonate de calcium au sein des fissures en deux phases. [35]

Le carbonate de calcium peut exister sous quatre formes cristallines différentes : la calcite, l'aragonite, la vaterite et sous la forme d'un hexahydrate. Ce dernier, peu stable, évolue vers la calcite, qui est la forme thermodynamiquement la plus stable. La calcite est également la forme la plus fréquemment rencontrée dans l'autocicatrisation naturelle, au point que, dans les commentaires des études, il n'est plus fait de distinction entre le carbonate de calcium et la calcite.

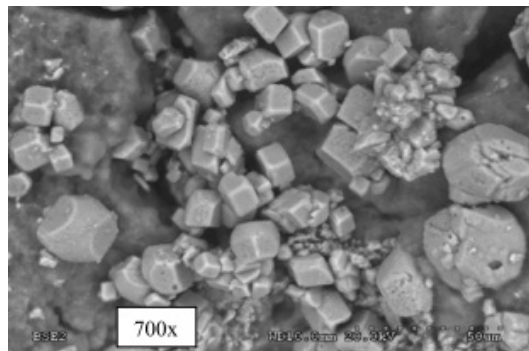


Figure 2.4 Observation au microscope électronique à balayage de carbonate de calcium, sous forme de calcite. [55]

Le processus de l'autocicatrisation naturelle est, la plupart du temps, la concomitance des deux mécanismes principaux : l'hydratation secondaire et la déposition de carbonate de calcium. La figure 2.5 tirée des travaux de Argouge [7], schématise le fonctionnement de l'autocicatrisation naturelle.

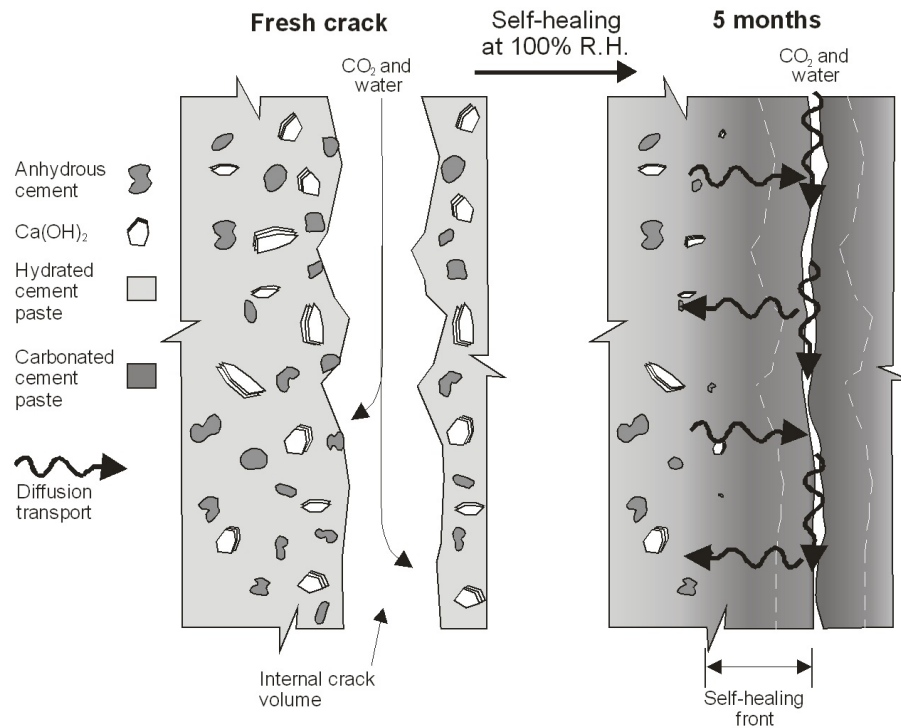


Figure 2.5 Schéma explicatif de l'autocicatrisation naturelle. [7]

L'eau et le CO<sub>2</sub> pénètrent dans la fissure et réagissent avec les réactifs présents dans la pâte de ciment, la portlandite (Ca(OH)<sub>2</sub>) et les grains de ciment anhydre. Il se forme une première couche de produits, qui vont progressivement refermer la fissure. Après quelques mois, dans des conditions favorables d'humidité et de température, l'ouverture de la fissure est réduite. Un processus plus lent s'instaure alors. L'eau et le CO<sub>2</sub> doivent diffuser à travers la fissure partiellement refermée. Dans la fissure, l'eau, le CO<sub>2</sub> et le calcium présent dans la matrice cimentaire doivent ensuite diffuser à travers la couche de cicatrisation pour venir former de nouveaux produits et poursuivre le processus.

### 2.2.4 Techniques de mesure et modélisation

De nombreux chercheurs ont développé des techniques de mesure permettant de quantifier et de valider les principaux mécanismes et effets de l'autocicatrisation. Si l'observation visuelle permet, dans certains cas, une estimation suffisante de la cicatrisation, elle ne l'est cependant pas pour quantifier précisément l'état d'évolution du matériau.

L'évaluation et la compréhension du phénomène de cicatrisation dans les matériaux cimentaires requièrent de nombreuses techniques de mesure. Les plus classiques reposent sur des essais de perméabilité à l'eau ou à l'air dans les fissures, d'autres utilisent des techniques d'osculation acoustique ou réalisent des tomographies pour accéder au cœur du matériau.

#### Mesures de débit dans les fissures

Initialement, le phénomène de l'autocicatrisation naturelle a été mis en évidence en constatant la réduction du débit d'eau s'écoulant dans les fissures [20, 35]. La quantification de l'autocicatrisation naturelle par les mesures de débit d'eau a été perfectionnée par Rastiello et al. [97]. Un débit d'eau sous gradient de pression s'écoule dans la fissure. La masse d'eau, le gradient de pression, mais aussi les variations de dimension de l'éprouvette fissurée sont mesurés en temps réel. En utilisant les lois de la mécanique des fluides et des analyses numériques, les auteurs ont pu mieux comprendre l'effet de la taille de l'échantillon sur le processus de percolation.

D'autres auteurs comme Argouges, Gagné [7] et Ismail [55] utilisent l'air pour les mesures de perméabilité. L'utilisation de l'air comme fluide pour la mesure de débit permet d'éviter les phénomènes parasites notamment, le gonflement du gel de C-S-H avec l'eau ou l'obstruction de la fissure par des particules en suspension. Seuls les mécanismes propres à l'autocicatrisation naturelle sont pris en compte. Un débit d'air à travers une fissure est mesuré sous des conditions d'écoulement contrôlées. Les lois de la mécanique des fluides et les observations au vidéomicroscope permettent de corréler la mesure du débit d'air à l'ouverture de la fissure. Cette méthode de mesure permet une estimation rapide et précise de l'ouverture d'une fissure.

---



### Tomographie

L'utilisation d'un tomographe permet de visualiser la géométrie interne des fissures et leur évolution. Cette technique permet d'accéder à l'intérieur du matériau, mais elle requiert un matériel conséquent et des éprouvettes de taille réduite. Dépendant de la puissance du tomographe, les échantillons observables font une dizaine de centimètres généralement. Lors des processus de cicatrisation, les parois internes des fissures ne se referment pas de façon homogène. En fonction des mécanismes impliqués, la formation des produits de cicatrisation peut se concentrer sur des zones particulières. L'intérêt de cette technique est de voir la répartition des produits formés à l'intérieur des fissures. Olivier et al. [85] ont utilisé cette approche pour des études d'autocicatrisation naturelle sur des matériaux cimentaires avec ajout de laitier de haut fourneau.

### Analyses acoustiques

Dans une optique plus structurelle, des analyses acoustiques ont été menées, afin de localiser les zones de rupture et la détérioration du matériau lors de chargements. Les gains en résistance ou en rigidité imputables à l'autocicatrisation naturelle peuvent ainsi être détectés. Granger et al. [44] et Van Tittelboom et al. [121] utilisent des analyses acoustiques sur des poutres en chargement, avant et après le processus de cicatrisation. La localisation des zones de rupture et les énergies dégagées sont analysées pour estimer les performances mécaniques des produits de cicatrisation formés. Van Tittelboom et al. [121] ont aussi utilisé des mesures acoustiques pour quantifier le système de cicatrisation. Le système d'autocicatrisation est constitué de tubes de céramique remplis de résine et coulés dans une poutre en béton. La localisation des points de rupture des tubes lors du chargement de la poutre est clairement visible sur les analyses acoustiques. L'autocicatrisation de la poutre est ainsi attribuée à la résine relâchée dans les fissures.

### Modélisation

La modélisation du phénomène de cicatrisation peut permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et la cinétique de réaction.

Les travaux de Hilloulin et al. [48] visent à reproduire virtuellement les processus d'autocicatrisation naturelle et de recouvrement des propriétés mécaniques dans les bétons à ultra-hautes performances. Dans ces bétons, les grains de ciments anhydres résiduels sont nombreux et leur hydratation constitue le principal mécanisme de cicatrisation. La modélisation vise à simuler la pénétration de l'eau dans une fissure et l'hydratation des grains de ciments, qui entraîneront une fermeture des fissures et un regain des performances mécaniques.

---

Huang et al. [52, 54] modélisent le processus d'autocicatrisation de fissures fraîchement ouvertes en ne considérant que la diffusion et le mécanisme d'hydratation des grains de ciment anhydres. La simulation, adaptée et perfectionnée grâce à des essais réels sur pâte de ciment a permis de décrire de façon réaliste le comportement de l'autocicatrisation dû uniquement à cette hydratation additionnelle. La modélisation permet de mettre en évidence des différences en fonction de la composition du ciment et en particulier de la présence de laitier de haut fourneau.

## 2.2.5 Cinétique de l'autocicatrisation naturelle et paramètres d'influence

### Cinétique de l'autocicatrisation naturelle

La compréhension de l'autocicatrisation naturelle doit inclure l'évaluation des composantes de sa cinétique : les différentes phases du processus, leur vitesse d'évolution et leur durée. Directement liée à la cinétique, l'ouverture initiale des fissures conditionne le comportement d'autocicatrisation naturelle. Argouges et al. [7] ont mené une étude dans le but de suivre le phénomène de cicatrisation en fonction du temps, en prenant également en compte l'ouverture initiale de la fissure et de l'âge du béton au moment de la fissuration, et donc de l'avancement de la réaction d'hydratation du ciment.

La composition des trois différents mortiers étudiés est présentée dans le tableau 2.3.

<b>E/C</b>	<b>0,35</b>	<b>0,45</b>	<b>0,60</b>
Ciment (g)	2800	2500	2134
Sable (g)	6220	6375	6586
Eau (g)	980	1125	1280
Superplastifiant (g)	43	0	0
Résistance à la compression à 28 jours (MPa)	62	51	37

Tableau 2.3 Composition des mortiers pour l'étude de la cinétique de l'autocicatrisation. [7]

L'étude utilise deux types d'appareillage :

- Un cœur expansif pour créer des fissures aux dimensions voulues (figure 2.6),
- Une cellule de perméabilité à l'air pour la mesure du débit d'air à travers la fissure (figure 4.4, page 91).

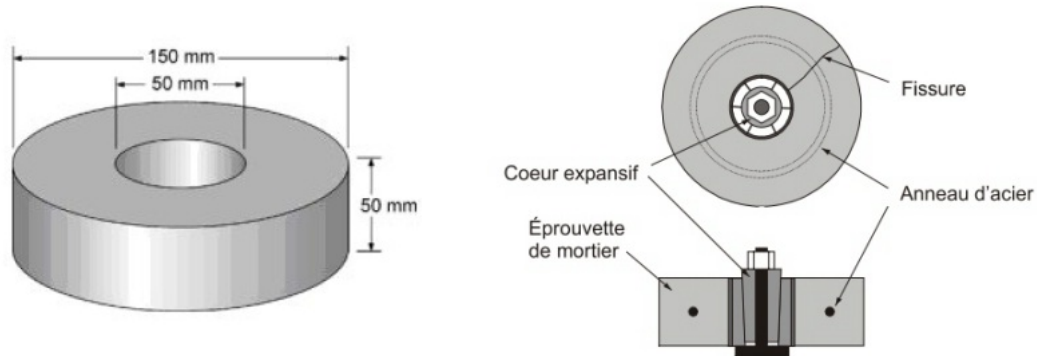


Figure 2.6 Schéma du cœur expansif. [7]

Les valeurs de débit d'air passant dans les fissures permettent d'estimer l'ouverture apparente de la fissure. En effectuant des mesures régulières dans le temps, avec différentes ouvertures de fissures et avec un âge de mortier différent, l'étude permet d'éclairer plusieurs aspects de l'autocicatrisation naturelle.

L'évolution de la cicatrisation est très influencée par l'ouverture initiale de la fissure. Les petites fissures, d'ouverture inférieure à  $105 \mu\text{m}$ , connaissent une phase d'évolution rapide pendant le premier mois. Par la suite, l'autocicatrisation naturelle est ensuite beaucoup plus lente les mois suivants. Le mécanisme impliqué semble être majoritairement la formation d'hydrates et de produits de carbonatation qui viennent obstruer la fissure. La raison du ralentissement du phénomène paraît être liée à cette obstruction qui limite les apports de  $\text{CO}_2$  et d'eau, nécessaires à ces réactions. Les fissures d'ouverture plus importante ont une cinétique d'autocicatrisation naturelle plus progressive, du fait du volume plus grand à combler. Le  $\text{CO}_2$  et l'eau sont toujours disponibles et permettent la poursuite des réactions d'autocicatrisation naturelle durant plusieurs mois. Cependant, la cinétique devient limitée : les ions, et notamment les ions calcium de la pâte de ciment, doivent diffuser à travers la couche de cicatrisation déjà formée sur les bords initiaux de la fissure.

Pour les petites fissures,  $< 50 \mu\text{m}$ , cette étude semble ne pas démontrer de différences en fonction de l'âge du mortier au moment de la fissuration, puisque les quantités de minéraux à former dans les fissures pour la colmater sont faibles. En revanche, pour les fissures plus larges, d'ouverture supérieure à  $180 \mu\text{m}$ , il semble avoir été observé une meilleure vitesse de cicatrisation pour des mortiers fissurés à des âges plus avancés. Ceci s'expliquerait par une plus grande quantité de portlandite présente dans des mortiers plus âgés. La mesure de débit à l'air impose une période de séchage pour les éprouvettes avant chaque utilisation de la cellule de perméabilité. Ce traitement semble avoir un effet sur la cinétique de la cicatrisation pour les fissures de  $220 \mu\text{m}$  d'ouverture. Les débits d'air observés à 5 mois

sont plus importants pour les échantillons ayant subi plusieurs mesures que ceux observés avec une mesure terminale unique. Cette différence observée est probablement due à la phase de séchage réalisée avant chaque mesure.

La re-fissuration des éprouvettes montre que les fissures autocicatrisées conservent un potentiel de cicatrisation. La carbonatation semble être le mécanisme principal du phénomène, ne nécessitant que la présence d'ions calcium, d'eau et de  $\text{CO}_2$ . Durant cette étude, des mortiers avec différents rapports E/C ont été testés, sans qu'il soit observé une quelconque influence sur la cicatrisation. Le paramètre ayant le plus d'impact sur la cicatrisation est clairement l'ouverture initiale de la fissure.

### Paramètres physicochimiques

Reinhardt et Joss [98] ont cherché par leur expérimentation à évaluer l'influence de la température de l'eau par des tests de perméabilité à l'eau.

Le principe repose sur des mesures d'écoulement de l'eau à différentes températures à travers une fissure. Cependant, pour bien caractériser l'évolution de la cicatrisation, il convient de tenir compte des variations de la perméabilité en fonction de la température. En effet, pour une ouverture de fissure constante, l'augmentation de la température de l'eau augmente la perméabilité (figure 2.7).

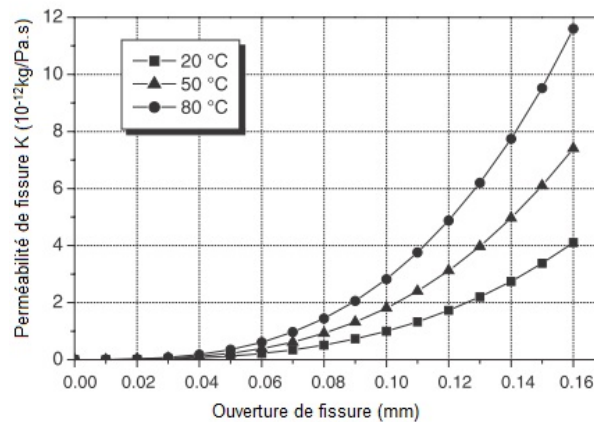


Figure 2.7 Évolution de la perméabilité dans la fissure en fonction de la température. [98]

Pour comparer l'évolution de la cicatrisation à différentes températures, il ne suffit pas de comparer le débit d'eau. Il est nécessaire de normaliser le débit par rapport au débit initial [98].

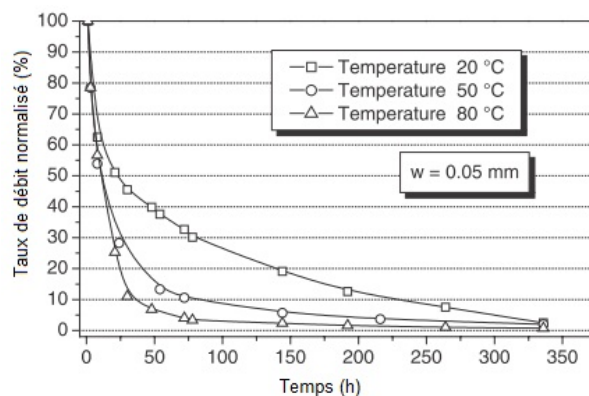


Figure 2.8 Évolution au cours du temps du débit normalisé en fonction de la température, pour une fissure de 0,05 mm. [98]

La figure 2.8 montre clairement un effet favorable de l'élévation de la température sur la cicatrisation. Cette constatation est compatible avec les mécanismes de l'autocicatrisation naturelle avancés par Edvardsen [35].

Les travaux de Parks et al. [87] ont étudié l'influence de la composition de l'eau sur l'autocicatrisation naturelle. De l'eau avec différentes concentrations en ions (calcium, magnésium, phosphore, silicium, zinc) et avec différentes valeurs de pH (7, 8, 8,5 et 9,5) traverse des échantillons de bétons fissurés.

Il ressort différentes conclusions, parmi lesquelles :

- Un pH élevé de 9,5, est favorable à la précipitation de carbonate de calcium ;
- La concentration en ions calcium (20 mg/L) dans l'eau n'influe pas sur l'autocicatrisation naturelle ;
- Le magnésium (40 mg/L) et le silicium (20 et 35 g/L), forment un précipité de silicate de magnésium dans les fissures qui apporte une résistance mécanique au béton, particulièrement avec un pH de 9,5. Toutefois, ce précipité ne confère pas une grande imperméabilisation en comparaison du carbonate de calcium.

Ces conclusions sont en accord avec les mécanismes identifiés par Edvardsen [35] par rapport aux conditions favorables à la précipitation de carbonate de calcium. Jacobsen [57] mentionne également dans son étude la formation de précipités contenant du magnésium, qui offrent un gain à la résistance des bétons.

Jonkers et al. [63] ont caractérisé les produits d'autocicatrisation naturelle dans des mortiers immergés dans de l'eau de mer dont la composition est la suivante : KCl (0,8 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,5 g/L), NaCl (27,35 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (6,9 g/L) et  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5,1

g/L). C'est principalement la présence de magnésium, qui va modifier la nature des précipités formés. Les analyses au microscope électronique à balayage et les analyses dispersives en énergie montrent que la présence de brucite ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ), de dolomite ( $\text{MgCa}(\text{CO}_3)_2$ ) et de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). La formation de certains minéraux comme la dolomite sont expansifs. Ils offrent un fort potentiel pour refermer les fissures, mais il faut contrôler leur formation, à la fois dans la matrice cimentaire pour éviter l'apparition de nouvelles fissures et dans les fissures existantes pour éviter leur élargissement. Le milieu marin, grâce à son alcalinité et à la présence de nombreux cations, favorise la formation de précipités dans les fissures et semble permettre une meilleure autocicatrisation naturelle que dans l'eau douce.

Certains auteurs ont cherché à observer un seul des deux mécanismes de l'autocicatrisation naturelle. Pour caractériser et quantifier le mécanisme dû uniquement à l'hydratation du ciment anhydre, Huang et al. [54] ont ainsi empêché l'accès du  $\text{CO}_2$  lors du processus d'autocicatrisation. L'étude analyse la formation des produits d'autocicatrisation se formant dans des fissures d'éprouvette en pâte de ciment de rapport E/C de 0,3. Si la formation de gel de C-S-H a bien été constatée dans les fissures, le principal produit formé contribuant à la cicatrisation est de la portlandite,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . L'étude montre aussi l'influence de l'âge de la pâte de ciment à 7, 14 et 28 jours. Un matériau plus jeune et donc avec plus de composés anhydres est capable de former plus de produits de cicatrisation dans les fissures, l'effet est plus prononcé pour la formation du gel de C-S-H que pour la portlandite. Ce phénomène n'est pas incompatible avec les observations de Argouges et al. [7] qui rapporte une meilleure autocicatrisation dans des mortiers plus âgés pour des fissures larges ( $> 180 \mu\text{m}$ ), mais sans déceler de différence sur des fissures fines ( $< 50 \mu\text{m}$ ). Dans ce cas, la portlandite n'est pas le produit de cicatrisation venant refermer les fissures, mais le réactif du produit de cicatrisation, en l'occurrence le carbonate de calcium.

---

## 2.3 Amélioration du phénomène naturel d'autocicatrisation

La découverte et la compréhension du phénomène de l'autocicatrisation naturelle ont poussé nombre de chercheurs à développer des solutions visant à améliorer ce phénomène. Parvenir à créer des matériaux refermant seuls leurs fissures est une technologie d'avenir pour répondre à l'impératif de la durabilité des ouvrages qui s'impose à nous.

Ce champ de recherche a été baptisé "Engineered healing" [29], ingénierie de cicatrisation, il regroupe les méthodes artificielles et intentionnelles de fermeture des fissures. Les techniques de cicatrisation sont conçues et intégrées comme une fonction spécifique du matériau béton.

### 2.3.1 Bétons hautes performances et bétons fibrés

La composition des bétons peut influencer au moins l'un des deux mécanismes de l'autocicatrisation naturelle. Agir sur la composition d'un béton pour favoriser le phénomène peut être profitable en améliorant ainsi la durabilité du matériau. Dans les parties suivantes, il sera présenté l'effet sur l'autocicatrisation de la composition de différents bétons, l'autocicatrisation étant, parfois l'effet recherché, ou parfois un effet collatéral inattendu.

#### Ciment Ductal<sup>®</sup>

Le béton Ductal<sup>®</sup> est un matériau faisant partie des UHPFRC, Ultra-High Performance Fibre Reinforced Concretes, les bétons ultra-hautes performances renforcés de fibres. Les UHPFRC présentent une haute teneur en ciment, une forte quantité d'éléments ultras-fins, tels que la fumée de silice, de la farine de quartz. Avec de faibles rapports E/C, ces bétons ont une large part de leurs grains de clinker sous forme non hydratée, typiquement de l'ordre de 50 % des grains.

Pimienta et al., [92] a cherché à évaluer le comportement de deux types de bétons Ductal<sup>®</sup> en suivant l'évolution des caractéristiques mécaniques de spécimens fissurés immergés dans des milieux agressifs.

	Sable	Ciment	Filler	Fumée de silice	Fibre	Fibre (% vol)	W/C ratio
Ductal <sup>®</sup> FM	1,43	1	0,30	0,325	Acier	2,0	0,20
Ductal <sup>®</sup> FO	1,43	1	0,24	0,30	APV	4,2	0,27

Tableau 2.4 Tableau de composition des bétons Ductal<sup>®</sup>. [92]

Le tableau 2.4 détaille la composition des deux bétons. La principale différence entre ces deux bétons est la quantité et la nature des fibres utilisées : 2 % de fibres d'acier pour le Ductal<sup>®</sup> FM et 4,2 % de fibres d'alcool polyvinylique pour le Ductal<sup>®</sup> FO. Les échantillons fabriqués sont fissurés lors d'un essai de flexion 4 points. Ils sont ensuite soumis à différents milieux agressifs. La figure 2.9 montre l'évolution de la fréquence de résonance du béton Ductal<sup>®</sup> FM au cours du temps pour les différents milieux agressifs.

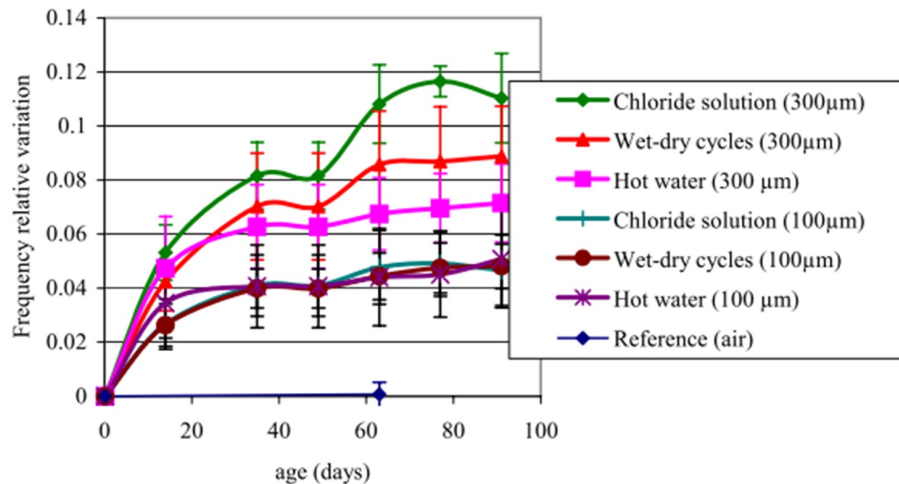


Figure 2.9 Évolution de la fréquence de résonance en fonction du temps pour le Béton Ductal<sup>®</sup> FM exposé à différents environnements agressifs. [92]

Il ressort une nette amélioration du comportement mécanique malgré le fait que ces environnements aient été supposés agressifs. Ce comportement inattendu est attribué à l'hydratation des grains de ciment anhydres via la pénétration de l'eau dans les fissures. La forte proportion de grains de ciment anhydres dans ce type de béton rend l'explication probable et des observations des fissures montrent la formation de nouveaux produits d'hydratation.

Plusieurs autres études ont mis en évidence le fort potentiel des bétons fibrés à hautes performances. Kunieda et al. [72] ont observé le comportement de l'autocicatrisation dans un béton ultra-hautes performances fibré : Ultra-High Performance-strain Hardening Cementitious Composites (UHP-SHCC). La présence de fibres permet de maintenir l'ouverture des fissures constamment en dessous de  $50 \mu\text{m}$  lors des différentes sollicitations en traction du matériau. Les périodes de cure à l'eau ont permis de voir une nette diminution de la perméabilité à l'eau et à l'air des bétons. Le même mécanisme mis en évidence par Pimeta et al. [92] est à l'œuvre, l'hydratation des grains de ciment anhydre résiduel. Il est aussi observé la formation de cristaux de carbonate de calcium. Mais l'étude met aussi en avant



l'effet des fibres sur le potentiel de cicatrisation, la réduction de l'ouverture des fissures en deçà de 50  $\mu\text{m}$  de largeur rend les fissures rapidement cicatrisables.

Poursuivant sur l'intérêt des fibres pour optimiser l'autocicatrisation, Homma et al. [49] et Nishimaki et al. [82] ont cherché à comprendre l'influence de différents types de fibres. Il ressort de leurs travaux que la quantité, la forme, la rugosité, la continuité des fibres, mais aussi leur polarité jouent un rôle important sur la formation des produits et notamment de la calcite dans les fissures. La polarisation, la présence de groupement hydroxyle ( $\text{OH}^-$ ) dans la constitution chimique des fibres et la rugosité, offrent de meilleures zones de nucléation pour les cristaux de calcite.

### Influence du seuil de détérioration

Une étude comparative est effectuée entre des bétons hautes performances, BHP, et des bétons ordinaires [137]. La figure 2.5 détaille leur composition respective. Le béton hautes performances, série 1, contient des granulats de laitier de haut fourneau (GGBS), et de la fumée de silice (SF). Le béton "normal" contient des cendres volantes.

Séries	Ciment	Cendre volante	GGBS	SF	Sable	Granulats	Eau	Superplastifiant
1	280	71	0	0	747	1126	165	3,3
2	205	0	184	21	706	1153	131	4,92

Tableau 2.5 Tableau de la composition des bétons contrôle et BHP. (unité :  $\text{kg}/\text{m}^3$ ). [137]

Le taux d'autocicatrisation est mis en relation avec le degré de détérioration des bétons. Les éprouvettes sont soumises à un effort de compression. Le degré de détérioration est quantifié par des mesures de rigidité via les vitesses d'ultrasons. Le taux d'autocicatrisation est évalué par la variation de la résistance en compression selon l'équation (2.4).

$$D = 1 - \frac{\nu}{\nu_0} \quad A = \frac{R_a - R}{R} \quad (2.4)$$

Avec :

- D le degré de dégradation ;
- $\nu_0$  et  $\nu$  respectivement la vitesse de l'onde ultrasonore avant et après le chargement ;
- A le degré d'autocicatrisation ;
- $R_a$  la résistance en compression après l'autocicatrisation ;
- R la résistance en compression au chargement initial.

Un effet de seuil est observé. En deçà d'un certain degré de détérioration, l'autocicatrisation est de plus en plus efficace lorsque le degré de détérioration augmente. Mais après le dépassement de ce seuil, le taux d'autocicatrisation décroît lorsque le degré de dommages augmente (figure 2.10).

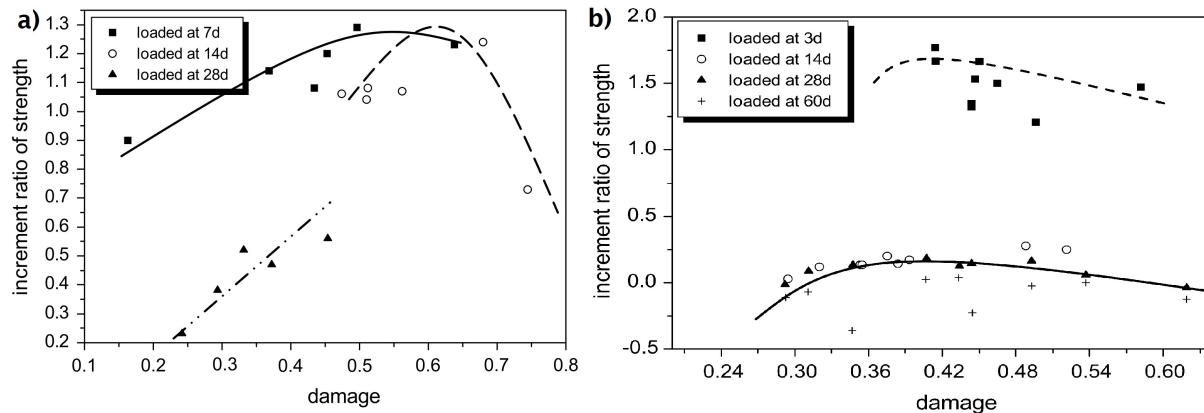


Figure 2.10 Relation entre l'endommagement "D" et l'autocicatrisation "A" pour des bétons endommagés à 7, 14 et 28 jours. avec graphique a) un béton conventionnel, graphique b) un BHP. [137]

Il semble donc apparaître, avec un certain degré de détérioration, des conditions optimales propices à l'autocicatrisation du matériau. La valeur de ce seuil est variable selon la nature du béton. Ainsi, ce seuil optimal en terme de potentiel d'autocicatrisation est plus élevé pour les bétons normaux ( $D_{optimal} \approx 0,6/0,7$ ) que pour les bétons à hautes résistances ( $D_{optimal} \approx 0,4$ ). Ce phénomène de seuil est explicable par la nature des mécanismes mis en jeu dans l'autocicatrisation. La fissuration plus importante permet une meilleure pénétration de l'eau dans l'échantillon, et donc d'hydrater les grains de ciment anhydre. Au-delà d'un degré de dommages, ces fissures deviennent trop larges pour une cicatrisation efficace. Les bétons hautes performances ont une plus grande quantité de grains anhydres et demandent donc un réseau de fissures plus réduit pour permettre à l'eau de venir réagir avec eux.

### 2.3.2 Additions minérales et autres ajouts

#### Fumées de silice

Les ajouts cimentaires pourraient avoir une influence sur le phénomène d'autocicatrisation. Ainsi, Jacobsen [58] a cherché à mesurer les effets de la fumée de silice.

Deux bétons sont évalués, sans fumée de silice et avec 5 % de fumée de silice. Les éprouvettes de bétons sont soumises à des cycles de gel-dégel, puis immergées dans de l'eau à 20°C pendant trois mois. Les mesures effectuées sont regroupées dans le tableau 2.6.

Béton	fc (MPa) <sup>(1)</sup>	E <sub>rel</sub> <sup>(2)</sup>	DF <sup>(3)</sup>	Conditionnement
040-00 sain	62,4	1,00		Intact, curés à l'eau
040-05 sain	73,7	1,00		2,5 mois
040-00 détérioré	49,0	0,51	11	détérioration par gel/dégel
040-05 détérioré	52,6	0,23	10	selon norme ASTM C666 proc.A
040-00 autocicatrisé	51,3	0,97		Autocicatrisés : stockage dans l'eau
040-05 autocicatrisé	55,9	0,72		20°C durant 3 mois

(1) cubes de 10 cm sciés de poutres. (2) E<sub>rel</sub> = module dynamique relatif = (f<sub>in</sub>/f<sub>abut</sub>)<sup>2</sup> avec f : fréquence de résonance. (3) DF Durability factor selon la norme ASTM C666

Tableau 2.6 Caractéristiques des bétons : 040-00 sans fumée de silice, 040-05 avec 5 % de fumée de silice. [58]

Les résultats obtenus ont mis en évidence un rôle négatif de la fumée de silice sur la cicatrisation [58]. La fumée de silice réagit avec la portlandite présente dans la pâte de ciment, qui est le principal réactif au mécanisme d'autocicatrisation. Il s'en suit une diminution du potentiel de cicatrisation.

### Cendres volantes

Le présence de cendres volantes dans la composition d'un béton apparait favorable à l'autocicatrisation.

Şahmaran [22] a étudié l'effet de l'autocicatrisation sur des bétons avec des taux de remplacement du ciment par des cendres volantes égaux à 33 % et 55 %. Des éprouvettes sont soumises à un chargement mécanique allant de 70 % à 90 % de la charge ultime pour fissurer le matériau. La phase de cicatrisation s'opère lors d'une période d'un mois d'immersion des éprouvettes. Le recouvrement des caractéristiques mécaniques et des propriétés de perméabilité est nettement meilleur pour les bétons avec des cendres volantes. Après une détérioration de 27 % de la résistance mécanique due à la phase de fissuration, les bétons contenant des cendres volantes recouvrent une résistance mécanique inférieure de seulement 7 % à la résistance mécanique initiale. Les bétons classiques, après une détérioration de la résistance mécanique de 19 % après fissuration, retrouvent une valeur de 13 % inférieure à la résistance initiale. De même, la perméabilité aux ions chlorure diminue plus significativement au cours du temps pour les éprouvettes avec les taux de remplacement les plus élevés.

La réaction pouzzolanique lente des cendres volantes expliquerait ce phénomène. Selon les conclusions de Şahmaran [22], la restauration de la résistance en compression et des

propriétés de perméabilité peut être relié au processus de colmatage des fissures par les C-S-H nouvellement formés par les réactions pouzzolaniques.

Termkhajornkit, [117], dans la même démarche, observe le processus d'autocicatrisation dans différents bétons en allant jusqu'à remplacer 50 % du ciment par les cendres volantes. De la même façon que dans l'étude de Şahmaran [22], la perméabilité évolue de façon d'autant plus favorable que le taux de remplacement du ciment par les cendres volantes est élevé. Pour comprendre le processus, la part de formation de C-S-H due au ciment et aux cendres volantes a été mesurée à différentes périodes [117]. Il en ressort que plus l'âge du béton augmente, plus la part de C-S-H formé est issue des cendres volantes. Ceci corrobore le fait qu'il s'agit bien de l'hydratation progressive des cendres volantes qui permet la formation de C-S-H (et possiblement d'autres hydrates comme les AFm) dans des fissures de béton au-delà de 28 jours.

Un autre aspect favorable de la présence de cendres volantes sur l'autocicatrisation est avancé par Kan [67]. L'étude menée de façon similaire a montré que lors de la fissuration en traction des éprouvettes, les fissures étaient plus nombreuses, mais plus fines pour les échantillons les plus âgés et avec des cendres volantes. Ce type de réseau de fissures est favorable à l'autocicatrisation.

Na et al. [78] se sont également intéressés à l'influence des cendres volantes sur l'autocicatrisation, mais se sont aussi attachés à déterminer l'influence du rapport E/C sur les dosages optimum en cendres volantes et les conditions de cure. L'endommagement des éprouvettes de mortier se fait par une série de cycles de gel/dégel, après différentes conditions de cure. L'autocicatrisation est estimée par des mesures de résistance en compression, en flexion, par la mesure du front de carbonatation accéléré. Les auteurs considèrent qu'un taux de remplacement en cendres volantes optimal se situe entre 10 % et 15 % pour les bétons avec un rapport E/C entre 0,50 et 0,55 et plutôt entre 11 % et 20 % pour les bétons avec un rapport E/C entre 0,55 et 0,60. Les échantillons curés à 40 ° C pendant 4 semaines ont de meilleures récupérations des performances que les bétons curés à 20 ° C pendant une semaine. Il semble que la vitesse d'hydratation des cendres volantes en gel de C-S-H soit la clé de l'autocicatrisation dans ces bétons avec cendres volantes.

### **Laitiers de haut fourneau et poudres de calcaire**

En remplacement des cendres volantes, Qian [93] a évalué l'autocicatrisation avec des sous-produits industriels locaux : les laitiers de haut fourneau et des poudres de calcaire.

---

Le tableau 2.7 montre la composition des bétons, M1 étant le béton de référence avec cendres volantes, M2, M3 et M4 sont des bétons avec laitier de haut fourneau et avec une proportion croissante de poudres de calcaire.

Mélange	CEM 1 42,5 N	Cendres volantes	Laitiers	Poudre calcaire	Eau/Liant <sup>a</sup>	Eau/Poudre <sup>b</sup>	Superplastifiant
M1	1	1,2	0	0,8	0,31	0,230	0,033
M2	1	0	1,2	1,5	0,45	0,265	0,023
M3	1	0	1,2	2	0,50	0,260	0,018
M4	1	0	1,2	3	0,60	0,256	0,018

(a) Liant : Ciment, laitiers et cendres volantes

(b) Poudre : Ciment, laitiers, cendres volantes et poudre calcaire

Tableau 2.7 Proportion des mélanges des bétons avec sous-produits industriels. [93]

Les échantillons sont fissurés par un essai de flexion en 4 points à 28 jours. La capacité de déformation est présentée en figure 2.11. Les échantillons curés à l'eau et donc soumis à l'autocicatrisation sont tous capables de retrouver une partie de leur capacité de déformation. Dans le cas d'un béton avec cendres volantes (M1) la capacité de déformation après autocicatrisation dépasse même la valeur initiale. Toutefois, les auteurs montrent qu'il existe des différences entre les différents bétons. S'ils sont tous capables d'autocicatrisation, le rapport eau sur liant (E/L) et le rapport poudre sur liant (P/L) ont une influence sur l'ampleur de la cicatrisation. La diminution de la quantité de liant diminue la capacité de recouvrement des bétons. Le remplacement des cendres volantes par des sous-produits industriels, tels que les laitiers de haut fourneau et les poudres de calcaire, permet de garder un potentiel d'autocicatrisation. Il faut cependant tenir compte de la quantité de liant dans les mélanges ; leur diminution ayant un impact négatif sur la cicatrisation.

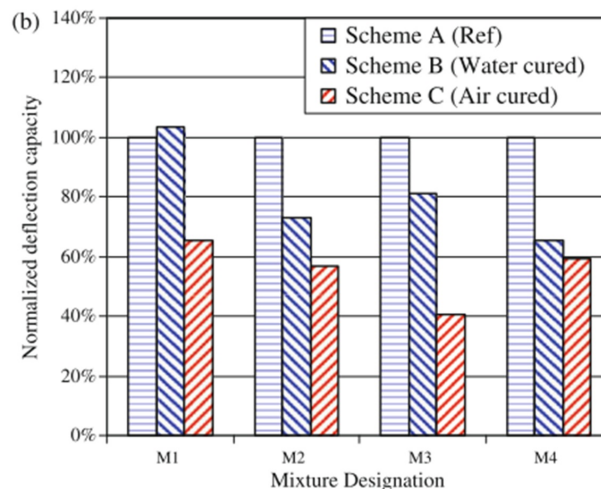


Figure 2.11 Capacité de déformation normalisée pour chaque mélange, pour les bétons de contrôle (A), les bétons curés en eau (B) ou à l'air (C). [93]

## Hydrogels

L'autocicatrisation naturelle nécessitant des conditions d'humidité élevée pour les processus de carbonatation ou d'hydratation des grains de ciment anhydres, certains auteurs comme Snoeck et al. [110] ont eu l'idée d'inclure dans le matériau cimentaire des hydrogels, des polymères capables d'extraire l'humidité de l'environnement et de l'apporter à la matrice. Les résultats ont montré une meilleure cicatrisation des fissures dans les bétons avec hydrogels lors des cures en eau, 80-95 % de recouvrement des propriétés mécaniques contre 40-55 % pour les témoins. Les bétons avec hydrogels ont aussi une capacité d'autocicatrisation lors des cures à l'air avec 35-55 % de recouvrement.

## Agents expansifs

Kishi et al. [70] ont observé le comportement de l'autocicatrisation dans des bétons contenant un agent expansif. Les bétons testés ont un faible rapport E/C, et l'agent expansif est utilisé en remplacement de 10 % du ciment.

Le diffractogramme aux rayons X de l'agent expansif effectué indique la présence de chaux vive (CaO), de yeemelite ( $C_4A_3\bar{S}$ )<sup>1</sup> et de sulfate de calcium (CaSO<sub>4</sub>).

Le comportement de l'autocicatrisation du ciment avec agent expansif est excellent. Une fissure d'ouverture initiale de 220  $\mu\text{m}$  a été presque entièrement comblée en un mois. Cependant, les observations ont démontré que les produits formés sont différents de ceux habituellement formés dans le cadre du phénomène d'autocicatrisation classique : il se forme de l'ettringite et du monosulfoaluminate de calcium (Equation (2.5)).



Sisomphon et al. [109] ont également observé l'effet favorable des agents expansifs, comme le sulfoaluminate de calcium et l'aluminate de calcium, sur l'autocicatrisation des matériaux en évaluant les capacités de résistance en flexion. Leur étude a mis aussi en évidence l'importance des conditions d'exposition. Les cycles de mouillages-séchages semblent les conditions les plus favorables comparativement aux immersions constantes dans l'eau et surtout à l'air. La formation d'ettringite nécessite beaucoup d'eau. La concentration en ions carbonate dans l'eau semble aussi avoir une forte incidence sur la cicatrisation du matériau. Les carbonates favorisent la formation des précipités dans les fissures qui se sont

---

<sup>1</sup>notation cimentière, voir annexes A

avérés être, en surface, de la calcite. Du C-S-H, de l'ettringite sont également observés, mais la calcite est majoritairement présente sur les couches superficielles.

Ahn et Kishi [4], en plus d'incorporer un agent expansif, ont utilisé un géomatériau et des additifs chimiques pour améliorer le potentiel d'autocicatrisation. L'agent expansif utilisé est le même qu'utilisé par Kishi et al. [70]. Le géomatériau est un mélange de silice, d'oxyde d'aluminium, de feldspath, de quartz et de montmorillonite. Ce dernier matériau est composé de silicate d'aluminium et de magnésium hydratés. Se composant de feuillets, la montmorillonite est capable de gonfler en présence d'eau. Les additifs chimiques renferment différents carbonates, tels que le carbonate de sodium ou de lithium. Les éprouvettes avec ajouts montrent des gains en compression et un meilleur comportement aux tests de perméabilité que les éprouvettes témoins. De plus, les résultats montrent que les fissures de largeur de 0,15 mm ont été cicatrisées après 3 jours de cure à l'eau. Les fissures de 0,22 mm de largeur sont passées à 0,16 mm après 7 jours, puis se sont entièrement refermées à 33 jours. Ces phénomènes seraient dus à trois capacités développées par le matériau : l'effet des agents expansifs, le gonflement de la matrice cimentaire et la re-cristallisation de carbonates dans les fissures. Les produits formés dans les fissures sont des aluminosilicates, des monosulfoaluminates et du carbonate de calcium.

### Polymères

Une autre piste pour augmenter le potentiel d'autocicatrisation a été explorée par Elmoaty et al. [36]. Son étude portait sur l'inclusion de deux types de polymère, mais en testant également l'influence de deux types de ciments et du rapport E/C. Les deux polymères utilisés sont une gomme de styrène butadiène (styrene butadiene rubber, SBR) et de l'acrylique (ACR). Les deux types de ciment testés sont du ciment de type I et de type V selon la norme européenne EN 197-1. Des cubes de béton sont chargés en compression jusqu'à leur charge ultime puis immergés dans l'eau pour 20, 40 et 60 jours. L'évaluation du degré de détérioration et d'autocicatrisation se fait à l'aide des vitesses de propagation des ondes ultrasonores dans les échantillons. Les figures 2.12 et 2.13 montrent la capacité d'autocicatrisation pour différentes teneurs et nature de polymère. Une augmentation de la quantité de polymère dans le béton semble jouer un rôle favorable sur l'autocicatrisation. Ceci s'expliquerait par la formation d'une membrane de polymère autour des grains de ciment, augmentant ainsi la proportion de grains anhydres. Ces derniers, lors de la fissuration du béton, pourraient alors réagir avec l'eau et refermer la fissure. Les mesures des degrés d'hydratation vont en ce sens. Le degré d'hydratation du béton de contrôle est de 71 % quand celui du béton avec 10 % de styrène butadiène est de 66 %.

---

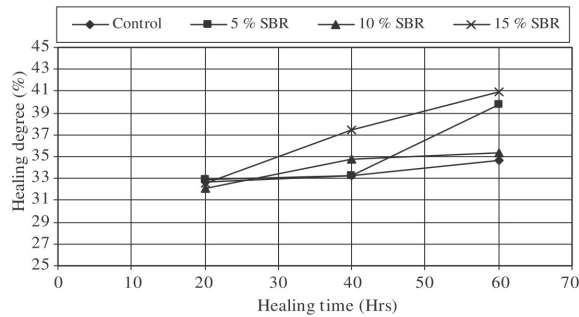


Figure 2.12 Influences de la teneur en SBR dans les bétons et de la durée de cicatrisation sur les vitesses de propagation de ondes ultrasonore (% de cicatrisation).

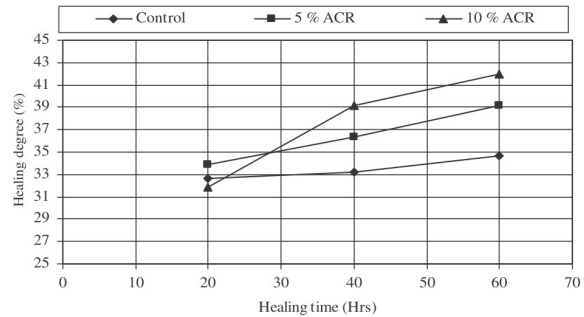


Figure 2.13 Influences de la teneur en ACR dans les bétons et de la durée de cicatrisation sur les vitesses de propagation de ondes ultrasonore (% de cicatrisation).

L'étude conclut également de l'effet favorable sur l'autocicatrisation du ciment de type V par rapport au ciment de type I. La plus forte teneur en bélite du ciment de type V lui confère une cinétique d'hydratation plus lente, facteur favorable à l'autocicatrisation.

La diminution du rapport E/C est également favorable, comme l'ont démontré les études précédemment citées, grâce à l'augmentation de grains de ciment anhydre dans le béton.

### 2.3.3 Capsules et système vasculaire

La cicatrisation des fissures résultant du phénomène naturel est limitée par la disponibilité des réactifs présents dans la pâte de ciment. Apporter d'autres réactifs, permettant une autocicatrisation plus rapide et complète, est une piste explorée par les chercheurs en utilisant des microcapsules et des systèmes vasculaires. Un processus innovant a été testé par Yang [134]. Les microcapsules qui ont été conçues contiennent soit du méthylméthacrylate, jouant le rôle du cicatrisant ou du triéthylborane qui est le catalyseur. L'inclusion de ces capsules dans le mortier devrait constituer un système d'autocicatrisation permettant le colmatage des fissures suite à la formation d'un polymère (figure 2.14).

Trois types de bétons sont testés : un béton de contrôle, un béton incluant les microcapsules (SHM) et un béton avec des microsphères de polystyrène avec surface sulfatée (SPSM). Ces dernières ont servi à constituer la paroi des micro-capsules, leur inclusion dans le béton vise à évaluer la seule influence du contenant. La figure 2.15 est une observation au microscope électronique à balayage des microcapsules. Les coefficients de perméabilité pour les trois types de béton après 3 et 30 jours d'immersion dans l'eau montrent une meilleure imperméabilité des bétons avec microcapsules. Toutefois, la présence de polystyrène avec surface sulfatée exerce aussi une influence favorable sur le béton.



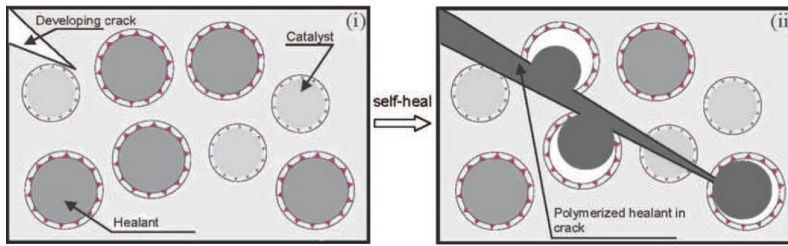


Figure 2.14 Schéma de l'autocicatrisation avec microcapsules. [134]

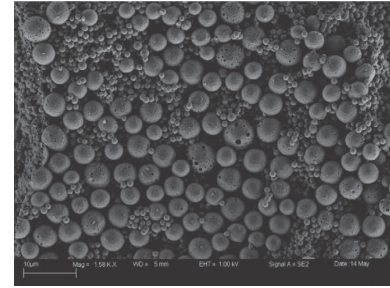


Figure 2.15 Capsules au microscope électronique. [134]

Van Tittelboom et al. [122] ont utilisé des capsules tubulaires, non pas réparties dans tout le matériau, mais placées aux zones les plus sollicitées en traction. Les capsules, en verre ou en céramique, se rompent lors de la fissuration et relâchent l'agent cicatrisant, un pré-polymère de polyuréthane et un accélérateur, stockés dans des capsules différentes. La mousse de polyuréthane formée lors du mélange des deux produits permet de colmater la fissure. La méthode permet une nette amélioration du comportement des matériaux fissurés vis-à-vis des tests de perméabilité à l'eau, mais n'offre pas de récupération du comportement mécanique. La limite de la technique réside aussi dans la fragilité des capsules qui exigent d'être placées manuellement dans le matériau.

Huang et Ye [53] utilisent quant à eux le principe même de l'autocicatrisation naturelle en choisissant l'eau comme agent de cicatrisation. L'étude met en concurrence deux systèmes : des capsules et un système vasculaire, un tube de verre qui en se brisant va répandre l'eau dans les fissures, le système vasculaire pouvant être alimenté en eau. Le système vasculaire semble permettre un meilleur recouvrement des performances selon l'analyse des vitesses ultrasonore. Mais, le système semble être difficile à mettre en place.

Un système vasculaire, ou un réseau poreux, est également utilisé par Sangadji et Schlangen [104]. Le système cherche à imiter la structure de l'os : un cœur poreux au centre du matériau. Un béton drainant constitue ainsi le centre des éprouvettes. L'agent cicatrisant injecté est de la résine époxy. La cicatrisation des éprouvettes est réalisée en injectant la résine, qui circule dans le cœur poreux et vient colmater la fissure.

### 2.3.4 Matériaux à mémoire de forme

L'incorporation de matériaux à mémoire de forme dans les bétons permet de refermer les fissures par une action mécanique. Les fibres à mémoire de forme, sous une augmentation

de la température, cherchent à retrouver leur forme initiale et imposent une contrainte mécanique au matériau, qui tend à faire refermer les fissures.

Ce système a été testé par Jefferson et al. [60]. De petites poutres, de 120 mm de longueur avec une section carré de 25 mm de côté, sont soumises à des essais en flexion 3 points. Les poutres ont une cavité en leur centres, dans lequel passe une fibre à mémoire de forme. Seul les extrémités de la fibre sont ancrées à l'éprouvette. L'ancrage uniquement aux extrémités a été retenu, car les fibres à mémoire de forme coulées directement dans le matériau engendrent des contraintes trop importantes localisées aux bords de la fissure et se rompent. Le matériau utilisé pour constituer la fibre est le polytéréphtalate d'éthylène, PET. Ce matériau peut développer les contraintes de traction nécessaires, 20 MPa, après avoir été chauffé à des températures inférieures à 100°C mais supérieure à 60°C. Ainsi, la chaleur dégagée par les réactions d'hydratation du ciment ne risque pas d'activer la fibre et la température d'activation reste inférieure aux températures qui pourraient endommager le matériau cimentaire. Les poutres sont fissurées par un essai en flexion 3 points à 4 jours.

La figure 2.16 montre la charge en ordonnée et l'ouverture de la fissure en abscisse. La courbe "Stage 1" correspond à la première fissuration avant l'activation de la fibre à mémoire de forme. La courbe "Stage 3" correspond à la poutre fissurée après avoir activé la fibre par chauffage à 90°C pendant 18 h et après une cure humide de 4 jours.

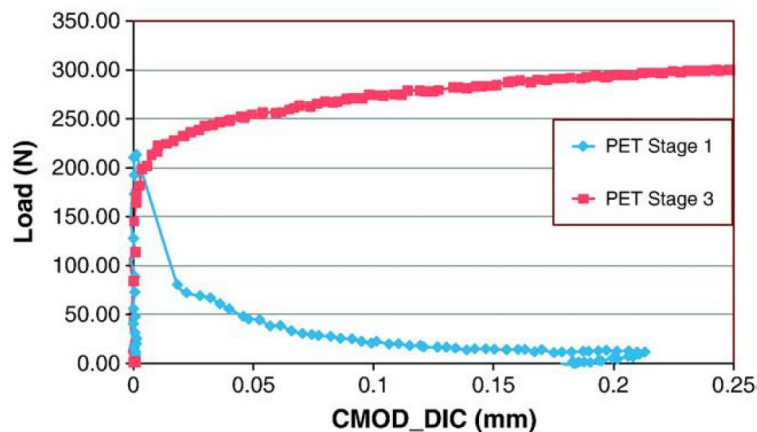


Figure 2.16 Courbes de flexion pour des poutres avec fibre à mémoire de forme. Stage 1 : chargement initial ; Stage 3 : Chargement après la fissuration (Stage 1) et l'activation du matériaux à mémoire de forme. [60]

Ce système permet une amélioration du processus d'autocicatrisant en refermant la fissure causée par le chargement. Avec le phénomène d'autocicatrisation naturelle, les fissures fines sont capables de cicatriser complètement et plus rapidement que les fissures larges.

La figure 2.17 illustre l'effet des fibres à mémoire de forme sur l'ouverture de la fissure.

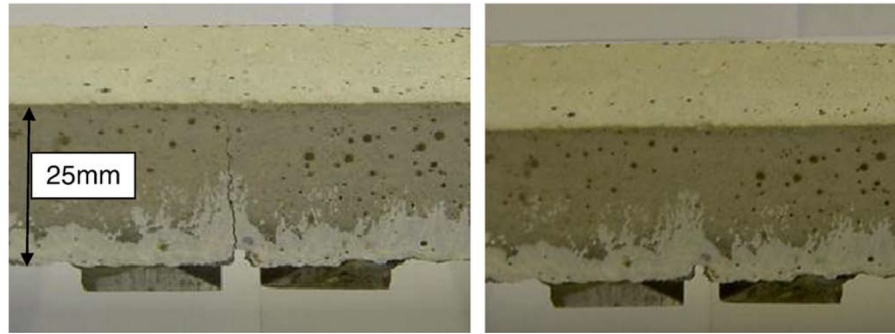


Figure 2.17 Ouverture de la fissure avant et après l'activation de la fibre à mémoire de forme [60]

Si cette technique permet de retrouver rapidement des gains de résistance mécanique, son coût est élevé et la mise en œuvre complexe. De plus, le chauffage de l'échantillon de béton, même à 90°C peut amener à des altérations de la structure cimentaire [131].

### 2.3.5 Synthèse des différentes stratégies d'améliorations de la cicatrisation

Les principales méthodes sont référencées par Wu et al. [131] dans le tableau 2.8, avec leurs avantages et leurs inconvénients.

Les coûts, la capacité à répondre aux différents types de dommages, la difficulté d'utilisation et le bon déclenchement au moment de la fissuration sont autant de facteurs à prendre en compte dans le choix d'une solution d'autocicatrisation. De plus, l'incorporation des différents traitements au sein même du matériau peut être délétère pour les propriétés mécaniques. Chaque système possède ses propres atouts et ses limites. L'utilisateur doit adapter ses choix en fonction de la situation à laquelle l'ouvrage sera exposé.

La solution bactérienne se détache néanmoins des autres systèmes pour plusieurs raisons. Le système de traitement avec bactéries ne doit pas nécessairement être inclus dans le matériau, il peut constituer une technique de réparation applicable au matériau après la fissuration. L'utilisation des bactéries permet également une approche écologique et naturelle, qui permet le colmatage des fissures par un composé durable et hautement compatible avec les matériaux cimentaires. La grande variété du vivant confère également de nombreuses voies possibles pour le développement de solutions bactériennes radicalement différentes.

Stratégie	Avantages	Inconvénients
<b>Encapsulation</b> Système externe d'alimentation	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agent cicatrisant relâché en cas de nécessité.</li> <li>2. Large quantité ajustable d'agents cicatrisants.</li> <li>3. Efficacité dans de multiples cas de dommages.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Difficulté de coulage.</li> <li>2. Effet négatif sur les propriétés mécaniques de la matrice cimentaire avec l'utilisation d'une trop grande quantité de fibres creuses.</li> </ol>
Encapsulation interne	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agent cicatrisant relâché en cas de nécessité.</li> <li>2. Quantité modérée d'agents cicatrisants.</li> <li>3. Possible efficacité dans de multiples cas de dommages.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Difficulté de coulage.</li> <li>2. Effet négatif sur les propriétés mécaniques de la matrice cimentaire avec l'utilisation d'une trop grande quantité de fibres creuses.</li> <li>3. Possible difficulté pour relâcher l'agent cicatrisant.</li> </ol>
Microcapsule	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agent cicatrisant relâché en cas de nécessité.</li> <li>2. Réponse simultanée à des dommages en plusieurs endroits.</li> <li>3. Possible efficacité dans de multiples cas de dommages.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Difficulté de préparation des capsules et du coulage.</li> <li>2. Quantité limitée d'agents cicatrisants.</li> <li>3. L'interface entre la capsule et la matrice doit être étudiée.</li> <li>4. Effet négatif sur les propriétés mécaniques de la matrice cimentaire avec l'utilisation d'une trop grande quantité de capsules.</li> </ol>
<b>Agents expansifs et additions minérales</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bonne efficacité de cicatrisation.</li> <li>2. Bonne compatibilité des produits de cicatrisation avec la matrice cimentaire.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Expansion indésirable en cas de mauvaise conception.</li> <li>2. Production des produits de cicatrisation au moment opportun non garantie.</li> <li>3. Efficacité potentiellement problématique dans certains cas de dommages.</li> </ol>
<b>Matériaux à mémoire de forme</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Capacité à refermer de larges fissures.</li> <li>2. Fort taux de recouvrement des propriétés mécaniques.</li> <li>3. Efficacité dans de multiples cas de dommages.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coût important.</li> <li>2. Le chauffage pour stimuler la cicatrisation peut mener à des altérations.</li> </ol>

Tableau 2.8 Avantages et inconvénients des différentes stratégies d'ingénierie de cicatrisation. [131]

## 2.4 Phénomène de biocicatrisation

Afin d'accroître la capacité de cicatrisation et compléter le mécanisme naturel de l'auto-cicatrisation, plusieurs chercheurs ont mis à profit la physiologie de certaines bactéries.

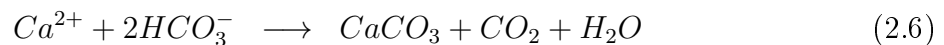
### 2.4.1 Mécanismes de la précipitation microbienne de carbonate de calcium

La quasi-totalité des mécanismes bactériens à l'œuvre pour améliorer la durabilité des matériaux de construction repose sur la précipitation de carbonate de calcium, baptisé en anglais Microbiologically Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP), précipitation microbienne de carbonate de calcium. Les bactéries, de diverses manières, favorisent par leur physiologie la formation de carbonate de calcium : par leur métabolisme, par les substances qu'elles sécrètent, par les caractéristiques de leurs parois cellulaires. Ces mécanismes biologiques sont influençables par l'environnement : pH, composition du milieu, température [45].

#### Métabolismes bactériens impliqués

La précipitation de carbonate de calcium peut être induite par différents métabolismes bactériens.

**Métabolisme autotrophe** Les souches bactériennes autotrophes utilisent le dioxyde de carbone atmosphérique ou dissout dans l'eau comme source de carbone pour produire de la matière organique. La consommation de ce dioxyde de carbone favorise la formation de calcite comme le présente l'équation (2.6).



**Métabolisme lié à l'azote** Le premier mécanisme lié à l'azote est l'ammonification des acides aminés, c'est-à-dire la production d'ions ammoniacques  $NH_3$  à partir d'acides aminés, comme le présente la figure 2.18 :

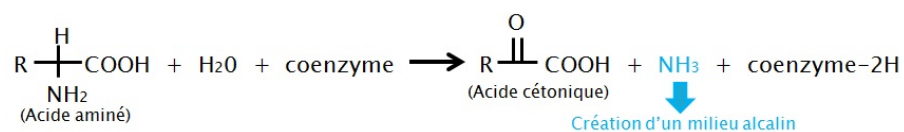
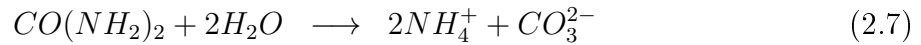


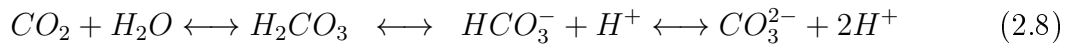
Figure 2.18 Réaction d'ammonification des acides aminés.

Un autre mécanisme bactérien aboutissant à la production d'ammonium est la réduction dissimilatrice de nitrate, ( $\text{NO}_3^-$ ) avec production de  $\text{NH}_3$ .

Le dernier mécanisme bactérien possible dans le cycle de l'azote est la dégradation de l'urée ou de l'acide urique. L'équation (2.7) synthétise les réactions à l'œuvre [26] :

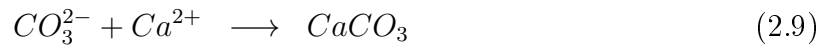


Toutes ces réactions induisent la production d'ions carbonate, bicarbonate ou d'ammonium. Ce dernier provoque une augmentation du pH ; ce qui provoque dans l'équilibre carbonate-bicarbonate la production d'ions carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). L'équation (2.8) montre les réactions produites par une augmentation du pH :



L'équilibre entre  $\text{H}_2\text{CO}_3$  et  $\text{HCO}_3^-$  se fait autour d'un pH de 6 et entre  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  autour de 9.

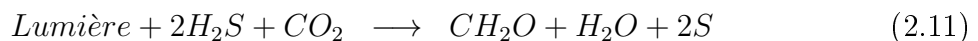
En présence d'ions calcium, la précipitation de carbonate de calcium est possible, comme le montre l'équation (2.9) :



**Métabolisme lié au soufre** Les bactéries utilisant la réduction dissimilatrice des sulfates peuvent jouer un rôle favorable pour la précipitation du carbonate de calcium [129]. Elles produisent des ions carbonate et bicarbonate, mais aussi du sulfure d'hydrogène,  $\text{H}_2\text{S}$ . L'équation (2.10) présente un cas particulier de bactéries sulfato-réductrices :



Pour permettre la précipitation du  $\text{CaCO}_3$  le pH doit augmenter et donc le  $\text{H}_2\text{S}$  doit être dégazé ou consommé et converti en soufre élémentaire par des bactéries (photosynthèse anoxygénique) [15]. L'équation (2.11) présente la réaction de photosynthèse anoxygénique produite par des bactéries en présence de lumière.



**Métabolisme lié au fer** Les bactéries réductrices de fer offrent un potentiel intéressant pour favoriser la précipitation de carbonate de calcium. Comme présenté dans l'équation 2.12, ces bactéries permettent l'oxydation de composés organiques et la formation de bicarbonate qui pourra ensuite venir précipiter en présence de calcium. La précipitation est d'autant plus importante que la réduction du Fe(III) est souvent associée à une augmentation du pH [76]. Certains auteurs [135] considèrent que la réduction du fer a un plus fort potentiel pour la précipitation du carbonate que pour la réduction du sulfate.



### Action des enzymes

**Action de l'uréase** Les protéines et enzymes produites par les bactéries sont également des acteurs primordiaux dans les mécanismes modifiant la précipitation des minéraux.

Le rôle de l'uréase a été mis en évidence par Bachmeier et al. [8]. Cette enzyme est produite par les bactéries pour permettre l'hydrolyse de l'urée. Les auteurs ont comparé la production de carbonate de calcium induite par *Sporosarcina pasteurii* (anciennement appelée *Bacillus pasteurii*) et par deux souches d'*Escherichia coli*. Chacune des deux souches d'*E. coli* contiennent un plasmide, un fragment d'ADN extra-chromosomique. Le plasmide de l'une des deux souches d'*E. coli* est quelconque, pour l'autre il encode la protéine de l'uréase. La quantité de calcite précipitée est beaucoup plus importante dans les milieux avec la souche de *S. pasteurii*, naturellement capable de produire l'uréase et pour *E. coli* avec le plasmide encodant l'uréase. Une faible quantité de précipités est constatée dans le milieu avec la souche d'*E. coli* qui ne peut pas produire d'uréase. Nombre d'auteurs utilisent ainsi le potentiel de bactéries uréolytiques pour développer leur technique de biocatrisation (tableau 2.9). Nematy et al. [80, 81] comparent avec ces deux études le potentiel de précipitation du carbonate de calcium entre une solution purement enzymatique, milieux avec l'uréase seule sans bactéries, et une solution avec bactéries, *S. pasteurii*. Les essais consistent à mesurer différents paramètres, concentration en ammonium, en carbonate de calcium, densité optique et perméabilité dans des colonnes de sable à différentes températures. La réduction de perméabilité des colonnes de sable est comparable dans les deux cas, avec bactéries et avec l'enzyme seule : soit respectivement 65 % et 62 % de diminution. Cependant, si la baisse de perméabilité avec la solution enzymatique est entièrement due à la formation de  $\text{CaCO}_3$ , la diminution de la perméabilité dans le cas des bactéries est principalement due à la biomasse et faiblement à la quantité de  $\text{CaCO}_3$

formé. Il a été aussi souligné que l'activité enzymatique est plus sensible aux variations de température que l'activité bactérienne.

Lié au métabolisme des bactéries uréolytiques, les ions calcium et l'urée doivent être présents en quantités suffisantes pour permettre une formation en grande quantité de  $\text{CaCO}_3$ . L'augmentation de leur concentration au début du processus semble favoriser l'action des bactéries [83]. De plus, dans le cas particulier des études de M. Biswas [10] et B. Chattopadhyay [18], l'ajout de calcium dans certaines proportions (10 mM) améliore l'activité enzymatique de 18 %.

Dans les études de Bachmeier et al. [8], le nickel joue un rôle important sur l'activité enzymatique de l'uréase. Le site actif de l'uréase requiert en effet du nickel pour être fonctionnel. L'activité de l'enzyme recombinante, produite par *E. coli*, est améliorée avec des concentrations en nickel dans le milieu autour de 5-100  $\mu\text{M}$ . Dans le cas de *S. pasteurii*, l'ajout de nickel influence moins l'activité enzymatique. L'affinité au nickel du système de transport dans la membrane cytoplasmique de *E. coli* est supposé plus faible par rapport à *S. pasteurii*.

**Action d'enzymes de type silicase** Les travaux de M. Biswas [10] et B. Chattopadhyay [18] ont isolé de sources chaudes en Inde des bactéries produisant une enzyme proche de la silicase. Cette dernière est produite par des organismes comme les éponges marines qui dissocient la silice solide et relache de l'acide silicique,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ . L'action de cette enzyme modifie la composition du gel de C-S-H au niveau de la répartition de la silice et favorise la formation de géhlénite dans les pores de la pâte de ciment. La démarche et les résultats de ces chercheurs sont détaillés dans la partie 2.5.4.



### Biofilms

Dans la plupart des biotopes, les bactéries s'adaptent aux surfaces qui les accueillent. Les cellules bactériennes adhèrent entre elles et à la surface du support. Elles sécrètent et produisent une matrice adhésive et protectrice, appelé biofilm. Les substances sécrétées par les bactéries qui forment le biofilm sont appelées substances de polymères extracellulaires (SPE). Elles sont composées essentiellement d'exopolysaccharides (EPS), d'acide uronique et de protéines. Dans cet environnement particulier qu'est le biofilm, la précipitation du carbonate de calcium est contrôlée par l'action des SPE qui peuvent l'inhiber, l'altérer ou l'augmenter [30].

Les interactions entre les ions métalliques et les SPE sont régies par différents groupes fonctionnels comme des acides carboxyliques, des groupes sulfate ou phosphate ou des amines [11] comme illustré dans la figure 2.19. Ces groupes permettent à des SPE adjacentes de former des ligands monodentates ou bidentates avec l'ion calcium,  $\text{Ca}^{2+}$ . Les SPE peuvent se lier à un seul des deux sites chargés (+) du calcium, ligand monodentate ou aux deux, ligand bidentates. Dans les cas où les deux charges sont liées à la matrice SPE, la précipitation du calcium est inhibée en diminuant les concentrations en ions calcium libres. À l'inverse, le calcium avec une liaison monodentate expose un site de nucléation favorable à la précipitation de carbonate de calcium. L'activité bactérienne, le pH peuvent influencer le fait que les SPE soient monodendates ou bidentades. Les modifications, notamment la consommation des acides uroniques par les bactéries ou les variations de pH, changent la solubilité, la flexibilité, les conformations stériques des SPE et donc le nombre de groupes fonctionnels capables de se lier au ions métalliques.

Les SPE influencent également, par ces interactions avec les ions calcium, la morphologie des cristaux de carbonate de calcium [37, 68]. Les formes rencontrées peuvent être des aiguilles d'aragonite, des sphères de vaterite ou de la calcite. Dans les conditions marines, le magnésium peut venir se substituer au calcium pour former de la "magnesian calcite"  $(\text{Ca}/\text{Mg})\text{CO}_3$ , de stœchiométrie différente de la dolomite,  $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ .

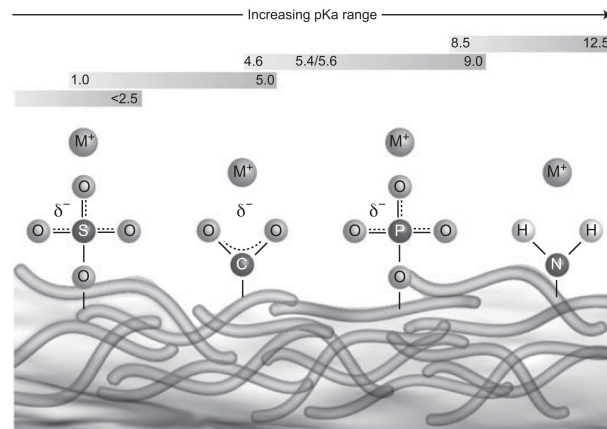


Figure 2.19 Diagramme des différents groupes fonctionnels associés aux substances polymères extracellulaires (SPE) dans les biofilms. [11]

## 2.4.2 Paramètres d'influence

De nombreux facteurs influencent la précipitation bactérienne de carbonate de calcium. Certains chercheurs comme Ferris et al. [39] ou encore Okwadha et Li [83] ont évalué l'impact de la température, de la concentration initiale d'urée et de calcium, le nombre de bactéries par mL, la valeur du  $\zeta$ -potentiel et la valeur du pH.

### " $\zeta$ -potentiel"

Le  $\zeta$ -potentiel est la mesure de la charge électrique à la surface d'une particule. La surface de la paroi cellulaire des bactéries est chargée négativement. Les ions calcium chargés positivement sont attirés par la surface de la bactérie, il en ressort une sursaturation locale et une précipitation hétérogène de carbonate de calcium aux alentours de la bactérie. La paroi bactérienne sert de site de nucléation durant le processus de minéralisation [113]. Au bout d'une certaine période, la bactérie peut se retrouver entièrement encapsulée dans une gangue minérale. La mort de la bactéries survient quand il n'y a plus d'échanges possibles avec le milieu extérieur. Le schéma représenté en figure 2.20 résume les évènements.

Dans l'étude menée par Dick et al. [32], différentes souches bactériennes sont utilisées avec différents  $\zeta$ -potentiel. Les pierres calcaires traitées avec les bactéries ayant le plus fort  $\zeta$ -potentiel montrent une plus faible absorption capillaire que les autres pierres. Ceci semble être dû à la couche protectrice de calcite produite par la précipitation bactérienne, plus dense que les autres.

Le  $\zeta$ -potentiel semble aussi un des paramètres importants à la mobilité des bactéries dans les milieux poreux. Sharma et al. [106] ont mis en évidence la forte corrélation entre la mobilité des bactéries et les charges de surface des bactéries, mais aussi des charges de

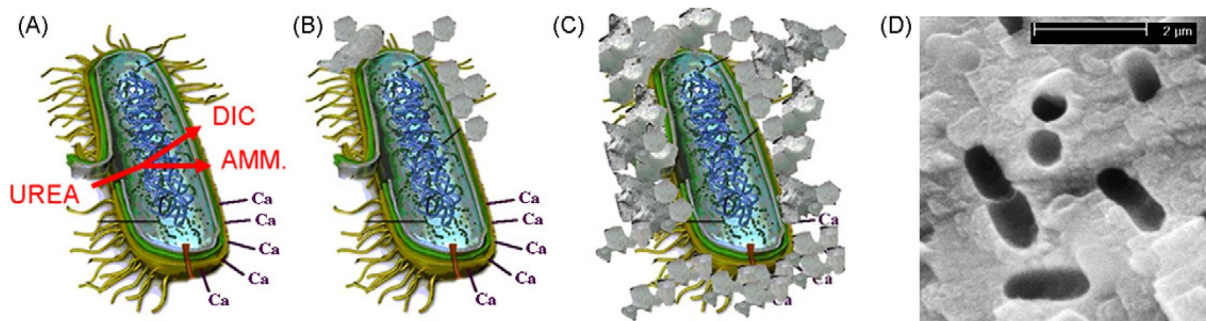


Figure 2.20 Schéma de l'action du  $\zeta$ potentiel des cellules bactériennes sur la précipitation de carbonate de calcium. [26]

surface des grains de sable, chargés négativement. Plus le  $\zeta$ -potentiel des bactéries est négatif, moins les grains de silice retiennent les cellules bactériennes. L'augmentation de la charge négatives des grains de sable engendre le même effet, la rétention des bactéries est plus faible. Une charge de surface des cellules bactériennes élevée permet aussi de défloculer les bactéries, dans un milieu faiblement chargé.

#### Milieus alcalins, rôle du pH et du calcium

Les études montrent clairement le rôle favorable d'une augmentation du pH (jusqu'à 9 environ) sur la précipitation de  $\text{CaCO}_3$ . La basicité de la solution est souvent due à l'activité bactérienne elle-même, par la présence des ions ammonium lors de l'hydrolyse de l'urée.

Le milieu alcalin, notamment avec la forte concentration en calcium et sa forte basicité, impose aux bactéries un processus métabolique, qui favorise la précipitation localisée de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). La figure 2.21 schématise l'activité bactérienne en milieu alcalin.

Du fait du gradient de concentration en ions calcium et en ions hydrogène entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule bactérienne, un flux passif s'instaure à travers les parois cellulaires tendant à homogénéiser les concentrations. Les ions calcium entrent dans la cellule tandis que les ions hydrogène en sortent. Pour survivre dans ces conditions, la cellule bactérienne doit équilibrer ce flux passif par un flux actif d'expulsion de calcium et d'absorption de l'hydrogène. L'énergie nécessaire au flux actif engendre la consommation de matière organique et la production de  $\text{CO}_2$  qui est rejeté dans le milieu. Ce flux actif génère localement une alcalinisation localisée et les conditions favorables à la formation de carbonate de calcium.

Le pH et la charge ionique du milieu interfèrent sur le  $\zeta$ -potentiel des bactéries [106]. Une augmentation du pH a tendance à faire augmenter la charge négative du  $\zeta$ -potentiel.

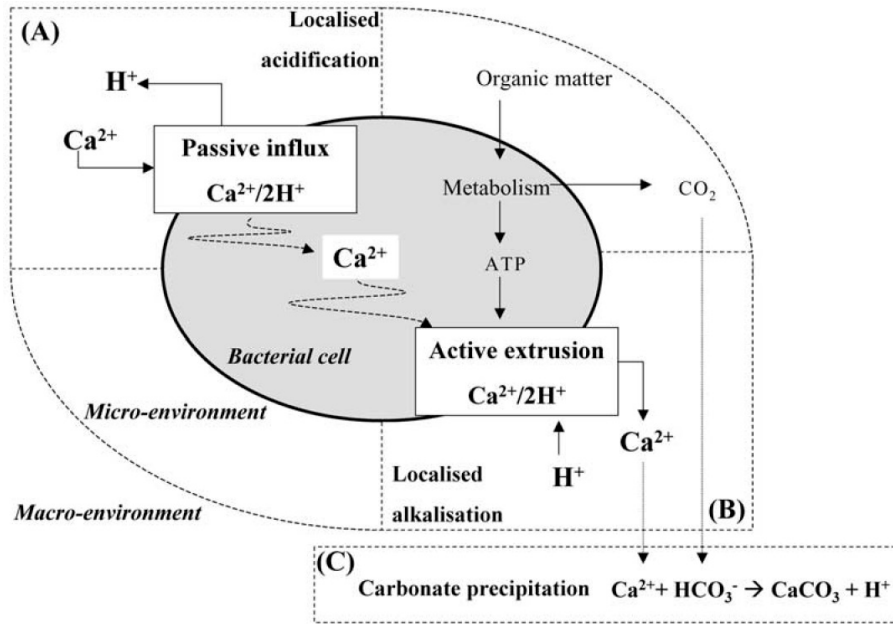


Figure 2.21 Représentation schématique de l'activité bactérienne en milieu alcalin. [45]

Également liée aux forces ioniques dans le milieu, une forte concentration en calcium provoque la formation d'agglomérats de bactéries, ce qui peut modifier leur capacité de biocristallisation, via notamment les capacités de diffusion dans les milieux poreux [46, 111].

### Rôle de la température

La température influence la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  à divers niveaux : action sur l'activité bactérienne, sur la cinétique des réactions chimiques et sur la solubilité des produits. Il est clairement montré qu'une augmentation de la température de  $5^\circ\text{C}$  à  $20^\circ\text{C}$  augmente significativement la cinétique du métabolisme bactérien [39]. La température optimale semble se situer entre  $20^\circ\text{C}$  et  $37^\circ\text{C}$ . Cependant, cette augmentation de l'activité des bactéries ne se traduit pas forcément par une augmentation des dépôts de carbonate de calcium. En effet, la température joue également un rôle sur la solubilité d'autres ligands organiques et d'ions tels que les ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  qui peuvent limiter la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  en se substituant au calcium. L'effet de la température sur la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  par l'action des bactéries dépend de la composition chimique du milieu. Dans les conditions de l'étude de Ferris et al. [39], avec la présence de  $\text{NH}_4^+$  et de  $\text{Mg}^{2+}$ , la température a un impact faible sur la précipitation de carbonate de calcium.

### Influence de l'eau de mer

Mortensen et al. [77] ont évalué la précipitation de carbonate de calcium induite par *S. pasteurii* sur différents types de sol, en présence d'eau douce et d'eau de mer.

Les essais sont découpés en deux parties. Les bactéries sont d'abord cultivées dans les différents milieux de culture seuls, sans les sols. Les milieux sont composés de nutriments (milieu Nutrient Broth), d'urée, de  $\text{NaHCO}_3$ , de  $\text{KCl}$ , de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , de  $\text{CaCl}_2$  et d'eau de mer (eau de mer synthétique Instant Ocean, fabriquée par Aquarium Systems Inc.) avec différentes concentrations. Les essais avec les sols consistent à effectuer des injections dans des colonnes remplies de différents sables. Les milieux sans  $\text{CaCl}_2$ , avec les bactéries sont injectés dans ces colonnes. Après 4 à 6 h d'arrêt, les injections reprennent avec les milieux sans bactéries avec du  $\text{CaCl}_2$ . Les résultats montrent une meilleure rigidité des sols grâce à l'action des bactéries dans l'eau de mer. La rigidité est améliorée par la formation de précipités qui viennent cimenter les grains du sol. Les auteurs attribuent ce comportement à la plus grande alcalinité de l'eau de mer et à la plus grande concentration en cations. Le principal composé formé est du carbonate de calcium.

### 2.4.3 Sélection des souches bactériennes

Les souches bactériennes rapportées dans la littérature concernant la précipitation microbienne de carbonate de calcium sont nombreuses. Le tableau suivant 2.9 regroupe les différentes souches utilisées dans la littérature. Différents métabolismes peuvent être privilégiés selon les auteurs. Deux souches bactériennes, *S. pasteurii* et *Bacillus sphaericus*, sont fréquemment employées en raison de leur fort potentiel à précipiter le carbonate de calcium. En effet, les bactéries capables d'hydrolyser l'urée produisent une forte quantité d'ions carbonates qui vient former avec les ions calcium présents en solution du carbonate de calcium. *S. pasteurii* revêt également l'avantage d'être une bactérie alcalinophile et donc capable à se développer en milieu basique, comme peuvent l'être les matériaux cimentaires. La capacité d'hydrolyse de l'urée et la nature alcalinophile de *S. pasteurii* en font la souche la plus étudiée. Les souches bactériennes peuvent être ainsi des espèces connues, choisies dans les catalogues des fournisseurs en fonctions de leurs caractéristiques bien définies. Cependant, certains chercheurs choisissent de les prélever et de les isoler de différents biotopes offrant des conditions de croissance favorables aux bactéries potentiellement intéressantes pour la biocatratisation comme les sources thermales, les lacs salés, ou les milieux alcalins...

---

Souche	Auteur	Alcalinophile	Urease	Facultés
<i>Sporosarcina pasteurii</i> ( <i>Bacillus pasteurii</i> )	[2], [9], [8], [17], [19], [31], [34], [43], [46], [69], [77], [84], [88], [94], [95], [102], [113]	Oui	Oui	aerobie
<i>Escherichia coli</i> OGM avec <i>Bacillus pasteurii</i>	[8]	Non	Oui	
<i>Bacillus sphaericus</i>	[24], [71], [25], [126], [125] [27], [28], [32], [69], [123], [5], [128], [127]	Non	Oui	aerobie
<i>Bacillus pseudofirmus</i> (Muté, sélectionné)	[136]	Oui	Non	aerobie
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	[65], [114]	Oui	Non	aerobie
<i>Bacillus cereus</i>	[15]	Non	Oui	aerobie
<i>Bacillus lentus</i>	[32]	pH 5-10	Oui	aerobie
<i>Bacillus cohnii</i>	[65], [108]	Oui	Non	aerobie
<i>Bacillus subtilis</i>	[89], [90]	Non	Non	aerobie
<i>Bacillus megaterium</i>	[3]	Non	Non	aerobie
<i>Myxococcus xanthus</i>	[61], [62], [100], [99]	pH > 5	Non	aerobie
<i>Escherichia coli</i>	[41]	Non	Non	anaerobie
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> et <i>D. desulfuricans</i>	[129], (revue)	-	-	anaerobie et sulfato- réductrice
<b>Isolées in situ</b>				
<i>Thermoanaerobactor</i> <i>thermohydrosulfuricus</i>	[10], [18]	-	-	Enzyme, Silicase
<i>Bacillus sp.</i> VS1	[111]	-	Oui	
<i>Bacillus sp.</i> (I-001)	[5]	-	-	
<i>Bacillus sp.</i> CT-5	[1]	-	-	aerobie
<i>Bacillus alkalinitrilicus</i>	[130]	Oui	Non	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[94]	Non	Non	aerobie
<i>Bhargavaea cecembensis</i>	[75]	-	Oui	
<i>Proteus vulgaris</i>	[80]	-	Oui	anaerobie
<i>Micrococcus sp.</i>	[119], [120]	Non	Non	
<i>Shewanella</i>	[41]	Non	Non	anaerobie et ferroréductrice
Bactéries autoctones	[62]	-	-	

Tableau 2.9 Bactéries impliquées dans le processus de biocicatrisation.

### 2.4.4 Objectifs de la biocicatrisation

Le potentiel des bactéries pour précipiter le carbonate de calcium peut s'utiliser pour différentes finalités. Il existe un large panel de possibilités pour les traitements bactériens, allant du traitement esthétique de surface à la modification en profondeur du matériau. De plus, le vivant, évoluant dans le temps, permet de conférer des propriétés actives au support comme l'autocicatrisation. En fonction de l'objectif visé différentes approches peuvent être envisagées. Les sections suivantes décrivent les procédés possibles en fonction du but recherché.

#### Potentiel d'autocicatrisation dans le temps

L'utilisation d'organismes vivants pourrait octroyer au matériau inerte des capacités autonomes de réparation ou de protection. Cependant, pour y parvenir il faut permettre le développement et la survie sur le long terme des microorganismes au sein même du matériau. Plusieurs études ont poursuivi cet objectif [65, 130]. Toutefois, des effets délétères apparaissent pour le matériau lui-même ou pour la survie à long terme des bactéries.

#### Amélioration des caractéristiques du matériau

Dans les matériaux cimentaires, pour parvenir à modifier la matrice cimentaire dans son ensemble, les microorganismes doivent être partie intégrante de sa composition [10, 18, 64, 75]. Cependant, si seule une modification en périphérie du matériau est recherchée, le traitement bactérien peut être appliqué à la surface [19, 27]. Les modifications recherchées peuvent agir la durabilité (diminution de la porosité, de la perméabilité, de la résistance au gel-dégel) ou sur les résistances mécaniques.

La pierre calcaire présente les mêmes problématiques de durabilité que le béton du fait de sa porosité. Le traitement de la pierre calcaire par "biominéralisation" doit permettre d'offrir une couche protectrice tout en préservant l'aspect extérieur du support. La méthode consiste à pulvériser ou badigeonner en surface un mélange de nutriments, de précurseurs comme l'urée ou du calcium, avec un pH élevé. Dans la majorité des cas, les bactéries sont ajoutées au mélange [15, 28, 100]. Parfois, il s'agit seulement de favoriser la croissance et le développement des bactéries déjà présentes naturellement dans la pierre [62].

#### Système de réparation

En remplacement de produits de réparation classiques, les bactéries peuvent être utilisées pour colmater les fissures. Elles peuvent être directement incluses dans la matrice cimentaire [130], appliquées en surface du matériau [123] ou injectées directement dans la fissure [123].

---

### 2.4.5 Biominéralisation sur différents matériaux

La capacité des bactéries à précipiter le carbonate de calcium ouvre le champ à de nombreuses applications. De nombreux supports et matériaux peuvent voir leurs caractéristiques améliorées par ce que l'on peut appeler des biotraitements. Les termes peuvent être variés selon la fonction recherchée : biocimentation, biorenforcement, biocicatrisation, bioconsolidation. Toutefois, le principe fondamental reste le même : l'utilisation de bactéries et d'un milieu de culture adéquat pour précipiter du carbonate de calcium.

Cependant, en fonction de la nature du matériau, vont se dessiner des modes d'action et des contraintes techniques différentes.

#### Sables et sols

Les différentes études pour le traitement des sols adoptent généralement les mêmes principes d'essais au laboratoire : la biocimentation de colonnes de sable via l'injection d'une solution bactérienne suivie d'une injection d'une solution de "cimentation" [5, 31, 46, 77, 80, 102, 111].

Dans ces travaux, les souches bactériennes utilisées hydrolysent l'urée. La plupart ont sélectionné *S. pasteurii*. Seul Aiko Shirakawa et al. [5], ont utilisé *Bacillus sphaericus* et une souche isolée du sol baptisée *Bacillus* sp.(I-001).

Les solutions bactériennes contiennent, en plus des cellules bactériennes, du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) avec ou sans urée.

Les solutions de cimentation, quand à elles, sont composées seulement de  $\text{CaCl}_2$  et d'urée [5, 31, 77, 111]. Dans ces solutions, les concentrations de  $\text{CaCl}_2$  varient de 0,05 à 3 mol/L et les concentration d'urée varie de 20 g/L à 90 g/L selon les études.

Stabnikov et al. [111] ont recherché particulièrement à réduire la perméabilité des couches de sables. Ils parviennent à obtenir une couche fine de 1 mm imperméable au bout de la sixième injection de leur solution de cimentation. La mesure de la résistance de la couche est faite par un essai en flexion 3 points sur un échantillon de 0,1 cm d'épaisseur, 2 cm de largeur et 4 cm de longueur. La résistance ainsi obtenue est de 39,5 MPa, valeur comparable à une pierre calcaire, mais l'épaisseur de la couche laisse la place à des marges d'erreur importantes. La faible épaisseur de la couche de sable cimentée par les bactéries a été également observée par Day et al. [23]. La limitation de l'action des bactéries à la surface du matériau est expliquée par le fait que *Sporosarcina pasteurii*, bien que potentiellement anaérobie, croit à un taux plus haut en présence d'oxygène.

---



Dans l'étude de Stabnikov et al. [111] le  $\text{CaCl}_2$  a été ajouté dans le milieu de croissance pour améliorer l'agrégation des cellules bactériennes entre elles et favoriser leur fixation sur les grains de sable. La figure 2.22 montre la différence de volume des cellules et des agrégats de cellules obtenus par cette méthode : A) présente la distribution de la taille des cellules et des agrégats de cellules sans traitement et B) la distribution avec le traitement au milieu de culture contenant du  $\text{CaCl}_2$

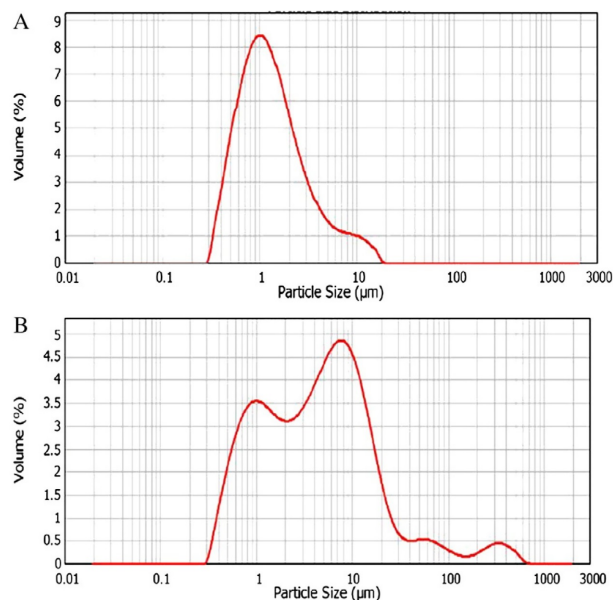


Figure 2.22 Distribution volumique des particules en fonction de leur tailles. Sans traitement ( graphique A).Après traitement au milieu de culture contenant du  $\text{CaCl}_2$  (graphique B). [111]

Harkes et al. [46] approfondissent l'étude de l'impact de la composition des solutions sur la capacité de fixation des bactéries sur les grains de sable. En recueillant les solutions en sortie des colonnes de sable, il est possible d'estimer la quantité de bactéries retenues à la surface des grains. La suspension bactérienne est injectée dans les colonnes de sable cylindriques, suivi par la solution de fixation puis par la solution de cimentation à 1 mol/L de  $\text{CaCl}_2$  et d'urée.

Le tableau 2.10 résume les différentes conditions d'injection et les résultats obtenus avec les mesures de densité optique.

La force ionique de la solution contrôle la capacité des bactéries à être retenues ou à diffusées dans le milieu poreux. De nombreux autres chercheurs confirment ce phénomène [106]. Il est intéressant de pouvoir jouer sur ce paramètre en fonction des besoins.

Mortensen et al. [77] ont montré que la nature du sol a un impact sur le mécanisme de biominéralisation. Si la minéralogie n'a que peu d'influence, la granulométrie du sol joue

Colonne	Fluide de fixation	Bactéries injectées [mL] (DO/activité) <sup>a</sup>	Débit [mL/h]	DO <sup>b</sup> % retenue	Activité % retenue
I	50 mM CaCl <sub>2</sub>	270 (0,29/0,51)	220	14	17
II	50 mM CaCl <sub>2</sub>	30 (3,78/2,15)	220	99	100
III	Eau déminéralisée	30 (4,04/2,20)	220	0	0
IV	Eau douce de surface	30 (3,44/1,64)	220	36	74
V	9 g/L NaCl	30 (3,51/2,06)	220	92	93
VI	Solution de cimentation	30 (3,92/2,06)	220	100	100
VII	50 mM CaCl <sub>2</sub>	30 (3,00/0,96)	660	79	72

<sup>a</sup> Les valeurs entre parenthèses sont la densité optique à 600 nm et l'activité enzymatique en mS/cm/min de la suspension bactérienne juste avant l'injection (1 mS/cm/min  $\approx$  660 mM urée/h)

<sup>b</sup> Les fines particules ou les cristaux de carbonate de calcium interfèrent parfois avec les mesures de densité optique, induisant de plus grandes valeurs pour des rinçage et de plus petites valeurs lors de rétentions de bactéries

Tableau 2.10 Synthèse des injections de colonnes de l'étude de Harkes et al. [46]

un rôle primordial. Les sols dont la granulométrie offre le plus grand nombre de contacts entre les grains permettent logiquement une meilleure et plus rapide montée en résistance mécanique. Les performances mécaniques des traitements de biocimentation sur les sols ont été approfondies par des essais triaxiaux [31] ou des essais en traction et des essais directs en cisaillement [5]. Ces essais ont pour but d'établir un indice de mesure pour la consolidation du sol par les bactéries.

## Pierre

Le traitement de la pierre calcaire par "biominéralisation" doit permettre d'offrir une couche protectrice tout en préservant l'aspect extérieur du support. Le concept est principalement utilisé dans le cadre de restauration de monuments historiques où préserver l'esthétisme est un impératif.

Les travaux sur le sujet, menés par Tiano et al. [119], Castanier et al.[15] ou Le Métayer-Levrel et al. [74], cherchent à établir les bases théoriques et les méthodes de traitement. Ces recherches s'inscrivent également dans le cadre de projets concrets menés par des entreprises pour le traitement de monuments, comme Calcite bioconcept sur des églises en France, avec des méthodes parfois brevetées [16].

De Muynck [28] a également conduit ses études sur l'évaluation de ces méthodes sur la pierre calcaire. Il s'agit de caractériser l'impact du milieu nutritif, des précurseurs comme l'urée ou le calcium sur la qualité du traitement. Ce dernier est évalué à la fois sur des critères physico-mécaniques et sur des critères esthétiques. Il est ainsi mesuré sur les pierres les variations de la porosité, de l'absorption capillaire, la résistance aux ultrasons ou encore les variations de couleur. Le traitement apporte clairement un effet hydrofuge et une résistance aux ultrasons, comparables au traitement avec des silicates d'éthyle, avec cependant une légère modification de la couleur de la pierre. Tous ces paramètres semblent

fortement dépendants de la concentration en ions calcium, et, dans une moindre mesure, à la concentration d'urée.

Si la plupart des études choisissent des souches bactériennes effectuant l'hydrolyse de l'urée, d'autres pistes sont prometteuses dans certains cas. Pour nettoyer des croûtes noires sulfatées à la surface des pierres, l'utilisation de bactéries sulfato-réductrices est pertinent. Webster et May [129] émettent l'hypothèse de l'utilisation de ce type de bactéries en remplacement des traitements conventionnels, qui sont parfois inefficaces ou délétères.

Les bactéries sont omniprésentes dans l'environnement. Jimenez-Lopez et al. [61, 62] ont cherché à favoriser la biominéralisation grâce aux bactéries déjà présentes dans le matériau. Dans leurs travaux, des pavés de calcaire, stériles et non stériles sont immergés dans différentes solutions nutritives avec bactéries (*Myxococcus xanthus*) et sans bactéries. Les pavés non stérilisés, immergés dans les solutions sans bactéries, doivent présenter une biocatrisation uniquement induite par les bactéries présentes naturellement dans la pierre. Les performances de ces pavés et des pavés traités par les solutions avec bactéries sont comparables vis-à-vis du carbonate de calcium déposé et de la résistance aux ultrasons. Dans ces deux cas, les performances du matériau traité sont meilleures que dans les témoins, les pierres stériles avec une solution sans bactéries. Les solutions nutritives ont un pH de 8 et une forte concentration en calcium. Elles favorisent le développement de bactéries alcalinophiles capables de précipiter le carbonate de calcium. Les espèces identifiées sont des bactéries Gram-positives de l'ordre des Bacillales, notamment des bactéries du genre *Bacillus*, alcalinophiles ou halophiles, se développant dans des milieux à fortes concentrations en sels. Le carbonate de calcium formé est sous la forme de calcite, mais aussi de vatérite en fonction de certaines solutions nutritives utilisées.

Rodriguez et al. [99, 100] expliquent la présence de vatérite par l'influence de l'activité bactérienne, en particulier des substances polymériques extracellulaires (SPE) qui modifient les conditions de précipitation du carbonate de calcium (voir partie 2.4.1). La vatérite est moins stable que la calcite et généralement finit par se transformer en cette dernière. Les auteurs soulignent donc le fait que la couche de vatérite offrira peut-être une durabilité au matériau plus faible comparativement au matériau recouvert de calcite. Il s'agit donc de sélectionner les solutions nutritives, qui permettent de former le plus de calcite.

---

## 2.5 Biocicatrisation des matériaux cimentaires

Les matériaux cimentaires offrent des conditions particulières à prendre en compte pour l'application des traitements avec bactéries. Ce sont des supports poreux, comme les pierres calcaires, mais qui possèdent une composition chimique complexe, avec des espèces facilement solubles et un pH très basique, variant de 13 au cœur à 9 pour une surface carbonatée.

### 2.5.1 Injection dans les fissures

K. Van Tittelboom et al. [123] ont étudié les bactéries et leur potentiel pour reboucher des fissures. La souche bactérienne est *B. sphaericus*. L'étude observe le comportement de divers systèmes de réparation dans des fissures. Les fissures sont créées de façon "standardisée" ou de façon "réaliste". Les fissures "standardisées" sont obtenues à l'aide de plaques de cuivre pour former des ouvertures maîtrisées de 0,30 mm sur une profondeur de 10 ou 20 mm. Les fissures "réalistes" sont obtenues avec un essai de fendage.

Les différents traitements d'injection sont présentés au tableau 2.11. Pour permettre aux bactéries de se développer malgré le pH très élevé du béton, un gel de silice a été utilisé pour faire office de protection. Différentes solutions de précurseurs sont testées :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . L'urée est introduite de façon à ce qu'il y ait le même nombre de moles de calcium que de moles d'urée ; il y a constamment 20 g/L d'urée dans les essais.

Certaines solutions utilisent des bactéries autoclavées, de façon à voir uniquement l'effet de la biomasse sur le colmatage des fissures.

Type de traitements	Description						
<b>A) Traditionnels</b>							
Époxy	Injection d'une résine époxy avec une seringue						
Coulis de mortier	Application du mortier avec une truelle						
<b>B) Non traditionnels</b>							
	Bactéries autoclavées	Injection Levasil	Injection Levasil+BS	Immersion culture BS	Immersion urée+ $\text{CaCl}_2$	Immersion urée + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Immersion urée + $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
BS+ $\text{CaCl}_2$				X	X		
Sol-Gel		X					
Sol-Gel+BS+ $\text{CaCl}_2$		X		X	X		
BS en Sol-gel+ $\text{CaCl}_2$			X		X		
BS en Sol-gel+ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$			X			X	
BS en Sol-gel+ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$			X				X
BS autoclavées en Sol-gel+ $\text{CaCl}_2$	X		X		X		
BS autoclavées en Sol-gel+ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	X		X				X

Tableau 2.11 Différentes techniques de réparation des fissures. [123]

Les méthodes bactériennes sont mises en compétition avec des méthodes plus classiques, telles que l'injection d'époxy ou de coulis de mortier. La méthode d'inoculation de traite-

ment bactérien se fait de deux manières différentes : l'injection du mélange de gel de silice et de bactéries avec une seringue, ou, l'injection seulement du gel de silice et les bactéries sont apportées par les solutions. Les échantillons sont ensuite immergés dans les différentes solutions pendant 3 jours puis séchés pendant 3 jours.

Les différents traitements sont évalués par des essais de perméabilité à l'eau, des mesures des vitesses ultrasonores et par des observations visuelles.

La figure 2.23 montre l'évolution des vitesses ultrasonores avant et après traitement, pour des fissures "standards" de 10 mm (A) ou 20 mm (B) de profondeur.

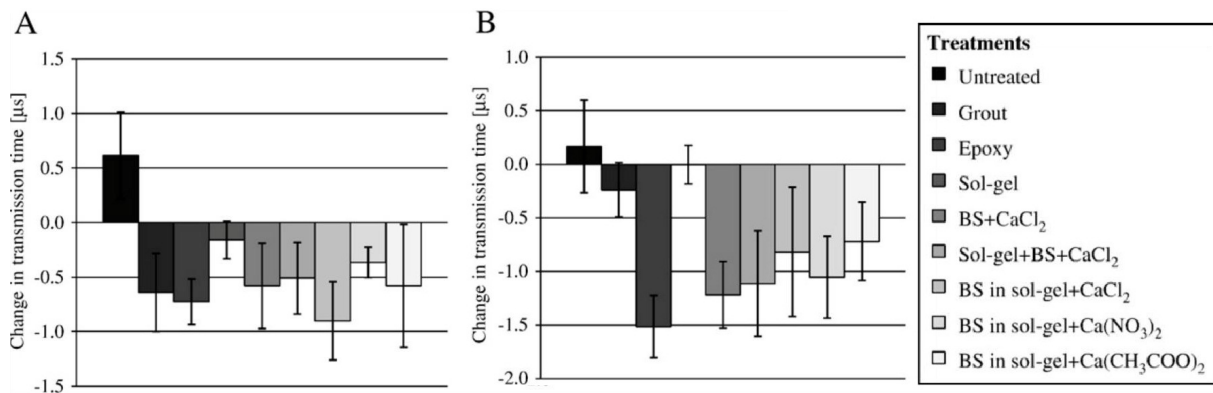


Figure 2.23 Changement relatif des vitesses ultra-sonores en fonction des différents techniques de réparation des fissures. [123]

La mesure des vitesses ultrasonores montre clairement l'effet favorable du traitement par les bactéries puisque le cas d'amélioration le plus important est pour des fissures de petites profondeurs avec gel de silice, bactéries et comme source de calcium du CaCl<sub>2</sub>.

La figure 2.24 montre les différentes perméabilités pour différentes valeurs d'ouvertures de fissures "réalistes".

Les courbes de la figure 2.24 (B) soulignent l'effet du gel de silice seul et les courbes 2.24 (C) suggèrent que la perméabilité à l'eau peut être également réduite juste par la biomasse (cellules bactériennes autoclavées).

La figure 2.25 présente les observations des fissures après traitement. La photo (A) montre que, même sans traitement, le test de perméabilité à l'eau génère des conditions favorables à la formation de précipités dans la fissure, il s'agit d'autocicatrisation naturelle [7]. La photo (F) montre l'effet probant du traitement bactérien sur les fissures de faible profondeur (10 mm). En revanche, l'effet est presque nul pour les plus grandes profondeurs, photo (I). Le gel de silice a un léger effet visible sur la photo (G).

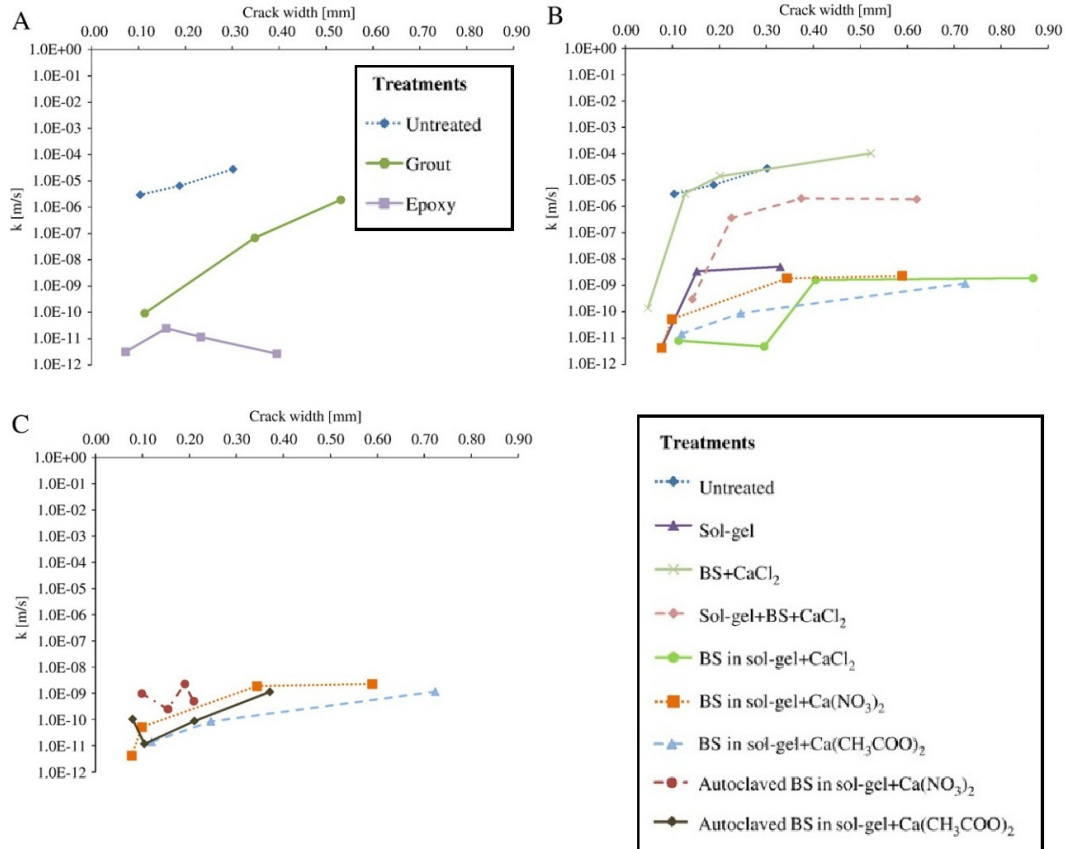


Figure 2.24 Coefficients de perméabilité à l'eau pour différentes tailles de fissures, après les différents techniques de réparation des fissures. [123]

En remplacement du gel de silice, Bang et al. [9] ont utilisé du polyuréthane en guise de protection. Les fissures sont réalisées en pratiquant des entailles de 25,4 mm de profondeur pour une largeur de 3,18 mm. Elles sont remplies par une mousse de polyuréthane chargée de cellules bactériennes *B. pasteurii*. Les éprouvettes sont ensuite immergées dans un milieu composé d'urée et de chlorure de calcium. Le tableau 2.12 résume les résistances en compression obtenues pour les différents traitements des cubes de mortier.

Le polymère de polyuréthane, avec ou sans bactéries, devient de moins en moins rigide après une semaine d'incubation dans le milieu à base d'urée et de carbonate de calcium. Les bactéries semblent jouer un rôle prépondérant dans l'augmentation de la résistance des mortiers traités. Les analyses au microscope électronique confirment la formation de calcite. La présence du polymère semble protéger les bactéries du pH alcalin du béton mais aussi la mousse de polyuréthane constitue des sites de nucléation pour la formation des cristaux de calcite.

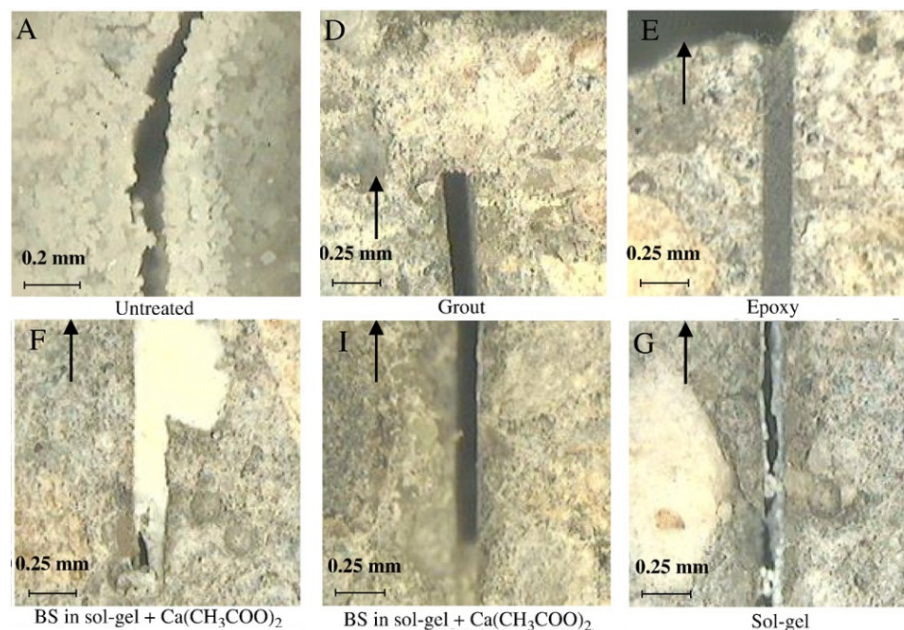


Figure 2.25 Observation des fissures après les différents traitements. [123]

Temps d'incubation	Résistance en compression (psi)			
	Concentration en cellule bactérienne (cellules par fissure)			
	0	$5.10^7$	$5.10^8$	$5.10^9$
7 jours	4261 ( $\pm 172$ )	4172 ( $\pm 179$ )	4599 ( $\pm 210$ )	4772 ( $\pm 94$ )
28 jours	4191 ( $\pm 56$ )	4198 ( $\pm 309$ )	4266 ( $\pm 2$ )	4303 ( $\pm 139$ )

Toutes les données sont obtenues à partir de la moyenne d'échantillons en triplicat  
( ) écart type

Tableau 2.12 Résistance en compression des cubes de mortier avec les différents traitements de fissures. [9]

## 2.5.2 Immersion et traitement de surface

W. De Muynck et al., [25, 27], dans ces deux articles, évaluent par de nombreux essais l'effet des bactéries en comparaison avec différentes méthodes plus conventionnelles de traitement de surface.

Le premier article [27] évalue le potentiel de *B. sphaericus* sur des bétons et des mortiers. Cette souche est capable d'hydrolyser l'urée et possède un fort  $\zeta$ -potentiel. Le second article [25] utilise la même souche bactérienne, mais aussi des bactéries issues des boues de stations d'épuration. Cette démarche vise à estimer le potentiel de ces souches indigènes dans une démarche économique et écologique.

Les produits conventionnels sont des acrylates, des silanes, des siloxanes, des silicones et des polyuréthanes, appliqués selon les recommandations du fabricant.

L'inoculation des bactéries s'effectue en immergeant les échantillons de mortier et de bétons dans des solutions bactériennes, puis pendant plusieurs jours dans un milieu nutritif particulier.

Les milieux nutritifs ont différentes compositions : chlorure de calcium, acétate de calcium, urée, milieu NB (Nutrient Broth). Le tableau 2.13 énumère les différents traitements testés [25].

Groupe	Sous-groupe	Composition des techniques conventionnelles ou composition de la solution nutritive	No	
Contrôle			0	
Revêtements de surface	Combinaison de système	Couche primaire en acrylique à base d'eau et revêtement	1	
		Siloxane, résine acrylique, à base de solvant	2	
		2 couche primaire (époxy, polyamine)	3	
	Acrylates	Copolymères de butadiène modifiés à base d'eau		
		Styrolacrylates	4	
		Dispersion d'acrylate transparent	5	
		Composant unique à base d'eau	6	
Produits d'étanchéité pénétrants	Silanes	Gel à base d'eau	8	
	Siloxanes	Composant unique à base de solvant	9	
		À base de solvant, 10 % siloxane-organométallique	10	
		Siloxanes oligomérique, résistant aux alcalis	11	
		Émulsion à base d'eau, oligomérique	12	
			Composant unique	13
	Silanes et	Gel à base d'eau	14	
	Siloxanes	Siloxanes/alkoxsilane	15	
	Silicones	Silicones	16	
	Polyuréthane	Base de polycarbonate aliphatique	17	
Traitements par biodéposition <sup>a</sup>		Urée, NB	18	
	Mélange de cultures	Urée, acétate de calcium	19	
		Urée, chlorure de calcium	20	
	uréolitiques	Urée, NB, acétate de calcium	21	
		Urée, NB, Chlorure de calcium	22	
			Urée, NB	23
	<i>B. sphaericus</i>	Urée, acétate de calcium	24	
		Urée, chlorure de calcium	25	
		Urée, NB, acétate de calcium	26	
		Urée, NB, Chlorure de calcium	27	

<sup>a</sup> Le milieu pour les essais de biodéposition a la composition suivante :

10 g/L d'urée, 10 g/L de milieu NB, 36 g/L de chlorure de calcium ou 51,25 g/L d'acétate de calcium

Tableau 2.13 Tableau des différents traitements appliqués. [25]

Les différents essais et mesures effectués sont : l'absorption capillaire, la perméabilité au gaz, la mesure de l'angle de contact, la mesure de la couleur, les observations au microscope électronique, les diffractions aux rayons X, la carbonatation accélérée, la migration accélérée aux ions chlorure et la résistance aux cycles de gel-dégel.

Sans rentrer dans les détails de ces tests, ils permettent néanmoins de conclure sur certains effets apportés par les bactéries et les produits classiques de traitement.

Les figures 2.26 et 2.27 illustrent respectivement l'absorption capillaire relative par rapport aux témoins et le coefficient de perméabilité à l'oxygène des échantillons traités. La déno-



mination "M" désigne le mélange de bactéries issues des boues des stations d'épuration, la dénomination "B" désigne la souche *B. sphaericus*.

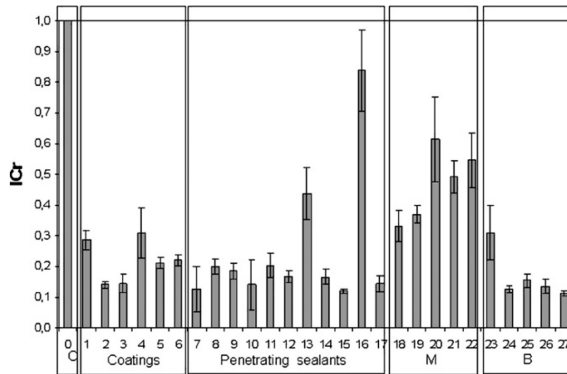


Figure 2.26 Absorption capillaire relative après les différents traitements de surface. [25]

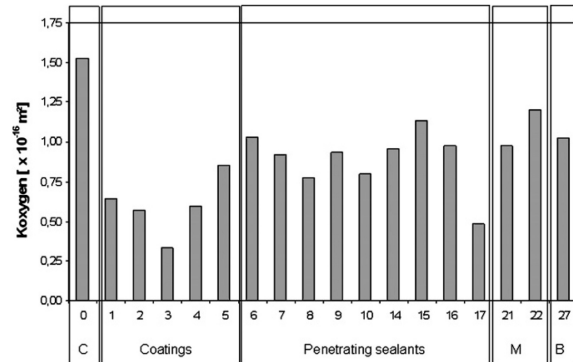


Figure 2.27 Perméabilités à l'oxygène. [25]

Les éprouvettes traitées par les bactéries présentent des résultats comparables aux traitements classiques. Un meilleur comportement est cependant observé pour les éprouvettes traitées avec la souche de *B. sphaericus* qu'avec le mélange issu des boues de récupération.

Il est clairement établi l'efficacité des bactéries comme traitement de surface, avec des résultats très compétitifs par rapport aux traitements classiques actuels. Les auteurs [25] ont montré que la présence de calcium dans le milieu nutritif ne paraît pas nécessaire pour obtenir une meilleure précipitation dans les fissures fraîches. Le calcium apporté par la pâte de ciment semble suffisant. La nature du précipité est du carbonate de calcium. Les observations au microscope électronique à balayage démontrent qu'il est sous forme de calcite. L'apport de chlorure de calcium semble modifier la morphologie des cristaux. En présence de chlorure de calcium et en l'absence de milieu nutritif, les cristaux de calcite sont de forme rhomboïdale (figure 2.28).

Les deux aspects critiques pour les traitements avec bactéries des surfaces relativement agressives comme le béton est la fixation des bactéries sur le support traité et l'accès aux nutriments. En ce sens, Wang et al. [128] ont utilisé l'Agar pour fixer les bactéries uréolytiques à la surface de pâte de ciment.

Le milieu de culture est semi-solide composé d'Agar (20 mg/mL), d'urée (300 mg/mL), de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1200 mg/mL) et de bactéries ( $2 \cdot 10^{10}$  cells/mL). La souche bactérienne n'est pas spécifiée.

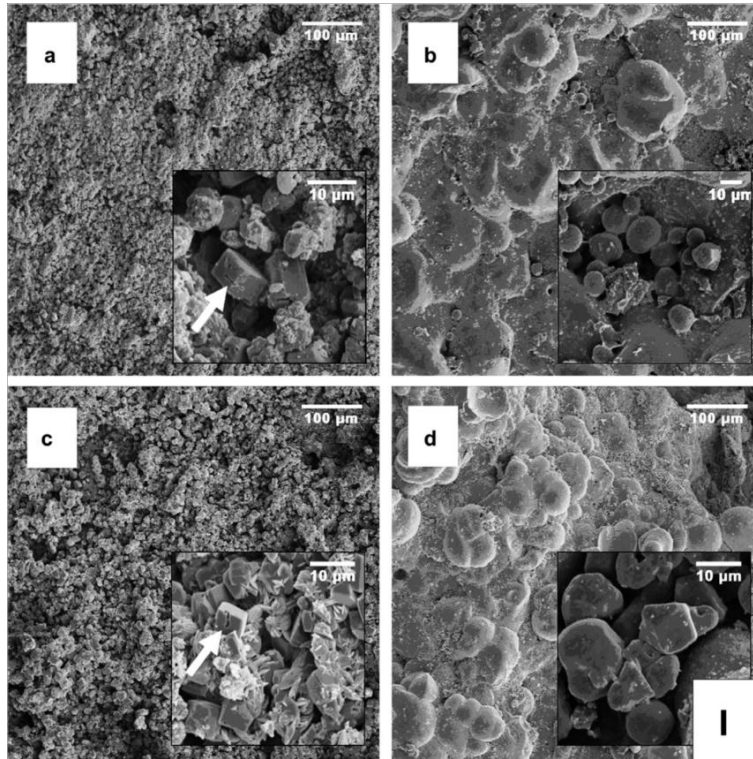


Figure 2.28 Observations au microscope électronique de la morphologie des cristaux de calcite exposés aux différents milieux : a) Avec  $\text{CaCl}_2$ , b) avec  $\text{CaCl}_2$  et des nutriments, c) Ca-Acétate, d) Ca-Acétate et nutriments. [25]

Différentes méthodes de traitement sont évaluées : l'alternance de couches de traitement, avec bactéries seules et avec le milieu semi-solide et l'application sur une surface horizontale ou verticale.

L'évaluation des traitements est faite par des tests d'absorption capillaire, des observations du biofilm au microscope optique, des observations au MEB et des analyses par DRX.

Il est observé la formation d'une couche de  $100 \mu\text{m}$  de calcite et une réduction de l'absorption capillaire de 15 %. Il est noté la nécessité pour les bactéries d'accéder à l' $\text{O}_2$  en plus des nutriments. L'Agar joue un rôle favorable dans l'immobilisation des nutriments et des précurseurs, et permet la création d'un micro-environnement favorable à la production et à l'action de l'uréase. Il est constaté une réduction de 16 % à 6 % d'absorption capillaire grâce à l'Agar. L'effet de la gravité n'est pas nul sur l'épaisseur de la couche de calcite formée dans le cas des parois verticales.

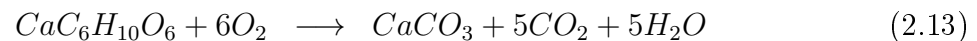
Cette solution technique semble prometteuse, l'Agar semble faciliter l'application et l'efficacité d'un traitement par les bactéries.

### 2.5.3 Bactéries incluses dans le matériau cimentaire

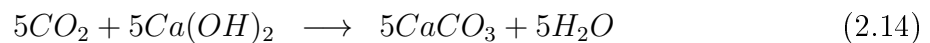
Plutôt que de devoir intervenir à postériori sur le béton, il est intéressant d'essayer de créer un matériau qui sera capable de se réparer seul. Dans cette idée, Jonker et al. [65] ont voulu évaluer l'influence des bactéries sur le béton en les incorporant directement dans le matériau cimentaire.

Leur étude utilise deux souches bactériennes différentes : *Bacillus pseudofirmus* et *Bacillus cohnii*, et les bétons en contiennent une proportion de 1 à  $10 \times 10^8$  spores par  $\text{cm}^3$ . Différents précurseurs sont ajoutés au béton, ils représentent 1 % du poids du ciment : extrait de levure, peptone, lactate de calcium, acétate de calcium.

Ces bactéries, par leur métabolisme, convertissent les composés en carbonate de calcium, comme dans le cas du lactate de calcium (équation (2.13)).



De plus, la présence de  $\text{CO}_2$  dans les produits formés par l'activité bactérienne permet la formation de carbonate de calcium à partir de la portlandite contenue dans le béton, comme le détaille l'équation (2.14).



La viabilité des bactéries dans le béton a été évaluée au cours du temps. La figure 2.29 montre qu'après 4 mois et demi les spores bactériennes viables ne sont plus présentes.

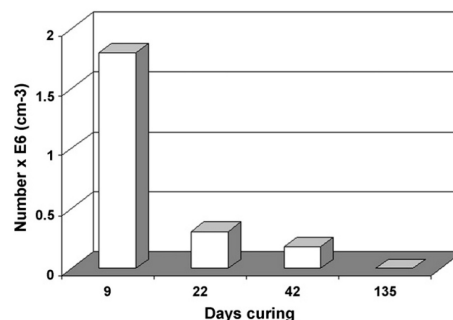


Figure 2.29 Estimation du nombre le plus probable de spores bactériennes viables dans le béton en fonction du temps. [65]

Les essais en compression du béton montrent une baisse de la résistance des bétons avec bactéries. Une baisse de la résistance en compression est aussi constatée pour les bétons contenant uniquement les précurseurs, à l'exception du lactate de calcium (Figure 2.30).

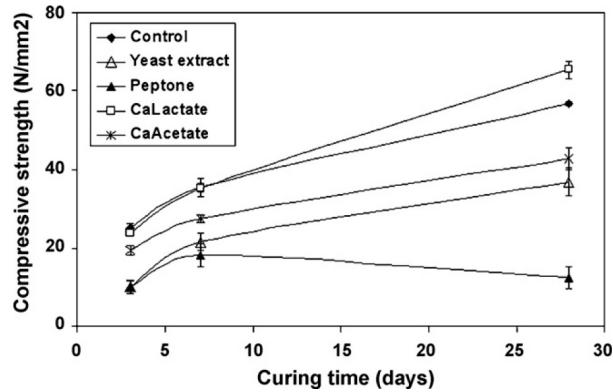


Figure 2.30 Résistance en compression en fonction du temps pour les bétons contenant les différents précurseurs, sans bactéries. [65]

Sur les bétons jeunes, la formation de  $\text{CaCO}_3$  due à un effet bactérien, est observée à la surface des éprouvettes. Mais, cet effet disparaît pour les bétons plus âgés. Il est important de noter l'impact des précurseurs, défavorables pour la plupart et favorables dans le cas du lactate de calcium.

Pour pallier au haut taux de mortalité des bactéries, les études postérieures proposées par Jonker et al. envisagent l'encapsulation des spores bactériennes. D'autres auteurs ont incorporé directement les bactéries dans les éprouvettes, [41, 75]. Ghosh et al. [41] ont isolé d'une source chaude d'Inde une souche bactérienne feroréductrice proche du genre *Shewanella*, cette étude utilise également *Escherichia coli* pour comparaison. Lee et al. [75] ont isolé *Bhargavaea cecembensis* d'une grotte en Corée.

Les deux études comparent l'influence de différentes concentrations en bactéries incorporées dans les éprouvettes de béton sur la porosité et la résistance en compression. Lee et al. [75] s'intéressent également au taux d'hydratation du ciment. Les deux études, malgré l'utilisation de souches différentes, obtiennent la même concentration optimale de  $1.10^5$  bactéries par mL pour les différents tests effectués. Un effet favorable est néanmoins constaté avec les autres concentrations utilisées,  $1.10^3$ ,  $1.10^7$  et  $1.10^{10}$  pour Lee et al [75]. La présence de *Shewanella* et d'*Escherichia coli* dans les mortiers se traduit par une réduction de la porosité avec la formation dans les pores de structure en aiguilles. À la différence de *Shewanella*, *Escherichia coli* n'offre pas de gains de résistance en compression par rapport aux témoins sans bactéries.

Il est intéressant de constater que, dans l'étude de Lee et al. [75], la présence de bactéries dans la pâte de ciment semble accélérer l'hydratation du ciment.

Dans l'étude de Ghosh et al. [41], il n'est pas mentionné la composition du milieu de culture de *Shewanella*, comme il n'est pas précisé si ce milieu de culture se retrouve en partie dans les mortiers. Dans l'étude de Lee et al. [75], les bactéries sont rincées dans de l'eau distillée avant d'être ajoutées dans les éprouvettes.

Xu et Yao [132] ont évalué l'efficacité d'une solution d'autocicatrisation, consistant à inclure dans la matrice cimentaire les bactéries, du genre *Bacillus*, les nutriments et les sources de calcium. Cette stratégie est comparée à une approche par cicatrisation extérieure consistant à immerger des éprouvettes fissurés dans des solution de réparation. Une autre spécificité de l'étude de Xu et Yao [132] est d'évaluer les différentes approches de cicatrisation par des essais mécaniques à une échelle macroscopique (essais en flexion 4 points, mesures par ultrasons) et à une échelle nanoscopique par nano-indentation.

Les différentes conditions de traitement et la composition des éprouvettes sont détaillées dans le tableau 2.14. Le milieu L-Ca ( $\text{CaC}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$ ) est composé de 0,1 mol/L de lactate de calcium, le milieu G-Ca est composé de 0,1 mol/L de glutamate de calcium ( $\text{CaC}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ). Dans les deux cas, les sources de carbone nutritionnel et d'azote sont apportées par 1 g/L d'extrait de levure. Dans les mortiers, la concentration en L-Ca et G-Ca correspond à 1 % de la masse de ciment, l'extrait de levure à 0,055 %. La concentration en cellules bactériennes, dans les milieux ou dans les mortiers, est de  $10^7$  bactéries par  $\text{cm}^3$  de mortier ou de milieu.

Séries	Numéro	Composition	Conditions de cicatrisation
Contrôles	1	Sans agents cicatrisant	dans l'eau
Nutriments seuls et cicatrisation externe	2	Sans agents cicatrisant	dans le milieu L-Ca
	3	Sans agents cicatrisant	dans le milieu G-Ca
Biocicatrisation externe	4	Sans agents cicatrisant	dans le milieu L-Ca + bactéries
	5	Sans agents cicatrisant	dans le milieu G-Ca + bactéries
Nutriments seuls et autocicatrisation	6	L-Ca	dans l'eau
	7	G-Ca	dans l'eau
Autocicatrisation avec bactéries et nutrimens	8	L-Ca + bactéries	dans l'eau
	9	G-Ca + bactéries	dans l'eau

Tableau 2.14 Présentation des différents traitements de cicatrisation [132]

Les fissures créées à 28 jours par flexion 4 points sont de largeur comprise entre 0,1 et 0,4 mm. L'incubation dans les différents milieux dure 30 jours. Les mesures de vitesses ultrasonores permettent d'estimer le degré d'endommagement (D) ainsi que le taux de cicatrisation (H). Les essais de flexions 4 points permettent d'estimer le recouvrement de la résistance flexionnelle ( $R_r$ ) et du module d'élasticité ( $M_r$ ).

Les essais mécaniques présentés en figure 2.31 montrent que le meilleur taux de cicatrisation est obtenu avec les traitements externes, par immersions dans les solution L-Ca et G-Ca avec bactéries, suivis par le traitement interne, avec inclusion dans les mortiers de bactéries et de milieu G-Ca.

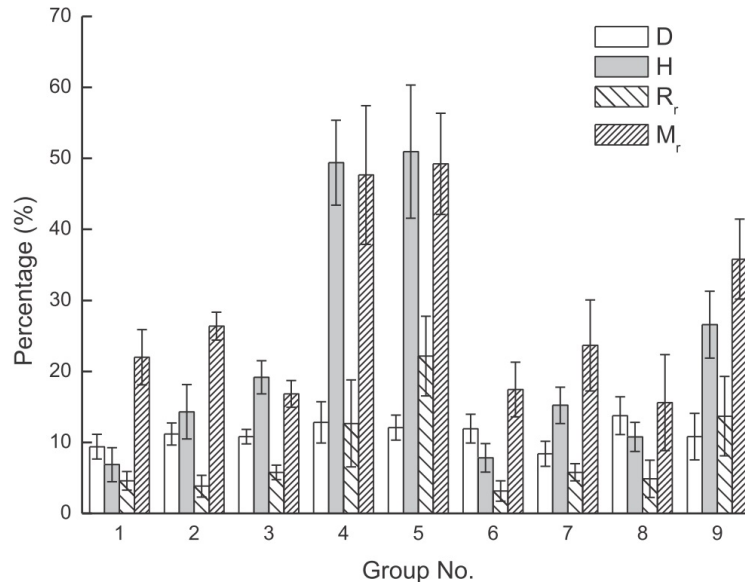


Figure 2.31 Résultats des essais mécaniques pour les différents traitements. Avec : (D) degré d'endommagement, (H) taux de cicatrisation, (R<sub>r</sub>) résistance flexionnelle et (M<sub>r</sub>) module d'élasticité. [132]

La nanoindentation prouve par les mesure de dureté et du module d'Young que la couche de précipités possède de meilleures caractéristiques mécaniques que la matrice cimentaire. Avec le milieu G-Ca, la zone de transition entre la matrice cimentaire et la couche de précipités est mécaniquement plus performante que la matrice cimentaire ou que la couche de précipité elle-même. En revanche, avec le milieu L-Ca la dureté et le module d'Young sont plus faibles dans la zone de transition. L'étude suggère donc que le milieu G-Ca permet de constituer un lien solide entre la couche de produit de cicatrisation et le matériau traité.

## 2.5.4 Biotraitements inertes dans le matériau cimentaire

### Utilisation d'enzyme dans le matériau cimentaire

Les travaux de M. Biswas [10] et B. Chattopadhyay [18] sont innovants à plus d'un titre, dans l'obtention de la souche bactérienne et dans l'utilisation de protéine. La souche bactérienne utilisée est issue de sources chaudes (65°C) du Bengale-Occidental. L'analyse phylogénétique la place proche de la souche *Thermoanaerobactor* sp.

L'étude menée peut se décomposer en deux parties.

La première partie observe, sur les échantillons de mortier, l'influence de l'inclusion des bactéries ou du milieu de culture. Sept types de cubes de mortier sont évalués :

- Type 1 : échantillons de contrôle
- Types 2, 3 et 4 : échantillons avec respectivement  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  cellules bactériennes par mL d'eau
- Type 5 : échantillons avec le milieu de croissance après 8 jours de culture, centrifugé pour éliminer les bactéries
- Type 6 : échantillons avec le milieu de croissance après 8 jours de culture, puis autoclavé
- Type 7 : échantillons avec le milieu de croissance

Les échantillons de contrôle ont un rapport E/C de 0,4 et un rapport ciment/sable de  $\frac{1}{3}$ .

Les échantillons de types 2, 3 et 4 contenant des cellules bactériennes sont obtenus en mélangeant à l'eau de gâchage les bactéries à la concentration souhaitée.

Pour le type 5, le milieu de croissance, après 8 jours d'incubation, subit une centrifugation pour éliminer les cellules bactériennes. Il est alors utilisé en remplacement de l'eau de gâchage pour fabriquer les mortiers.

Les échantillons de type 6 sont fabriqués en incorporant le milieu de croissance avec les bactéries, stérilisé par autoclavage après 8 jours d'incubation. À la différence des échantillons du type précédent, il y a donc la présence de bactéries mortes.

Le mortier de type 7 est obtenu en utilisant le milieu de culture pur, sans qu'il n'ait jamais accueilli de bactéries.

B. Chattopadhyay [18] montre que l'ajout des bactéries modifie le gel de C-S-H. Les analyses à l'EPMA<sup>2</sup> du gel de C-S-H en différents points de la matrice cimentaire révèlent que la présence de cellules bactériennes altère le rapport  $\text{CaO/SiO}_2$  (C/S) du C-S-H. Il y a une répartition plus homogène des oxydes de silice, et à l'inverse, la distribution des oxydes de calcium est plus hétérogène.

Le tableau 2.15 regroupe les résistances en compression des différents types de mortier.

L'inclusion des bactéries est clairement favorable aux mortiers.

---

<sup>2</sup>microsonde de Castaing (electron probe microanalyser, EPMA)

---

Éprouvette	Résistance en compression (Mpa)	% d'augmentation vs contrôle
Contrôle	42,17 (1,36)	-
10 <sup>4</sup> cellules par mL d'eau	49,99 (1,85)	18,54
10 <sup>5</sup> cellules par mL d'eau	58,18 (1,20)	25,23
10 <sup>6</sup> cellules par mL d'eau	48,38 (2,65)	14,72
Milieu de croissance après 8 jours de culture	53,44 (2,50)	26,73
Milieu de croissance autoclavé après 8 jours de culture	42,11 (1,66)	-
Milieu de croissance	41,98 (2,21)	-

Les valeurs sont les moyennes et l'écart type est noté entre parenthèses, N=12

Toutes les valeurs sont statistiquement significatives à P<0,05

Tableau 2.15 Résistances en compression des différents mortiers incorporant des bactéries. [10]

Cependant, il semble que la concentration optimale soit de 10<sup>5</sup> cellules par mL (confirmée par les analyses statistiques sur les résistances en compression). Le moins bon comportement en résistance pour les échantillons à 10<sup>6</sup> cellules par mL est relié par les auteurs au changement observé dans le C-S-H. Les lignes de tendances observées sur les analyses à l'EDMA semblent montrer un abrupt changement entre les éprouvettes à 10<sup>6</sup> cellules par mL et les autres.

L'ajout du milieu bactérien dans la composition des mortiers, sans qu'il y ait la présence de cellules bactériennes, conduit à une surprenante amélioration de la résistance en compression.

En utilisant la technique de SDS-PAGE<sup>3</sup> utilisée pour séparer les protéines, il apparaît que les bactéries sécrètent dans le milieu de culture une enzyme proche de la silicase.

Ainsi, la deuxième partie de l'étude porte sur l'effet de l'enzyme sur les matrices cimentaires. La protéine extraite du milieu de culture et purifiée est mélangée au ciment dans différentes proportions, allant de  $\frac{1}{1}$  à  $\frac{1}{10}$   $\mu\text{g}$  de protéines par gramme de ciment. Pour évaluer l'action enzymatique et pas seulement l'effet chimique de l'ajout des protéines, il est également incorporé des protéines dénaturées.

La figure 2.32 présente les résistances en compression obtenues sur les petits cubes de mortiers de 10 mm × 10 mm × 10 mm.

La protéine relâche la silice des matériaux cimentaires et forme avec les différents oxydes de la gehlénite, Ca<sub>2</sub>Al[AlSiO<sub>7</sub>], qui va boucher les micropores et ainsi augmenter la résistance et la durabilité du matériau.

<sup>3</sup>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium



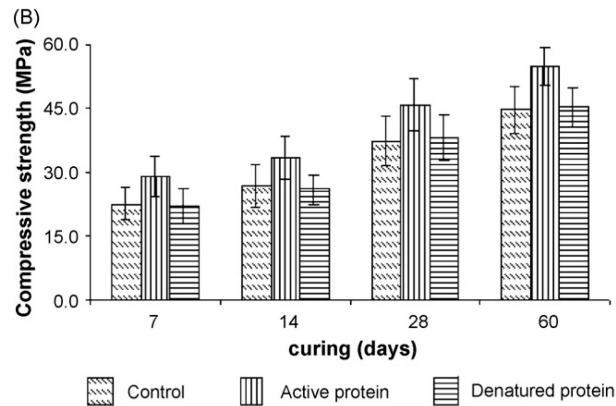


Figure 2.32 Résistances en compression des différents mortiers incorporant des protéines. [10]

Il est probable que c'est également le rôle de l'enzyme dans le mécanisme de silicication qui explique les modifications du le gel de C-S-H.

### Utilisation des cellules bactériennes mortes

Ramachandran et al. [94] ont comparé l'effet de l'inclusion dans le matériau cimentaire de bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *S. pasteurii*, vivantes et mortes. L'étude s'attache aussi à évaluer le traitement de fissures de différentes profondeurs avec du sable et un milieu contenant *S. pasteurii*. *P. aeruginosa* a été choisi pour sa capacité à accumuler les exopolysaccharides (EPS), (voir la section 2.4.1 sur les biofilms).

Les bactéries sont incluses dans le matériau cimentaire avec une solution saline de NaCl ou une solution tampon de phosphate de sodium. Les échantillons sont ensuite curés dans une solution d'urée et de CaCl<sub>2</sub>. Il est noté que même sans bactéries, la solution saline et la solution tampon ont un léger effet sur les résistances en compression, respectivement négatif et positif. De même, l'immersion dans la solution d'urée et de CaCl<sub>2</sub> a un effet favorable sur la résistance en compression, même sans bactéries. Le chlorure de calcium est connu pour être un accélérateur de prise.

Il ressort néanmoins un effet favorable pour des concentrations à  $7 \cdot 10^3$  bactéries par mL, mortes et vivantes sur les résistances en compression, surtout à 7 jours. Au-delà, l'augmentation des concentrations en cellules bactériennes est délétère. Les améliorations sont moins fortes à 28 jours et une baisse des résistances en compression est même constatée pour les bactéries mortes. Les observations au microscope électronique montrent une faible formation de carbonate de calcium. L'amélioration des résistances en compression semble donc essentiellement due à la biomasse qui agirait comme des fibres organiques, mais permettrait aussi de réduire la porosité. Du fait de la diminution de la porosité des

mortiers entre 7 et 28 jours, les bactéries vivantes finissent par manquer de nutriments et d'oxygène, ce qui expliquerait la diminution des performances avec le temps. Une baisse serait même attendue. La diminution à 28 jours observée avec les bactéries mortes semble suggérer que les cellules mortes se désintègreraient avec le temps.

En revanche, la formation de carbonate de calcium a été constatée dans les fissures traitées avec du sable et un milieu contenant *S. pasteurii*. Cette formation de carbonate de calcium permet une amélioration des résistances des mortiers fissurés. Le traitement semble avoir d'autant plus d'impact que la fissure est profonde.

### Utilisation des parois cellulaires

Pei et al. [89] ont utilisé les parois cellulaires des bactéries comme ajout dans les mortiers. Trois souches bactériennes ont été sélectionnées : *Bacillus subtilis*, et comme contrôle *Myxococcus luteus* bactérie Gram-positif et *E. coli* bactérie Gram-négative.

Les essais évaluent la résistance en compression, la porosité, la quantité de  $\text{CaCO}_3$  dans les mortiers. Un essai de précipitation de  $\text{CaCO}_3$  in vitro, dans des milieux contenant  $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a été réalisé pour voir un éventuel effet des bactéries Gram + ou Gram -.

Les parois bactériennes sont obtenues en suivant le protocole suivant :

- Les bactéries congelées sont broyées dans un mortier avec un volume égal d'alumine pendant 15 minutes ;
- Les cellules brisées ont été recueillies par l'ajout d'une solution saline physiologique ;
- Les centrifugations successives permettent de séparer les parois cellulaires, le cytosol, les cellules non broyées et l'alumine utilisée pour le broyage.

Grâce aux parois bactériennes, il a été constaté une augmentation de la résistance en compression, une diminution de la porosité et la formation de carbonate de calcium dans les mortiers. Il n'y a pas d'augmentation de résistance avec les cellules vivantes. Il s'agit cependant de ne pas généraliser à toutes les souches bactériennes. La littérature mentionne des cas contraires avec d'autres souches. Il a été constaté la diminution de la résistance en compression avec les cellules mortes. Une explication possible est que la charge négative des protéines et des polysaccharides des cellules bactériennes à pH élevé interfèreraient avec les charges négatives des parois cellulaires sur la nucléation du  $\text{CaCO}_3$ . Ainsi, l'utilisation de la paroi bactérienne seule permet un meilleur traitement du matériau qu'avec les bactéries entières, vivantes ou, à fortiori, mortes.

---

Les essais in vitro n'indiquent pas de différences de précipitation entre les bactéries Gram + ou Gram -.

### 2.5.5 Influence de la composition du matériau

V. Achal et al. [3] dans leurs travaux ont incorporé dans leurs éprouvettes de mortier et de béton la bactérie *Bacillus megaterium*, bactérie capable d'hydrolyser l'urée. L'originalité de l'étude réside dans l'incorporation de cendres volantes en plus des bactéries.

Le milieu de culture bactérienne contenant des nutriments et de l'urée, incorporé dans les bétons et les mortiers amène à  $5 \times 10^5$  CFU/mL (Colony-Forming Unit, Unité Formant Colonie<sup>4</sup>).

Le taux de remplacement du ciment par les cendres volantes issues d'une centrale thermique locale varie de 10, 20 et 40 %.

La viabilité des bactéries dans le béton (notés C) et les mortiers (notés M) est présentée en figure 2.33, pour différents taux de remplacement en cendres volantes. Si le nombre de bactéries vivantes diminue avec le temps, l'augmentation du taux de remplacement par des cendres volantes semble avoir un léger effet favorable.

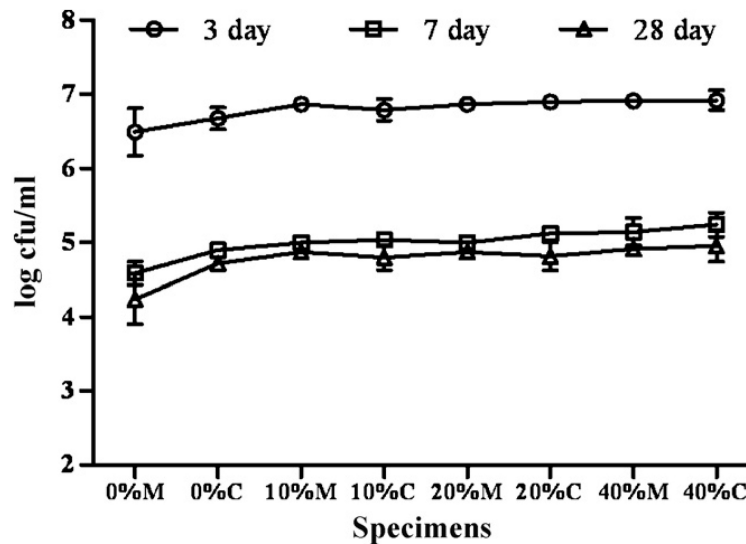


Figure 2.33 Taux de survie de *B. megaterium* dans le temps, en fonction du taux de remplacement en cendre volante dans les mortiers (M) et les bétons (C) [3]

<sup>4</sup>Il s'agit de compter le nombre de colonies bactériennes, formant des monticules visibles de formes particulières, et non le nombre direct de bactéries.

Les résultats des tests d'absorption d'eau sont en figure 2.34. Le graphique a) représente les éprouvettes sans bactéries, b) avec bactéries. Pour les bétons jeunes, l'effet bactérien est clairement visible, bien moins d'eau est absorbée par les échantillons comparativement aux échantillons de contrôle.

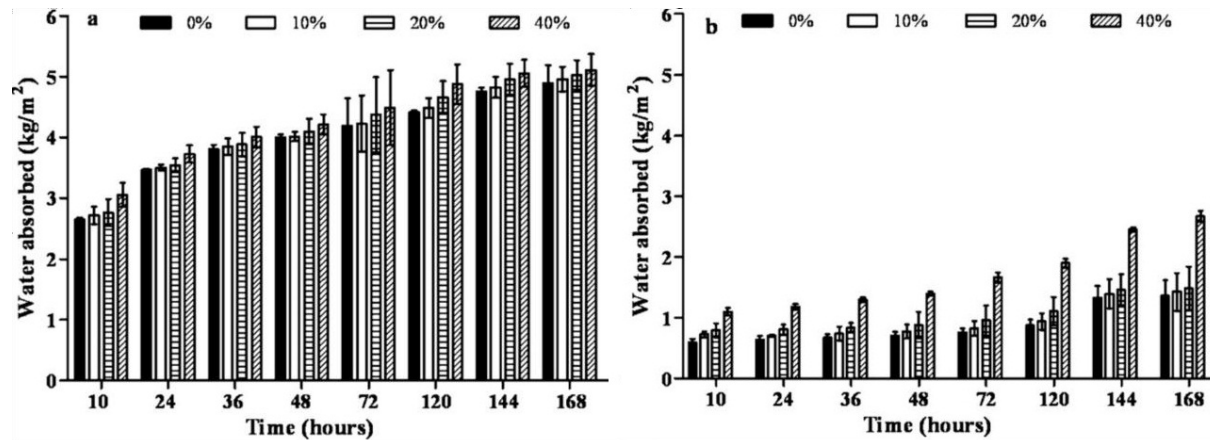


Figure 2.34 Eau absorbée dans les différents échantillons contenant différents taux de remplacement en cendre volantes en fonction du temps. Graphique a : sans bactéries. Graphiques b : avec bactéries [3]

La présence des bactéries augmente également les résistances en compression, quel que soit le taux de remplacement en cendres volantes.

Les cendres volantes avec les bactéries semblent apporter de meilleures performances aux matériaux traités. Néanmoins, la durée des observations ne s'étend pas au-delà de 28 jours. L'effet des cendres volantes et des bactéries à plus long terme aurait pu être intéressant. En effet, d'autres études mentionnent l'effet positif des cendres volantes sur la cicatrisation autogène des bétons pour des âges avancés [117].

## 2.5.6 Biotraitement avec capsules et système vasculaire

V. Wiktor et H.M. Jonker [130] proposent d'inclure les bactéries directement dans la matrice cimentaire via des billes d'argile expansée. Ces dernières ont été immergées dans une solution de lactate de calcium (80 g/L) et d'extrait de levure (1 g/L) puis dans une solution avec les spores bactériennes ( $1,7 \cdot 10^5$  spores par gramme de bille). La souche bactérienne a été prélevée dans un lac alcalin en Égypte, elle est proche de *Bacillus alkalinitrilicus*.

Le tableau 2.16 présente la composition des bétons.

Les éprouvettes sont fissurées par une traction contrôlée de la barre d'armature centrale. Puis, les éprouvettes sont stockées en immersion dans l'eau.

Ingrédients	Poids (g)
Ciment	384
Eau	192
Granulats fins (0,125-1 mm)	929
Billes d'argiles expansées (1-4 mm)	292

Tableau 2.16 Tableau de composition des bétons autocicatrisants. [130]

En observant l'évolution de l'ouverture des fissures obtenues, il a été possible d'établir le pourcentage de cicatrisation au cours du temps (Figure 2.35). Il a été comptabilisé le nombre de fissures complètement rebouchées, en considérant deux ordres de grandeur : les fissures de moins de 0,18 mm et les fissures de plus de 0,18 mm.

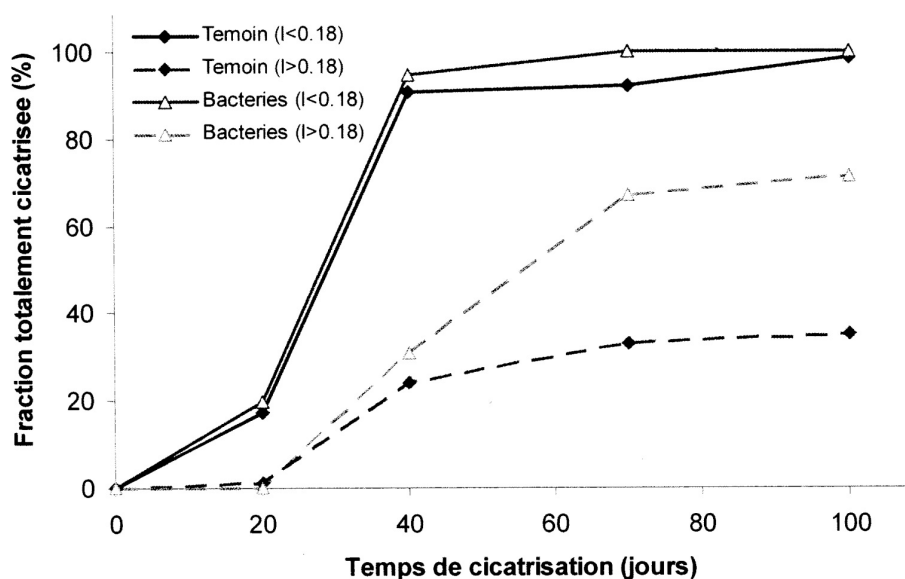


Figure 2.35 Pourcentage de fissures totalement cicatrisées, pour deux catégories d'ouverture de fissures ( $>$  ou  $<$  à 0,18 mm), avec bactéries et sans bactéries (Témoins). [130]

Il est intéressant de constater que pour les petites fissures, l'autocicatrisation du béton sans bactéries est aussi efficace que la cicatrisation avec bactérie. Cependant, pour les fissures plus grandes, le traitement bactérien est clairement plus efficace. Les résultats de la porosité au mercure confirment cette tendance. L'utilisation de billes d'argile a joué le rôle de protection attendu puisqu'après 9 mois une activité bactérienne est encore décelée.

M.G. Sierra-Beltran, H.M. Jonker et E. Schlangen [108] ont poursuivi les travaux précédents [130] en remplaçant les billes d'argile expansée par les granulats légers et en intégrant à la composition des mortiers des laitiers de haut fourneau, des cendres volantes et des fillers calcaires. La souche bactérienne est apparenté à *B. cohnii*. Ces mortiers seraient

utilisés comme mortier de réparation pour du béton et leur confèreraient un potentiel d'autocicatrisation grâce aux bactéries.

Les granulats légers sont imprégnés dans une solution de lactate de calcium (150 g/L) et d'extrait de levure (7,5 g/L) puis dans une solution contenant des spores bactériennes. Au final, les particules de granulats légers contiennent 15 % en masse de lactate de calcium et  $1,2 \cdot 10^7$  spores bactériennes par gramme de particules. Leur taille varie entre 0,25 et 2 mm.

La composition des différents mortiers est détaillée dans le tableau 2.17.

	Mélange 1 Contrôle	Mélange 1 Bactéries	Mélange 2 Contrôle	Mélange 2 Bactéries
Ciment	493	461	440	405
Laitier de haut fourneaux	-	-	131	121
Cendres volantes	592	553	558	516
Filler calcaire	394	267	-	-
Sable	-	-	440	308
Granulats légers	-	101	-	97
Eau	414	385	379	364
Super plastifiant	7	16	7	16
Fibre (PVA)	26	26	26	26
Eau/Liant	0,38	0,38	0,34	0,35

Tableau 2.17 Composition des différents mortiers de l'étude de Sierra-Beltran et al. [108]

Les essais de flexion tendent à montrer un léger recouvrement des résistances mécaniques pour les échantillons avec bactéries après 56 jours de cure. Surtout, l'étude montrent que les mortiers utilisés remplissent les critères pour constituer un matériau de réparation structural. Les résistance en compression, l'adhérence des mortiers sur un béton support et leur résistance à la délamination due au retrait empêché permettent leur utilisation en respectant les normes en vigueur.

Stuckrath et al. [114] ont repris la technique d'autocicatrisation biologique avec l'inclusion de granulats légers imprégnés. Les essais menés cherchent à mesurer un effet de la source de calcium seule, le lactate de calcium, sur l'autocicatrisation. Les effets du superplastifiant et de l'entraineur d'air sont également évalués. La souche bactérienne est *B. pseudofirmus*. Le traitement d'images permet de suivre le processus de cicatrisation au cours du temps. L'analyse statistique révèle que c'est l'agent chimique, le lactate de calcium, qui contribue principalement à la cicatrisation des éprouvettes. Cependant, les bactéries permettent de promouvoir la formation de cristaux de calcite plus grands et plus stables.

Wang et al. [125, 126] ont développé deux approches pour encapsuler leur traitement bactérien : une encapsulation dans des microcapsules à base de mélamine et une encapsulation dans des microfibrilles en hydrogel. Le traitement bactérien lui-même utilise la souche *B. sphaericus*, bactérie uréolytique capable de décomposer l'urée en nitrate. Les "bio-réactifs" utilisés sont l'extrait de levure qui constitue le nutriment, l'urée et le nitrate de calcium qui constituent les précurseurs de précipitation. Cette souche bactérienne et ces précurseurs ont déjà été utilisés dans d'autres études de ce même laboratoire [27, 123].

Les deux modes d'encapsulation préservent la viabilité des bactéries et permettent de conférer aux bétons qui les contiennent une capacité de s'autocicatriser. Des fissures jusqu'à 0,5 mm d'ouverture peuvent se refermer avec l'utilisation des feuillets d'hydrogel. Les microcapsules, qu'en à elles, offrent un potentiel de cicatrisation pour des fissures jusqu'à 950  $\mu\text{m}$ .

D'autres chercheurs comme Sangadji et al. [105] développent un système poreux pour apporter le traitement bactérien à l'endroit de la fissure. Les premiers résultats montrent un recouvrement des capacités en flexion de l'éprouvette testée. Néanmoins, la complexité et la quantité de la solution de traitement pourraient être un frein au développement d'une telle solution.

## 2.6 Conclusion de l'état de l'art

La première partie de l'état de l'art a permis de comprendre l'autocicatrisation naturelle, mais il y est aussi exposé les différentes approches et techniques développées pour l'évaluation de ce phénomène. Ces techniques sont par ailleurs réutilisées par différents auteurs pour l'évaluation des processus de biocicatrisation sur matériaux cimentaires.

La deuxième partie de ce chapitre présente les solutions techniques envisagées pour améliorer l'autocicatrisation naturelle. Certaines voies envisagées reposent sur les mêmes principes que l'autocicatrisation naturelle en favorisant la formation de calcite ou de C-S-H pour colmater les fissures. D'autres voies explorent des systèmes radicalement différents : utilisation de polymères ou de matériaux à mémoire de forme. Si certaines approches paraissent prometteuses, aucune n'est efficace à 100% et toutes relèvent des limites et des inconvénients.

Ainsi la troisième partie de cet état de l'art présente la biocicatrisation et les différents processus bactériens qui favorisent, directement ou indirectement, la cicatrisation des fissures. Les bactéries peuvent contribuer directement à la fermeture des fissures en produi-

---

sant les enzymes ou les réactifs nécessaires à la formation de produits de cicatrisation. Elles peuvent aussi indirectement agir sur les mécanismes de précipitation par l'influence de leur  $\zeta$ -potentiel ou par la formation de biofilms. La biocicatrisation offre un large éventail de possibilité mais présente également une grande complexité par les nombreux mécanismes possibles et les nombreux paramètres d'influences tels que la température, le pH ou la composition ionique du milieu.

La quatrième et dernière partie de ce chapitre passe en revue les solutions mises en œuvre dans le cadre de la biocicatrisation des matériaux cimentaires. Les objectifs des techniques de biocicatrisation développées sont essentiellement regroupés en trois catégories :

- Traitement de surface des matériaux,
- Réparation des fissures applicable après la fissuration,
- Capacité d'autocicatrisation au matériau.

De ces objectifs découlent différentes approches et modes de traitements. L'immersion ou l'imprégnation des matériaux dans des solutions bactériennes peut constituer un traitement de surface ou de réparation des fissures. D'autres auteurs choisissent d'injecter les solutions bactériennes directement dans les fissures. Les techniques visant à conférer une capacité d'autocicatrisation au matériau via les bactéries nécessitent d'inclure la solution de traitement au sein même du matériau.

Cette diversité dans les objectifs fixés et les techniques utilisées rend difficile la comparaison de l'efficacité des traitements. Notamment, les compositions des milieux de culture sont très diversifiées sans explication quant au choix fait.

De façon générale les études sur la biocicatrisation ne tiennent que rarement compte du phénomène de l'autocicatrisation naturelle et de ses interactions possibles avec le traitement bactérien.

Le mode de fissuration est une autre limite constatée dans l'ensemble des études. La plupart des fissures étudiées sont réparties en deux catégories : artificielles, afin de pouvoir maîtriser leurs ouvertures ou réalistes, mais dont l'ouverture n'est pas maîtrisée. Pourtant il est clair que le réalisme et la maîtrise de l'ouverture des fissures influencent tous les processus de cicatrisation qui peuvent toucher les matériaux cimentaires. De plus, la surface interne des fissures étudiées n'est pas carbonatée. Ce paramètre peut avoir un rôle particulièrement important du fait des interactions chimiques possibles entre la pâte de ciment et le milieu de culture bactérien, notamment avec l'effet du pH. Les fissures sur un ouvrage de génie civil sont carbonatées à cause de l'exposition des structures à l'environnement extérieur.

---



La conception d'un traitement bactérien réaliste pour une application réelle doit prendre en compte l'état de carbonatation des fissures.

C'est riches de toutes ces informations et conscient des lacunes existantes que s'est définie la démarche expérimentale de cette thèse.

---



# CHAPITRE 3

## Objectifs de la thèse et démarche expérimentale

### 3.1 Problématique

La biocicatrisation est le processus par lequel les fissures présentes dans le matériau se referment grâce à l'influence, directe ou indirecte, des bactéries. La biocicatrisation est un phénomène complexe qui peut reposer sur des mécanismes très variés. Le principal phénomène de biocicatrisation dans les matériaux cimentaires décrit dans la littérature, repose sur la formation de carbonate de calcium provoquée par l'activité bactérienne. Les souches bactériennes, les métabolismes à l'œuvre, les modes de traitement sont nombreux pour parvenir à une solution de réparation. Néanmoins, il est possible de résumer les interactions du système de biocicatrisation en quatre éléments :

- Le matériau, avec sa composition, la morphologie de ses fissures ;
- L'environnement, avec la température, l'humidité,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  ;
- Les bactéries, avec leur physiologie, leur métabolisme, leur cinétique de croissance ;
- Le milieu de culture, avec les nutriments pour assurer l'activité bactérienne et les précurseurs apportant les réactifs pour produire le carbonate de calcium.

Ces quatre éléments interagissent et ont une influence sur le processus de biocicatrisation (figure 3.1).

Le matériau, par sa chimie, son pH, sa rugosité et par la géométrie de ses fissures influence l'action des bactéries et les équilibres chimiques du milieu de culture.

L'environnement, via la température, l'humidité, le  $\text{CO}_2$  atmosphérique, influence le matériau, avec notamment le phénomène d'autocicatrisation naturelle. La température et l'accès à l'oxygène influencent également fortement la cinétique de croissance des bactéries.

Le milieu de culture interagit avec les bactéries en leur apportant les nutriments nécessaires à leur croissance. Les précurseurs de précipitation du milieu de culture apportent le calcium

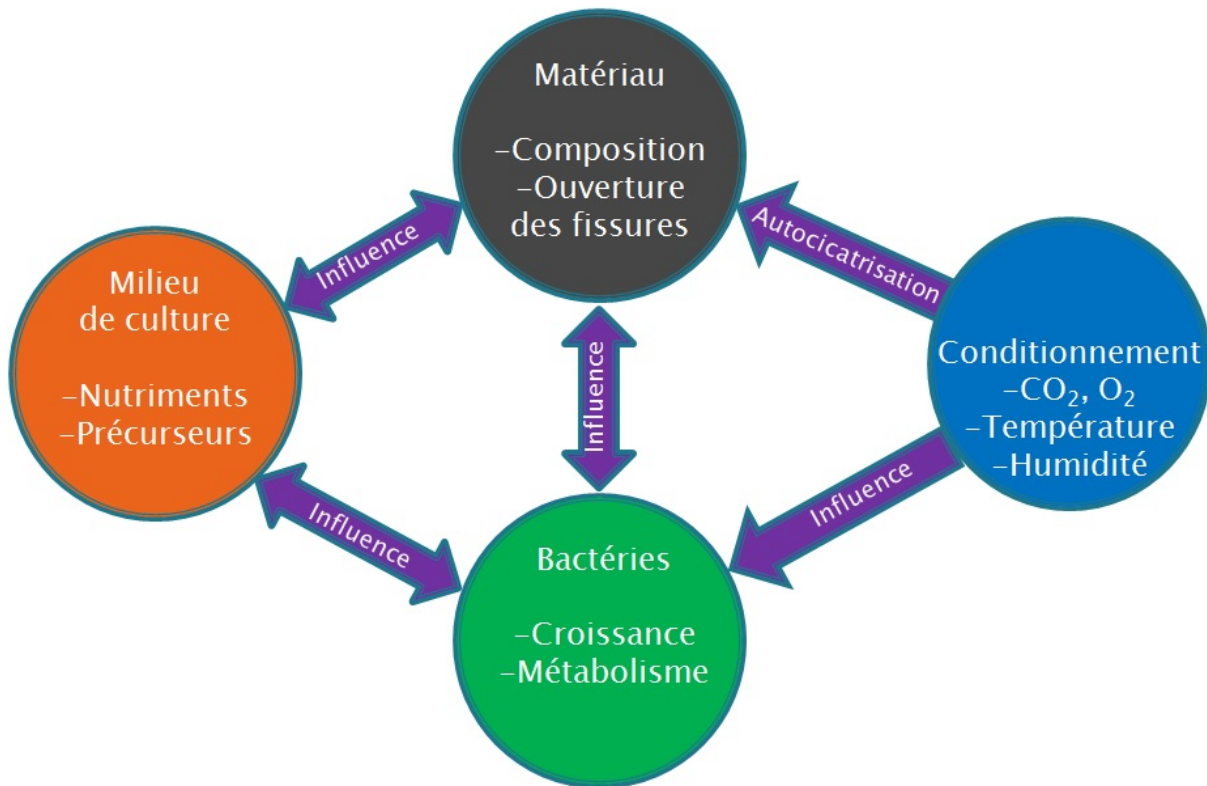


Figure 3.1 Facteurs d'influences du processus de biocicatrisation.

et les carbonates, qui constituent les réactifs nécessaires à la formation de carbonate de calcium. Ces précurseurs influencent l'activité bactérienne mais également le matériau cimentaire. Le milieu de culture peut réagir chimiquement avec le matériau, en produisant notamment des précipités.

Les bactéries, par leurs métabolismes et leurs physiologies, consomment les composés du milieu de culture. Elles se fixent et modifient le matériau cimentaire, notamment en favorisant la précipitation de carbonate de calcium dans les fissures.

La compréhension du mécanisme et surtout la difficile tâche de dissociation des différents paramètres d'influence ouvrent encore le champ à de nombreuses études.

Ainsi, se définit la problématique de cette étude :

**Comment identifier les rôles spécifiques du matériau, de l'environnement, du milieu de croissance et des bactéries dans la biocicatrisation des matériaux cimentaires, afin de les faire agir en synergie ?**

## 3.2 Objectifs de l'étude

L'approche retenue dans ce projet de recherche consiste à étudier un traitement de biocicatrisation post-fissuration. La solution de réparation envisagée consiste en une imprégnation des fissures existantes par une suspension bactérienne. Cette démarche se distingue d'autres approches possibles explorées par d'autres auteurs [41, 65, 75, 130], comme l'incorporation de bactéries dans le matériau au moment de sa fabrication.

L'objectif principal de cette recherche est de mieux comprendre les mécanismes de la biocicatrisation des matériaux cimentaires qui s'ajoutent au phénomène de l'autocicatrisation naturelle, et ainsi pouvoir accélérer la cinétique et maximiser l'efficacité du colmatage des fissures relativement importantes ( $> 200 \mu\text{m}$ ). Cette efficacité sera estimée à partir de la mesure de la perméabilité à l'air de mortiers fissurés. Le même dispositif sera utilisé dans les essais d'autocicatrisation naturelle et dans les essais de biocicatrisation.

Il découle donc de l'objectif principal des objectifs spécifiques :

1. Évaluer l'autocicatrisation naturelle des mortiers testés ;
2. Évaluer la cicatrisation de ces mêmes mortiers en présence de solutions contenant des précurseurs de précipitation et en présence des milieux de culture stériles ;
3. Évaluer la biocicatrisation de ces mêmes mortiers en présence des milieux de culture inoculés avec une souche bactérienne donnée tout en suivant l'activité bactérienne au cours du temps. Pour réaliser ces essais, il conviendra préalablement de :
  - (a) Sélectionner des souches bactériennes conduisant à précipiter la calcite dans des environnements ayant un pH voisin de 9 ;
  - (b) Développer des milieux de culture conduisant à une bonne activité bactérienne tout en n'entraînant pas une attaque chimique du mortier ;
  - (c) Établir une méthode de suivi de l'activité bactérienne lors des essais de biocicatrisation.

La figure 3.2 schématise les phases de réalisation du projet de recherche qui comprennent :

- Des essais d'autocicatrisation et de cicatrisation en présence de précurseurs sur des mortiers fissurés (objectifs spécifiques 1 et 2)
  - Des essais de croissance sur les souches bactériennes sélectionnées (objectifs spécifiques 3.(a) et 3.(b))
-

- Des essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés (objectif spécifique 3.(c))

La phase finale consiste à appliquer aux éprouvettes de mortier les solutions de biocimentation sélectionnées lors de la phase précédente.

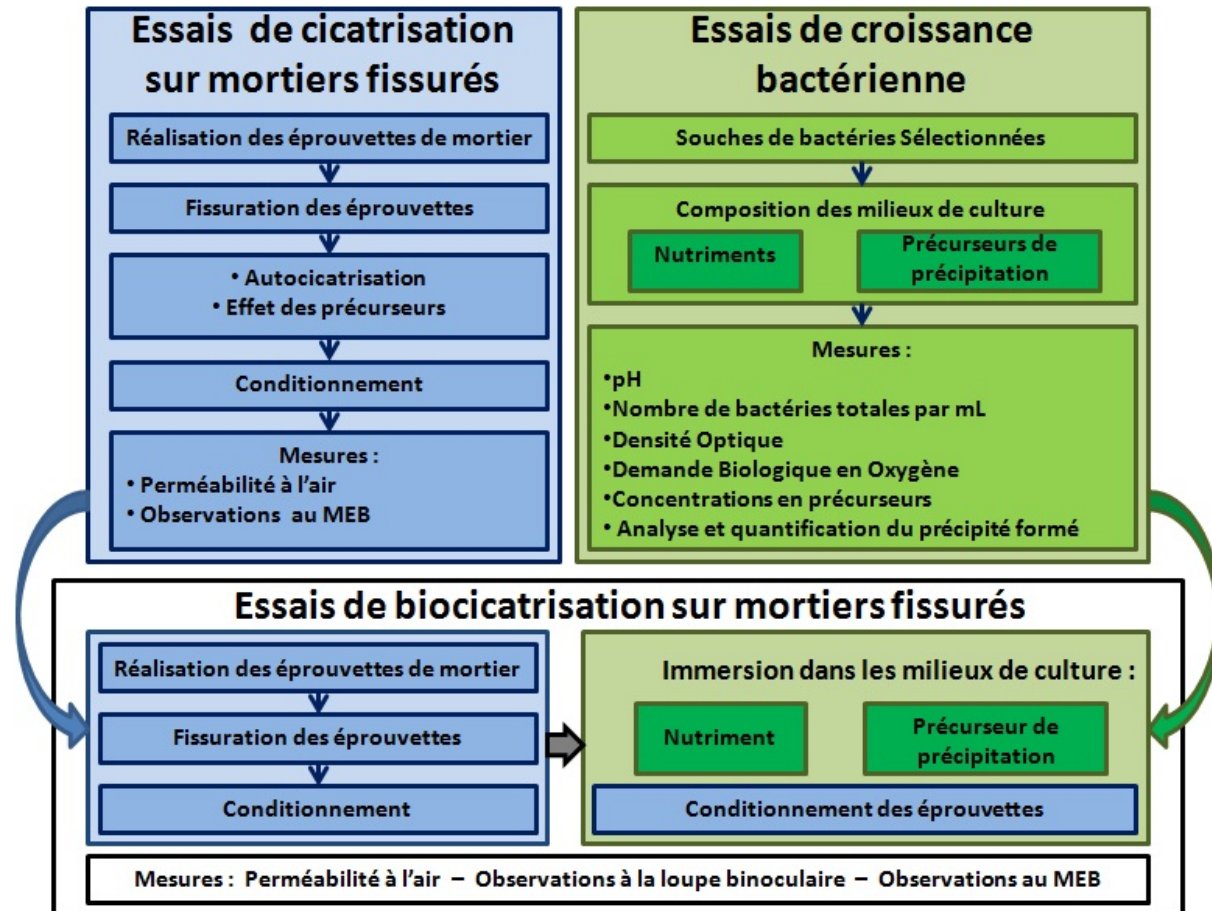


Figure 3.2 Descriptif du programme expérimental.

## 3.3 Choix des variables

La cicatrisation des matériaux cimentaires, et plus encore, le métabolisme des microorganismes est sensible à de nombreux paramètres. Le programme scientifique de la thèse se limite à considérer certaines variables, en se basant sur la recherche bibliographique.

### 3.3.1 Composition du mortier

Le matériau traité est un mortier dont la composition respecte la norme ASTM C109 C109M. Le ciment est de type GU (norme canadienne, équivalent CEM I normes européenne). Ce type de mortier est produit avec un sable siliceux inerte, qui n'a pas d'interaction chimique avec les processus de cicatrisation.

### 3.3.2 Ouvertures des fissures

Le choix de l'ouverture des fissures se limite à deux valeurs :  $\approx 100 \mu\text{m}$  et  $\approx 200 \mu\text{m}$ , qui sont trop larges pour pouvoir être refermées par l'autocicatrisation. Le processus d'autocicatrisation semble suffisant pour refermer les petites fissures de l'ordre de  $50 \mu\text{m}$  selon M. Argouge et R. Gagné [7].

### 3.3.3 Conditionnement des éprouvettes

Les conditions de stockage des éprouvettes doivent être favorables aux processus d'autocicatrisation naturelle et de biocicatrisation. Il a été choisi un conditionnement qui permet l'accès de l'air, placé à  $23^\circ\text{C}$  et à 100% d'humidité relative, permettant la formation de gouttelettes d'eau à la surface des éprouvettes. Ces conditions permettent aux éprouvettes de mortier de s'autocicatriser naturellement [7]. Des cycles de mouillages séchages auraient également pu être envisagés puisqu'ils favorisent également l'autocicatrisation naturelle [59, 115]. Cependant, des conditions environnementales constantes simplifient la reproductibilité et la mise en œuvre du stockage. De plus, dans le cas des essais de biocicatrisation, une humidité constante constitue de meilleures conditions pour la survie des bactéries au sein des fissures, comparativement à des changements alternant humidité et atmosphère sèche.

### 3.3.4 Fissures fraîches et fissures carbonatées

Deux types de fissures sont étudiées : des fissures fraîchement ouvertes et des fissures ayant subi une carbonatation. La surface interne de ces dernières est recouverte par une couche

---

de calcite, formée lors d'un stockage prolongé à 100% humidité relative à 23°C avec un accès au CO<sub>2</sub> de l'air. Les fissures carbonatées permettent de simuler un cas réaliste d'un ouvrage soumis aux intempéries.

### 3.3.5 Souches bactériennes

Deux souches de bactéries sont sélectionnées : *Bacillus cohnii* et *Bacillus pseudofirmus*.

Les *Bacillus* sont des bactéries Gram positif. Ces bactéries sont aérobies, hétérotrophes et capables de produire des endospores quand les conditions environnementales deviennent défavorables. Les bactéries se présentent sous forme de bâtonnets de quelques  $\mu\text{m}$  de long (de 0,6 à 6  $\mu\text{m}$ ). Les spores apparaissent comme un espace clair, réfringent, ovoïde limité par un contour régulier de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$ .

Ces deux souches peuvent se développer à des pH alcalins, jusqu'à environ 10 ; ce qui facilite leur développement sur les matériaux cimentaires. Jonker et al. [65] ont utilisé ces souches bactériennes qu'ils ont directement incluses dans la matrice cimentaire avec différents réactifs tels que le lactate de calcium.

*B. cohnii* et *B. pseudofirmus* ont été préférées à des bactéries uréolytiques telles que *Sporosarcina pasteurii* ou *Bacillus sphaericus*. Bien qu'ayant un fort potentiel pour favoriser la précipitation de carbonate de calcium, les bactéries capables d'hydrolyser l'urée produisent des ions ammonium qui peuvent être extrêmement agressifs pour les matériaux cimentaires.

### 3.3.6 Nutriments

Les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne sont apportés par de l'extrait de levure ou par le milieu Nutrient Broth (NB). Ce dernier est composé de peptone (5 g/L) et d'extrait de bœuf (3 g/L).

Ces nutriments sont des sources de carbone, mais aussi d'azote, de soufre, de magnésium, de potassium, qui permettent aux bactéries la synthèse des protéines dont elles ont besoin.

La peptone s'obtient par digestion enzymatique de la gélatine. L'extrait de levure s'obtient par l'incubation de cultures de levures à 50°C. L'extrait de levure et l'extrait de bœuf sont riches en vitamines, glucides et acides nucléiques (sources d'azote et de phosphore).

La teneur en carbone organique total (COT) du Nutrient Broth et de l'extrait de levure sont présentée dans le tableau 3.1 suivant.

---



<b>Carbone Organique Total (g/kg)</b>	
Nutrient Broth (NB)	419
Extrait de levure	402

Tableau 3.1 Analyses du Carbone Organique Total des nutriments utilisés.

### 3.3.7 Précurseurs de précipitation

Certains produits ajoutés au milieu de culture ont pour objectif d'apporter les réactifs nécessaires à la formation de précipités par les bactéries. Ce sont les précurseurs de précipitation. La formation de ce précipité, qui est constitué de carbonate de calcium, permet la cicatrisation des fissures du matériau cimentaire.

Les précurseurs utilisés sont le lactate de calcium, le gluconate de calcium et l'urée. Du nitrate de calcium est aussi ajouté comme source supplémentaire de calcium dans certains milieux. Le nitrate de calcium est préféré au chlorure de calcium utilisé pourtant fréquemment dans de nombreuses études. Les ions chlorures présentent le désavantage de catalyser la corrosion des armatures dans le béton armé. Le nitrate de calcium est fortement soluble dans l'eau, permettant de mettre d'importantes quantités d'ions calcium en solution. L'urée sera également utilisée pour imprégner les fissures. Il s'agit d'un précurseur employé couramment dans les études [9, 24, 25, 32, 123]. Les formules chimiques des différents précurseurs sont présentées dans le tableau 3.2.

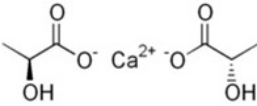
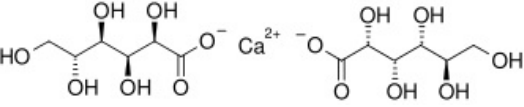
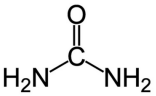
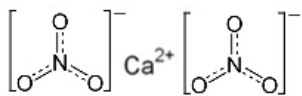
Précurseurs de précipitation	Formule chimique	Formule topologique
L-Lactate de calcium	$C_6H_{10}CaO_6$	
D-Gluconate de calcium	$C_{12}H_{22}CaO_{14}$	
Urée	$CH_4N_2O$	
Nitrate de calcium	$Ca(NO_3)_2$	

Tableau 3.2 Formules chimiques des précurseurs sélectionnés.

La figure 3.3 résume les différents paramètres étudiés lors des différentes phases du programme expérimental permettant d'étudier les processus de cicatrisation et de biocicatrisation.

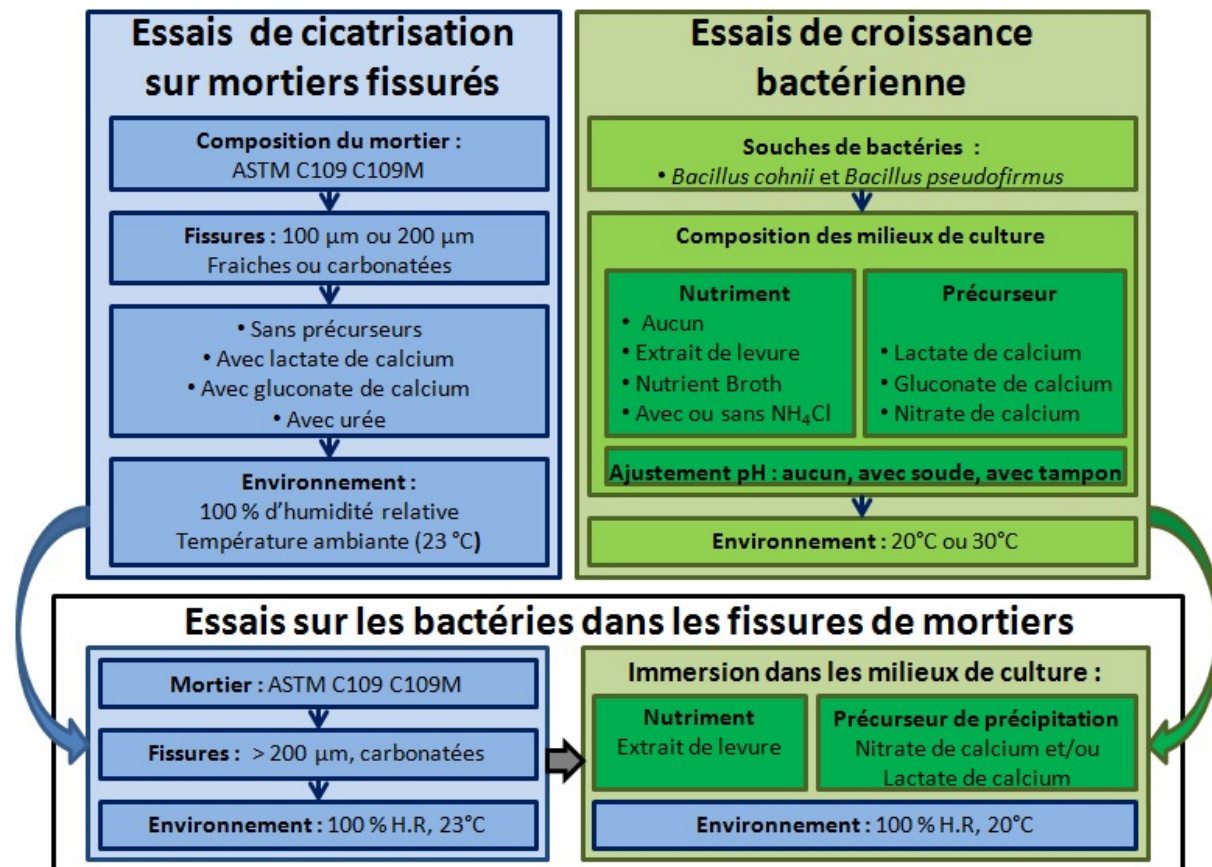


Figure 3.3 Paramètres étudiés lors des différentes phases du programme expérimental.

# CHAPITRE 4

## Matériels et méthodes

### 4.1 Préparation des mortiers fissurés

#### 4.1.1 Composition du mortier

La composition du mortier suit la norme ASTM C109 C109M. Elle impose un rapport sable/ciment de 2,75 et un rapport eau/ciment de 0,485.

Le sable utilisé respecte la norme C778. Il s'agit du sable normalisé d'Ottawa : sable de silice naturel avec une granulométrie des grains répartie entre de 600  $\mu\text{m}$  (tamis n° 30) et 150  $\mu\text{m}$  (tamis n° 100) et de densité 2,65.

Le ciment employé est un ciment GU, ciment hydraulique à usage général. Ses caractéristiques sont regroupées dans les tableaux 4.1 et 4.2. La finesse de Blaine est de 381  $\text{m}^2/\text{kg}$ . La composition minéralogique du ciment utilise les notations cimentières <sup>1</sup>.

Oxydes présents	Pourcentage massique
CaO	63,1 %
SiO <sub>2</sub>	20,3 %
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,4 %
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,4 %
MgO ( $\leq 5.0$ % )	2,2 %
SO <sub>3</sub>	3,5 %

Tableau 4.1 Analyses chimiques du ciment sur les différents oxydes présents

C3S	C2S	C3A	C4AF
60%	13%	7,50%	7%

Tableau 4.2 Composition minéralogique du ciment en notation cimentière

Les essais de résistance en compression permettent de caractériser le mortier utilisé. Sa composition étant celle d'un mortier standard, les phénomènes de cicatrisation qui l'affecteront seront vraisemblablement représentatifs des matériaux cimentaires classiques. Cependant, la proportion de pâte dans un mortier étant supérieure à celle dans un bé-

<sup>1</sup>Les notations cimentières sont présentées en annexe A

ton, il convient d'être prudent sur une généralisation de l'ampleur des phénomènes sur les bétons. Les processus de cicatrisation devrait être plus marqués dans le cas de mortiers.

Le mortier utilisé a été soumis à des tests de compression suivant la norme ASTM C39. Des cubes de 5 cm de côté ont été coulés avec les mêmes gâchées que celles utilisées pour la réalisation des éprouvettes cylindriques de mortier, décrite ci-après. Les cubes après le démoulage sont stockés en chambre humide à 100 % d'humidité relative et à 23°C. Les essais en compression ont été effectués à 7, 14, 28 et 91 jours sur une presse RIEHLE de capacité 300 000 livres (136 tonnes). La vitesse de chargement est de 250 livres par seconde (1112 N/s). Trois cubes de mortier ont été testés à 7 jours, 9 cubes à 14 jours, 18 cubes à 28 jours et 3 cubes à 91 jours.

#### 4.1.2 Réalisation et fissuration des éprouvettes de mortier

La réalisation des éprouvettes suit le même principe que pour la thèse de M. Argouges [7].

La procédure de malaxage du mortier est conforme à la norme ASTM C 305.

Les échantillons de mortier sont de forme annulaire, de diamètre 150 mm et de hauteur 50 mm. L'ouverture au centre de 55 mm de diamètre permet l'insertion du mécanisme de fissuration contrôlée : le cœur expansif en acier. Toutes les éprouvettes de mortier sont armées d'un anneau en acier de section circulaire de 4,8 mm de diamètre et de diamètre intérieur de 95,2 mm. L'armature est placée grâce à un support au centre de la section puis suspendue par des fils, le support est alors retiré (figure 4.3). L'armature permet notamment de préserver la cohésion globale et l'ouverture de la fissure après la fissuration de l'éprouvette de mortier.

Les figures 4.1 et 4.2 montrent le dispositif du cœur expansif et une éprouvette de mortier prête à être utilisée.



Figure 4.1 Dispositif du cœur expansif et une éprouvette de mortier

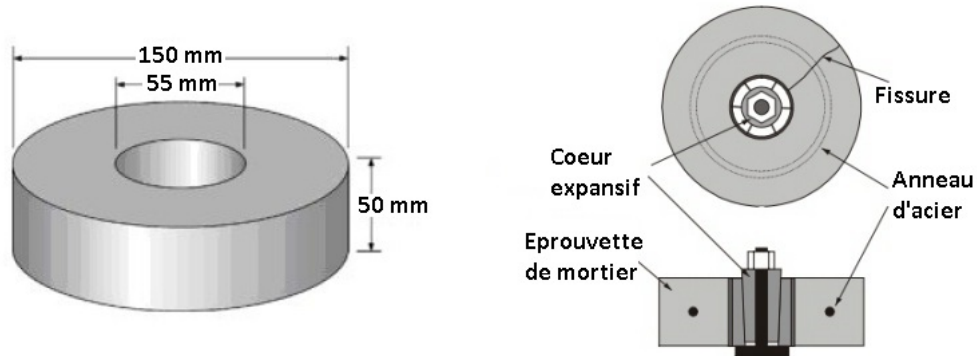


Figure 4.2 Schéma de l'éprouvette et du cœur expansif. [7]

Les moules cylindriques, présentés en figure 4.3, comportent une insertion cylindrique en Téflon en leur centre. Ils sont remplis en deux couches en utilisant une légère vibration après la mise en place de chacune des couches. La surface supérieure de l'éprouvette est ensuite arasée et le moule est recouvert d'une plaque de plastique rigide et imperméable pendant approximativement 24 heures. Immédiatement après le démoulage, les éprouvettes sont conservées dans une chambre humide (brouillard) maintenue à 23°C et 100 % d'humidité relative pendant 28 jours. Avant de débiter la fissuration, la face supérieure de l'éprouvette (soumise à l'arasement du béton frais) a été polie. L'éprouvette est fixée sur un tour industriel, puis une meule diamantée vient enlever une fine couche sur la partie supérieure du mortier pour atteindre l'épaisseur souhaitée de 50 mm  $\pm$  1 mm.

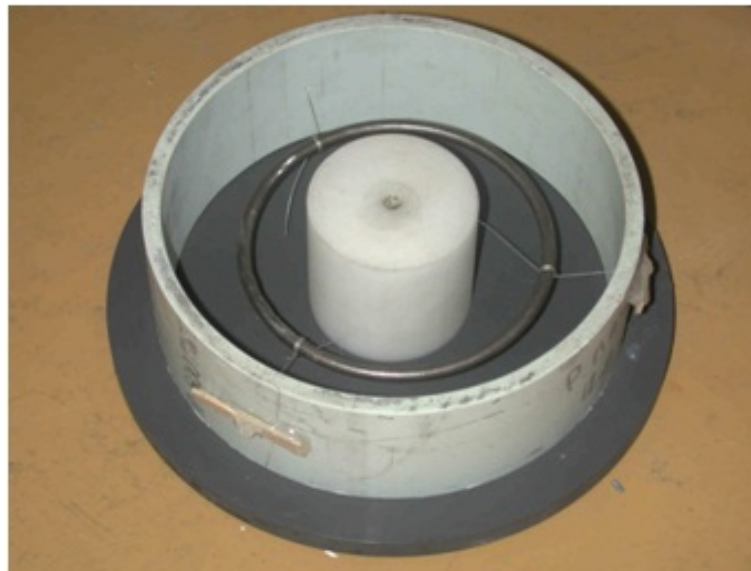


Figure 4.3 Moule pour la réalisation des éprouvettes de mortier. [Source : Richard Gagné]

Les éprouvettes de mortier sont fissurées par l'application d'une déformation contrôlée engendrée par le cœur expansif. Le cœur expansif est constitué d'un cône tronqué en acier, qui glisse à l'intérieur de six pétales coniques en acier. Une mince bague en PVC retient l'ensemble des pétales contre le cône interne et joue le rôle de coussin déformable entre le cœur expansif et la surface interne des éprouvettes de mortier. La fissuration contrôlée est engendrée par le serrage d'un boulon en acier haute résistance, qui force la pénétration du cône à l'intérieur des pétales. Ce processus entraîne une augmentation du diamètre de la bague en PVC ; ce qui conduit à une déformation du diamètre interne de l'éprouvette de mortier. Les dimensions de l'ouverture de la fissure sont contrôlées en ajustant la déformation du cœur expansif.

Les ouvertures de fissures sont classées en deux catégories, larges ou fines, en fonction de la mesure faite au vidéomicroscope. Les fissures d'ouverture inférieure à  $150\ \mu\text{m}$  sont classées comme fines, les fissures d'ouverture supérieure à  $150\ \mu\text{m}$  sont classées comme larges.

### 4.1.3 Éprouvettes fraîchement fissurées et éprouvettes avec fissures carbonatées

Les processus d'autocicatrisation et de cicatrisation avec précurseurs ont été suivis sur des fissures fraîchement fracturées et sur des fissures carbonatées. Le processus de biocicatrisation a été suivi uniquement sur des fissures carbonatées. Les essais avec éprouvettes fraîchement fissurées sont lancés juste après la fissuration. En revanche, les essais sur éprouvettes avec fissures carbonatées (ou préalablement autocicatrisée) exigent un traitement préalable. Après la fissuration, ces éprouvettes ont été stockées en chambre humide (brouillard) à 100 % d'humidité relative et à  $23^\circ\text{C}$  pendant 1 an et demi. Les éprouvettes s'autocicatrisent et une couche de calcite se forme sur les surfaces internes des fissures. Cette période d'un an et demi est suffisante pour obtenir une autocicatrisation "complète". Le processus d'autocicatrisation est alors très lent et négligeable. Il ne se superposera pas aux autres mécanismes de cicatrisation que l'on souhaite étudier.

À la fin de cette période, les cœurs expansifs permettent d'ouvrir à nouveau la fissure afin d'ajuster l'ouverture des fissures à plus de  $250\ \mu\text{m}$  correspondant à des fissures larges. La carbonatation des fissures correspond à une autocicatrisation limitée, l'objectif étant de former une couche de calcite sur les surfaces internes des fissures sans pour autant la colmater entièrement.

---

## 4.2 Essais de cicatrisation abiotique sur mortiers fissurés

Ces essais ont pour objectif de suivre l'évolution de l'ouverture apparente de fissures sur des éprouvettes de mortier soumises à un environnement humide, 100 % H.R. et à température ambiante (23°C). Certaines fissures sont immergées dans des solutions de précurseur, afin d'évaluer l'influence du précurseur sur la cicatrisation des fissures.

### 4.2.1 Mode d'application des solutions de précurseur dans les fissures

L'application des différentes solutions de précurseur dans les fissures se fait après un séchage en étuve pendant 24 h à 40°C. Les éprouvettes sont immergées dans les solutions de précurseur pendant 24 heures. Une seule imprégnation par éprouvette de mortier est réalisée pour toute la durée de l'essai.

La concentrations des solutions de précurseur sont indiquées dans le tableau 4.3.

Milieux	Lactate de calcium	Gluconate de calcium	Urée
Concentration (g/L)	79	20	10

Tableau 4.3 Concentration des solutions de précurseur.

Les concentrations en lactate de calcium et en gluconate de calcium ont été choisies pour être proches des concentrations de saturation. La concentration en urée a été fixée à 10 g/L, concentration utilisée notamment par De Munyck et al. [25, 27] et Dick et al. [32].

Six catégories d'éprouvettes sont définies :

- Éprouvettes fraîchement fissurées sans immersion,
- Éprouvettes fraîchement fissurées avec immersion dans le lactate de calcium,
- Éprouvettes fraîchement fissurées avec immersion dans le gluconate de calcium,
- Éprouvettes fraîchement fissurées avec immersion dans l'urée,
- Éprouvettes carbonatées sans immersion,
- Éprouvettes carbonatées avec immersion dans le lactate de calcium.

Les éprouvettes de mortier après immersions sont ensuite placées dans les systèmes de conditionnement.

### 4.2.2 Conditionnement des éprouvettes de mortier

Le conditionnement des mortiers est primordial du fait des mécanismes liés à l'autocicatrisation : l'hydratation secondaire et la déposition de carbonate de calcium. Il convient de maîtriser les cycles de mouillage-séchage, le taux d'humidité et l'accès au dioxyde de carbone.

Le dispositif de stockage est constitué d'un bidon auquel un appareil d'humidification est branché (voir schéma en annexe G). Ce dernier fonctionne en faisant vibrer une capsule piézoélectrique à des fréquences ultra-sonores. Les vibrations produites engendrent la formation de micro-gouttelettes d'eau. Ce brouillard remplit le volume des bidons et expose les éprouvettes à une humidité de 100 %. Une fine pellicule d'eau se dépose sur les éprouvettes.

Les éprouvettes sont ainsi stockées durant toute la durée de l'essai à 23°C à 100% d'humidité relative.

### 4.2.3 Mesures et suivi de la cicatrisation

Afin de suivre au cours du temps l'évolution de l'ouverture des fissures, les éprouvettes sont sorties des systèmes d'humidification à 1 mois, 3 mois, 6 mois. Certains essais ont été prolongés à 11 mois.

Afin d'empêcher un artéfact de mesure par la présence d'eau dans la fissure, les éprouvettes sont séchées à 40°C pendant 24 h avant chaque mesure de débit d'air. Cette température permet d'enlever l'eau dans les fissures sans pour autant altérer les produits de cicatrisation comme l'ettringite, qui se seraient formés dans les fissures. L'utilisation de l'air comme fluide circulant à travers la fissure, et non de l'eau, permet d'éviter d'affecter le processus de cicatrisation, en lixiviant ou en hydratant la matrice cimentaire. Cette méthode de mesure par débit d'air constitue un moyen d'estimation rapide et relativement précis de l'ouverture des fissures.

Les mesures de débit d'air sont réalisées à l'aide de la cellule de perméabilité (figure 4.4).

Cette cellule est spécifiquement conçue pour être utilisée avec une éprouvette de mortier annulaire sollicitée par le cœur expansif en acier placé en son centre. Elle permet des mesures précises du débit d'air à travers une fissure unique sous des conditions d'écoulement

---



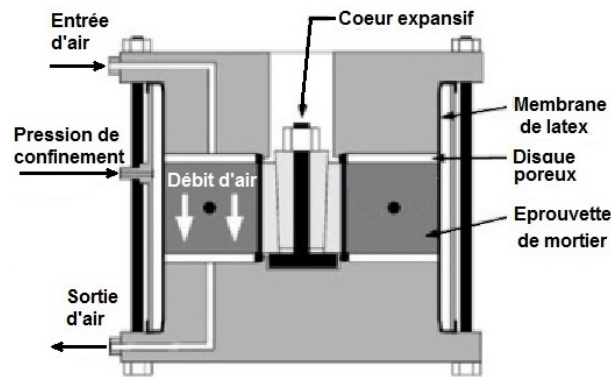


Figure 4.4 Schéma de la cellule de perméabilité à l'air. [7]

bien contrôlées : température et gradient de pression constants. Les pressions absolues en amont et en aval sont maintenues constantes à 150 kPa et à 100 kPa  $\pm$  5 kPa (pression atmosphérique) respectivement.

Une membrane en latex est plaquée sur les côtés de l'éprouvette de mortier avec une pression de confinement de 1 bar. Ainsi, le flux d'air circulant dans la fissure s'écoule du haut vers le bas sans déperditions latérales.

Le débit volumique en aval est mesuré par un des trois débitmètres à bille (rotamètres) comportant chacun une plage de mesure spécifique.

La valeur du débit d'air permet de déterminer l'ouverture de la fissure en utilisant une courbe d'étalonnage. La correspondance entre la valeur du débit d'air et l'ouverture repose sur les travaux de M. Argouges [7] et complétée par une série de mesures au vidéo-microscope réalisée sur des éprouvettes fraîchement fissurées. L'estimation de l'ouverture d'une fissure par vidéo-microscope consiste à mesurer la largeur de la fissure en une quinzaine de points sur chacune des faces de l'éprouvette et d'en calculer la moyenne.

La figure 4.5 regroupe les résultats des mesures d'ouverture de fissures fraîches obtenues au vidéo-microscope et la correspondance avec le débit d'air mesuré.

Définir l'ouverture d'une fissure fraîche par des observations au vidéo-microscope est simple, mais les lèvres des fissures subissant une cicatrisation sont plus difficilement visibles. Dans ce dernier cas, ce sont les mesures de débit d'air qui permettent de remonter à la valeur de l'ouverture.

La valeur du coefficient de corrélation  $R$  est assez proche de 1. Généralement, les points qui s'écartent de la courbe de tendance correspondent à des fissures de géométries irrégulières.

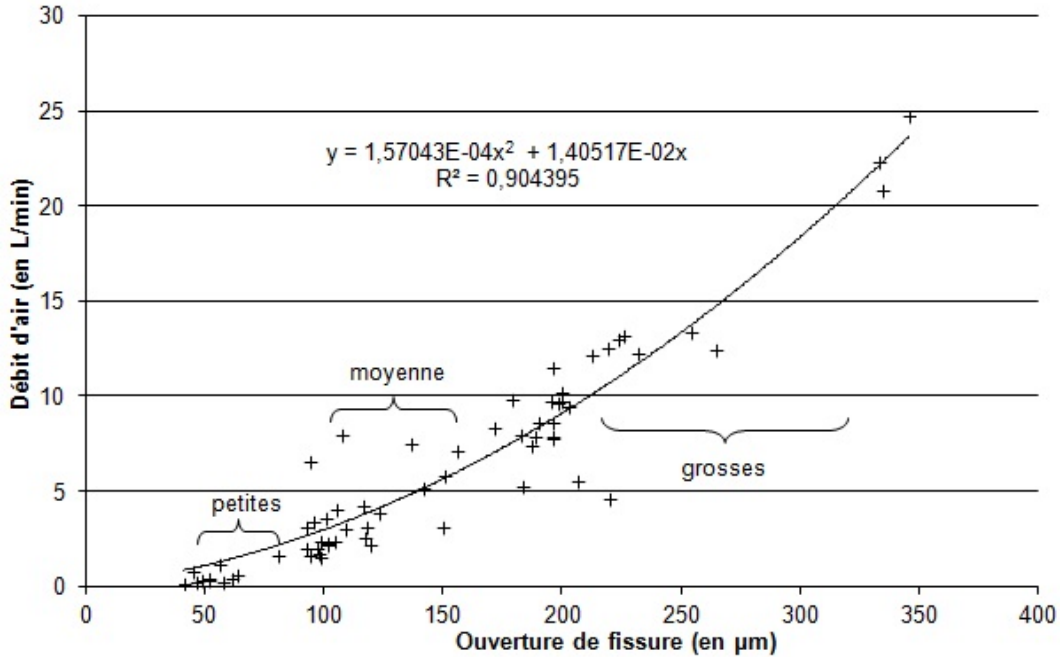


Figure 4.5 Relation entre le débit expérimental et l'ouverture initiale d'une fissure.

Une analyse statistique de la relation entre le débit d'air et l'ouverture des fissures est présentée plus en détail en annexe B.

Concrètement, la détermination de l'ouverture des fissures à partir du débit d'air se fait en résolvant l'équation suivante (4.1) :

$$Q = 1,57043 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 + 1,40517 \cdot 10^{-2} \cdot x \quad (4.1)$$

$Q$  est le débit mesuré en L/min et  $x$  l'ouverture de fissure en  $\mu\text{m}$ .

Cette méthode donne une ouverture apparente, celle d'une fissure équivalente qui aurait un débit d'air identique et dont la largeur serait constante sur toute la section. En pratique, la fissure n'a pas une largeur parfaitement constante. De plus, dans le cadre des essais de biocicatrisation, les fissures peuvent se cicatriser de façon très hétérogène. Néanmoins, cette approche permet une estimation de l'état global de la fissure et constitue un moyen de comparaison.

Le taux apparent de cicatrisation ( $C_t$ ) permet, à partir des mesures d'ouverture apparente, de quantifier l'avancement de la cicatrisation. Celui-ci est défini par la formule présentée dans l'équation (4.2) :

$$C_t = \frac{W_{t0} - W_t}{W_{t0}} \quad (4.2)$$

$W_{t0}$  est l'ouverture apparente initiale (initial effective Width), mesurée au début de l'essai et  $W_t$  est l'ouverture apparente mesurée au temps "t". Le taux apparent de cicatrisation ( $C_t$ ) est exprimé en pourcentage. Il varie de 0 %, pour une fissure non cicatrisée, à 100 % pour une cicatrisation complète.

L'épaisseur apparente de cicatrisation ( $E_t$ ) est définie également à partir de la mesure de l'ouverture apparente. Celle-ci est définie par la formule présentée dans l'équation (4.3) :

$$E_t = \frac{W_{t0} - W_t}{2} \quad (4.3)$$

L'épaisseur apparente de cicatrisation ( $E_t$ ) représente l'épaisseur théorique des produits de cicatrisation, qui se sont formés sur l'une des deux surfaces internes de la fissure. Cette épaisseur est considéré comme constante dans toute la fissure malgré le fait que les processus de cicatrifications réels ne soient pas homogènes. Elle permet cependant de comparer l'avancement de la cicatrisation entre deux fissures de tailles différentes.

Après chaque mesure, les éprouvettes sont replacées dans le système d'humidification. Après la dernière mesure, à 6 mois ou 11 mois selon les cas, les éprouvettes de mortier sont découpées à 1 cm de part et d'autre de la fissure. La fissure est alors ouverte par de légers coups de burin. La surface interne des fissures est observée au microscope électronique à balayage à pression variable, qui évite la métallisation de l'échantillon et la mise sous vide total. Des analyses dispersives en énergies (EDS) sont effectuées, afin d'identifier les éléments chimiques constitutifs des produits d'hydratation.

---

## 4.3 Essais de croissance bactérienne dans différents milieux de culture

Pour l'étude de l'activité bactérienne, les méthodes de réalisation des essais doivent éviter toute contamination par des microorganismes non désirés. Le matériel, la réalisation des milieux de culture et les conditions de croissance doivent respecter cet impératif. Les différentes méthodes de stérilisation et de réalisation des milieux sont détaillées en annexe D.

Les deux souches bactériennes utilisées, *Bacillus cohnii* et *Bacillus pseudofirmus*, proviennent de la collection de culture de microorganismes de l'entreprise DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Les bactéries sont stockées sous forme de cryotube à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Un cryotube contient 1 mL de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance et 0,5 mL de glycérol (1/4).

Les milieux initiaux testés sont les milieux de culture recommandés par le fournisseur des souches bactériennes DSMZ. Puis, différents paramètres ont été testés pour aboutir à un milieu de culture permettant une croissance optimale de la souche sélectionnée et la formation de quantités significatives de précipités.

### 4.3.1 Méthodes d'analyses microbiologiques

Les essais de croissance bactérienne consistent à ensemencer et à suivre l'activité bactérienne dans les milieux de culture à étudier. L'évolution théorique et la description des différentes phases d'une croissance bactérienne sont présentées en annexe C.

Les paramètres analysés sont les suivants :

- Le pH ;
- La densité optique ;
- La taille de la population bactérienne par des comptages par épifluorescence ;
- La Demande Biologique en Oxygène (DBO) ;
- La concentration en précurseurs par des dosages par chromatographie ionique ou par ICP.

Le pH des suspensions bactériennes a été mesuré au moyen d'un pH-mètre WTW 340i.

---

Le développement des bactéries engendre un trouble dans le milieu de culture. La mesure de la turbidité de la solution peut se quantifier par des mesures d'absorbance (appelé aussi densité optique) à l'aide d'un spectrophotomètre. La longueur d'onde la plus appropriée pour évaluer la densité optique d'une solution contenant des microorganismes est communément fixée autour de 600 nm, soit la région spectrale des oranges. Pour cette étude, la longueur d'onde est fixée à 620 nm. Les mesures régulières de densité optique permettent de mettre en évidence les différentes phases de croissance bactérienne. Cette technique, bien que simple et facile à mettre en œuvre, présente certains biais, notamment lors de la formation de précipités dans les milieux. Les mesures de la turbidité ne sont alors plus représentatives du nombre de cellules bactériennes en solution.

Le comptage par épifluorescence est une méthode permettant d'estimer la concentration en bactéries et la proportion de cellules vivantes ou mortes [91]. Cette technique consiste à compter au microscope optique équipé en épifluorescence les bactéries recueillies sur une membrane en polycarbonate à pores cylindriques calibrés à 0,2  $\mu\text{m}$ . L'utilisation d'un fluorochrome, l'acridine orange, permet de différencier les bactéries mortes des bactéries vivantes. À la lumière ultraviolette, l'acridine orange colore de façon spécifique les bactéries vivantes ou mortes, les cellules vivantes apparaissent en rouge, les mortes en vert. Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries vivantes ou mortes par mL.

La chromatographie ionique est une technique qui permet d'isoler et de quantifier une substance chargée électriquement. Le principe repose sur les différences de charge électrique et de masse entre les espèces chimiques. Ces différences vont se traduire par une migration différente dans les colonnes de séparation. Cette technique est utilisée pour doser le lactate et le gluconate, les deux précurseurs utilisés dans l'étude. Il est également possible de doser par cette technique l'acétate, le propionate et le formiate, qui pourraient se former dans les solutions suite à la dégradation des précurseurs. Pour les dosages avec la chromatographie ionique, le volume de la solution à analyser est filtré par un filtre de diamètre de pore de 0,2  $\mu\text{m}$ . Les bactéries ainsi que les précipités formés sont éliminés, seuls les composés en solution sont dosés.

La spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif, ou, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)<sup>2</sup> est une technique d'analyse utilisée pour déterminer les éléments chimiques présents en solution. La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma. L'analyse de lumière émise par le plasma permet d'identifier et de quantifier les ions métalliques présents dans les solutions, tels que

---

<sup>2</sup>Également dénommé Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES)

---

le calcium dans le cas présent. De la même manière que pour les analyses à la chromatographie ionique les solutions à analyser sont filtrées.

Les organismes aérobies, consommant l'oxygène et dégageant du dioxyde de carbone, peuvent être suivis en mesurant leur consommation d'O<sub>2</sub>. Le système Oxitop<sup>®</sup> (WTW, Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten) est capable d'évaluer la demande biologique en oxygène (DBO).

Les milieux de culture sont ensemencés à partir d'une aliquote d'une pré-culture. Une pré-culture est une culture menée en erlemeyer refermant 100 mL de milieu recommandé, ensemencée à partir d'un cryotube et placé à 30°C sous agitation. Pour les souches étudiées, le milieu recommandé est composé du milieu Nutrient Broth (NB) à 8 g/L. Le pH est ajusté à 9,6 avec une solution tampon (0,5 mol/L de NaHCO<sub>3</sub> et 0,5 mol/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Pour constituer un bon inoculum, la pré-culture doit être en phase exponentielle de croissance avec plus de 10<sup>8</sup> bactéries vivantes par mL au moment de l'ensemencement de la culture bactérienne proprement dite.

Deux types d'essais de croissance bactérienne sont menés :

- Des essais de croissance en erlenmeyers ;
- Des essais de croissance avec le système Oxitop<sup>®</sup>.

### 4.3.2 Essais de croissance bactérienne en erlenmeyers

Les essais menés en erlenmeyers permettent des prélèvements périodiques dans le milieu de culture. Il est possible de suivre, tout au long de la croissance bactérienne, l'évolution du pH, de la taille de la population bactérienne (par des mesures de densité optique et par des comptages par épifluorescence) et de la concentration en précurseurs (par des dosages en chromatographie ionique ou par ICP).

Ces essais ont été menés en erlenmeyers de 250 mL ou de 500 mL, contenant respectivement 100 mL ou 250 mL du milieu de culture à étudier. Les milieux sont inoculés avec un aliquote de la pré-culture en phase exponentielle de croissance, à un volume de 1/1000 par rapport au volume du milieu. Une fois inoculés, les milieux de culture sont incubés à la température souhaitée (30°C ou 20°C) sous agitation.

Certains milieux cultivés en erlenmeyers ne subissent par de prélèvement réguliers, ils sont filtrés en totalité à la fin de l'essai (filtration à 0,45 µm). Le précipité qui s'est formé dans

---

les milieux au cours de la croissance bactérienne est séché, pesé et analysé par analyse thermogravimétrique (ATG) ou par diffractométrie de rayons X (DRX).

La DRX permet de définir la nature minéralogique et la structure cristallographique des constituants du matériau. C'est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X par la matière. L'échantillon analysé est bombardé de rayons X. L'intensité des rayons X diffusés dans les différentes directions de l'espace permet de caractériser la nature de la phase cristalline.

L'analyse thermogravimétrique (ATG) consiste à mesurer la perte de masse lors de l'élévation de la température de l'échantillon. Le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) se décompose à  $800^\circ\text{C}$  en chaux vive ( $\text{CaO}$ ) et en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). La perte de masse à cette température doit correspondre à la masse de  $\text{CO}_2$  dégagé. La mesure de cette perte de masse permet de déterminer la masse de carbonate de calcium initiale.

### 4.3.3 Essais de croissance bactérienne avec le système Oxitop<sup>®</sup>

Les essais utilisant le système Oxitop<sup>®</sup> permettent la mesure en continu de la consommation de l'oxygène issue de l'activité des bactéries aérobies (Demande Biologique en Oxygène, DBO). Le système doit être hermétiquement scellé durant la période de mesure. Les prélèvements et les mesures ne sont possibles qu'avant et après la période de mesure de la DBO. Les essais sont menés en flacons de 1 litre contenant 200 mL de milieu de culture etensemencé avec 200  $\mu\text{L}$  de pré-culture. Les têtes de mesure du système Oxitop<sup>®</sup> sont alors immédiatement visées hermétiquement sur les flacons et le système est placé à  $30^\circ\text{C}$  sous agitation pendant toute la durée de l'expérimentation.

Les têtes de mesures enregistrent les variations de pression engendrées par la respiration bactérienne. Des pastilles de soude dans le capuchon piègent le  $\text{CO}_2$  dégagé par la respiration bactérienne (figure 4.6). La mesure de la dépression créée par la consommation bactérienne de  $\text{O}_2$  permet d'obtenir la DBO ( exprimée en mg de  $\text{O}_2$  par litre). La DBO est calculée par le système Oxitop<sup>®</sup> toutes les deux heures pour les essais d'un mois, et toutes les 28 minutes pour les essais d'une semaine. Dans les deux cas, il est effectué 360 mesures tout au long de l'essai.

Cette méthode permet un suivi plus simple de l'activité bactérienne, sans besoin d'intervention entre le début et la fin de l'essai. Cependant, aucun prélèvement intermédiaire n'est possible, en raison de la variation de pression que provoquerait l'ouverture des flacons.

---



Figure 4.6 Système Oxitop® [Modifié de WTW]

#### 4.4 Essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés.

Un essai de biocicatrisation sur mortiers fissurés a été mis au point en laboratoire à partir de la souche bactérienne et des deux milieux de culture sélectionnés lors des essais de croissance.

Les éprouvettes de mortier utilisées dans cet essai sont identiques à celles utilisées pour les essais de cicatrisation abiotique, utilisant les précurseurs sans bactéries.

Les éprouvettes fissurées à 28 jours sont stockées pendant plus d'un an dans une atmosphère humide à 100% d'humidité relative, à 23°C avec un accès de l'air et du CO<sub>2</sub>. Les fissures sont ainsi déjà carbonatées (partiellement autocicatrisées) et simulent le cas d'ouvrages fissurés soumis aux intempéries. L'ouverture des fissures est contrôlée à la fin de la période de carbonatation. Les cœurs expansifs permettent d'ajuster l'ouverture des fissures à plus de 250 μm (fissures larges).

Après un séchage à 40°C pendant 24 h, les mortiers fissurés et carbonatés sont immergés dans les milieux sélectionnés renfermant des bactéries en phase exponentielle de croissance, durant 24 h sous atmosphère stérile (sous hotte à flux laminaire). La concentration en bactéries vivantes dans les milieux au moment de l'immersion doit être supérieure à 1.10<sup>9</sup> bactéries par mL.

Des essais témoins, sans bactéries, ont été réalisés, afin de mettre en évidence l'effet des constituants du milieu dans le processus de cicatrisation. Ainsi, après séchage, des mortiers fissurés et carbonatés ont été immergés dans les milieux sans bactéries, auxquels a été ajouté un biocide, du bronopol (à 0,1 g/L voir annexe E). Les concentrations en lactate et en calcium correspondent à celles des suspensions bactériennes utilisées pour les essais



avec bactéries. Ces concentrations ont été déterminées par des dosages du lactate et du calcium sur les deux suspensions bactériennes au moment de l'immersion des éprouvettes de mortier.

Pour les essais avec bactéries et les essais témoins, et pour chaque milieu testé, l'expérience est réalisée en duplicat ; soit 8 mortiers fissurés testés.

Après la phase d'immersion, les éprouvettes sont stockées dans des systèmes d'humidification similaires à ceux utilisés pour les essais de cicatrisation abiotique de mortiers fissurés (voir annexe G). Pour éviter toutes contaminations extérieures, les systèmes d'humidification sont nettoyés à l'alcool. L'eau pour l'humidification est stérilisée par autoclavage. Dans le cas des essais témoins, l'eau est additionnée de 0,1 g/L de bronopol.

Chaque dispositif de stockage, renfermant 2 éprouvettes de mortier ayant subi le même traitement, est placé à 20°C.

Tous les mois, pendant 4 mois, les éprouvettes sont retirées des systèmes d'humidification puis séchées à 40°C pendant 24 h. Une aliquote du liquide de brumisation contenu au fond du dispositif de stockage est prélevé, afin de procéder à un comptage bactérien par épifluorescence. Pour les essais avec bactéries, ces analyses permettent d'évaluer indirectement l'activité bactérienne au cours de l'essai de biocicatrisation. Pour les essais témoins, elles ont permis de vérifier la stérilité du conditionnement.

Les mesures de débit d'air sont réalisées, selon le même protocole que décrit précédemment, afin de suivre l'évolution de l'ouverture apparente des fissures. Des observations des fissures à la loupe binoculaire ont également permis d'évaluer l'évolution visible de leur ouverture.

Les éprouvettes de mortier sont à nouveau immergées dans les milieux, avec et sans bactéries, selon les mêmes modalités que décrites précédemment. Les mortiers sont replacés dans les systèmes d'humidification stériles à 20°C pendant un mois avant les prochaines mesures.

Après la dernière mesure de débit d'air réalisée à 4 mois, les éprouvettes de mortier sont découpées et la fissure est ouverte. Les produits formés à l'intérieur des fissures sont analysés par DRX. Puis, la surface interne des fissures est observée au microscope électronique à balayage ; la mise sous vide est exigée pour faire les observations. Une métallisation au carbone est effectuée sur les échantillons avant les observations.

Une section polie sur la coupe transversale d'une fissure a également été réalisée, afin de visualiser l'épaisseur de la couche de cicatrisation formée. La figure 4.7 décrit les coupes

---

pratiquée sur l'éprouvette de mortier pour réaliser la section polie. Les parties de la fissure observées sont au cœur de l'éprouvette, éloignées des bords extérieurs.

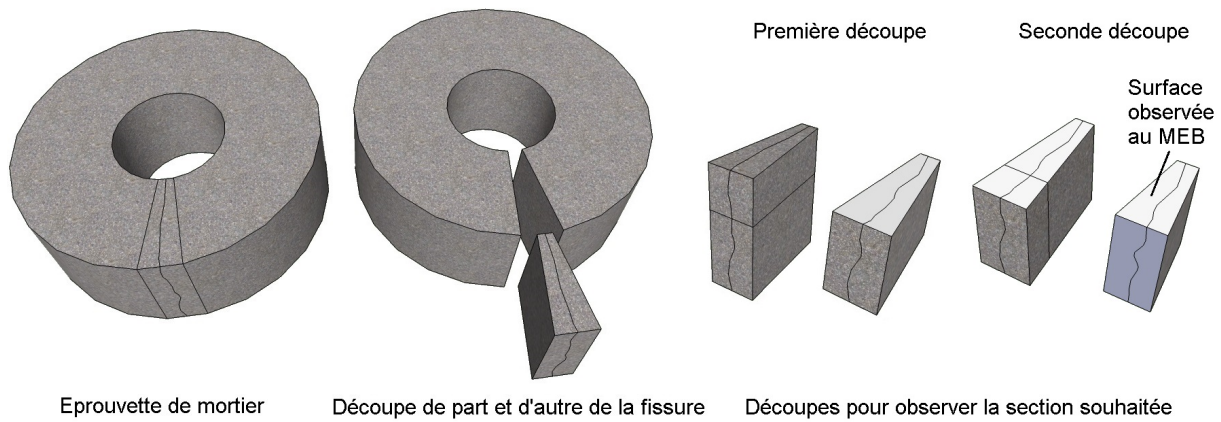


Figure 4.7 Schématisation des découpes pour l'observation au MEB de la fissure.

La section de mortier sélectionnée est coulée dans une résine de type araldite, polie puis métallisée.

# CHAPITRE 5

## Résultats des essais de cicatrisation abiotique de mortiers fissurés

Les résultats des essais de cicatrisation sans bactéries sont découpés en trois parties :

- Autocicatrisation naturelle,
- Cicatrisation des fissures fraîches avec précurseur,
- Cicatrisation des fissures carbonatées avec et sans précurseur.

### 5.1 Résistance en compression du mortier

Le mortier utilisé tout au long de l'étude montre en moyenne une résistance en compression de 36,5 MPa à 28 jours.

La figure 5.1 présente les moyennes et l'écart type des résistances en compression obtenues au cours du temps.

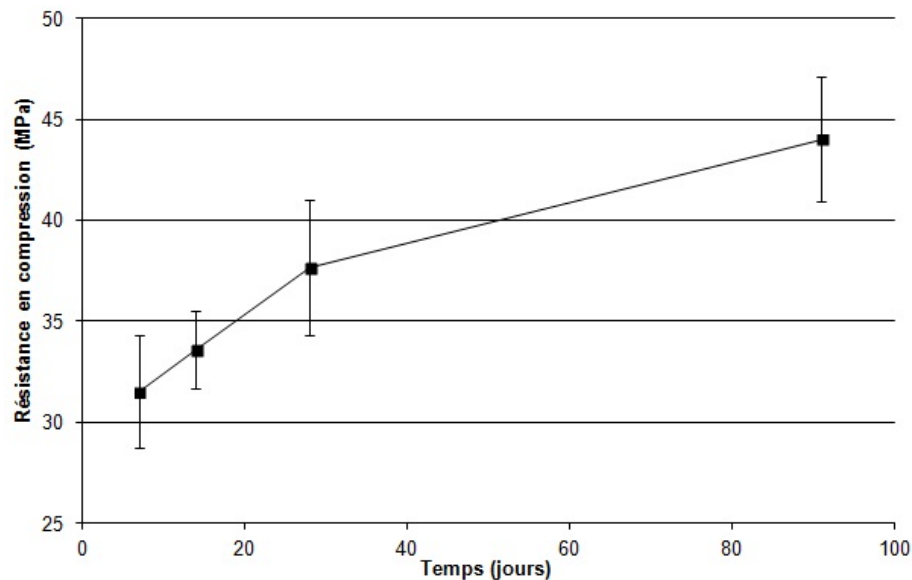


Figure 5.1 Moyennes des résistances en compression du mortier au cours du temps

## 5.2 Autocicatrisation naturelle

La partie suivante présente les résultats obtenus pour l'étude du phénomène d'autocicatrisation.

### 5.2.1 Évolution de l'ouverture apparente avec l'autocicatrisation naturelle

Les éprouvettes, après 28 jours de cure humide, sont fissurées et placées directement dans les systèmes d'humidification : à 100 % d'humidité relative à 23°C. L'eau se condense à la surface des éprouvettes.

La figure 5.2 montre l'évolution de l'ouverture apparente des fissures durant 6 mois de stockage humide.

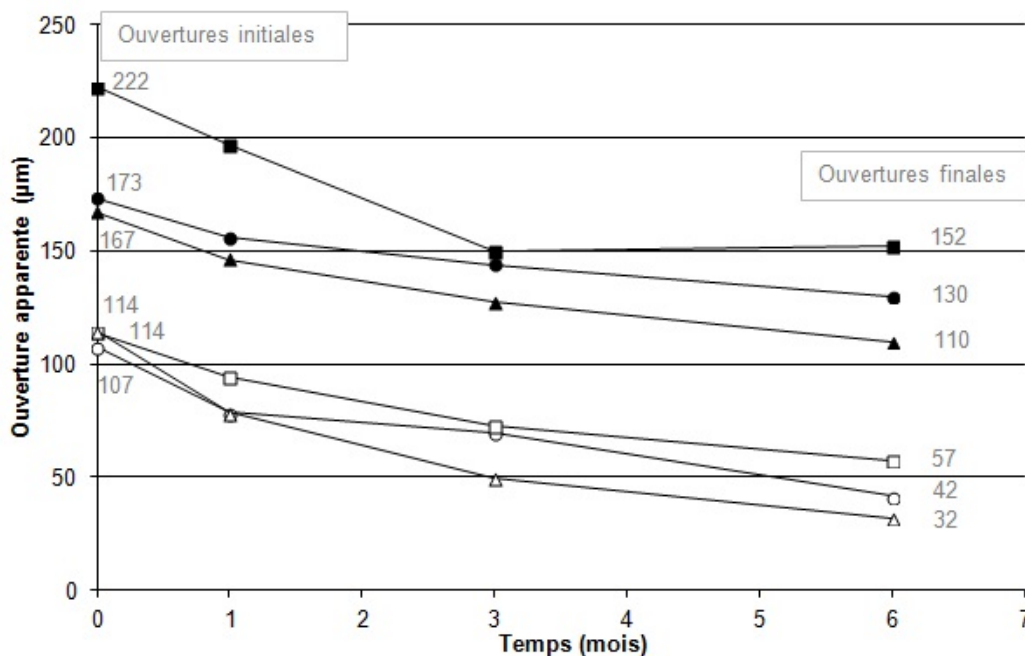


Figure 5.2 Évolution des ouvertures apparentes de fissures soumises à l'autocicatrisation naturelle.

Ces essais permettent d'évaluer la cinétique de l'autocicatrisation naturelle durant les 6 premiers mois après la fissuration initiale. Les courbes sont regroupées en deux familles. La première regroupe les plus fines fissures, inférieures à 150 µm et la deuxième regroupe les fissures larges de plus de 150 µm. L'autocicatrisation est systématiquement plus rapide durant le premier mois. Après 6 mois, l'autocicatrisation naturelle est plus complète dans le cas des fissures fines, pour lesquelles le taux apparent de cicatrisation est autour de

60 % en moyenne. Pour les fissures plus larges, le taux apparent de cicatrisation n'est que de 30 % en moyenne. Le tableau 5.1 présente les taux apparents de cicatrisation obtenus pour chaque éprouvette autocicatrisée naturellement. Globalement, ces résultats sont comparables à ceux obtenus, dans des conditions similaires, par Argouges et Gagné [7, 40].

<b>Autocicatrisation</b>	<b>N°1</b>	<b>N°2</b>	<b>N° 3</b>	<b>N°4</b>	<b>N°5</b>	<b>N°6</b>
Ouverture initiale ( $\mu\text{m}$ )	107	113	114	167	173	222
Ouverture finale ( $\mu\text{m}$ )	42	32	57	110	130	152
Taux apparent de cicatrisation (%)	61	72	50	34	25	32

Tableau 5.1 Ouvertures apparentes des fissures au sein de mortiers avant et après 6 mois d'autocicatrisation naturelle.

### 5.2.2 Observations au microscope électronique à balayage des mortiers fissurés autocicatrisés naturellement

Après 6 mois, les produits d'autocicatrisation dans les fissures sont principalement des cristaux de calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) formant très souvent une couche compacte sur les surfaces internes des fissures (figures 5.3 et 5.4). Les dépôts de calcite se retrouvent préférentiellement près de l'embouchure des fissures, au voisinage des faces exposées à l'environnement externe. Plus en profondeur, les dépôts sont moins denses et moins compacts. Ils sont composés d'un mélange de cristaux de calcite et d'ettringite ( $\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12}\cdot 26\text{H}_2\text{O}$ ) (figure 5.5 et 5.6). L'analyse EDS confirme la nature des produits formés, la calcite en figure 5.7 et l'ettringite en figure 5.8.

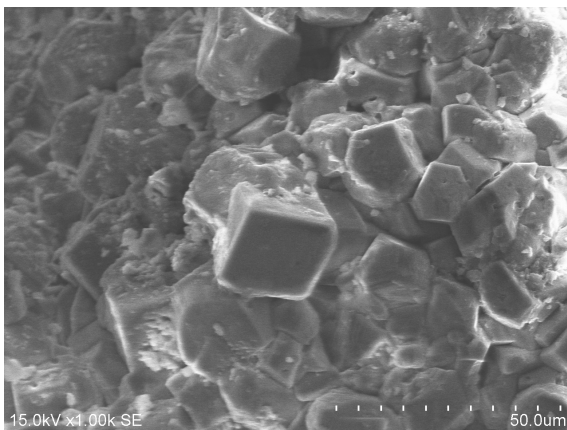


Figure 5.3 Calcite en gros plan dans une fissure large ( $222 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) à 6 mois.

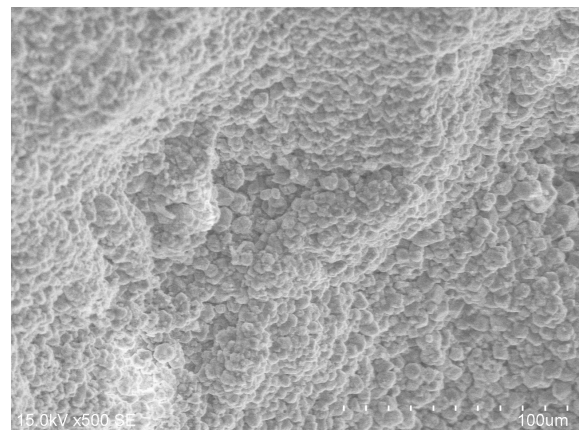


Figure 5.4 Calcite tapissant une fissure large ( $222 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) à 6 mois.

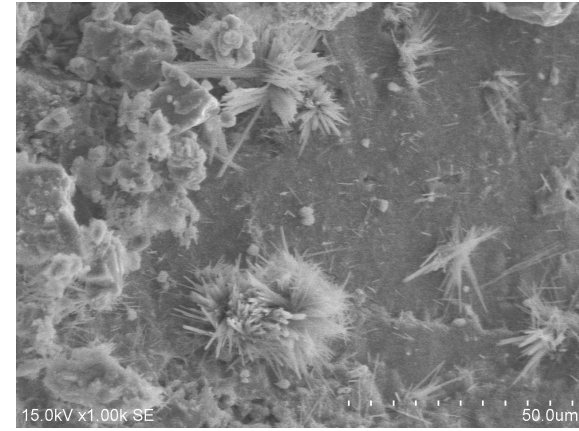


Figure 5.5 Ettringite isolée au centre d'une fissure fine (113  $\mu\text{m}$  d'ouverture initiale) à 6 mois.

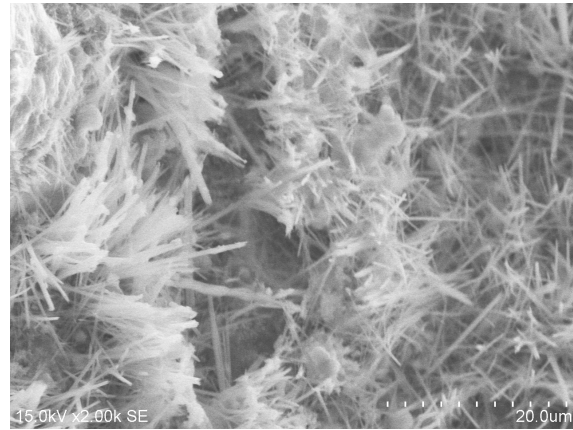


Figure 5.6 Ettringite tapisant le centre d'une fissure fine (113  $\mu\text{m}$  d'ouverture initiale) à 6 mois.

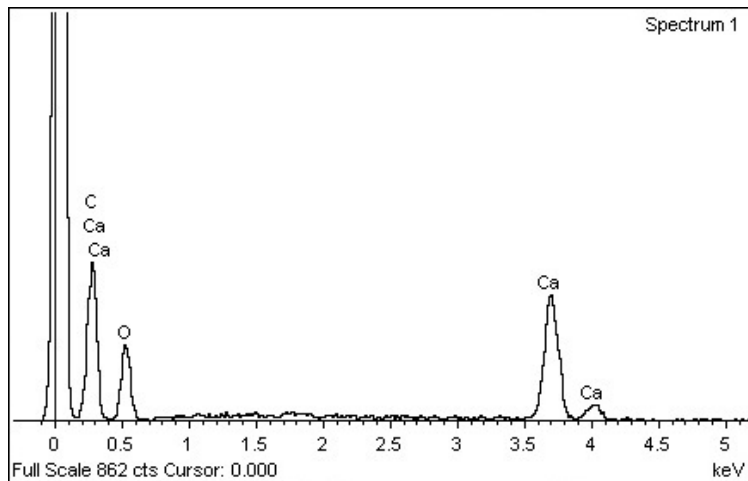


Figure 5.7 Analyse EDS des cristaux de calcite dans une fissure autocicatrisée.

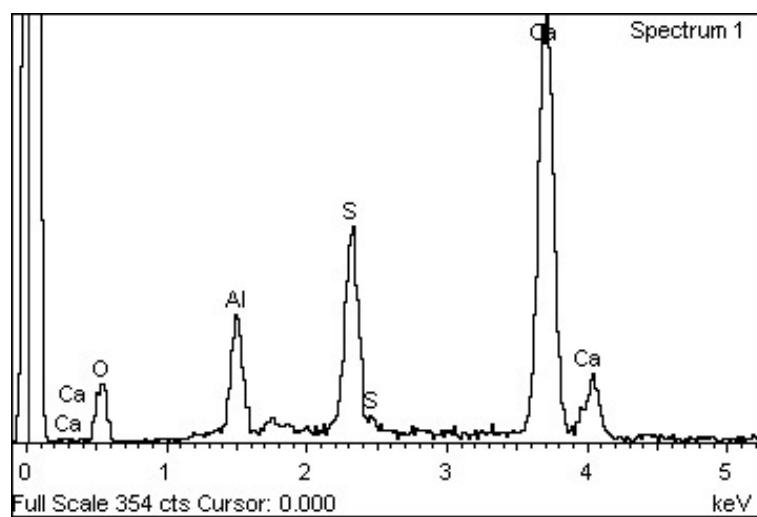


Figure 5.8 Analyse EDS des cristaux d'ettringite dans une fissure autocicatrisée.

## 5.3 Cicatrisation en présence de précurseurs

Comparativement aux essais précédents, les fissures, juste après fissuration, sont immergées 24 h dans une solution de précurseur : lactate de calcium, gluconate de calcium ou urée. L'objectif de ces essais est d'évaluer si les précurseurs permettent d'améliorer la cinétique de l'autocicatrisation naturelle.

À titre de comparaison, les courbes enveloppes des mesures obtenues avec le processus d'autocicatrisation naturelle sont reportées sur toutes les courbes suivantes. Il s'agit des deux courbes grises, correspondant aux évolutions des fissures larges et des fissures fines.

### 5.3.1 Évolution de l'ouverture apparente en présence de précurseurs

#### Lactate de calcium

Les courbes de la figure 5.9 montrent que la cicatrisation est globalement plus rapide et plus complète lorsque la fissure est imprégnée de lactate de calcium immédiatement après la fissuration. C'est principalement la cicatrisation des fissures larges, supérieures  $150 \mu\text{m}$ , qui est nettement meilleure en présence de lactate de calcium. Après 6 mois, l'ouverture apparente des fissures d'ouvertures initiales de  $195 \mu\text{m}$ ,  $208 \mu\text{m}$  et  $247 \mu\text{m}$  ont un taux apparent de cicatrisation  $C_{6\text{mois}}$  de plus de 70 %. Pour la même catégorie de fissures, le taux apparent de cicatrisation mesuré dans les mortiers soumis à l'autocicatrisation naturelle n'est que de 30 % en moyenne, comme le reporte la courbe grise correspondant aux fissures larges. Le lactate de calcium a relativement peu d'effets sur la cinétique d'autocicatrisation des fissures fines ( $124 \mu\text{m}$  et  $167 \mu\text{m}$ ). La fissure de  $167 \mu\text{m}$  a été classée comme fine du fait de la mesure visuelle au vidéomicroscope qui lui donne une valeur de  $136 \mu\text{m}$ .

Deux fissures larges ont été suivies sur une période de 11 mois. Ces essais montrent un prolongement de la tendance, une cicatrisation qui continue à un rythme plus lent.

Le tableau 5.2 reprend les taux apparents de cicatrisation obtenus pour toutes les fissures imprégnées de lactate de calcium.

<b>Lactate de calcium</b>	<b>N°1</b>	<b>N°2</b>	<b>N°3</b>	<b>N°4</b>	<b>N°5</b>
Ouverture initiale ( $\mu\text{m}$ )	124	167	195	208	247
Ouverture finale ( $\mu\text{m}$ )	27	57	67	45	32
Taux apparent de cicatrisation (%)	78	66	66	80	87

Tableau 5.2 Évolution des ouvertures apparentes des fissures imprégnées de lactate de calcium.



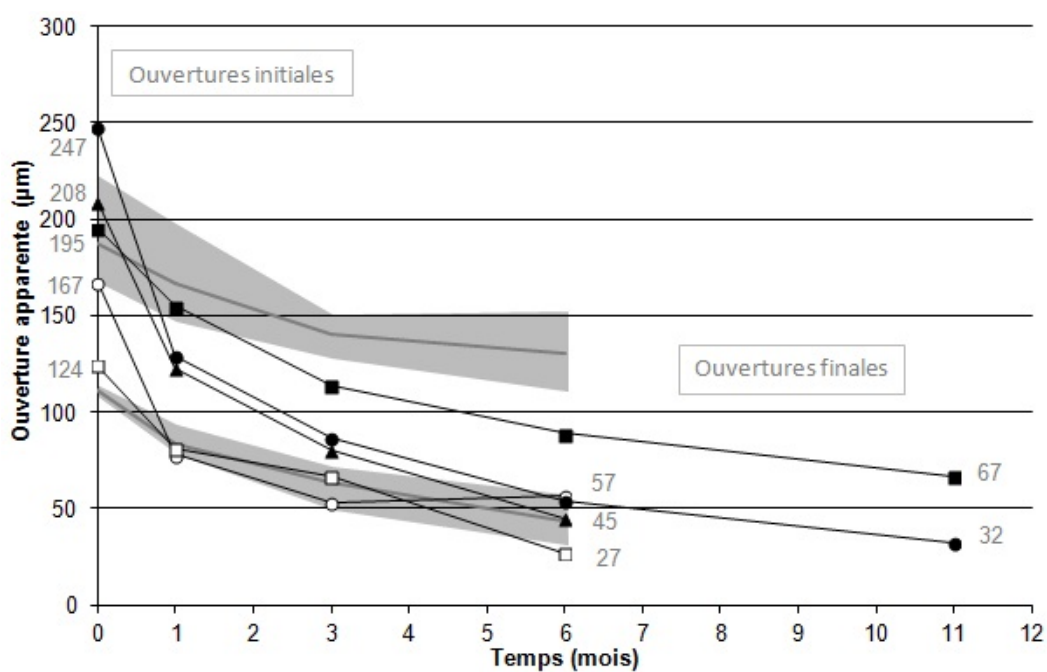


Figure 5.9 Évolution des ouvertures apparentes de fissures imprégnées de lactate de calcium

### Gluconate de calcium

L'influence du gluconate de calcium sur la cinétique de cicatrisation est présentée sur la figure 5.10. La cicatrisation des fissures larges, supérieures  $150 \mu\text{m}$ , est nettement meilleure en présence de gluconate de calcium. Après 6 mois, les fissures d'ouverture initiale de  $177 \mu\text{m}$ ,  $182 \mu\text{m}$  et  $192 \mu\text{m}$  ont un taux apparent de cicatrisation de 60 à 70 %. Pour la même catégorie de fissures, le taux apparent de cicatrisation mesuré pour les mortiers autocicatrisés naturellement n'est que de 30 % en moyenne (courbe grise supérieure). Le gluconate de calcium a relativement peu d'effets sur la cinétique d'autocicatrisation de la fissure fine ( $127 \mu\text{m}$ ). L'évolution de la fissure, illustrée par la courbe aux marqueurs blancs, suit une tendance comparable à l'évolution des fissures fines des mortiers autocicatrisés naturellement (courbe grise inférieure). Globalement, les courbes de la figure 5.10 suggèrent que le gluconate de calcium a un effet similaire à celui du lactate de calcium (figure 5.9).

De la même façon qu'avec le lactate de calcium, une fissure large a été suivie jusqu'à 11 mois. La cicatrisation continue sur cette période, mais avec une cinétique plus lente.

Le tableau 5.2 reprend les taux apparents de cicatrisation obtenus pour toutes les fissures imprégnées de gluconate de calcium.

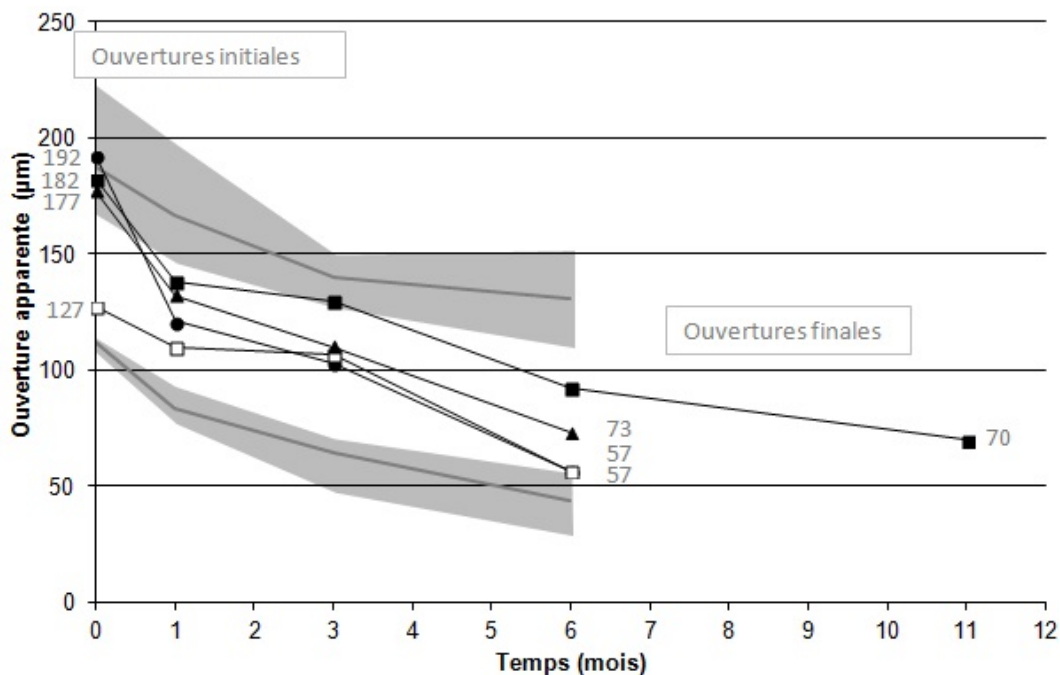


Figure 5.10 Évolution des ouvertures apparentes de fissures imprégnées de gluconate de calcium

---

<b>Gluconate de calcium</b>	<b>N°1</b>	<b>N°2</b>	<b>N°3</b>	<b>N°4</b>
Ouverture initiale ( $\mu\text{m}$ )	117	177	182	192
Ouverture finale ( $\mu\text{m}$ )	57	73	70	57
Taux apparent de cicatrisation (%)	51	59	62	70

---

Tableau 5.3 Évolution des ouvertures apparentes des fissures imprégnées de gluconate de calcium.

**Urée**

La figure 5.11 représente l'évolution des ouvertures apparentes des fissures immergées dans l'urée après fissuration. Seules deux fissures larges ont été observées durant 11 mois. À l'inverse des deux autres précurseurs, l'urée ne semble pas améliorer le processus de cicatrisation, les deux fissures semblent suivre une évolution comparable à celle des fissures larges soumises au seul processus d'autocicatrisation, représenté par la courbe grise.

Le tableau 5.4 reprend les taux apparent de cicatrisation obtenus pour toutes les fissures imprégnées avec l'urée.

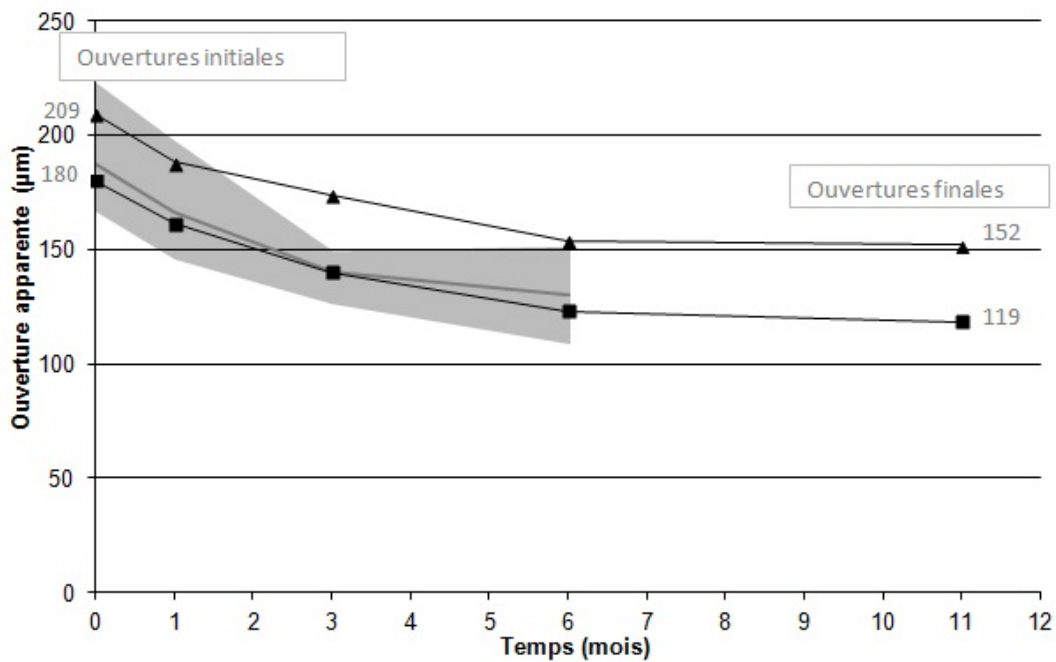


Figure 5.11 Évolution des ouvertures apparentes de fissures imprégnées urée

Urée	N°1	N°2
Ouverture initiale (µm)	209	180
Ouverture finale (µm)	152	119
Taux apparent de cicatrisation (%)	27	34

Tableau 5.4 Évolution des ouvertures apparentes des fissures imprégnées d'urée.

### 5.3.2 Observations au microscope électronique à balayage des mortiers fissurés imprégnés de précurseurs

Après 6 mois d'essai, des observations au MEB montrent que les produits d'autocicatrisation sont systématiquement composés d'ettringite. Toutes les surfaces internes des fissures imprégnées de lactate de calcium (figures 5.12 et 5.13) ou de gluconate de calcium (figures 5.17 et 5.18) sont recouvertes majoritairement d'ettringite comme l'atteste l'analyse EDS (figure 5.14) avec quelques zones où des cristaux de calcite sont visibles (figures 5.15 et 5.16). L'ettringite est présente autant dans les fissures larges (figures 5.12 et 5.17) que dans les fissures plus fines (figures 5.13 et 5.18). Il n'y a pas de différences évidentes entre les produits d'autocicatrisation formés près de l'embouchure des fissures et ceux formés plus profondément sous la surface exposée à l'environnement externe. L'ettringite se dépose soit sous forme d'aiguilles formant une couche moins compacte (figures 5.12 et 5.18), soit sous une forme plus amorphe et plus dense (figures 5.13 et 5.17).

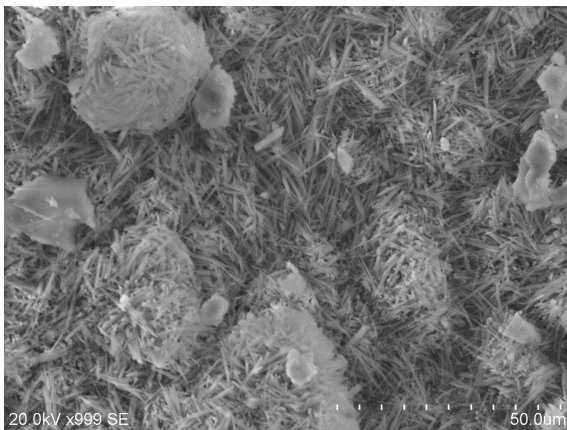


Figure 5.12 Ettringite dans une fissure large (208  $\mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de lactate de calcium à 6 mois.

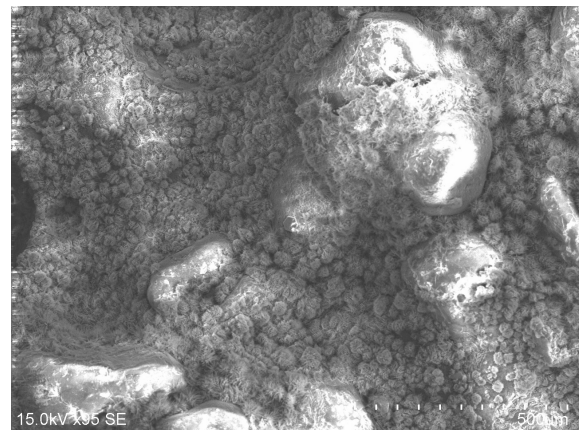


Figure 5.13 Ettringite dans une fissure fine (124  $\mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de lactate de calcium à 6 mois.

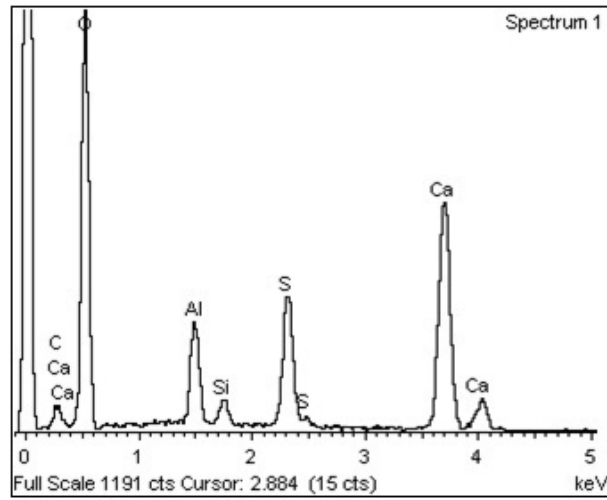


Figure 5.14 Analyse EDS de l'ettringite dans la fissure large présentée en figure 5.12.

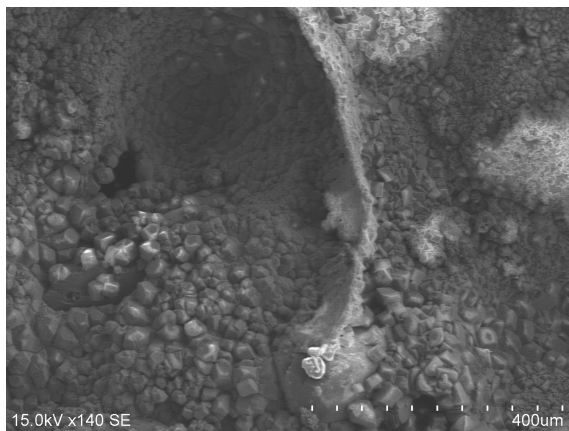


Figure 5.15 Calcite dans une fissure large (222  $\mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de lactate de calcium à 6 mois.

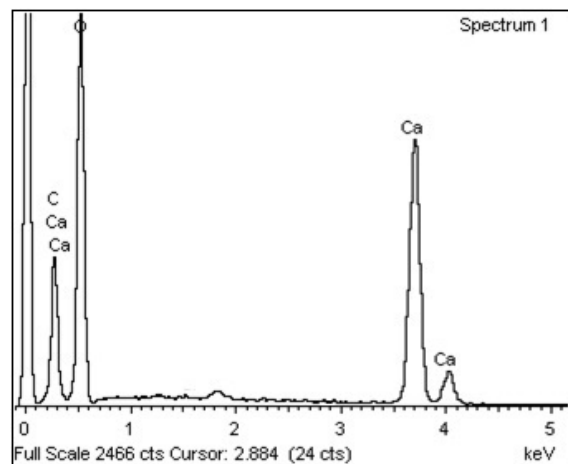


Figure 5.16 Analyse EDS de la calcite dans la fissure large présentée en figure 5.15.

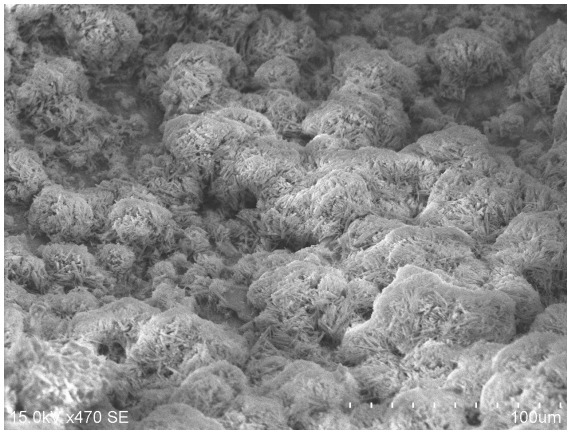


Figure 5.17 Ettringite dans une fissure large ( $177 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois.

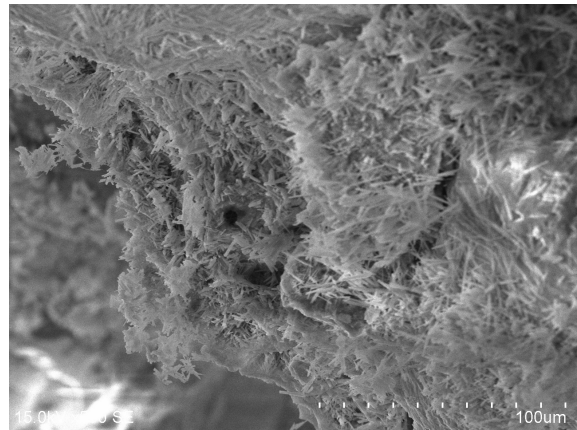


Figure 5.18 Ettringite dans une fissure fine ( $127 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois.

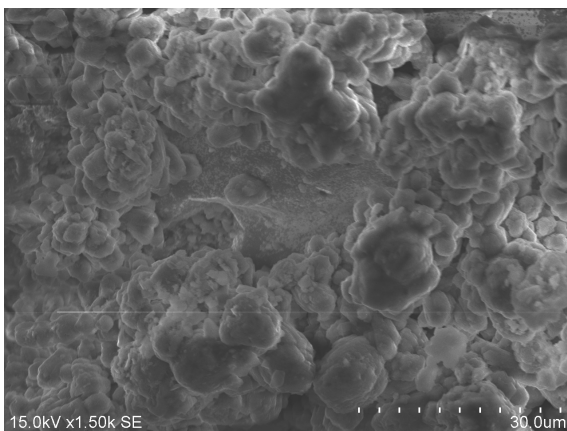


Figure 5.19 Calcite dans une fissure large ( $192 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois.

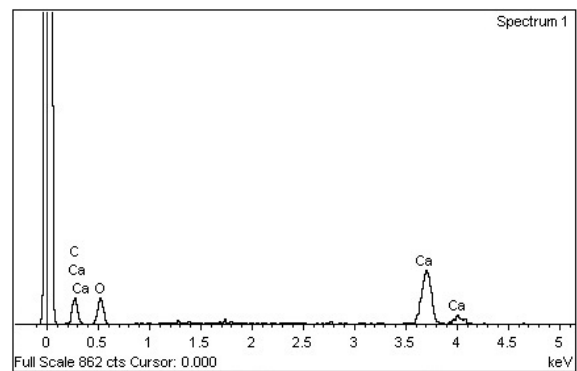


Figure 5.20 Analyse EDS de la calcite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 6 mois.

Les observations dans les fissures cicatrisées après 11 mois montrent en majorité de la calcite, quel que soit le précurseur utilisé, lactate de calcium (figures 5.21 et 5.23 ), gluconate de calcium (figure 5.29) ou urée (figure 5.33). Dans les fissures observées après 6 mois d'essai, l'ettringite était majoritaire. L'ettringite est encore présente après 11 mois, recouvrant la surface des fissures dans certaines zones. Sa présence est visible pour les fissures imprégnées de lactate de calcium (figures 5.22 et 5.24), de gluconate de calcium (figure 5.30) ou d'urée (figure 5.34).

L'ettringite et la calcite cohabitent sur certaines régions (figures 5.25 et 5.31) respectivement avec le lactate de calcium et le gluconate de calcium. Les analyse EDS (figures 5.32 et 5.26) confirment la nature des cristaux observés.

La présence de portlandite est fréquemment observée à proximité des cristaux d'ettringite, comme le montre la figure 5.27. L'analyse EDS confirme la nature de la portlandite  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (figure 5.28).

La figure 5.31 montre également la présence d'un gel de C-S-H, sur lequel quelques cristaux de calcite et d'ettringite se sont formés. L'analyse EDS confirme la composition élémentaire des structures visibles (figure 5.32).

### Imprégnation par du lactate de calcium

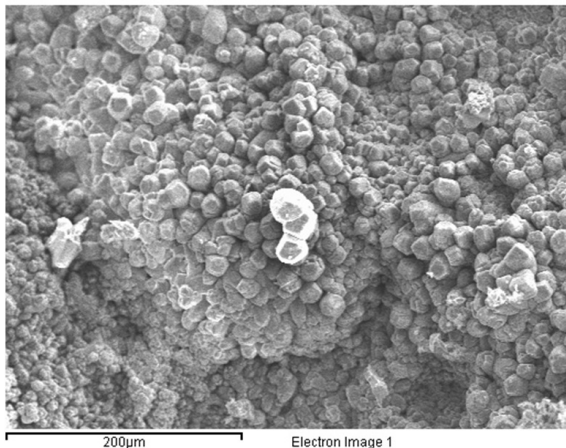


Figure 5.21 Calcite dans une fissure large ( $247 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

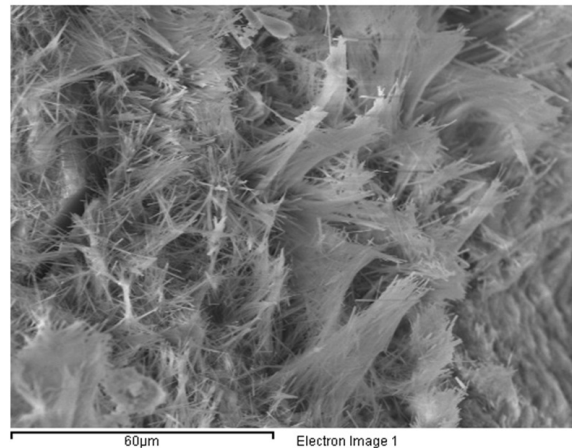


Figure 5.22 Ettringite dans une fissure large ( $247 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

---



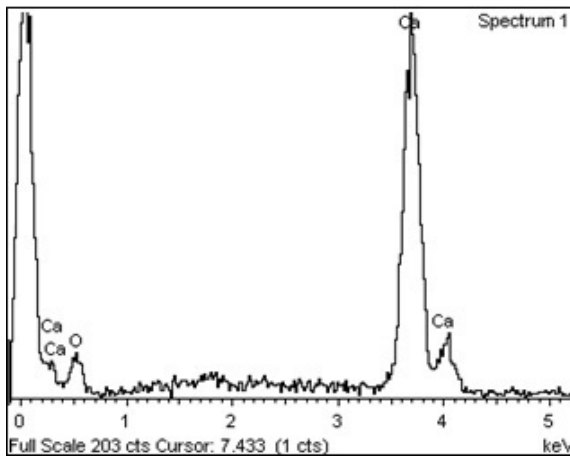


Figure 5.23 Analyse EDS de la calcite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

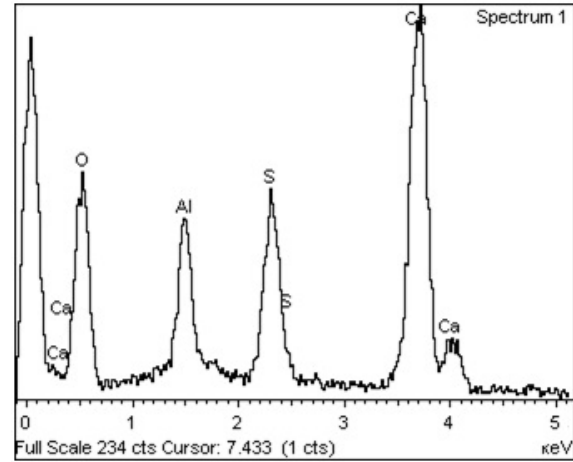


Figure 5.24 Analyse EDS de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

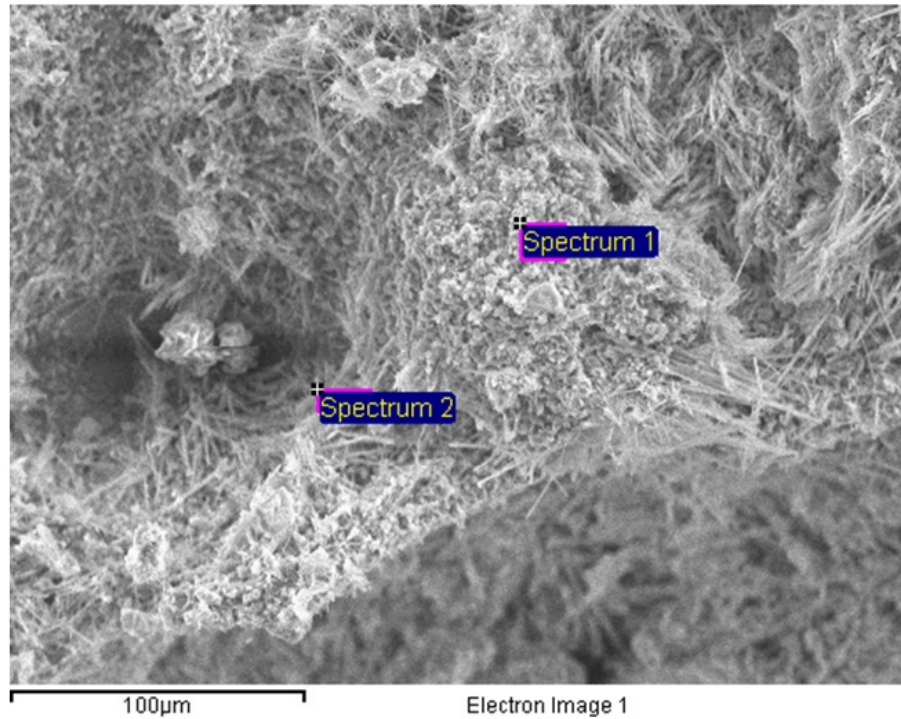


Figure 5.25 Calcite et ettringite dans une fissure large (247  $\mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

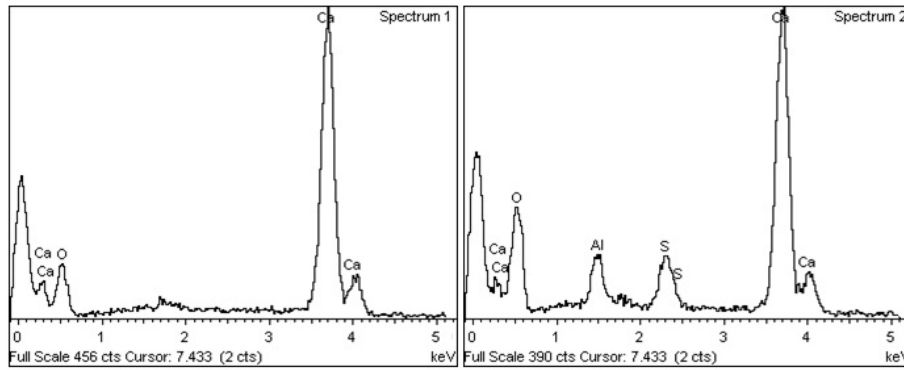


Figure 5.26 Analyse EDS de la calcite et de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

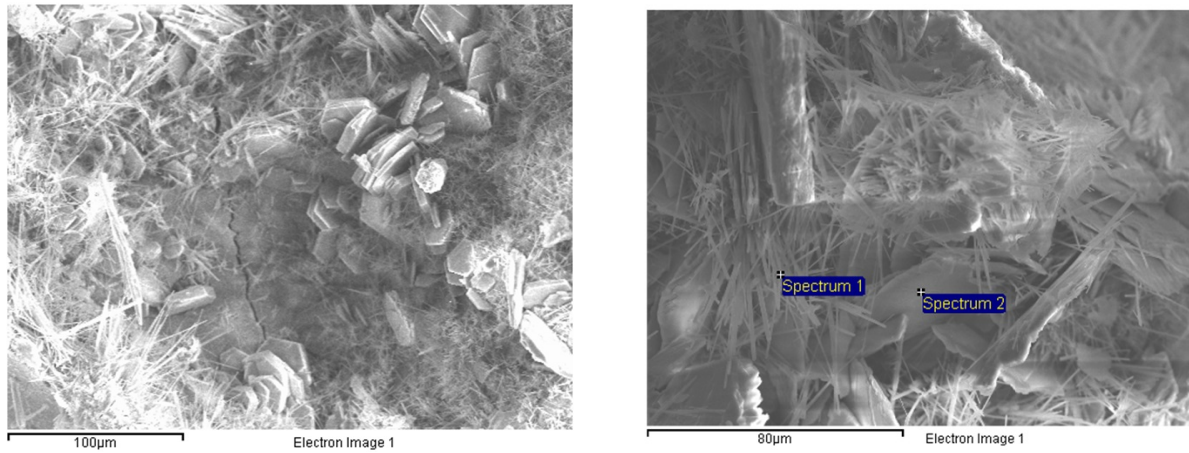


Figure 5.27 Portlandite et ettringite dans une fissure large (172 µm d'ouverture initiale) imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

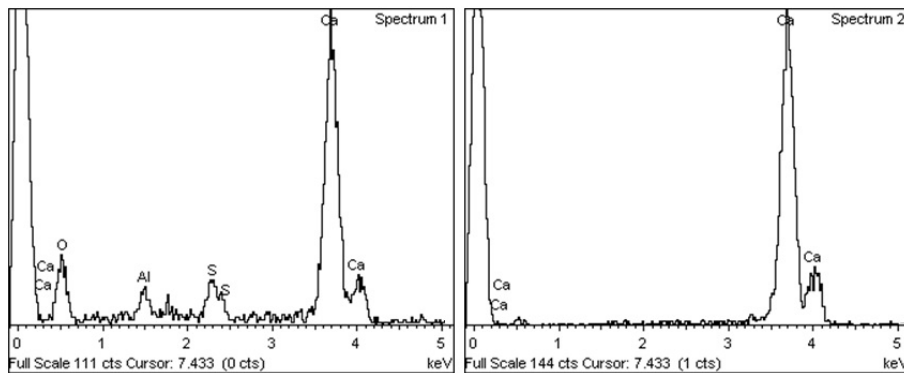


Figure 5.28 Analyse EDS de la portlandite et de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de lactate de calcium à 11 mois.

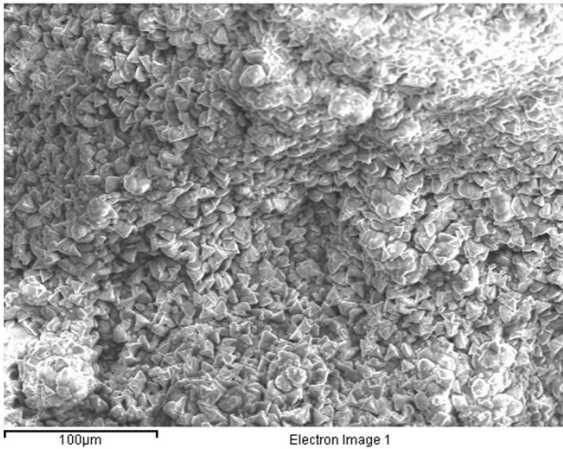
**Imprégnation par du gluconate de calcium**

Figure 5.29 Calcite dans une fissure large ( $182 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois.

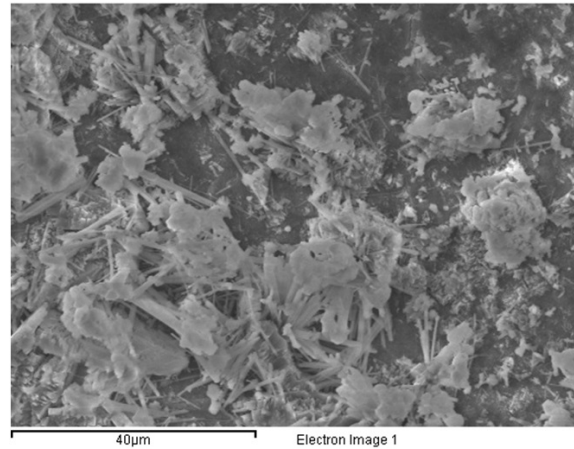


Figure 5.30 Ettringite dans une fissure large ( $182 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois.

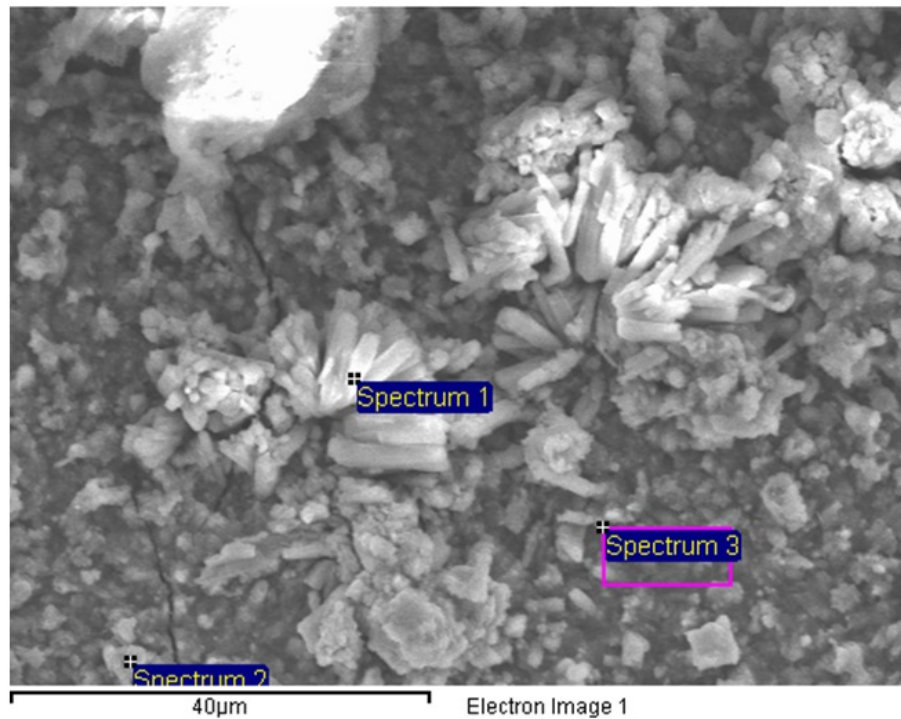


Figure 5.31 Calcite et ettringite dans une fissure large ( $182 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois.

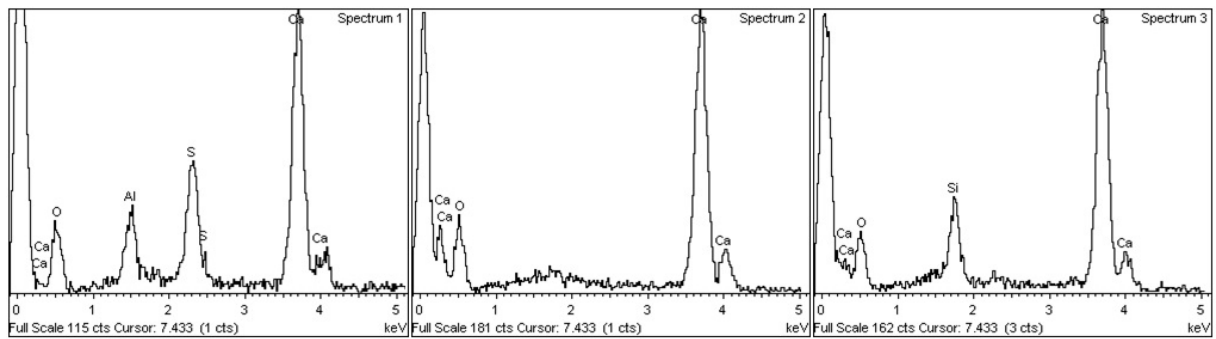


Figure 5.32 Analyse EDS de la calcite et de l'ettringite dans une fissure large imprégnée de gluconate de calcium à 11 mois

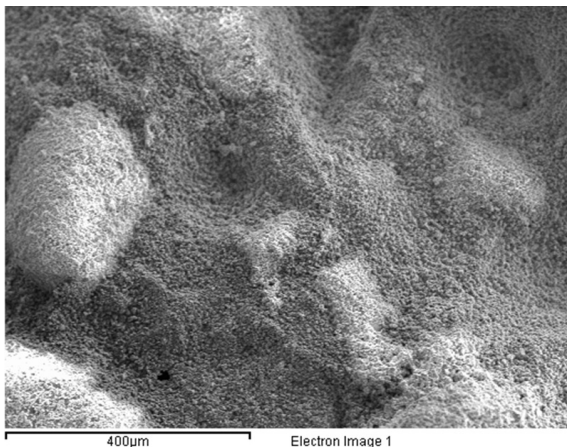
**Imprégnation par de l'urée**

Figure 5.33 Calcite dans une fissure large ( $180 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée d'urée à 11 mois.

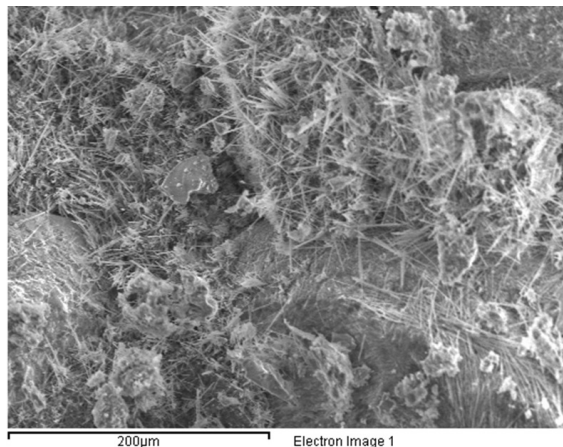


Figure 5.34 Ettringite dans une fissure large ( $180 \mu\text{m}$  d'ouverture initiale) imprégnée d'urée à 11 mois.

## 5.4 Cicatrisation sur des fissures pré-carbonatées

Les essais précédents suivent la cicatrisation de mortiers fraîchement fissurés. Le traitement des ouvrages dans la réalité est souvent plus tardif, les fissures sont généralement déjà carbonatées. Suivre l'évolution de fissures carbonatées permet de s'approcher des conditions réelles d'application d'une solution de traitement. Le comportement et la cinétique de cicatrisation, avec et sans précurseur, devraient être assez différents et plus lents qu'avec des fissures fraîchement formées.

Deux types d'essais sont menés :

- Des essais sur éprouvettes de mortier fissurées et carbonatées, sans précurseur ;
- Des essais sur éprouvettes de mortier fissurées et carbonatées, avec une imprégnation de lactate de calcium.

Le lactate de calcium étant le précurseur qui montre le meilleur potentiel de cicatrisation, les essais ont été réalisés en utilisant uniquement ce précurseur.

La figure 5.35 montre l'évolution de l'ouverture apparente des fissures carbonatées, sans précurseur (courbes avec les marqueurs noir) et avec immersion dans le lactate de calcium (courbes avec les marqueurs blanc).

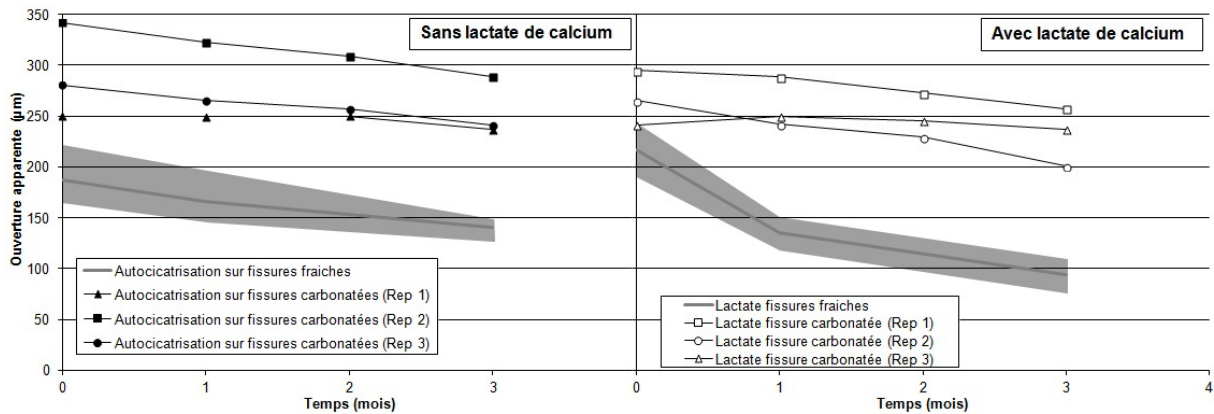


Figure 5.35 Évolution des ouvertures apparentes de fissures carbonatées.

La réduction de l'ouverture apparente des fissures carbonatées est plus lente que celle des fissures fraîches. Le tableau 5.5 présente les taux apparents de cicatrisation pour chacune des éprouvettes de mortier. Les ouvertures initiales des fissures carbonatées sont supérieures à celles des fissures fraîches, la comparaison des taux apparents de cicatrisation n'est pas pertinente. Néanmoins, il apparaît que le précurseur, le lactate de calcium

n'offre pas d'amélioration. Les taux apparents de cicatrisation entre les fissures carbonatées traitées avec et sans précurseur sont semblables.

<b>Eprouvette carbonatée</b>	<b>N°1</b>	<b>N°2</b>	<b>N° 3</b>
<b>Autocicatrisée naturellement</b>			
Ouverture initiale ( $\mu\text{m}$ )	250	342	281
Ouverture finale ( $\mu\text{m}$ )	236	288	241
Réduction (%)	5	16	14
<b>Lactate de calcium</b>			
Ouverture initiale ( $\mu\text{m}$ )	295	266	241
Ouverture finale ( $\mu\text{m}$ )	270	190	216
Taux apparent de cicatrisation (%)	13	24	2

Tableau 5.5 Évolution des ouvertures apparentes des fissures carbonatées.

## 5.5 Précipitation du lactate de calcium sur mortier

Afin de comprendre l'effet des précurseurs, plus précisément le lactate de calcium, des observations supplémentaires ont été effectuées sur les mortiers. Des morceaux de mortiers, carbonatés ou fraîchement fracturés, ont été immergés dans la solution de lactate de calcium (79 g/L) puis séchés à l'air libre 24 h. Une semaine plus tard, les échantillons ainsi traités sont observés au microscope électronique à balayage à pression variable. L'objectif est d'observer la morphologie du lactate de calcium précipité au contact du matériau cimentaire.

En plus de la précipitation sur mortier, la solution de lactate de calcium a été également déposée sur une feuille d'aluminium et laissée sécher 24 h. L'observation au microscope du précipité formé permet une comparaison avec le précipité formé sur les mortiers.

La figure 5.36 montre le lactate de calcium précipité sur la feuille d'aluminium. La structure est fibreuse, de fines fibres peuvent s'agglomérer en faisceaux. Les pics apparaissant à l'analyse EDS correspondent au calcium et au carbone, les éléments chimiques constituant le lactate de calcium,  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$ .

Le lactate de calcium précipité sur le mortier carbonaté ou fraîchement fracturé a une morphologie assez différente du lactate de calcium précipité sur la feuille d'aluminium. Les figures 5.37 et 5.38 montrent des structures en aiguilles ou coniques, qui hérissent la surface du mortier. Les analyses EDS (figures 5.39 et 5.44) montrent cependant les mêmes éléments chimiques que pour le précipité de lactate de calcium formé sur l'aluminium :

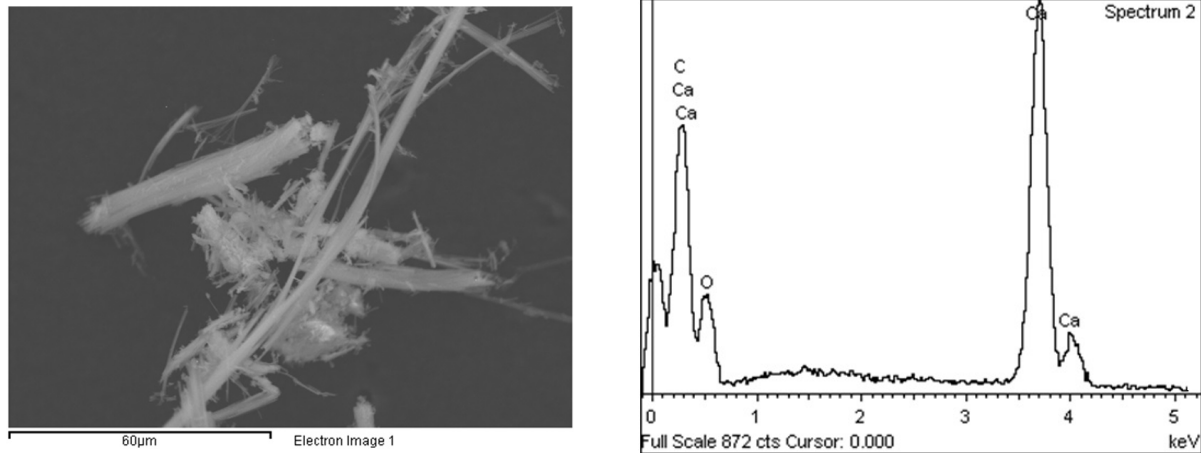


Figure 5.36 Observation au MEB du lactate de calcium précipité sur une feuille d'aluminium et analyse EDS correspondante.

carbone et calcium. La forme ainsi que la composition chimique du lactate de calcium sont donc différentes de celles des structures observées lors du processus de cicatrisation.

Les structures cristallines formées dans les fissures fraîches de mortiers cicatrisés avec lactate de calcium, se présentent en aiguilles plus fines. L'analyse EDS de ces cristaux a montré la présence de calcium, mais aussi de soufre et d'aluminium confirmant qu'il s'agit bien d'ettringite ( $\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12}\cdot 26\text{H}_2\text{O}$ ).

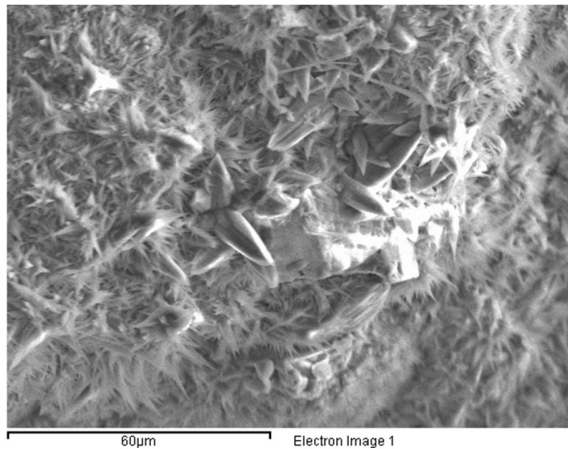


Figure 5.37 Lactate de calcium précipité sur mortier préalablement carbonaté.

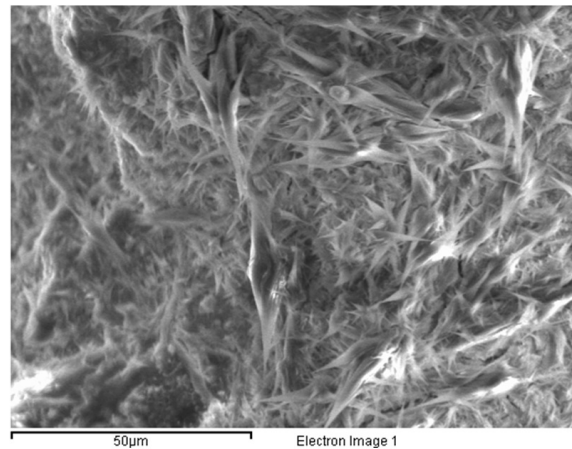


Figure 5.38 Lactate de calcium précipité sur mortier fraîchement fracturé.

Il a été constaté sur les mortiers fraîchement fracturés des structures identifiées comme étant de l'ettringite (figures 5.41 et 5.42). Ces structures n'ont pas été observées sur le mortier carbonaté.



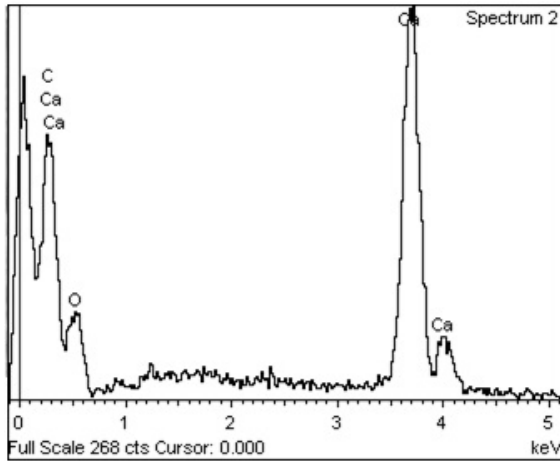


Figure 5.39 Analyse EDS du lactate de calcium précipité sur mortier carbonaté.

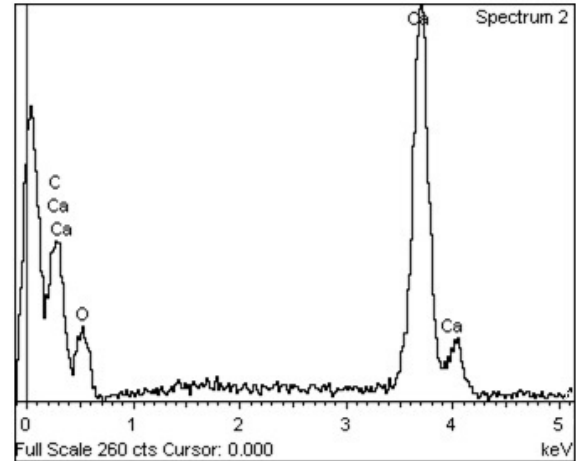


Figure 5.40 Analyse EDS du lactate de calcium précipité sur mortier fraîchement fracturé.

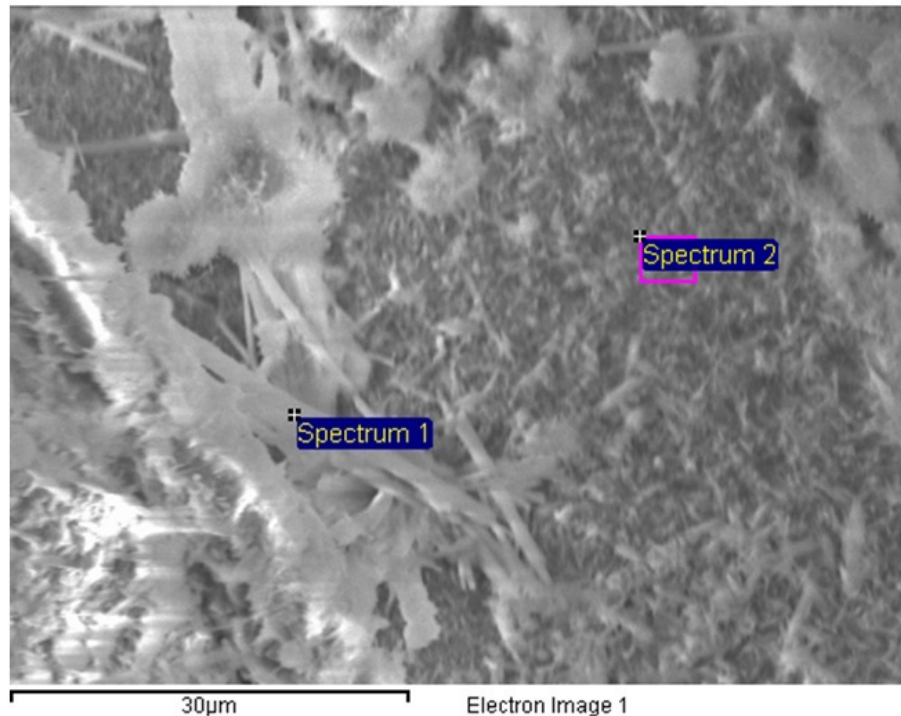


Figure 5.41 Cristaux d'ettringite sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium.

Il apparaît également sur les mortiers fraîchement fracturés des structures en aiguilles, qui tapissent la surface et dont la composition élémentaire semble être un mélange des composés du lactate de calcium, calcium et carbone, avec les éléments de la matrice cimentaire : calcium, soufre, aluminium et silicium.

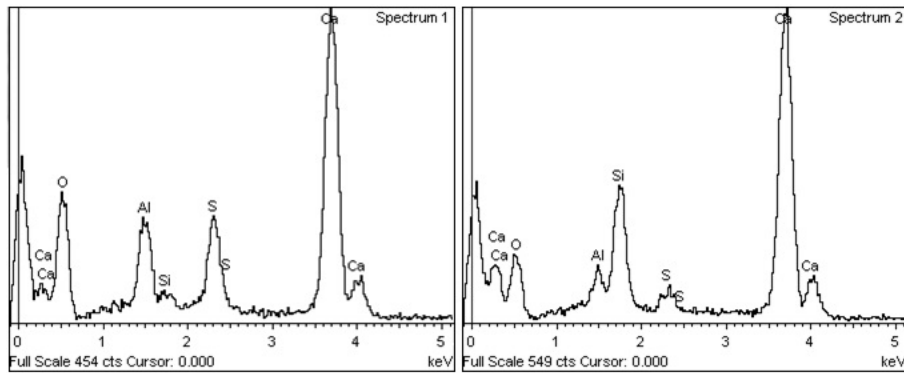


Figure 5.42 Analyse EDS des produits formés sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium.

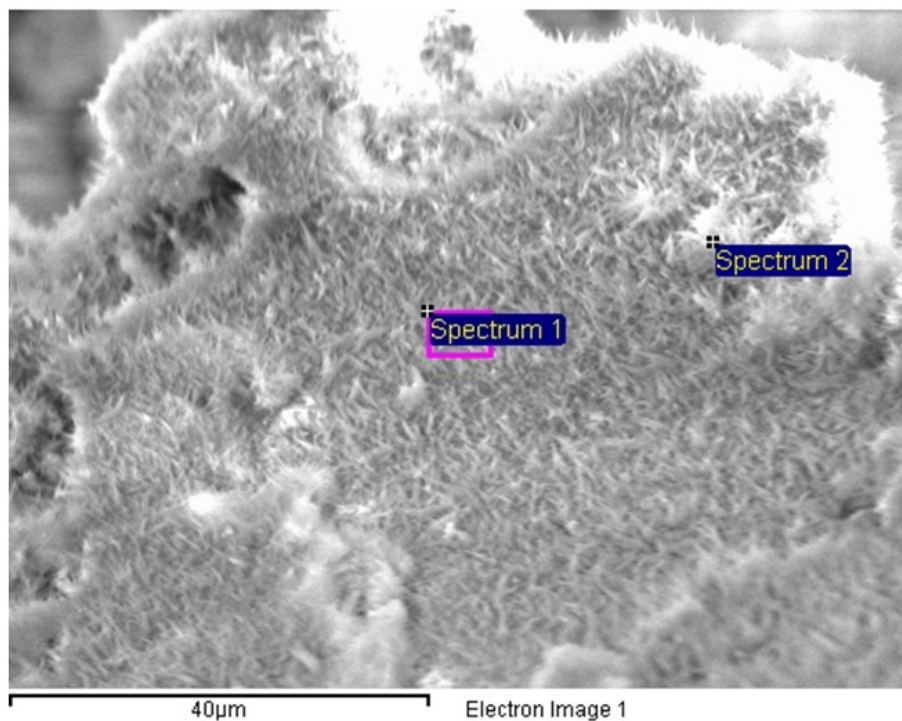


Figure 5.43 Formation de structures en aiguilles sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium.

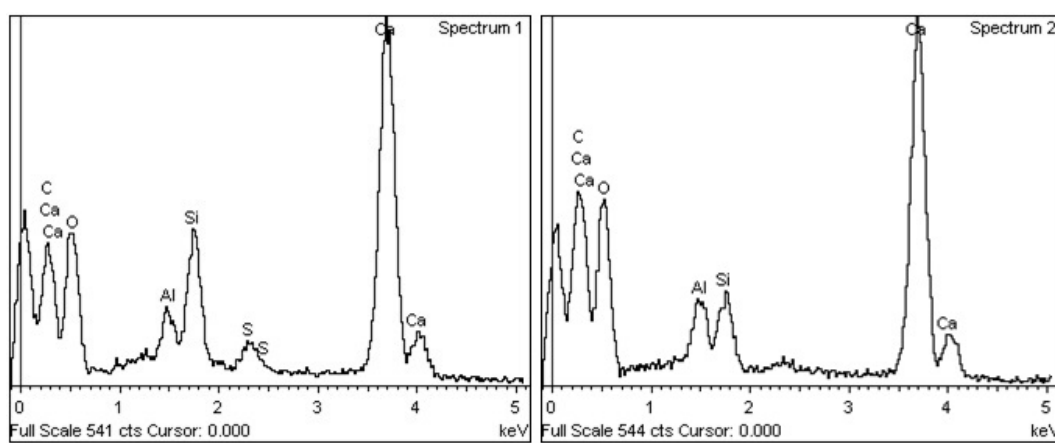


Figure 5.44 Analyse EDS des structures en aiguilles sur les mortiers fraîchement fracturés en présence de lactate de calcium.

## 5.6 Discussion sur les essais de cicatrisation abiotiques des mortiers

### 5.6.1 Évolution des ouvertures apparentes des fissures fraîches

Le tableau 5.6 résume l'évolution des ouvertures apparentes pour l'ensemble des mortiers fissurés non carbonatés.

Précurseur	Type de fissure	Ouverture initiale ( $\mu\text{m}$ )	Débit d'air (L/min)					Ouverture apparente ( $\mu\text{m}$ )					$C_t$ (%)		
			Mois après fissuration					Mois après fissuration					Au final	Moyenne à 6 mois	
			0	1	3	6	11	0	1	3	6	11			
Témoins	Fine	95	3,47	1,60	0,61	0,22	-	114	78	50	32	-	72	61	
		99	3,06	1,61	1,25	0,41	-	107	79	70	42	-	61		
		102	3,45	2,34	1,36	0,82	-	114	94	73	57	-	50		
	Large	183	8,03	6,53	5,54	4,50	-	173	156	144	130	-	25		
		226	13,14	10,40	6,02	6,19	-	222	197	150	152	-	32		
Gluconate de calcium	Fine	117	4,32	3,22	3,04	0,80	-	127	110	107	57	-	55	55	
		172	9,87	3,91	2,82	0,80	-	192	121	103	57	-	70		
	Large	179	8,40	4,67	3,22	1,38	-	177	132	110	73	-	59		59
		180	8,88	5,11	4,49	2,26	1,25	182	138	130	93	70	62		
Lactate de calcium	Fine	105	4,11	1,71	1,13	0,15	-	124	81	66	27	-	78	72	
		136	7,48	1,59	0,70	0,81	-	167	78	53	57	-	66		
	Large	195	10,18	6,45	3,45	2,08	1,14	195	155	114	89	67	66		
		226	16,18	4,46	1,96	0,71	0,22	247	129	86	54	32	87		
Urée	Large	200	8,69	6,96	5,25	4,05	3,75	180	161	140	123	119	34	29	
		212	11,67	9,47	8,11	6,35	6,18	209	188	174	154	152	27		

Tableau 5.6 Tableau de synthèse des mesures des ouvertures apparentes.

La mesure de l'ouverture initiale est obtenue par des observations au vidéo-microscope, les mesures suivantes sont obtenues avec les mesures de débits d'air. La mesure initiale et la mesure à 0 mois obtenue via la mesure de débit devrait correspondre exactement. Cependant, l'évaluation de l'ouverture de la fissure via le débit d'air est sensible à la rugosité et à la géométrie irrégulière des fissures. La figure 5.45 montre la corrélation entre les deux méthodes de mesure. Le coefficient de détermination proche de 0,90 indique une bonne correspondance entre les mesures par débit d'air et les mesures visuelles.

En comparant les différents type d'essais, il se dégage des informations sur le comportement et la cinétique de cicatrisation pour les différents traitements.

Les moyennes du taux apparent de cicatrisation  $C_t$  à 6 mois, présentées dans le tableau 5.6, font ressortir des différences dans les capacités de cicatrisation des mortiers en fonction du type de fissure, large ou fine, et en fonction du type de précurseur utilisé.

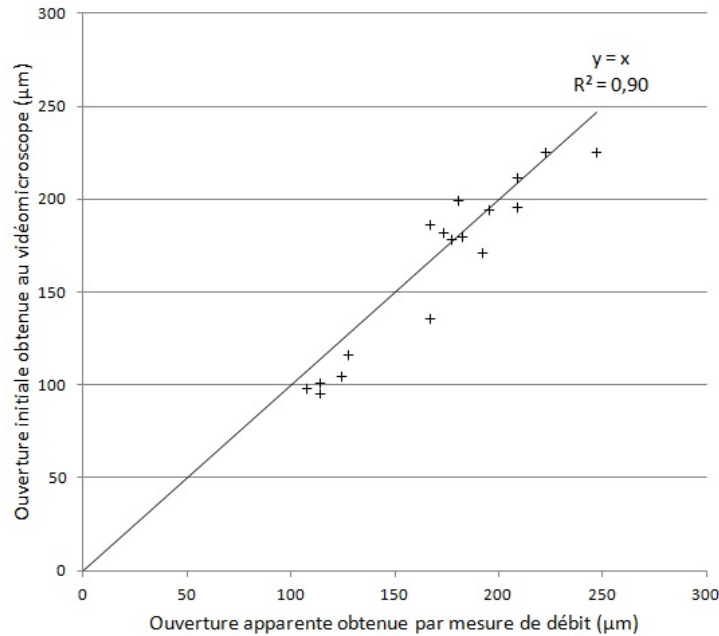


Figure 5.45 Corrélation entre les différents types de mesures de l'ouverture des fissures.

Les diagrammes présentés en figures 5.46 et 5.47 permettent de visualiser l'efficacité des différents traitement. Sur la figure 5.46, les barres représentent les moyennes des épaisseurs apparentes de cicatrisation ( $E_t$ ) des fissures en  $\mu\text{m}$ . Sur la figure 5.47, les barres représentent les moyennes des taux apparents de cicatrisation  $C_t$  de fissures à 6 mois.

Pour les éprouvettes autocicatrisée naturellement à 6 mois, l'épaisseur apparente de la couche de cicatrisation est comparable pour les fissures fines et les fissures larges (respectivement  $34 \mu\text{m}$  et  $28 \mu\text{m}$ ) compte tenu des écarts-types. Cependant, en tenant compte de l'ouverture initiale, le taux apparent de cicatrisation des fissures larges paraît deux fois plus faible que le taux apparent de cicatrisation des fissures fines. Dans le cas des fissures fines, l'autocicatrisation naturelle donne un fort potentiel de récupération,  $C_{6\text{mois}} = 61 \%$ , pour les fissures larges  $C_{6\text{mois}}$  n'est que de  $30 \%$ . Un taux apparent de cicatrisation des fissures larges dans la même proportion que pour les fissures fines exige une couche de produits de cicatrisation plus importante. Par exemple, un taux apparent de cicatrisation de  $1 \%$  pour une fissure de  $200 \mu\text{m}$  demande une couche de produits de cicatrisation de  $1 \mu\text{m}$  d'épaisseur sur chacune des deux surfaces internes de la fissure. En comparaison, il suffit de  $0,5 \mu\text{m}$  d'épaisseur sur chaque face pour un taux apparent de cicatrisation identique de  $1 \%$  pour une fissure de  $100 \mu\text{m}$ . Ainsi, la comparaison des taux apparents de cicatrisation entre deux fissures ne prend réellement de sens que pour des fissures d'ouvertures initiales semblables.

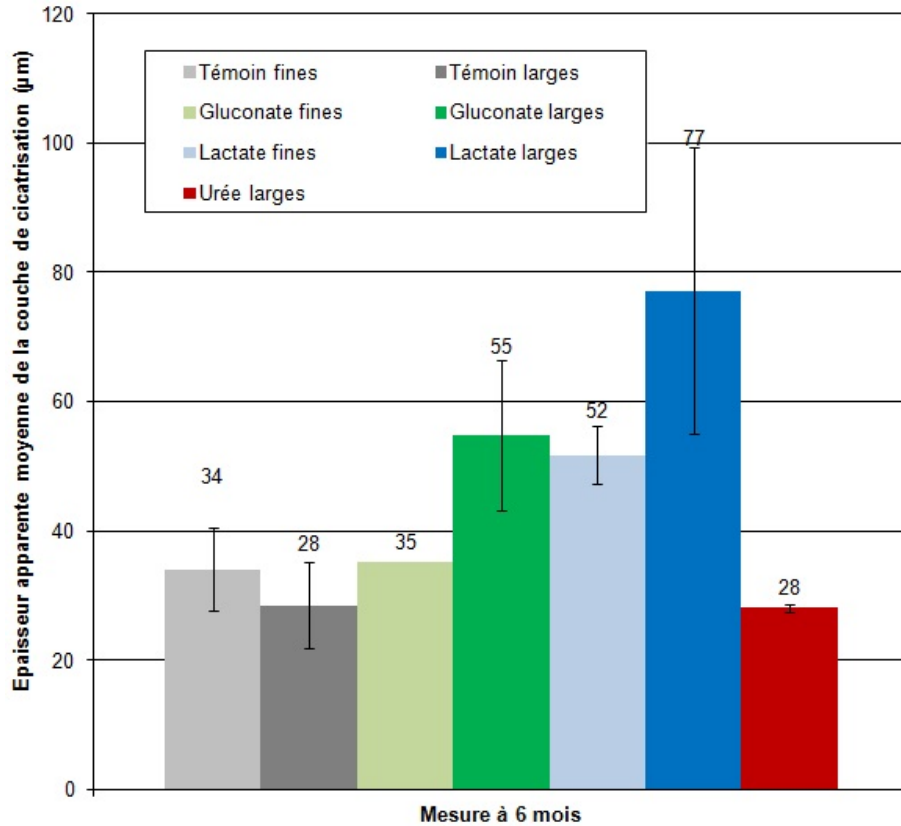


Figure 5.46 Épaisseur apparente de la couche de cicatrisation, moyennes pour chaque catégories de fissures à 6 mois.

Avec les précurseurs, lactate de calcium et gluconate de calcium, la cicatrisation suit un schéma différent. Les épaisseurs apparentes de la couche cicatrisée semblent bien plus importantes pour les fissures larges que pour les fissures fines. Pour le gluconate de calcium, l'épaisseur apparente des produits de cicatrisation à 6 mois pour les fissures fines est de 35 µm contre 55 µm en moyenne pour les fissures larges. Pour le lactate de calcium, la moyenne à 6 mois est de 52 µm pour les fissures fines contre 77 µm pour les fissures larges.

En revanche, les taux apparents de cicatrisation entre fissures fines et fissures larges restent comparables : respectivement 55 % et 59 % pour le gluconate de calcium et 70 % et 72 % pour le lactate de calcium.

Les figures 5.48 et 5.49 permettent une comparaison entre les différents traitements.

Dans le cas des fissures fines, l'autocicatrisation naturelle permet un fort potentiel de récupération. Le gluconate de calcium n'offre pas d'amélioration, le lactate de calcium permet sur ce type de fissure une amélioration de 10 % par rapport aux essais sans précurseur. L'autocicatrisation naturelle est déjà plus complète pour les fissures fines. De plus, la faible

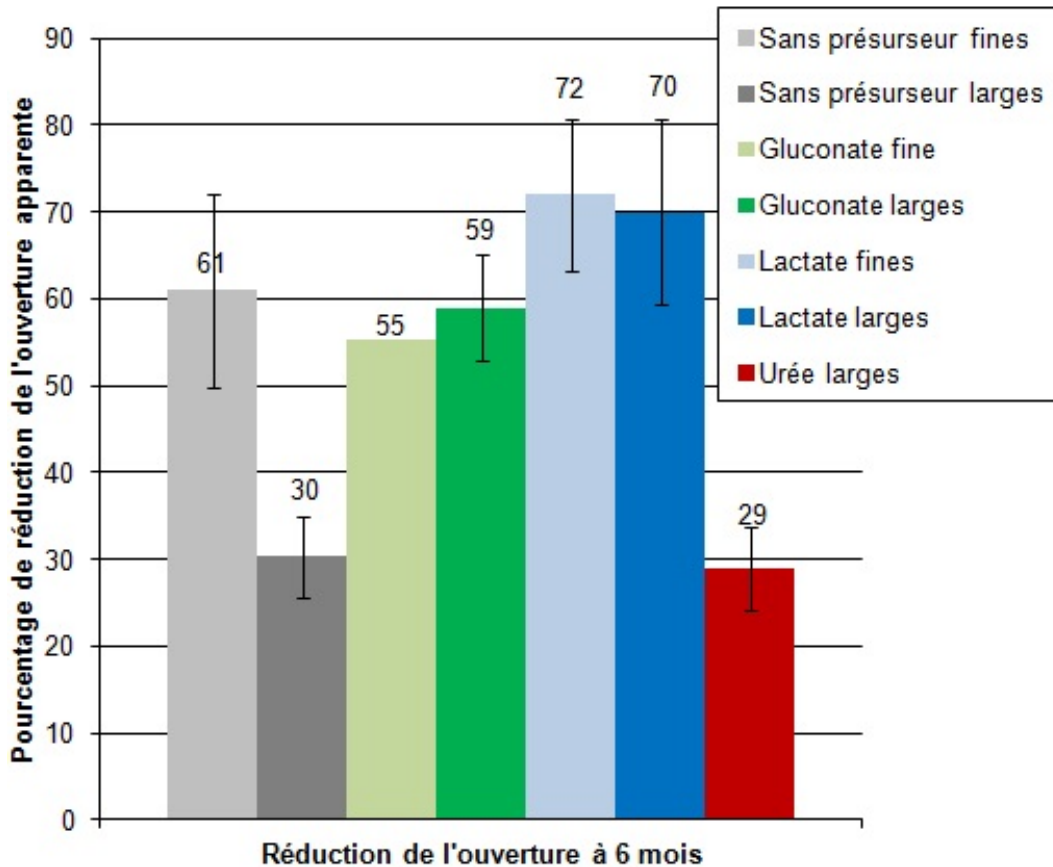


Figure 5.47 Taux apparents de cicatrisation, moyennes pour chaque catégories de fissures à 6 mois.

ouverture initiale de la fissure a peut être contribué à diminuer la quantité de précurseur imprégné dans le volume interne de la fissure.

En comparant les traitements pour les fissures larges, il apparaît que le gluconate de calcium et surtout le lactate de calcium permettent une bien meilleure cicatrisation par rapport à l'autocicatrisation naturelle : respectivement un taux apparent de cicatrisation de 59 % et 70 %, en comparaison à 30 % pour l'autocicatrisation naturelle. Les ouvertures larges semblent permettre une meilleure imprégnation des parois internes de la fissure et une formation plus importante de produits de cicatrisation. De plus, le plus grand volume interne de la fissure peut offrir une plus grande réserve de lactate de calcium ou de gluconate de calcium.

L'urée, en revanche, ne semble pas influencer la cicatrisation : son taux apparent de cicatrisation de 29 % est comparable aux essais sans précurseur. La nature chimique de ce précurseur ne semble pas permettre la formation de produits supplémentaires.

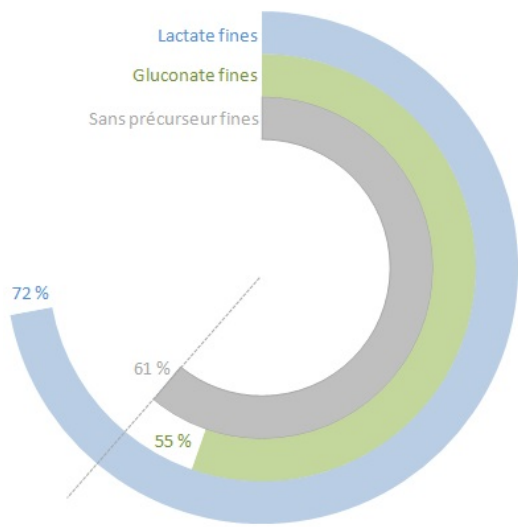


Figure 5.48 Taux apparents de cicatrisation, moyennes pour les fissures fines à 6 mois

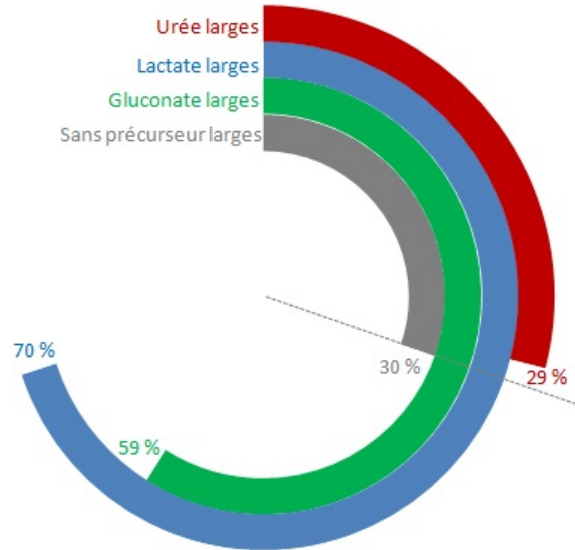


Figure 5.49 Taux apparents de cicatrisation, moyennes pour les fissures larges à 6 mois.

Les fissures cicatrisées à 11 mois montrent une légère amélioration supplémentaire dans la diminution des ouvertures. La figure 5.50 illustre les différents taux apparents de cicatrisation obtenus. Les trois types d'essais utilisant le gluconate de calcium, le lactate de calcium et l'urée gagnent en 5 mois entre 1 % à 6 %. Cette amélioration mineure montre que la cinétique de cicatrisation n'est pas constante dans le temps : la cicatrisation est rapide le premier mois puis ralentit au cours du temps.

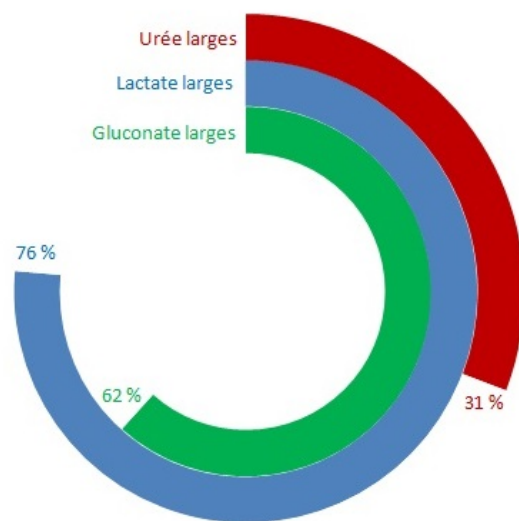


Figure 5.50 Taux apparents de cicatrisation, moyennes pour les fissures larges à 11 mois.



La figure 5.51 représente la cinétique de cicatrisation. Il s'agit de la vitesse de diminution de l'ouverture apparente, exprimée en  $\mu\text{m}$  par mois. La cinétique de cicatrisation est clairement plus importante au cours du premier mois pour les témoins comme pour les essais avec précurseurs.

Cet aspect du phénomène d'autocicatrisation est connu et expliqué dans la littérature [7, 40]. La couche formée par des produits de cicatrisation isole et ralentit les réactions entre les réactifs présents dans la matrice cimentaire et les réactifs apportés par l'environnement extérieur (eau, dioxyde de carbone).

Dans le cas des essais avec précurseur, vient s'ajouter à cette explication, le fait que les éprouvettes ne sont pas ré-immersées dans les solutions de précurseur. Il n'est cependant pas sûr qu'une immersion supplémentaire puisse permettre un gain de cicatrisation supplémentaire, pour les mêmes raisons que pour l'autocicatrisation naturelle : la couche de produits de cicatrisation pourrait empêcher toute formation de nouveaux produits.

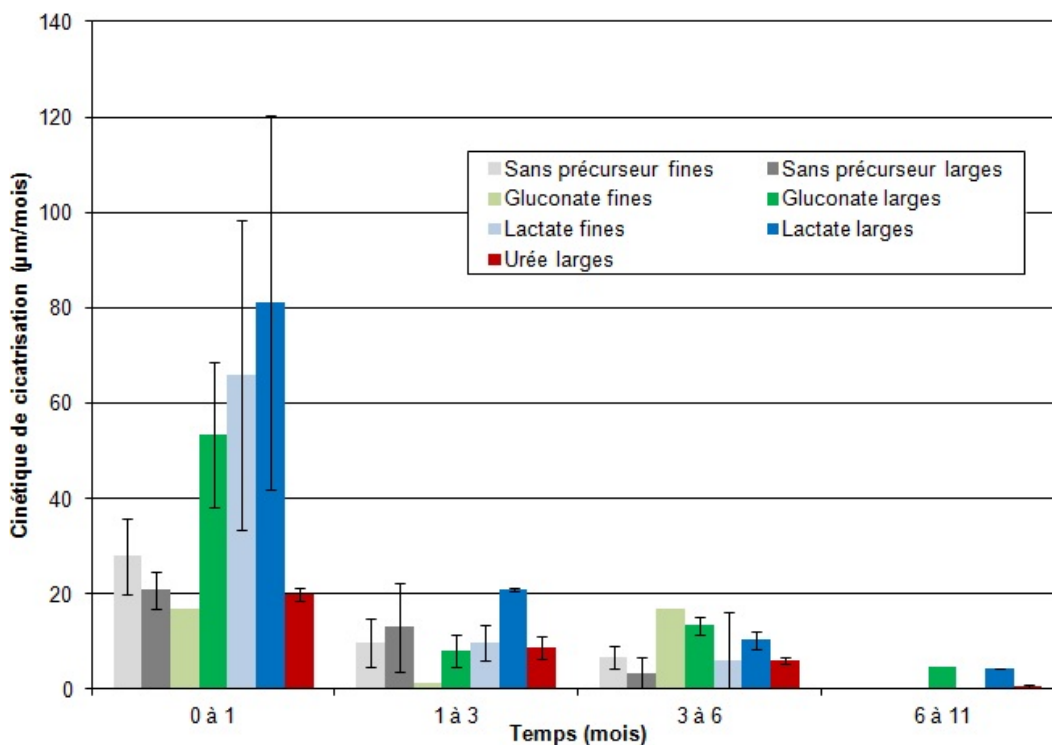


Figure 5.51 Cinétique de cicatrisation au cours du temps.

Durant le premier mois, en présence de lactate de calcium et de gluconate de calcium, la cinétique de cicatrisation est plus importante pour les fissures larges que pour les fissures fines. L'explication précédente reste valable : la faible ouverture initiale des fissures diminuerait l'apport de précurseurs dans la fissure. La tendance est à relativiser au regard des barres d'erreur.

### 5.6.2 Évolution des ouvertures apparentes des fissures pré-carbonatées

Le tableau 5.6 résume l'évolution des ouvertures apparentes pour les mortiers fissurés et carbonatés.

Précurseur	Type de fissure	Ouverture apparente ( $\mu\text{m}$ )				$C_t$ (%)	
		Mois après fissuration				Au final	Moyenne à 3 mois
		0	1	2	3		
Témoins	Grande	250	250	250	236	5	12
		342	323	309	288	16	
		281	265	257	241	14	
Lactate de calcium	Grande	295	288	273	257	13	13
		266	242	230	201	24	
		241	250	245	236	2	

Tableau 5.7 Tableau de synthèse des mesures des ouvertures apparentes des fissures carbonatées.

Pour les éprouvettes initialement carbonatées, le comportement entre les fissures non traitées et les fissures imprégnées dans le lactate de calcium sont similaires. Le lactate de calcium ne semble pas permettre la formation de produits de cicatrisation supplémentaires.

Les taux apparents de cicatrisation sont similaires entre les fissures fraîches et les fissures carbonatées, respectivement 12% et 13%. Cependant, la comparaison des épaisseurs apparentes de cicatrisation est plus adaptée dans le cas de fissures ayant des ouvertures initiales différentes. La figure 5.52 représentent les moyennes des épaisseurs apparentes de cicatrisation des fissures après 3 mois.

La comparaison des épaisseurs apparentes de cicatrisation montre que le phénomène d'autocicatrisation naturelle semble légèrement ralenti pour les fissures déjà carbonatées. L'effet du précurseur sur la cicatrisation est complètement annulé avec la carbonatation initiale.

La couche de calcite dans les fissures carbonatées empêche ou ralentit les mécanismes de l'autocicatrisation naturelle, à savoir, l'hydratation du ciment anhydre résiduel et la formation de calcite à partir du calcium de la matrice cimentaire.

Le précurseur n'offre pas d'amélioration de la cicatrisation pour les mêmes raisons : les réactifs présents dans la matrice cimentaire ne sont pas disponibles du fait de la couche compacte de calcite. Par conséquent, la formation de produits de cicatrisation avec le lactate de calcium est probablement empêchée.

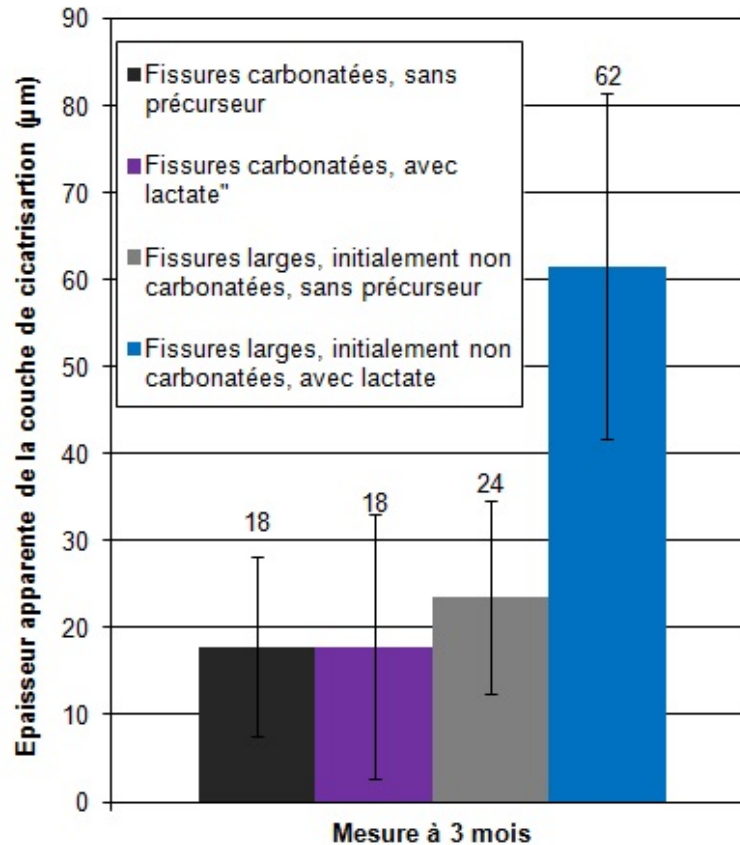


Figure 5.52 Épaisseur apparente de la couche de cicatrisation, moyennes à 3 mois

### 5.6.3 Observations des produits de cicatrisation

Les produits formés dans les fissures durant le processus d'autocicatrisation naturelle sont bien connus, il s'agit essentiellement de calcite. Le calcium de la matrice cimentaire, principalement via la portlandite ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), forme du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) sous forme de calcite, à partir de l'eau et du  $\text{CO}_2$  pénétrant dans la fissure. L'ettringite, qui peut être observée dans les fissures autocicatrisées, est minoritaire et réduite à des zones où le  $\text{CO}_2$  et l'eau accèdent difficilement.

La cicatrisation des fissures fraîches, en présence du lactate de calcium et du gluconate de calcium, repose aussi sur la formation de calcite dans les fissures mais l'ettringite semble jouer un rôle important. L'urée, en revanche, ne paraît pas modifier les conditions de l'autocicatrisation naturelle.

Les observations des produits de cicatrisation à 6 mois dans les fissures avec lactate de calcium et gluconate de calcium montrent que l'ettringite est le principal produit de cicatrisation. Ces précurseurs favoriseraient donc sa formation en réagissant avec la ma-

trice cimentaire. La composition de l'ettringite est  $\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12} \cdot 26\text{H}_2\text{O}$  ou en notation cimentière<sup>1</sup>  $\text{C}_3\text{A} \cdot 3\overline{\text{CS}} \cdot \text{H}_{32}$ . Si les précurseurs apportent du calcium, le soufre et l'aluminium doivent provenir de la matrice cimentaire, probablement du monosulfate,  $3(3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3) \cdot \text{CaSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , en notation cimentière  $\text{C}_3\text{A} \cdot \overline{\text{CS}} \cdot \text{H}_{12}$ .

Les observations à 11 mois montrent une diminution de la quantité d'ettringite dans les fissures avec lactate de calcium et gluconate de calcium. La calcite semble devenir le principal produit de cicatrisation. L'ettringite reste visible dans certaines parties de la fissure, accompagnée parfois par des cristaux de portlandite.

La formation d'ettringite secondaire dans les matériaux cimentaires est un sujet d'étude relativement bien documenté du fait de son implication dans certaines pathologies du béton [112]. Quelques études ont souligné l'influence de produits comme le lactate de calcium et le gluconate de calcium sur la formation d'ettringite [14, 21]. Toutefois, ce sont les études traitant des attaques acides sur les matériaux cimentaires, qui permettent d'apporter les informations les plus intéressantes [138].

### Formation d'ettringite sans précurseurs

L'ettringite est sensible au pH. En fonction de sa valeur, la morphologie et la stabilité des cristaux changent. La figure 5.53 décrit la relation entre la forme des cristaux et le pH. La figure 5.54 montre le domaine de stabilité de l'ettringite par rapport au pH, en fonction de différents auteurs.

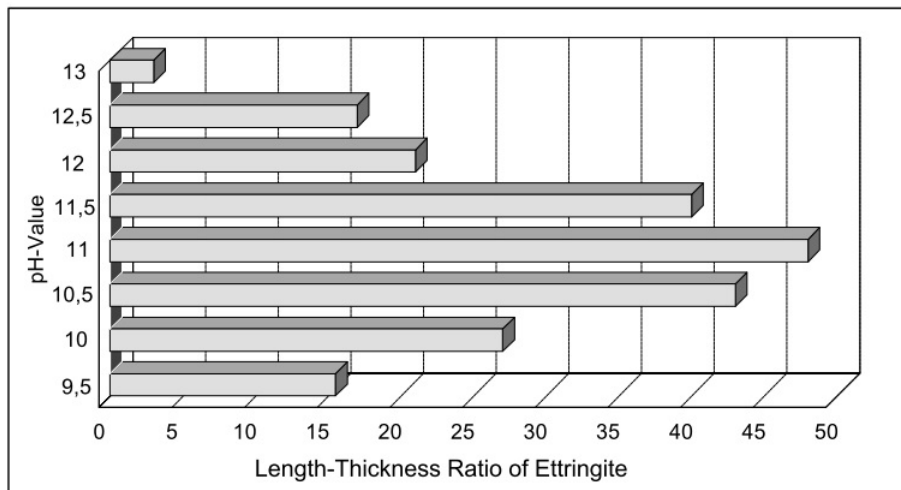


Figure 5.53 Changement de morphologie des cristaux d'ettringite en fonction du pH. [112]

<sup>1</sup>Les notations cimentières sont présentées en A

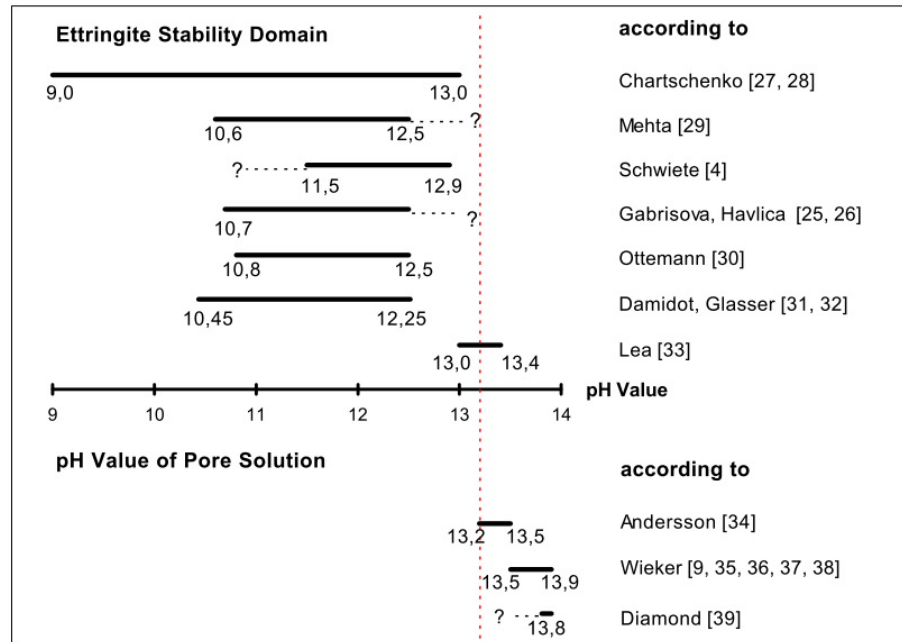


Figure 5.54 Domaine de stabilité de l'ettringite. [[112]]

Le pH dans les pores d'une pâte de ciment Portland ordinaire se situe entre 13 et 13,5 [6], un pH qui pour la majorité des auteurs, ne permet pas la stabilité de l'ettringite. Stark en Bollmann [112] présentent la carbonatation et les conditions d'humidification parmi les différents mécanismes expliquant la formation d'ettringite dans les pâtes de ciment durcies.

L'exposition à l'humidité des matériaux cimentaires peut conduire à des modifications de la micro-structure, à des transports de substances et à des gradients de concentration du fait de la lixiviation de certains éléments. La dissolution d'alcalins peut engendrer des baisses de pH et permettre la formation d'ettringite. Les phénomènes de transport, qui ont lieu dans les pores capillaires, sont interrompus par l'air présent dans les pores larges ou les fissures. Ceci expliquerait les accumulations d'ettringite constatées dans ces zones.

Les essais de stockage dans l'eau des échantillons de pâtes de ciment ont montré que les alcalins ( $K_2O$  et  $Na_2O$ ) sont plus facilement lixiviés, en comparaison des sulfates qui ne semblent pas affectés. Ainsi, l'exposition à l'eau des éprouvettes offre des conditions favorables à la formation d'ettringite, en faisant baisser le pH, sans diminuer la quantité d'ions sulfate, réactifs nécessaires à la formation de l'ettringite.

Le processus de carbonatation influencerait également la formation de l'ettringite. Kuzel et al. [73] décrivent le phénomène : le monosulfate décomposé par la carbonatation formerait du  $CaCO_3$ , du  $Al(OH)_3$ , du gypse ( $CaSO_4$ ) et de l'eau via les phases intermé-

diaires d'hémicarbonate ( $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{CaCO}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot \frac{23}{2}\text{H}_2\text{O}$ ) ou de monocarbonate ( $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ ). Le gypse libéré est disponible pour réagir avec des monosulfates encore non carbonatés et former de l'ettringite. Cependant, la carbonatation progressant, l'ettringite peut, à son tour, être carbonatée.

Ce phénomène est compatible avec les observations des échantillons à 11 mois : l'ettringite est observée quelques fois avec des cristaux de portlandite. Ceci suggère que les zones où l'ettringite est encore présente à 11 mois sont relativement épargnées par la carbonatation. L'ettringite observée serait ainsi sous des couches de calcite ou au centre de fissures protégée de l'air extérieur.

L'ettringite observée à 6 mois dans les échantillons sans précurseur est présente au centre de fissures fines, une zone où la carbonatation semble limitée.

### Formation d'ettringite avec précurseur

Colleparidi et al. [21] ont observé l'influence du gluconate de calcium, du glucose et des lignosulfonates sur l'hydratation de l'aluminate tricalcique ( $\text{C}_3\text{A}$ ). En présence de chaux, ces produits retardent la conversion de l'ettringite et la stabilise.

Sierra-Beltran et al. [108] dans leurs études utilisent également le lactate de calcium comme précurseur de précipitation en présence de bactéries. Des granulats légers, poreux, contenant des spores bactériennes et la solution de nutriments (extrait de levure et lactate de calcium) sont inclus dans le mélange de béton. Il a été observé dans certaines fissures des structures en aiguilles. L'analyse EDS montre la présence de soufre, d'aluminium, de silicium, de calcium et de carbone. Les auteurs suggèrent que la structure cristalline observée est de l'ettringite combinée avec le gel de silicate de calcium hydraté, C-S-H. Les ions sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) aurait été en partie remplacés par des ions carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ou par des ions hydroxyle ( $\text{OH}^-$ ).

Il semble donc que le lactate de calcium et le gluconate de calcium permettent la formation d'ettringite en réagissant avec la matrice cimentaire ou tout du moins offrent des conditions pour stabiliser l'ettringite.

---

## 5.7 Conclusion des essais abiotiques sur mortier

### 5.7.1 Autocicatrisation naturelle

Une autocicatrisation naturelle des mortiers testés a été mise en évidence lorsqu'ils sont conservés dans une atmosphère à 23°C et 100 % H.R. L'autocicatrisation naturelle est plus rapide durant le premier mois de conservation. Après 6 mois, les petites fissures ( $105 \pm 5 \mu\text{m}$ ) ont un taux apparent de cicatrisation d'environ 60 %. Pour les plus grosses fissures ( $195 \pm 30 \mu\text{m}$ ), l'autocicatrisation naturelle est moins complète puisque le taux apparent de cicatrisation n'est que de 30 % en moyenne. Les produits de l'autocicatrisation naturelle sont principalement constitués de cristaux de calcite et, dans une moindre mesure, d'ettringite. Dans le cas des petites fissures, les cristaux de calcite sont préférentiellement formés près de l'embouchure des fissures.

Parallèlement au taux apparent de cicatrisation, l'épaisseur apparente de la couche cicatrisée peut constituer un indicateur supplémentaire. Il apparaît ainsi que l'épaisseur apparente de la couche de produit de cicatrisation est sensiblement la même quelle que soit l'ouverture initiale de la fissure. Après 6 mois d'autocicatrisation naturelle, l'épaisseur apparente moyenne de la couche de cicatrisation pour les fissures fines est de  $34 \mu\text{m}$  contre  $28 \mu\text{m}$  pour les fissures larges. L'écart-type des mesures laisse à penser que la différence n'est pas significative.

### 5.7.2 Cicatrisation des fissures fraîches avec précurseur

L'immersion, juste après la fissuration dans le lactate de calcium ou le gluconate de calcium, permet d'accélérer la cicatrisation des fissures non carbonatées. L'effet est principalement visible durant le premier mois. Après 6 mois, le lactate de calcium permet une cicatrisation à 70 % des fissures larges contre 30 % sans précurseur ; soit une épaisseur apparente de produits de cicatrisation de  $77 \mu\text{m}$  contre  $28 \mu\text{m}$ . Le gluconate de calcium permet une réduction de 60 %, soit une épaisseur apparente de produits de cicatrisation de  $55 \mu\text{m}$ .

Le principal mécanisme par lequel ces deux précurseurs améliorent la cicatrisation semble reposer sur la formation d'ettringite. Les essais sur surfaces de mortier fraîchement fracturées et la littérature [21, 108, 138] appuient l'hypothèse d'une formation ou d'une stabilisation de l'ettringite grâce au lactate de calcium ou au gluconate de calcium. Ces précurseurs sont capables de réagir avec la matrice cimentaire, essentiellement avec les aluminates de calcium hydratés, pour former de l'ettringite.

---

Les observations à 11 mois montrent que l'ettringite se carbonate partiellement ou se recouvre en partie de calcite. Ce phénomène ne diminue pas l'épaisseur apparente de la couche de produits de cicatrisation.

L'urée ne semble pas influencer le processus de cicatrisation. Les éprouvettes imprégnées initialement d'urée suivent la même cinétique que les éprouvettes soumises à l'autocicatrisation.

### **5.7.3 Cicatrisation des fissures pré-carbonatées**

Sur fissures carbonatées, les précurseurs n'ont pas d'effet sur la cicatrisation. Entre des éprouvettes sans précurseurs et avec lactate de calcium, dans les mêmes conditions de stockage, la cicatrisation suit la même cinétique. Cette dernière est beaucoup plus faible comparativement à la cinétique de cicatrisation des fissures fraîches. La couche de calcite formée lors de la carbonatation des fissures empêche la formation de l'ettringite et ralentit celle de la calcite. Le contact entre le lactate de calcium et la matrice cimentaire paraît essentiel pour pouvoir améliorer la cicatrisation.



# CHAPITRE 6

## Résultats des essais de croissance bactérienne

La technique de biocicatrisation sur les matériaux cimentaires envisagée consiste en une application d'un milieu de culture contenant des cellules bactériennes en état de croissance optimale. Le développement de ce système requiert une série d'essais, afin d'identifier la meilleure adéquation entre la souche bactérienne et la composition du milieu de culture parmi les variables possibles.

Deux souches bactériennes sont étudiées : *Bacillus pseudofirmus* et *Bacillus cohnii*. La souche bactérienne sélectionnée doit produire les mécanismes favorables à la biocicatrisation et survivre au contact des matériaux cimentaires, qui constitue un environnement alcalin.

Le milieu de culture retenu doit permettre aux bactéries un développement et une survie le plus longtemps possible des cellules bactériennes. Il doit également apporter les réactifs susceptibles d'améliorer le potentiel biocicatrisant des bactéries en promouvant la précipitation d'une quantité significative de calcite. Ainsi, le milieu de culture doit apporter des nutriments aux bactéries et des précurseurs de précipitation de la calcite.

## 6.1 Phase 1 : Croissance dans le milieu recommandé

La première phase d'essai consiste à effectuer des suivis de croissance des bactéries dans les milieux recommandés par le fournisseur des souches. L'objectif est de déterminer l'influence de la température et du pH des milieux de culture sur la croissance des bactéries.

Le milieu préconisé pour *B. pseudofirmus* et *B. cohnii* est constitué de 8 g/L de milieu NB (Nutrient Broth) ajusté à un pH de 9,7 avec la solution tampon  $\text{NaHCO}_3/\text{NaCO}_3$ . La composition et les méthodes d'élaboration des milieux sont détaillés en annexe F.

### 6.1.1 Première partie : effet de la température et de la solution d'ajustement du pH initial

La méthode d'ajustement du pH initial du milieu préconisée consiste à utiliser la solution tampon  $\text{NaHCO}_3/\text{NaCO}_3$ . Cependant, dans le cadre du projet, la présence d'ions carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$  dans la solution tampon pourrait influencer ultérieurement la formation de carbonate de calcium. Afin de contrôler la quantité de réactifs permettant de former le carbonate de calcium, des ajustements avec de la soude sont effectués.

L'influence de la température sur la croissance bactérienne est pris en compte en plaçant les milieux de culture dans deux enceintes différentes : à 20°C et à 30°C. Les essais de croissance sont généralement réalisés à la température optimale de 30°C. Mais, dans les conditions d'application de la technique de biocicatrisation, les températures seront vraisemblablement plus faibles. La température de 20°C a été choisie pour correspondre à celle utilisée lors des essais de biocicatrisation (chapitre 7).

Les essais sont menés en erlenmeyer en duplicata selon le protocole détaillé au chapitre 4 Matériels et méthodes, section 4.3. Les deux répliquats sont notés Rep 1 et Rep 2.

La figure 6.1 synthétise la première partie des essais menés dans la phases 1. *B. pseudofirmus* et *B. cohnii* sont notés B.p, B.c respectivement.

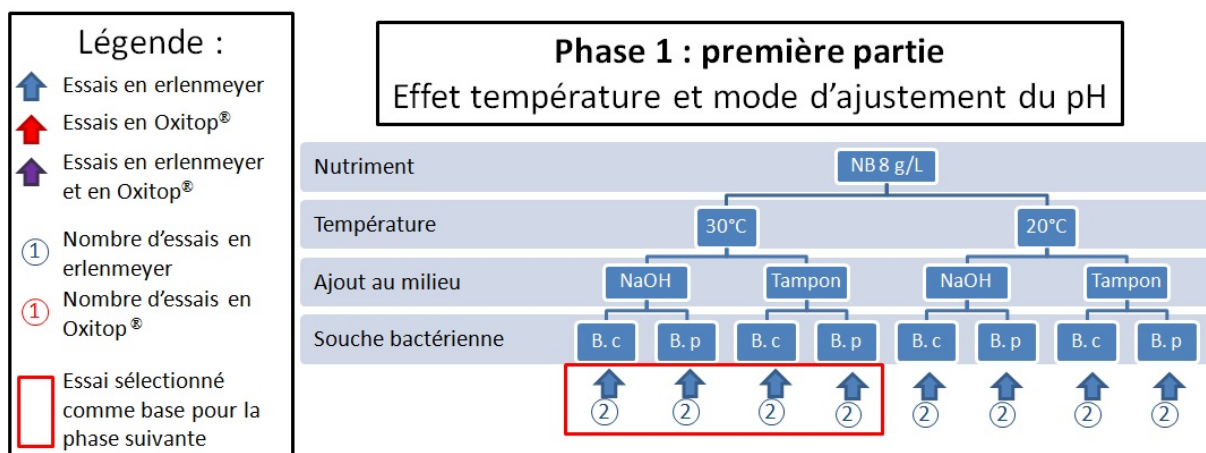


Figure 6.1 Schéma des essais menés en phase 1, première partie.

### Croissance de *B. pseudofirmus* dans le milieu recommandé

La figure 6.2 présente les mesures de pH et l'évolution de la taille de la population bactérienne dans la préculture ensemencée avec *B. pseudofirmus*.

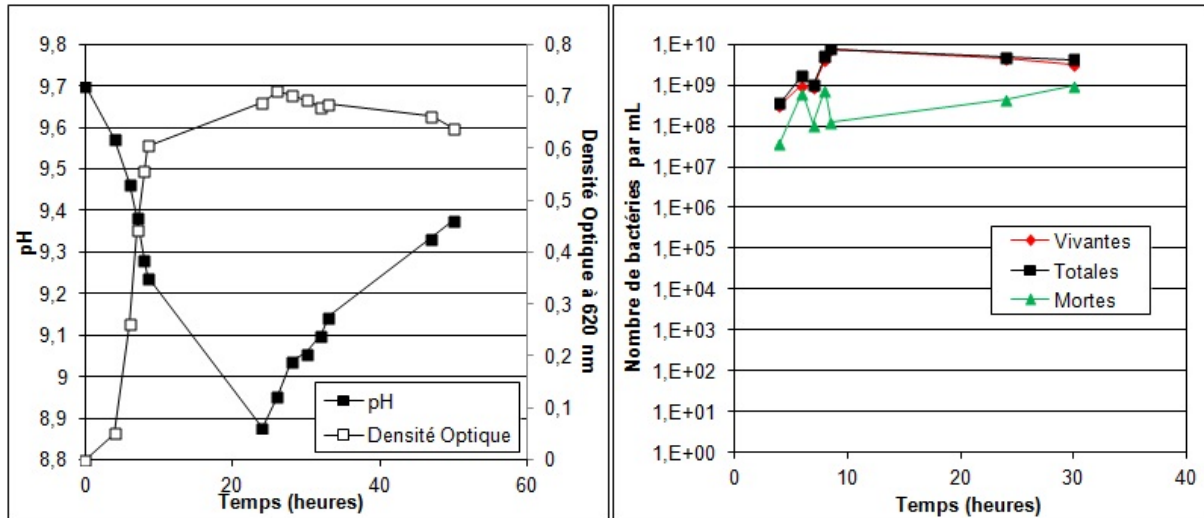


Figure 6.2 Suivi de la préculture ensemencée avec *B. pseudofirmus*.

La mesure de densité optique permet d'estimer assez fidèlement les périodes de phases de croissance. Le pH baisse légèrement en phase exponentielle puis remonte durant la phase de déclin. L'ensemencement des milieux de culture se fait à partir de 100  $\mu\text{L}$  prélevés dans la préculture après 8 h 30 de croissance. La préculture est en fin de phase exponentielle à plus de  $10^9$  bactéries par mL. Le temps  $t=0$  des courbes suivantes correspond au moment d'inoculation des milieux avec la préculture.

Les figures 6.3 et 6.4 présentent le suivi de la croissance bactérienne évaluée par des mesures de densité optique et par des comptages bactériens par épifluorescence. La mesure de densité optique paraît être un bon estimateur de la croissance bactérienne (figure 6.5, échelle non logarithmique).

À 30°C et à 20°C, le milieu ajusté avec la solution tampon offre les meilleures conditions pour le développement de cette souche bactérienne. La densité optique augmente de façon exponentielle pour atteindre un maximum de 0,4, correspondant à plus de  $10^9$  bactéries vivantes par mL. Le milieu ajusté à la soude permet d'obtenir à la fin de la phase exponentielle une population bactérienne légèrement plus faible. À 30°C, avec la soude, la concentration est de  $5 \cdot 10^8$  bactéries vivantes par mL à 10 h (figure 6.4). À 20°C, avec la soude, la concentration est également de  $5 \cdot 10^8$  bactéries vivantes par mL, mais après 28 h de croissance. L'effet de l'ajustement du pH, avec la solution tampon ou avec la soude, est

également observé par le suivi de la densité optique (figure 6.3). Une bonne répétabilité est également constatée entre les deux réplicats.

Si la température ne semble pas influencer la taille de la population bactérienne en fin de phase exponentielle, elle influence la durée de la phase de latence. À 30°C, la phase exponentielle semble se terminer environ 9 h après l'inoculation, sans véritable phase de latence, et ce, avec le milieu ajusté avec la solution tampon ou la soude. À 20°C, avec l'ajustement du pH avec la solution tampon, la phase de latence dure environ 9 h et la phase exponentielle se termine plus de 20 h après l'inoculation.

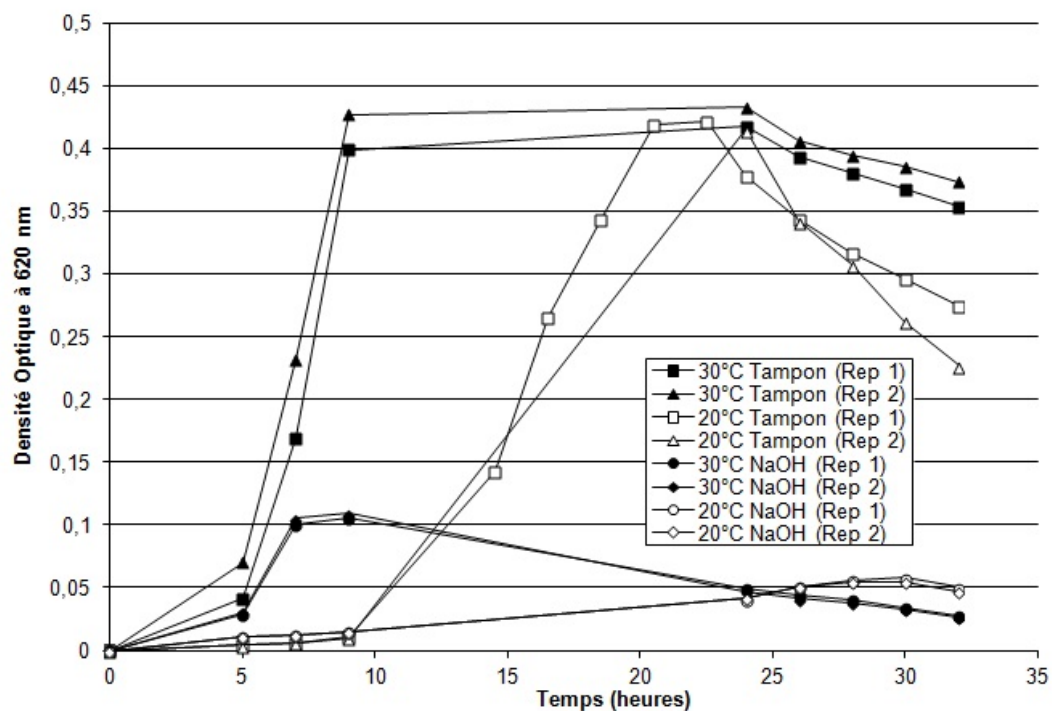


Figure 6.3 Évolution de la densité optique dans les milieux de culture avec *B. pseudofirmus*, phase 1.

La figure 6.6 décrit l'évolution du pH dans les huit erlemeyers. Le pH diminue dans tous les erlenmeyers, pendant 24 h pour les milieux à 30°C et pendant plus de 33 h pour les milieux à 20°C.

La baisse de pH constaté dans les deux milieux est plus prononcée pour le milieu ajusté avec de la soude que pour le milieu ajusté avec la solution tampon. Le minimum atteint est de 9 pour le milieu avec la solution tampon, aux températures de 30°C et de 20°C. Le minimum pour le milieu avec la soude est autour de 8,5 à 30°C ou à 20°C. Le pH minimum est atteint plus rapidement dans les milieux à 30°C que dans les milieux à 20°C.

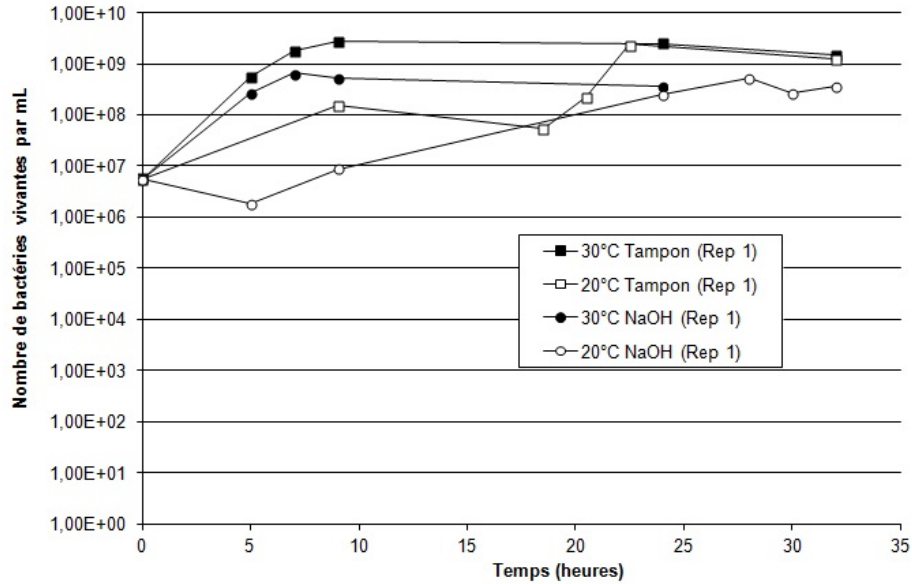


Figure 6.4 Évolution du nombre de bactéries *B. pseudofirmus* dans les milieux de culture, phase 1.

Après la phase de baisse, le pH semble augmenter légèrement. En comparant avec les courbes de densité optique, le pH semble baisser durant la phase exponentielle et la phase stationnaire puis se stabiliser et remonter légèrement durant la phase de déclin. L'évolution du pH semble donc être une conséquence du métabolisme des bactéries. L'activité bactérienne contribue à faire diminuer le pH, et lorsque celle-ci ralentit durant la phase de déclin l'évolution du pH semble ralentir également, voir légèrement augmenter. La corrélation entre activité bactérienne et pH est plus évidente dans les essais à 30°C que pour les essais à 20°C où le métabolisme et l'activité bactérienne semblent ralentis.

Il est à noter que les prélèvements dans les erlemeyers n'ont été effectués que pendant la journée, ce qui explique l'absence de mesures durant plusieurs heures. Il n'y a pas de mesures entre 10 h et 24 h et entre 34 h et 48 h. Pour la culture dans le milieu avec solution tampon et à 20°C, des mesures ont pu être faites entre 10 h et 24 h (courbe aux marqueurs carrés blancs). Cette courbe correspond en réalité de la compilation des mesures de deux erlemeyersensemencés avec quelques heures de décalage, afin de couvrir la période d'interruption. Ces interruptions rendent difficiles l'identification précise du début et de la fin de la phase exponentielle et le début de la phase de déclin. Les moments où l'évolution du pH s'inverse sont également difficiles à déterminer.

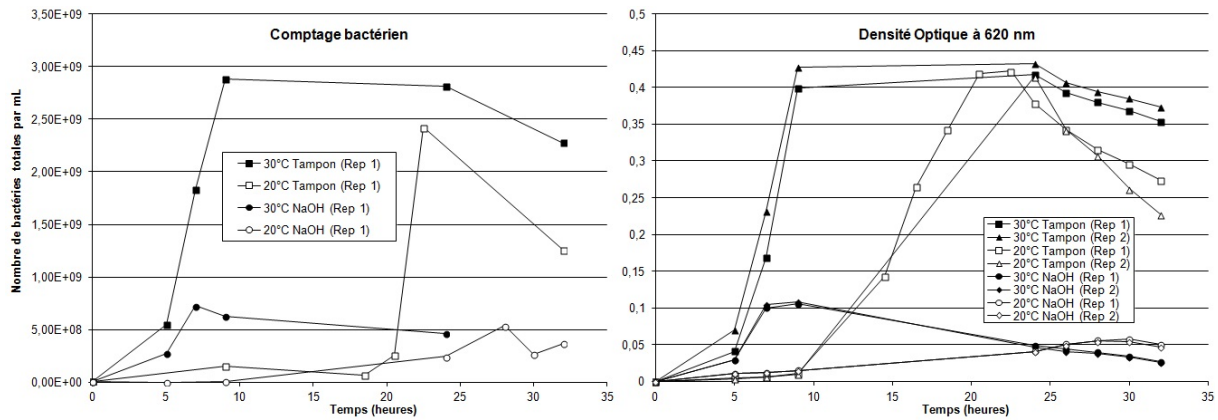


Figure 6.5 Comparaison des mesures de comptage bactérien et des mesures de densité optique.

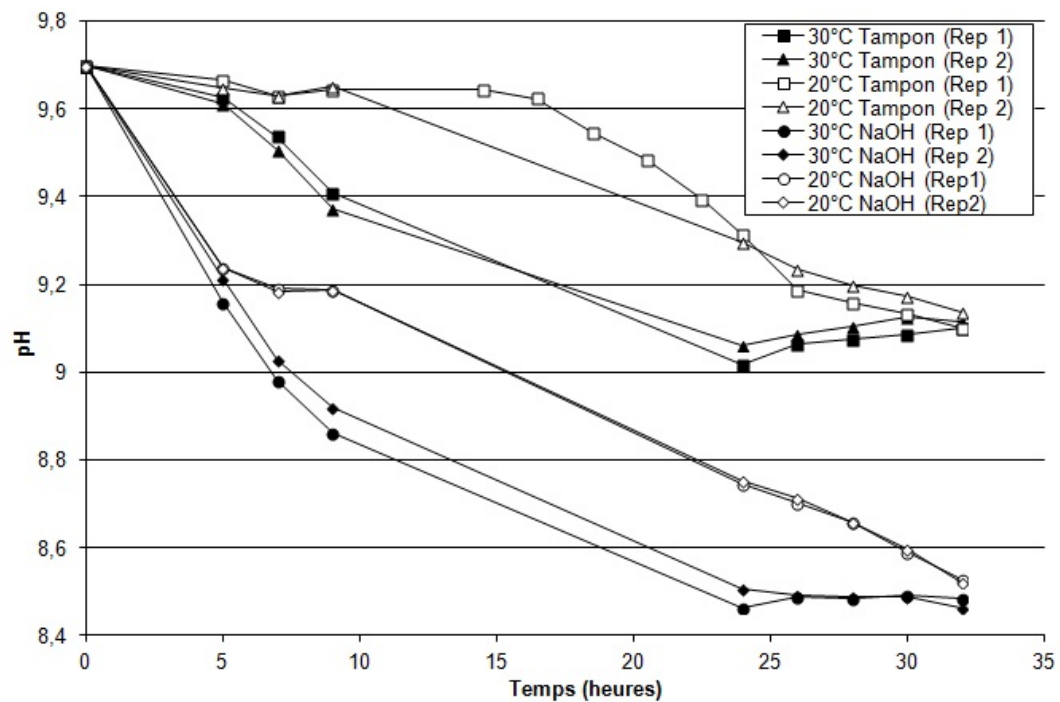


Figure 6.6 Évolution du pH dans les milieux de culture avec *B. pseudofirmus*, phase 1.

### Croissance de *B. cohnii* dans le milieu recommandé

La figure 6.7 montre l'évolution du pH et de la densité optique dans la préculture ensemencée avec *B. cohnii*. La courbe présentée est la compilation de deux précultures ensemencées à quelques heures d'intervalle. Il n'y a ainsi pas de période d'interruption.

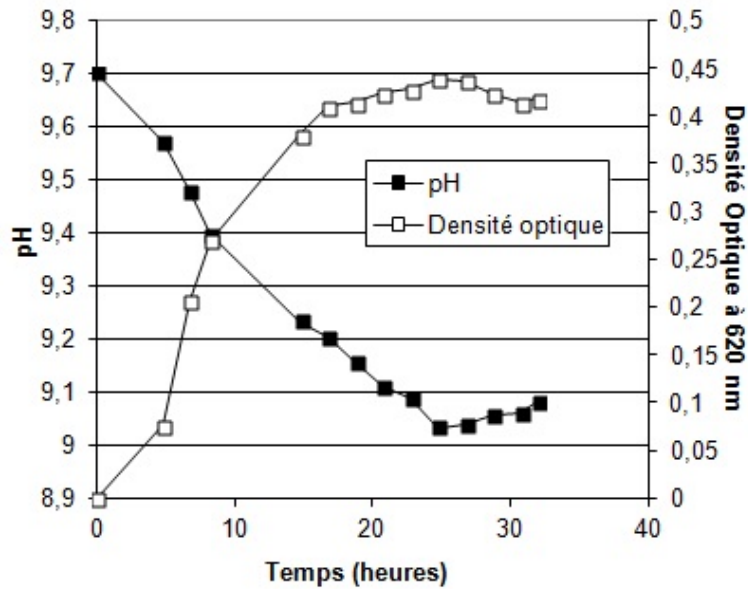


Figure 6.7 Suivi de la préculture ensemencé avec *B. cohnii*.

L'ensemencement des milieux de culture se fait à partir de  $100 \mu\text{L}$  prélevé dans la préculture après 8 h 30 de croissance. La préculture est en milieu de phase exponentielle à plus de  $5 \cdot 10^9$  bactéries par mL.

Les figures 6.8 et 6.9 présentent l'évolution de la densité optique des milieux de culture et de la préculture, à titre comparatif. La figure 6.9 montre l'évolution de la densité optique dans les 4 milieux ajustés avec de la soude, représentée avec une échelle plus adaptée.

Concernant le milieu avec solution tampon à  $30^\circ\text{C}$ , la fin de la phase exponentielle a vraisemblablement eu lieu durant la période d'interruption des mesures. La courbe correspondant à la préculture peut donner une indication sur le comportement de la croissance de *B. cohnii* durant cette période d'interruption. En effet, la seule différence entre la préculture et ce milieu de culture réside dans le mode d'ensemencement. La préculture est ensemencée par un cryotube de  $1,5 \text{ mL}$ , composée de  $1 \text{ mL}$  solution bactérienne ( $\approx 1 \cdot 10^9$  bactéries/mL) et de  $0,5 \text{ mL}$  de glycérol. Le milieu de culture est ensemencé par un inoculum de bactéries en pleine croissance de  $100 \mu\text{L}$  ( $\approx 5 \cdot 10^9$  bactéries/mL). La différence de taille d'inoculum peut expliquer la phase de latence plus courte avec la préculture qu'avec



le milieu de culture. Selon les projections, la fin de la phase exponentielle aurait eu lieu un peu avant 15 h.

Comme pour *B. pseudofirmus* la mesure de densité optique montre une meilleure croissance dans les milieux ajustés par une solution tampon qu'avec de la soude. Cette tendance est confirmée par la figure 6.10 qui présente l'évolution de la taille de la population bactérienne dans les milieux à 30°C. Le milieu avec tampon a une population bactérienne 10 fois plus concentrée que le milieu avec soude.

La figure 6.8 montre également que la température affecte la croissance de *B. cohnii*. En considérant que la densité optique est un bon indicateur de la concentration bactérienne, il semble qu'à 20°C les milieux de culture atteignent une taille de population bactérienne maximale plus faible qu'à 30°C. Ceci n'était pas observé avec *B. pseudofirmus* où la température n'avait pas d'effet sur ce paramètre. La température de 20°C semble également retarder la croissance bactérienne dans les milieux avec solution tampon. La phase de latence dure 6 heures à 30°C contre plus de 9 heures à 20°C. En revanche ce décalage est peu visible pour les milieux avec de la soude, dû fait de la plus faible activité dans ces milieux (figure 6.9).

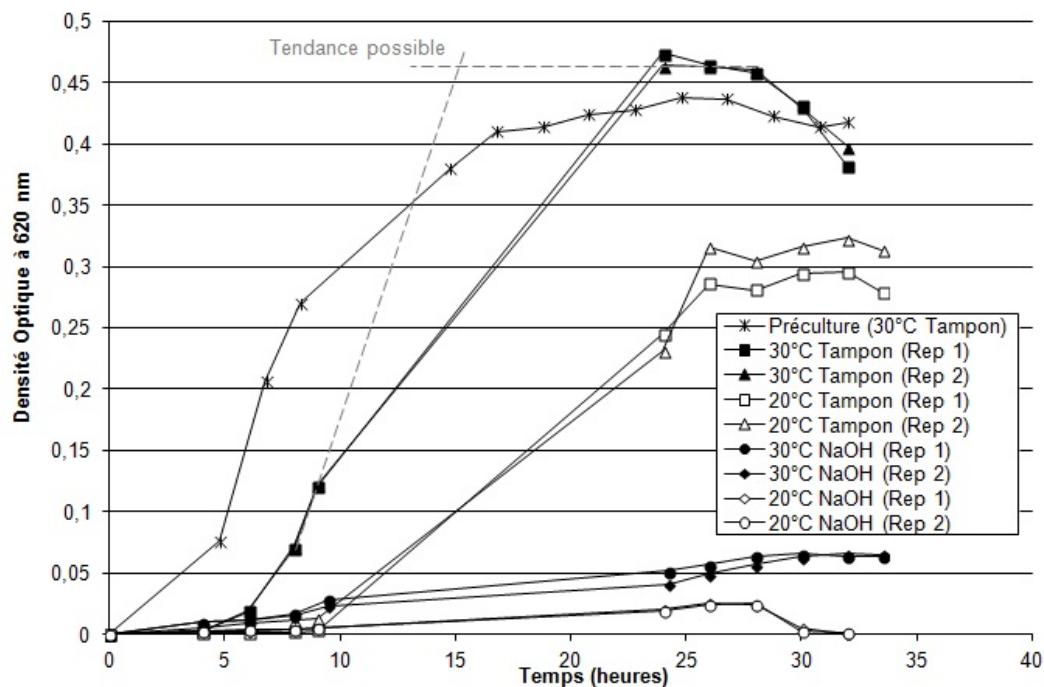


Figure 6.8 Évolution de la densité optique dans les milieux de culture avec *B. cohnii*, phase 1.

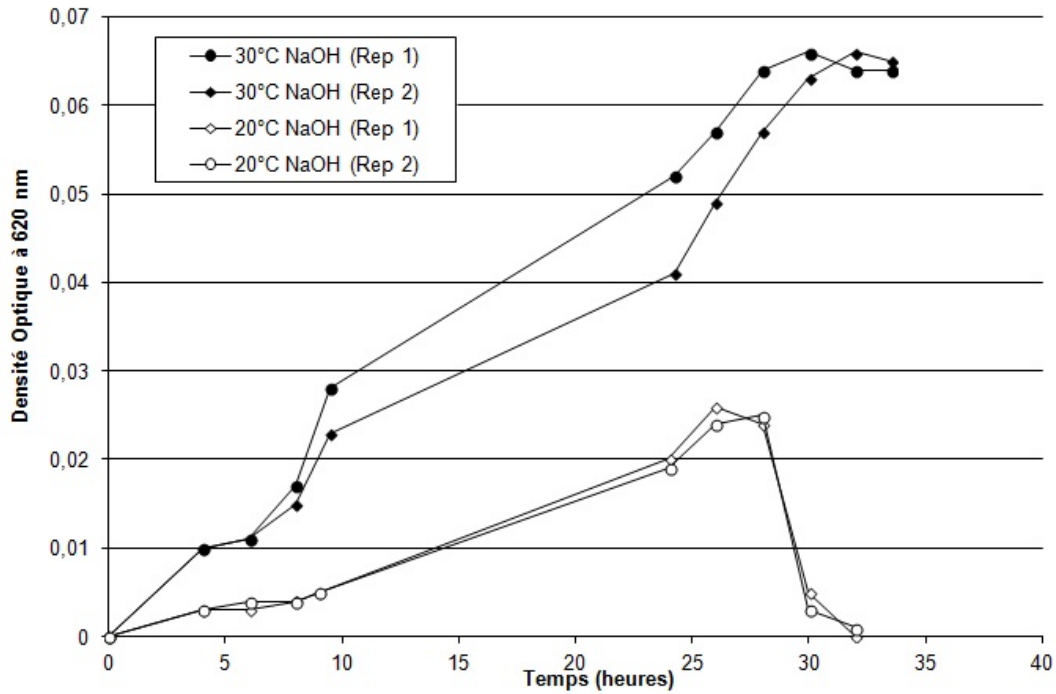


Figure 6.9 Évolution de la densité optique dans les milieux de culture avec *B. cohnii* avec NaOH, phase 1.

La figure 6.11 décrit l'évolution du pH dans les différents milieux ensemencés avec *B. cohnii*. Le milieu ajusté avec la soude voit son pH diminuer plus rapidement que le pH du milieu avec la solution tampon.

Pour le milieu ajusté avec la soude placé à 30°C, le pH minimum est atteint entre 25 et 30 heures avec une valeur autour de 8,1, il remonte ensuite pour atteindre une valeur entre 8,4 et 8,6 à 35 heures. Pour le même milieu à 20°C, le pH diminue constamment pour atteindre 8,6 à la fin de la période de mesures, à 35 heures. Le milieu ajusté avec la solution tampon à 30°C semble atteindre le minimum à 25 heures pour une valeur de 9. Le pH est ensuite relativement stable. La période de stabilité du pH après 25 heures pourrait correspondre à la phase de déclin observée par les mesures de densité optique. Le pH du même milieu à 20°C diminue constamment pour atteindre 9,2 à 35 heures.

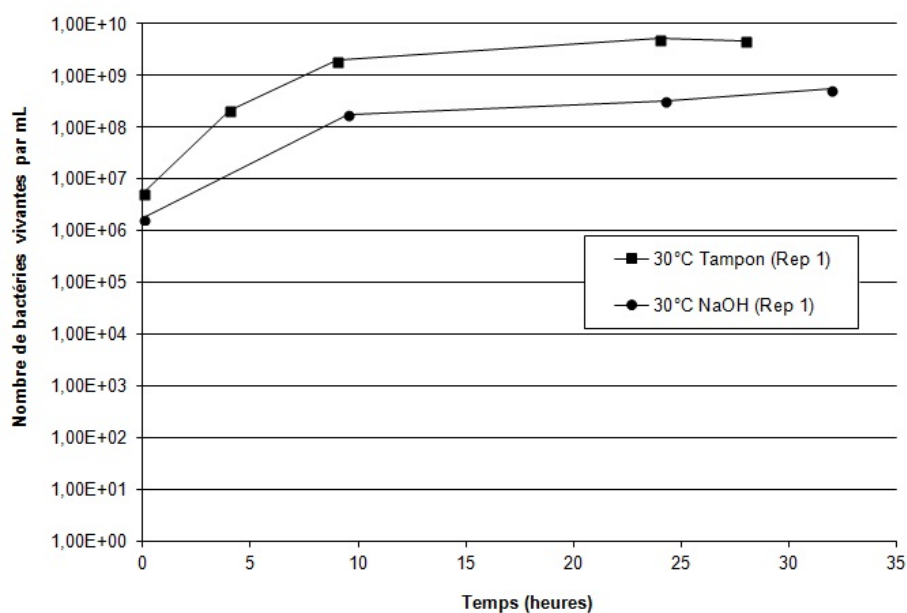


Figure 6.10 Évolution du nombre de bactéries *B. cohnii* dans les milieux de culture, phase 1.

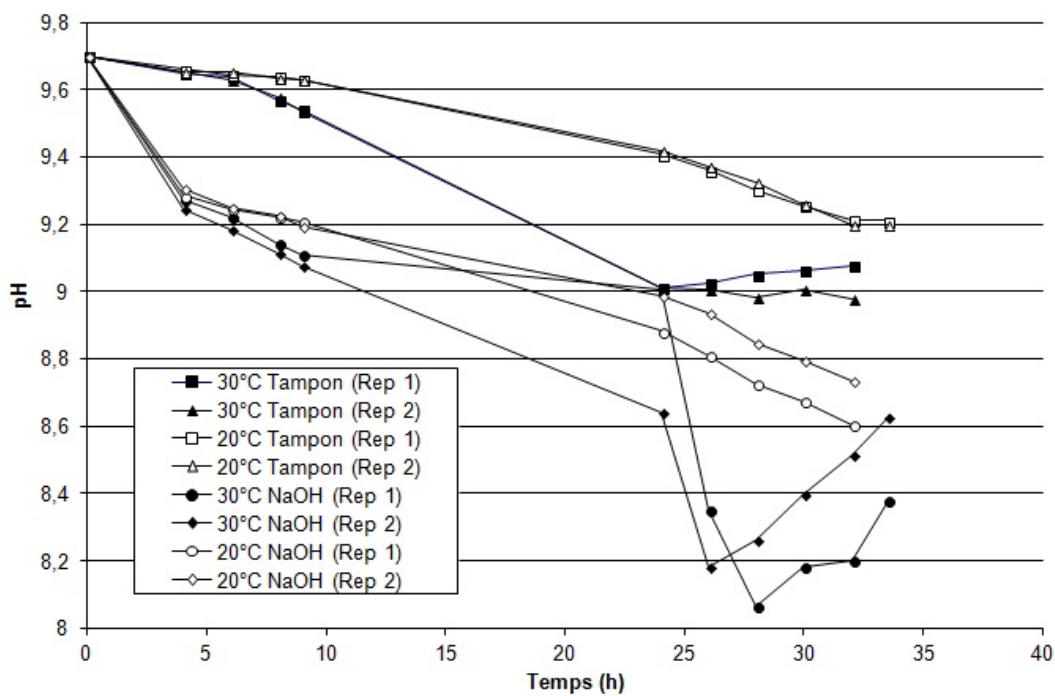


Figure 6.11 Évolution du pH dans les milieux de culture avec *B. cohnii*, phase 1.

### 6.1.2 Seconde partie : effet du pH sur la croissance des deux souches bactériennes testées

La seconde partie des essais de cette phase vise à déterminer le pH initial maximal dans lequel les bactéries *B. pseudofirmus* et *B. cohnii* sont capables de se développer, en relation avec les pH basiques d'un mortier plus ou moins carbonaté. Le pH initial du milieu Nutrient Broth est ajusté à des valeurs allant de 7,5 à 11,5. Les détails de l'élaboration des milieux sont présentés en annexe F. La croissance bactérienne est suivie par le système Oxitop®.

La figure 6.12 synthétise les essais effectués dans cette seconde partie.

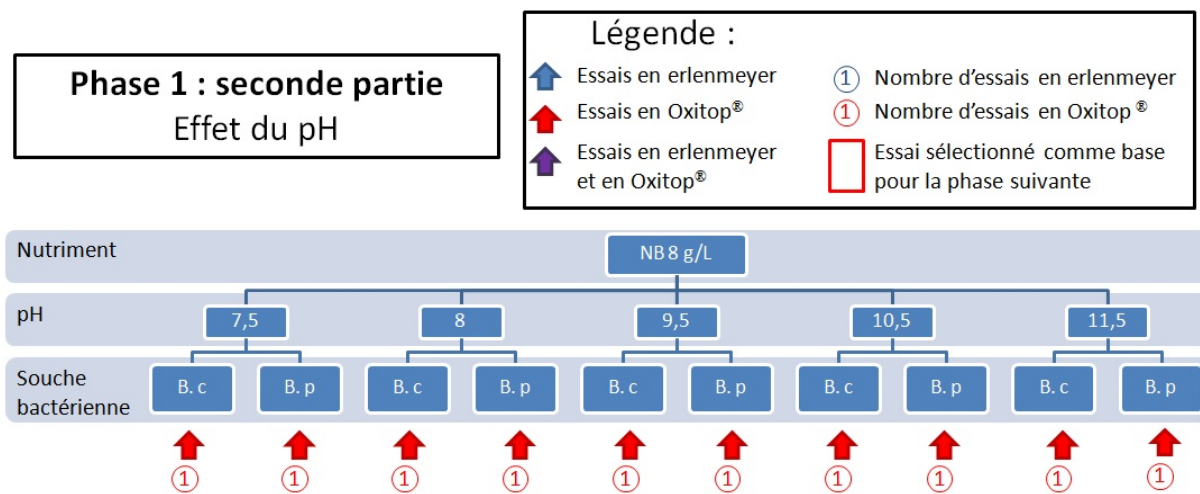


Figure 6.12 Schéma des essais menés en phase 1, seconde partie.

Les figures 6.13 et 6.14 présentent la consommation biologique en oxygène (DBO) obtenue avec le système Oxitop®, respectivement avec *B. pseudofirmus* et *B. cohnii*.

Les deux souches observées étant aérobies, la mesure de DBO traduit directement l'activité bactérienne dans les milieux. Pour les deux souches testées, le pH optimal est celui préconisé par le fournisseur : proche de 9,5. Les bactéries se sont développées dans tous les milieux jusqu'à un pH de 10,5. Le milieu à pH de 11,5 semble être trop basique pour le développement des souches bactériennes, puisqu'aucune consommation de O<sub>2</sub> n'est observée.

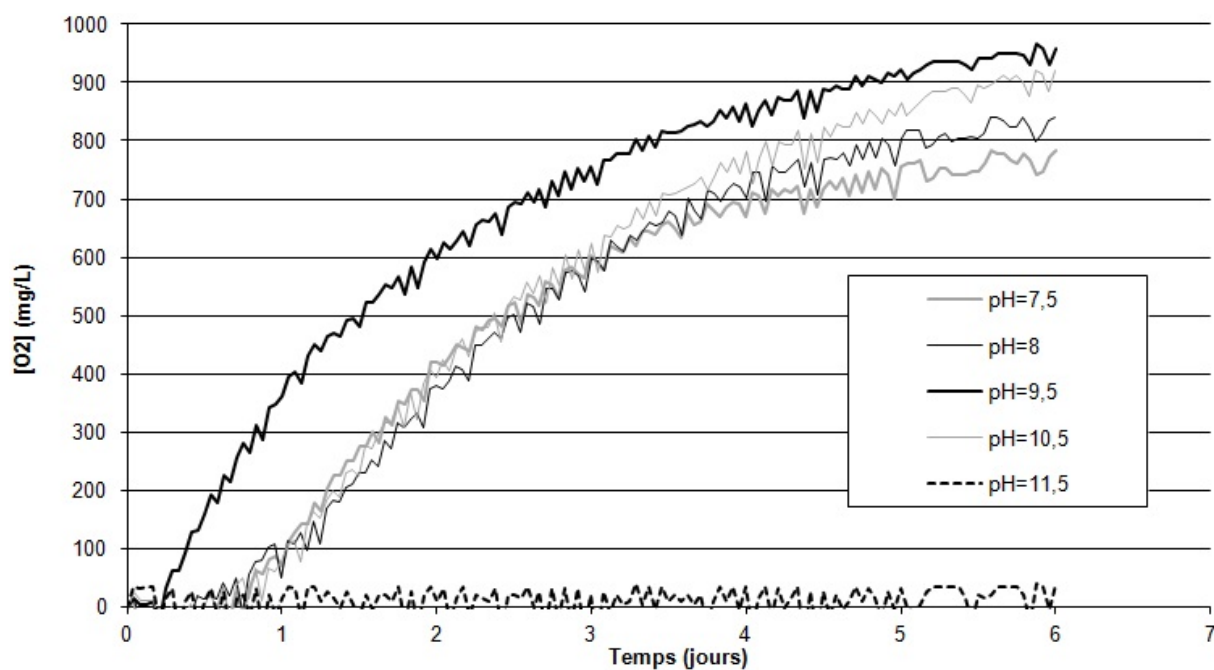


Figure 6.13 Demande biologique en oxygène de *B. pseudofirmus* dans les milieux Nutrient Broth à différents pH.

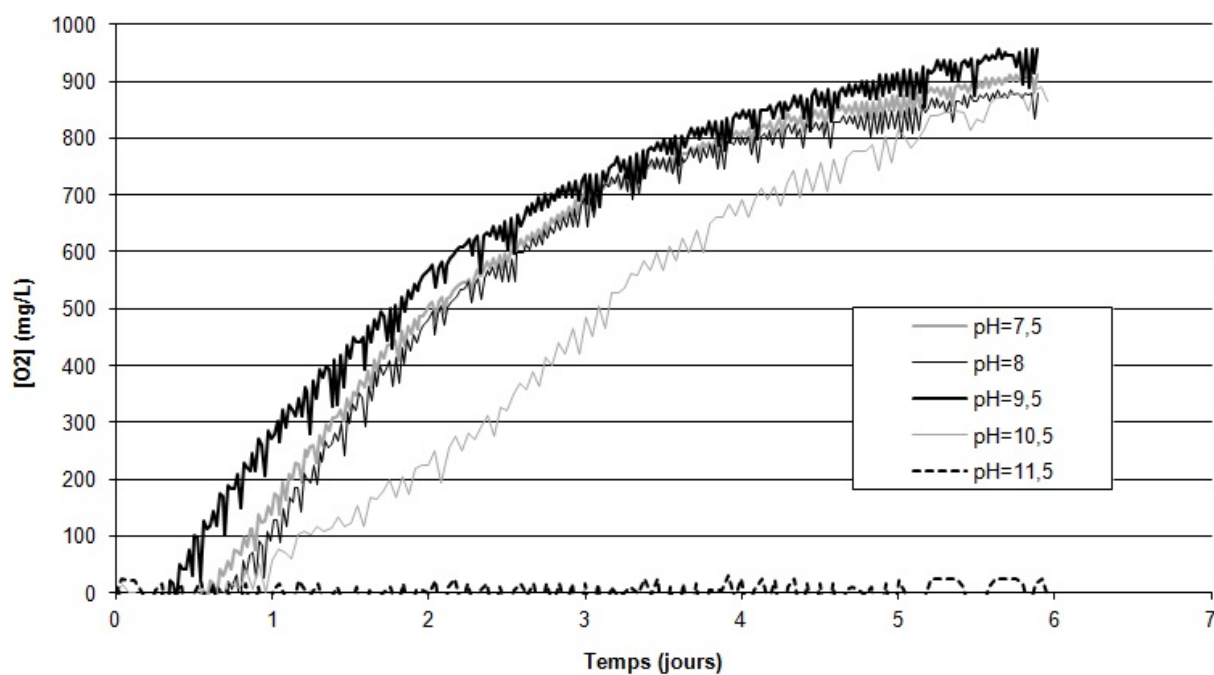


Figure 6.14 Demande biologique en oxygène de *B. cohnii* dans les milieux Nutrient Broth à différents pH.

### 6.1.3 Conclusion de la phase 1

Les mesures de pH, de densité optique et les comptages par épifluorescence constituent une batterie de tests complémentaires, qui permettent de suivre toutes les phases de croissance des souches bactériennes.

Le pH est un indicateur de l'activité bactérienne intéressant, puisque les évolutions du pH traduisent l'activité métabolique des bactéries. Dans les milieux étudiés durant cette phase, le pH sous l'action des deux souches bactériennes baisse, puis une remontée est ensuite constatée; qui peut correspondre à la baisse de l'activité bactérienne. Dans le cadre du développement d'une solution de biocicatrisation fondée sur la formation de carbonate de calcium, le pH est un paramètre important. Un pH qui augmente est en effet un facteur favorisant la précipitation de  $\text{CaCO}_3$ .

Les essais ont montré que les milieux recommandés, avec solution tampon, offraient les conditions optimales de croissance. Cependant, les modifications de pH par l'ajout de NaOH permettent d'obtenir une activité bactérienne légèrement plus faible mais acceptable. Le NaOH et le KOH sont des espèces chimiques qui peuvent être relarguées par la pâte de ciment dans les solutions aqueuses qui sont à leur contact. Dans l'objectif d'un traitement bactérien dans des fissures de mortier, il est primordial que les bactéries puissent se développer dans de tels environnements.

Pour les deux souches étudiées, *B. pseudofirmus* et *B. cohnii*, la température de 30°C permet un développement plus rapide des bactéries dans tous les milieux de culture comparativement à 20°C où une phase de latence est constatée. Cependant, avec *B. pseudofirmus*, à 20°C la concentration en bactéries atteint des valeurs comparables aux cultures à 30°C. La densité optique suggère que *B. cohnii*, contrairement à *B. pseudofirmus*, semble atteindre une concentration bactérienne légèrement plus faible à 20°C qu'à 30°C. La phase de latence constaté à 20°C avec les deux souches bactériennes est acceptable dans une logique d'application d'un traitement de biocicatrisation des fissures. Par contre, pour des développements ultérieurs, il conviendra de vérifier la durée de la phase de latence pour des températures plus basses.

Les tableaux 6.1 et 6.2 synthétisent les conclusions des essais avec les trois souches bactériennes.

La première colonne présente le critère d'évaluation, s'il y a eu une forte croissance et si elle a été rapide. Les deux premières lignes présentent la condition testée : la température ou le type d'ajustement du pH. Dans les cases, "DO" désigne les mesures de Densité Optique,

---

"Bac" désigne les comptages bactériens par épifluorescence et "pH" les mesures de pH. La couleur verte indique que le milieu correspondant aux conditions testées (Température et type ajustement), répond au critère d'évaluation de façon optimale selon le type de mesure choisie (DO, Bac, pH). La couleur rouge indique une mauvaise réponse, comparativement aux autres conditions testées. La couleur orange indique une bonne réponse mais pas optimale comparativement aux autres conditions testées.

<i>B. pseudofirmus</i>	Température		Ajustement du pH	
	30 °C	20 °C	Tampon	NaOH
Nombre maximal de bactéries	DO/Bac	DO/Bac	DO/Bac	DO/Bac
Durée de la phase de latence	DO/pH/Bac	DO/pH/Bac	DO/pH/Bac	DO/pH/Bac

Tableau 6.1 Tableau récapitulatif de la première partie de la phase 1, avec *B. pseudofirmus*.

<i>B. cohnii</i>	Température		Ajustement du pH	
	30 °C	20 °C	Tampon	NaOH
Nombre maximal de bactéries	DO	DO	DO/Bac	DO/Bac
Durée de la phase de latence	DO/pH/Bac	DO/pH/Bac	DO/pH/Bac	DO/pH/Bac

Tableau 6.2 Tableau récapitulatif de la première partie de la phase 1, avec *B. cohnii*.

Les résultats des croissance en Oxitop<sup>®</sup> montrent que *B. pseudofirmus* et *B. cohnii* sont capables de se développer dans des milieux ayant un pH compris entre 7,5 et 10,5. Cette gamme de pH correspond au pH d'un béton de surface carbonaté ou lixivié mais aussi du béton d'une fissure qui a commencé à être autocicatrisée. En revanche, aucune croissance n'a été détectée à pH de 11,5 pour les deux souches testées. Ce résultat met l'accent sur la nécessité de réaliser les essais de biocicatrisation sur des mortiers lixiviés et/ou carbonatés ou des mortiers ayant subi une autocicatrisation naturelle.

## 6.2 Phase 2 : Croissance bactérienne en présence de précurseur

En s'appuyant sur les résultats obtenus avec les deux souches testées dans le milieu recommandé, la seconde phase d'essais consiste à suivre la croissance des bactéries *B. pseudofirmus* et *B. cohnii* dans les milieux de culture avec différentes sources de nutriments et différents précurseurs de précipitation.

L'un des objectifs de cette phase est de déterminer la quantité minimale de nutriments nécessaire pour assurer une bonne activité bactérienne. La solution de biocicatrisation sera ainsi moins onéreuse et les interactions avec le matériau seront minimisées. Un second objectif est de déterminer l'influence des précurseurs de précipitation sur la croissance bactérienne, et de savoir s'ils peuvent permettre la formation de carbonate de calcium.

La concentration en nutriment apportés par le milieu Nutrient Broth (NB) est abaissée à 3 g/L, contre 8 g/L dans le milieu recommandé. Un autre nutriment est évalué. Il s'agit de l'extrait de levure, qui est ajouté à 3 g/L puis à 0,1 g/L. L'effet de l'absence de nutriment est également évalué, afin de déterminer si les bactéries sont capables d'utiliser le carbone des précurseurs comme nutriment. Certains milieux sont enrichis d'une source d'azote supplémentaire (0,2 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).

Les précurseurs de précipitation sont le lactate de calcium ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$ ) à 9,73 g/L (0,045 mol/L) et le gluconate de calcium ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ) à 10 g/L (0,022 mol/L). Le lactate de calcium est un précurseur de précipitation déjà utilisé par certains auteurs [65, 130]. Le gluconate de calcium est un composé proche, constitué de deux chaînes carbonées identiques, liées par un atome de calcium. Seule la longueur de la chaîne diffère entre le lactate ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$ ) et le gluconate ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$ ).

Les concentrations utilisées (9,73 g/L de lactate de calcium et 10 g/L de gluconate de calcium) permettent d'avoir le même apport en carbone avec les deux précurseurs : 0,267 mol/L. Le lactate de calcium se décompose en 2 molécules de lactate ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$ ) et un ion calcium. Le gluconate de calcium se décompose en 2 molécules de gluconate ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$ ) et un ion calcium.

Tout au long de cette phase, le pH initial n'est pas ajusté.

La figure 6.15 schématise les différentes compositions des milieux ainsi que le type de suivi : en erlenmeyers ou en Oxitop<sup>®</sup>.



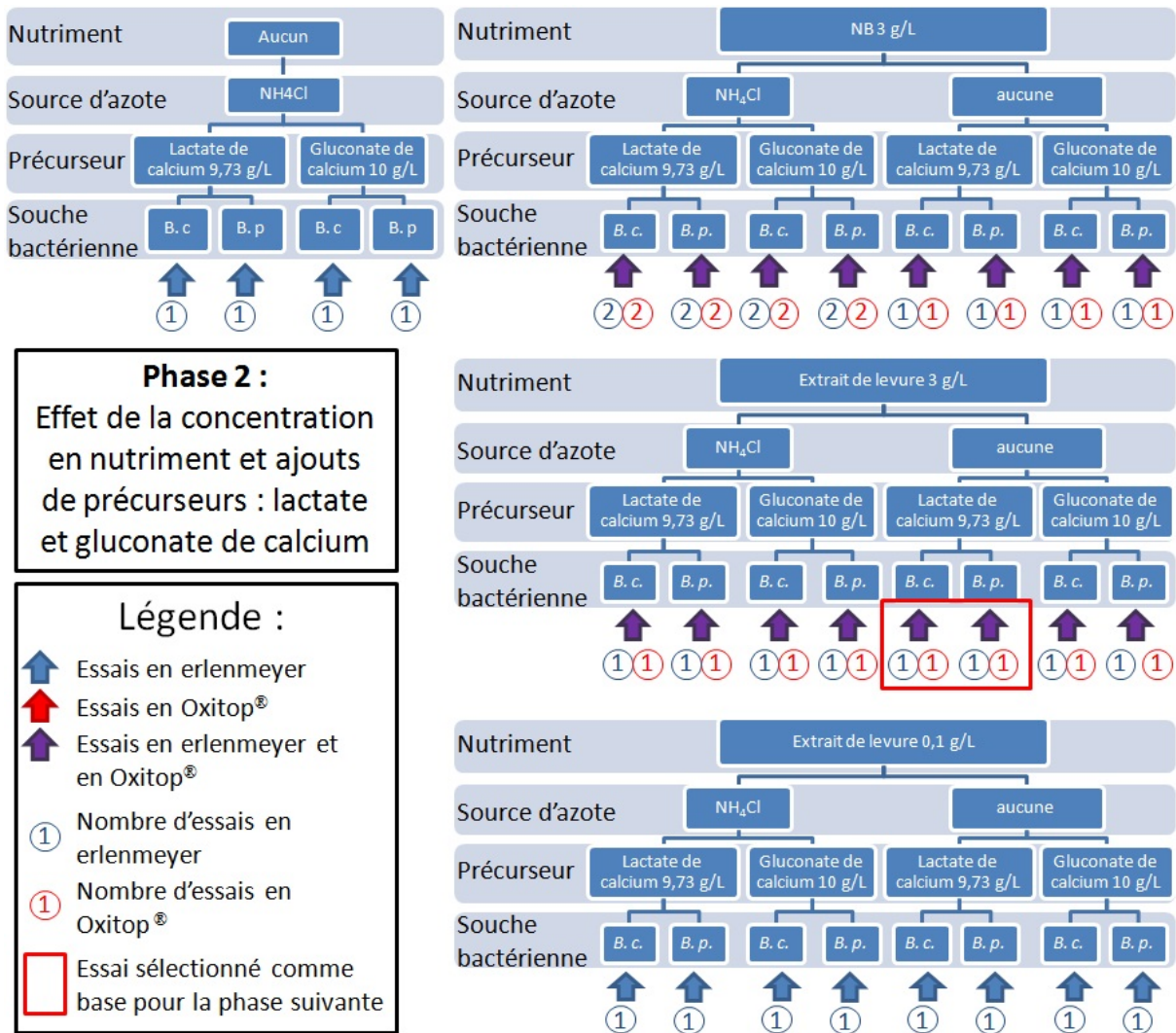


Figure 6.15 Schéma des essais menés en phase 2.

### 6.2.1 Essais en erlenmeyers

La croissance bactérienne a été suivie via la consommation des précurseurs de précipitation, le lactate de calcium et le gluconate de calcium. Les cultures en erlenmeyers sont suivies en dosant par chromatographie ionique les précurseurs. Il est ainsi présenté dans les figures suivantes 6.16, 6.17, 6.18 et 6.19, l'évolution de la concentration en lactate ( $C_3H_5O_3$ ) et en gluconate ( $C_6H_{11}O_7$ ). La première mesure a été réalisée au bout de 20 jours de croissance.

La figure 6.16 présente l'évolution de la concentration en précurseurs dans les milieux de culture ensemencés avec *B. pseudofirmus*.

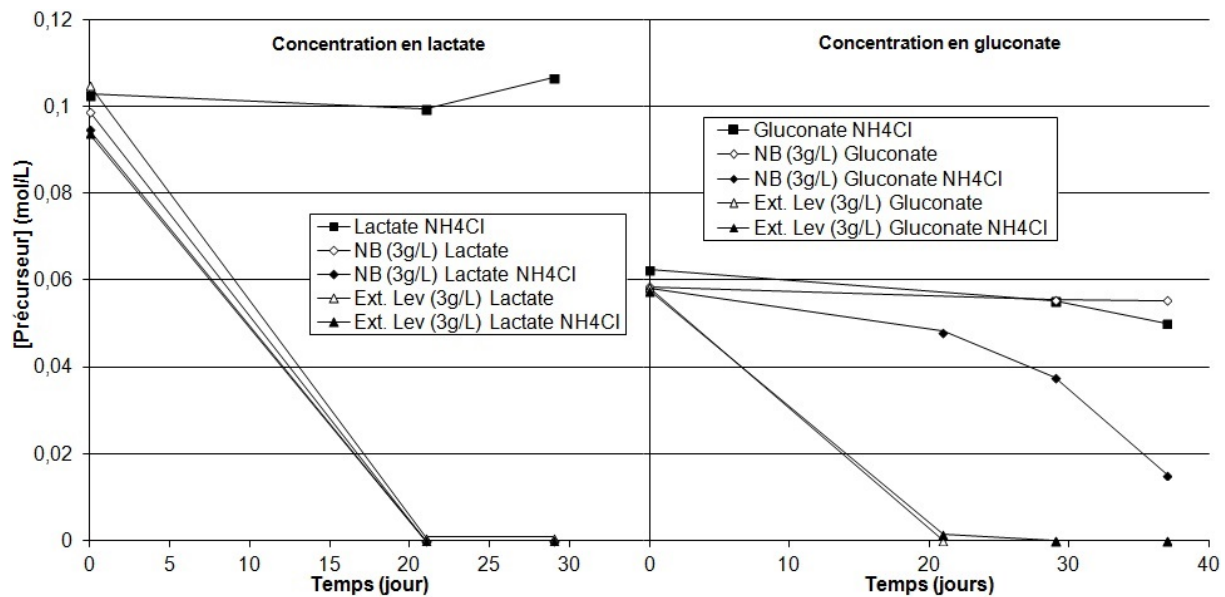


Figure 6.16 Concentration en précurseurs avec *B. pseudofirmus*, milieux avec et sans nutriments.

Les milieux avec lactate de calcium et une source de nutriment à 3 g/L (NB ou extrait de levure) ont une complète disparition du lactate en moins de 20 jours. En revanche, pour le milieu sans nutriment, avec lactate de calcium et chlorure d'ammonium, la concentration en lactate n'évolue pas pendant la durée de l'expérimentation ; traduisant le fait qu'il n'est pas dégradé par les bactéries.

Les milieux avec gluconate de calcium ont une complète consommation du précurseur que lorsque la source de nutriment est de l'extrait de levure (3 g/L). Le milieu sans nutriment, avec gluconate de calcium et chlorure d'ammonium n'a qu'une légère baisse de la concentration en gluconate. Le milieu avec NB et chlorure d'ammonium présente une consommation du gluconate incomplète, il reste autour de 3 g/L de précurseur après

37 jours de culture. Le milieu avec NB sans chlorure d'ammonium ne montre pas de diminution du gluconate.

La figure 6.17 montre l'évolution de la concentration en précurseurs dans les mêmes milieux de culture que précédemment, ensemencés avec *B. cohnii*.

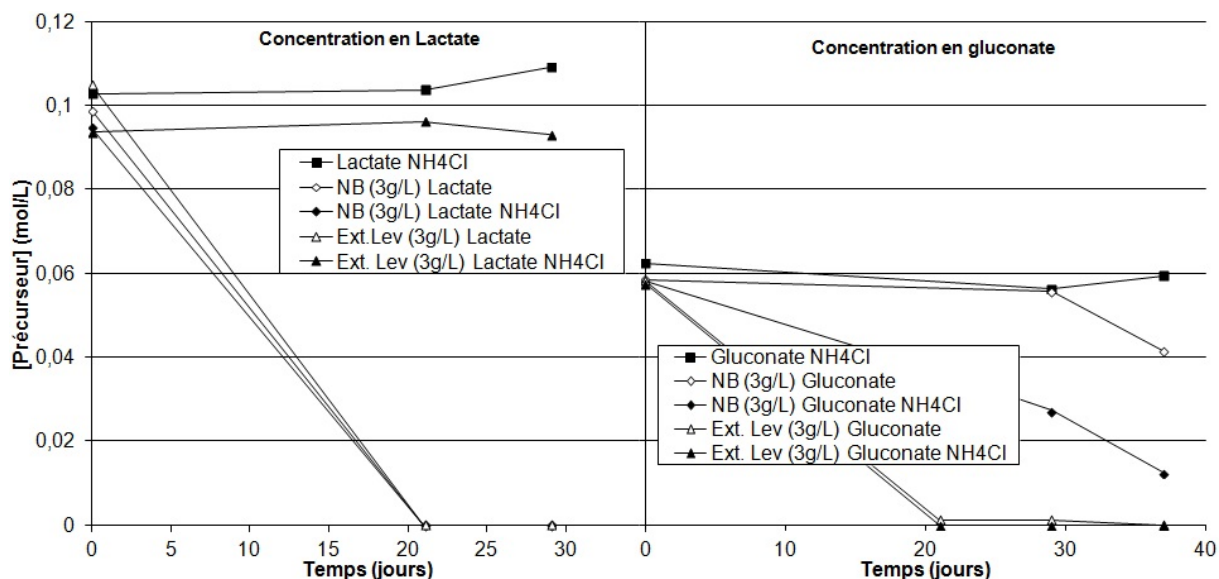


Figure 6.17 Concentration en précurseurs avec *B. cohnii*, milieux avec et sans nutriments.

Les mêmes tendances se dégagent avec *B. cohnii* qu'avec *B. pseudofirmus* à une exception près : le milieu avec lactate de calcium, extrait de levure et chlorure d'ammonium ne présente pas de consommation du précurseur.

Afin de savoir si l'activité bactérienne pouvait être conservée en présence d'une faible quantité de nutriment, il a été testé des milieux contenant 0,1 g/L d'extrait de levure. Les figures 6.18 et 6.19 présentent la consommation des précurseurs dans les milieux de culture ensemencés respectivement avec *B. pseudofirmus* et *B. cohnii*. Les milieux utilisés sont constitués de 0,1 g/L d'extrait de levure, avec et sans ajout de chlorure d'ammonium. Pour les deux souches, aucune activité n'est constatée dans les milieux avec 0,1 g/L d'extrait de levure.

L'influence de la source d'azote supplémentaire, le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  semble minimale. Le seul effet favorable d'un ajout de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  serait de permettre une consommation légèrement plus rapide du gluconate par les deux souches bactériennes en présence de Nutrient Broth. Les deux souches utilisées, *B. pseudofirmus* et *B. cohnii*, présentent globalement les mêmes tendances à la seule exception du milieu avec extrait de levure (3 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et lactate de

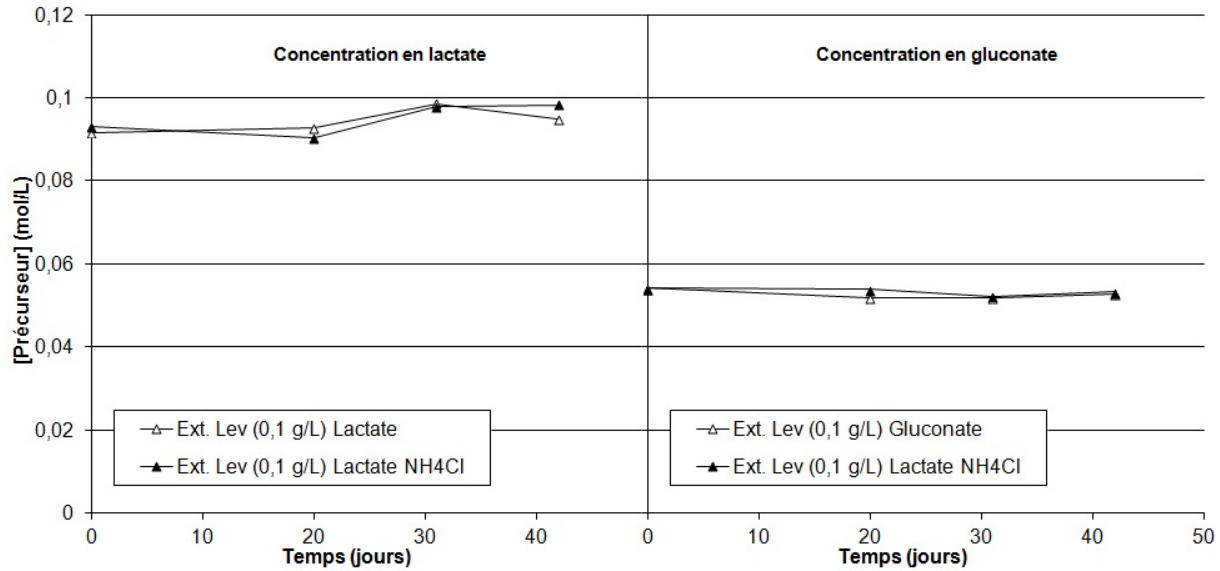


Figure 6.18 Concentration en précurseurs avec *B. pseudofirmus*, évaluation de la concentration en extrait de levure.

calcium. Cependant, les causes de la non croissance de *B. cohnii* dans ce milieu pourraient être liées à d'autres facteurs, comme un inoculum peu actif.

La présence d'un précipité est observée dans les milieux présentant une bonne activité bactérienne. Des analyses de diffraction des rayons X mettent en évidence la présence de carbonate de calcium sous forme de calcite dans le précipité formé (Figure 6.20). L'un des objectifs visés avec l'utilisation de précurseurs dans les milieux de culture est donc atteint. Les bactéries sont capables de produire de la calcite, un minéral susceptible de permettre une cicatrification des fissures dans les matériaux cimentaires.

Afin de confirmer les tendances observées, la croissance de *B. pseudofirmus* et de *B. cohnii* en présence des mêmes milieux de culture a été suivie en continu à l'aide du système oxitop<sup>®</sup>.

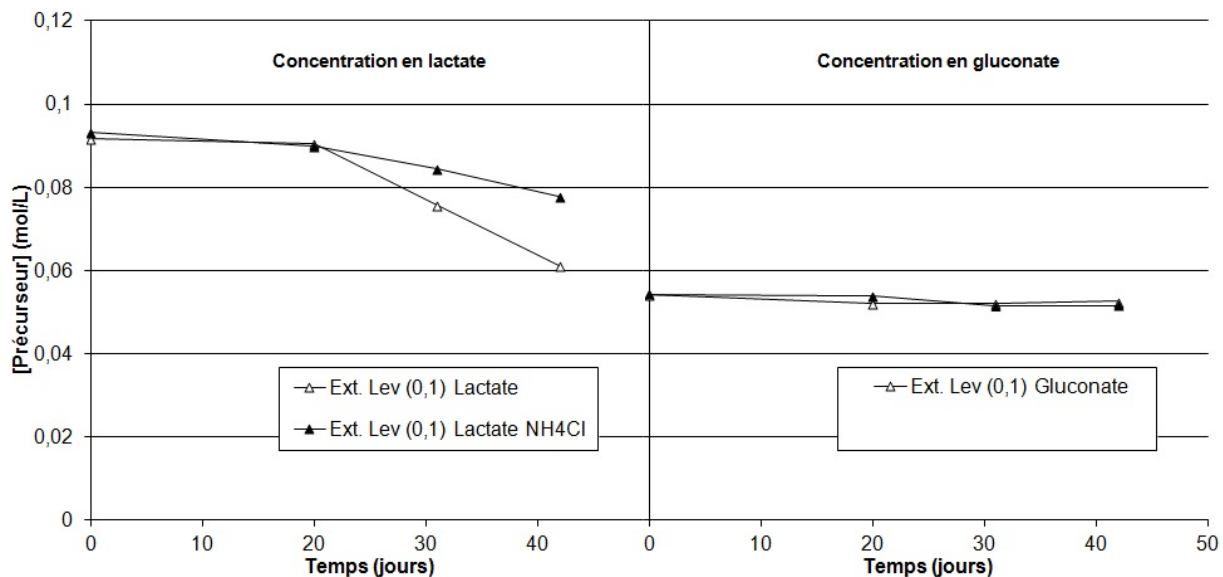


Figure 6.19 Concentration en précurseurs avec *B. cohnii*, évaluation de la concentration en extrait de levure.

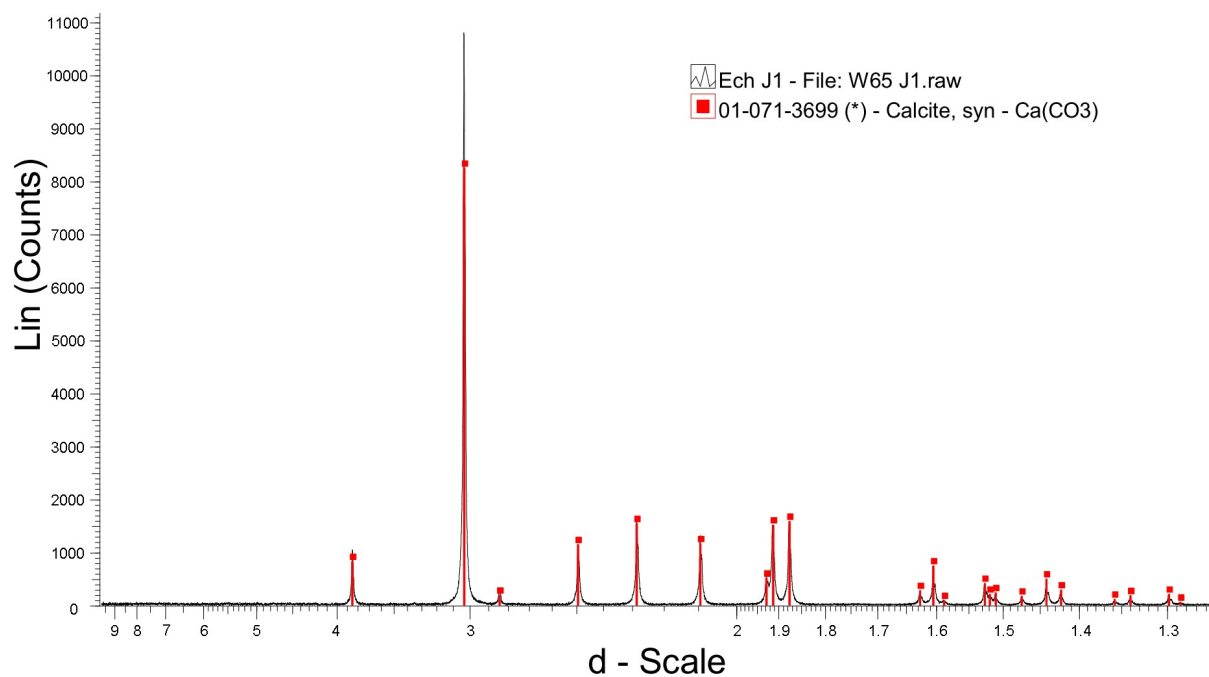


Figure 6.20 Diffraction aux rayons X du précipité formé dans le milieu de culture avec extrait de levure et gluconate de calcium ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

## 6.2.2 Essais en Oxitop

Les essais en Oxitop<sup>®</sup> consistent à suivre la consommation en O<sub>2</sub> engendrée par l'activité bactérienne, la demande biologique en oxygène (DBO). Des mesures de pH, des comptages bactériens par épifluorescence et des dosages des précurseurs sont menés au début et à la fin de chaque essai.

### Milieux avec Nutrient Broth

Les milieux testés dans cette partie sont constitués de 3 g/L de milieux NB, avec et sans source d'azote supplémentaire (NH<sub>4</sub>Cl), en présence de lactate de calcium ou de gluconate de calcium.

La figure 6.21 présente la demande biologique en oxygène (DBO) de *B. pseudofirmus* dans les milieux testés.

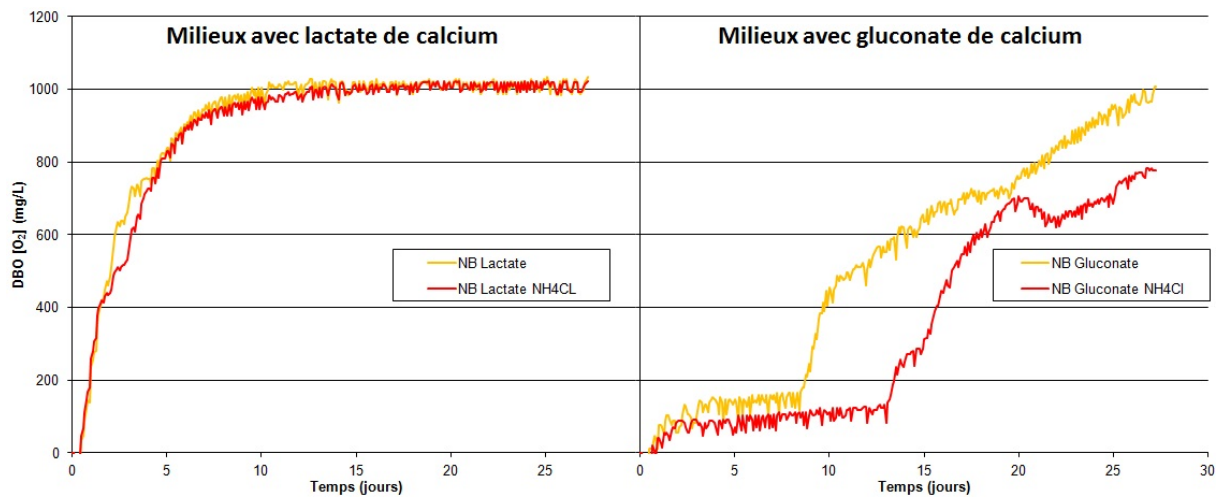


Figure 6.21 Demande biologique en oxygène, milieu NB (3 g/L) avec *B. pseudofirmus*.

L'activité bactérienne paraît plus rapide et constante dans les milieux avec lactate de calcium qu'avec gluconate de calcium. En revanche, l'influence du NH<sub>4</sub>Cl semble minime. Pour les milieux avec lactate de calcium, la DBO semble atteindre un maximum à 10 jours avec une valeur de 1000 mg/L de O<sub>2</sub>. L'évolution de la DBO pour les milieux avec gluconate de calcium est plus chaotique et le maximum ne semble pas encore atteint après 1 mois d'essai.

La figure 6.22 présente les variations de la concentration en précurseurs entre le début et la fin de l'essai. Les deux précurseurs ont été consommés, bien que partiellement. La concentration du lactate et du gluconate diminuent en moyenne respectivement de 0,031 mol/L

et de 0,024 mol/L. La consommation partielle des précurseurs est liée aux conditions dans lesquelles les essais ont été réalisés : les flacons du système Oxitop® sont hermétiquement fermés pour la mesure de la DBO, l'oxygène est par conséquent limité.

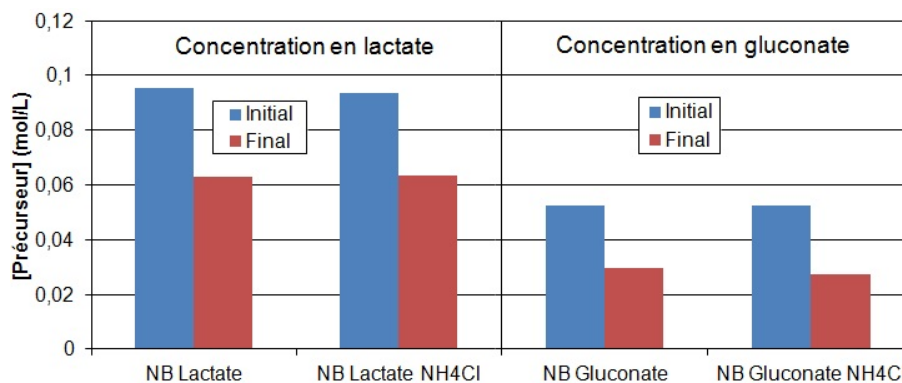


Figure 6.22 Évolution de la concentration en précurseurs, milieux NB (3 g/L) avec *B. pseudofirmus*.

Parallèlement à la consommation des précurseurs, la population bactérienne augmente (figure 6.23). Cependant, la durée des mesures de DBO s'étend sur 1 mois, la concentration en bactéries établie à la fin de l'essai ne rend pas compte des possibles pics de croissance qu'il y a pu avoir durant la période de mesure. Quel que soit le milieu, la population bactérienne augmente d'un facteur 100 entre le début et la fin de l'essai.

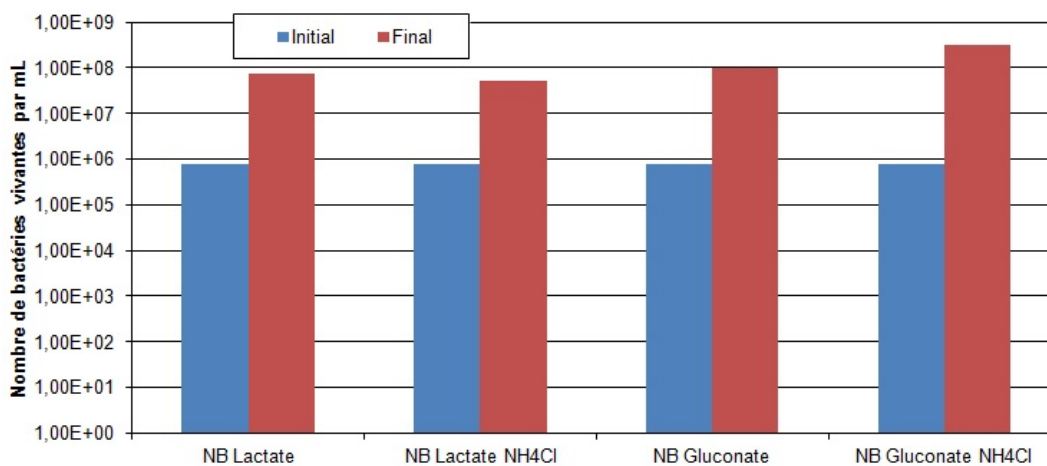


Figure 6.23 Évolution de la concentration de bactéries vivantes, milieux NB (3 g/L) avec *B. pseudofirmus*.

La figure 6.24 illustre les variations de pH entre le début et la fin des essais de croissance. Le pH pour tous les milieux est proche de 6,6 initialement. Les milieux avec lactate de calcium voient leur pH augmenter, à 9,9 pour le milieu avec NB et sans NH<sub>4</sub>Cl et à 8,6 pour le milieu avec NB et NH<sub>4</sub>Cl. Les milieux avec gluconate de calcium voient leurs pH

baisser légèrement pour atteindre 5,9 pour le milieu avec NB sans  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 5,6 pour le milieu avec NB et  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

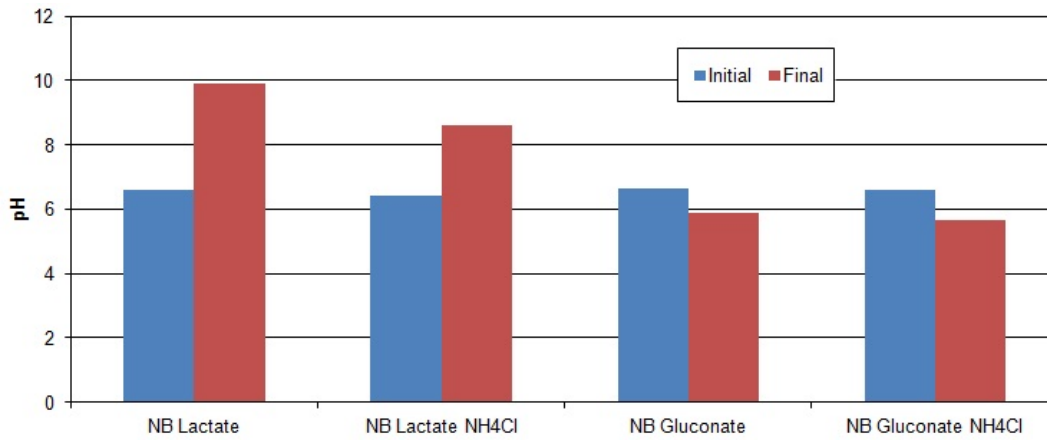


Figure 6.24 Évolution du pH, milieux NB (3 g/L) avec *B. pseudofirmus*.



Les figures 6.25, 6.26 et 6.27 présentent respectivement la demande biologique en oxygène, l'évolution de la concentration en lactate et l'évolution du nombre de bactéries en solution pour les essais avec *B. cohnii*.

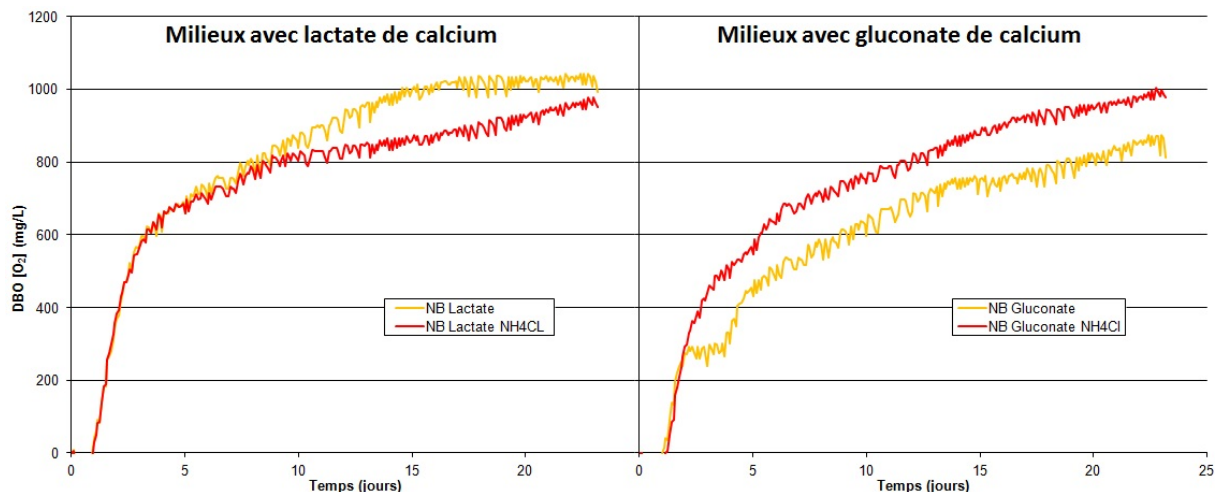


Figure 6.25 Demande biologique en oxygène, milieux NB (3 g/L) avec *B. cohnii*.

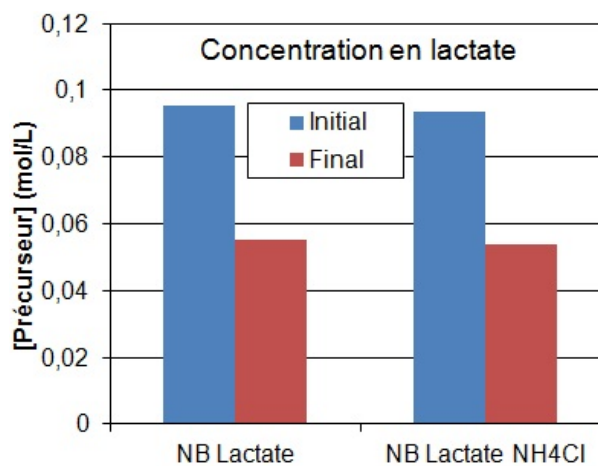


Figure 6.26 Évolution de la concentration en lactate, milieux NB (3 g/L) avec *B. cohnii*.

La croissance de *B. cohnii* est comparable à celle de *B. pseudofirmus*. En présence du gluconate de calcium comme précurseur, la croissance semble être moins rapide. Néanmoins, les bactéries sont capables d'atteindre une concentration proche  $1.10^9$  bactéries par mL dans tous les milieux. Le lactate est consommé au cours de la croissance mais pas dans sa totalité (diminution du lactate de 0,04 mol/L). Avec *B. cohnii*, tout comme avec *B. pseudofirmus*, le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ne semble pas influencer l'activité bactérienne.

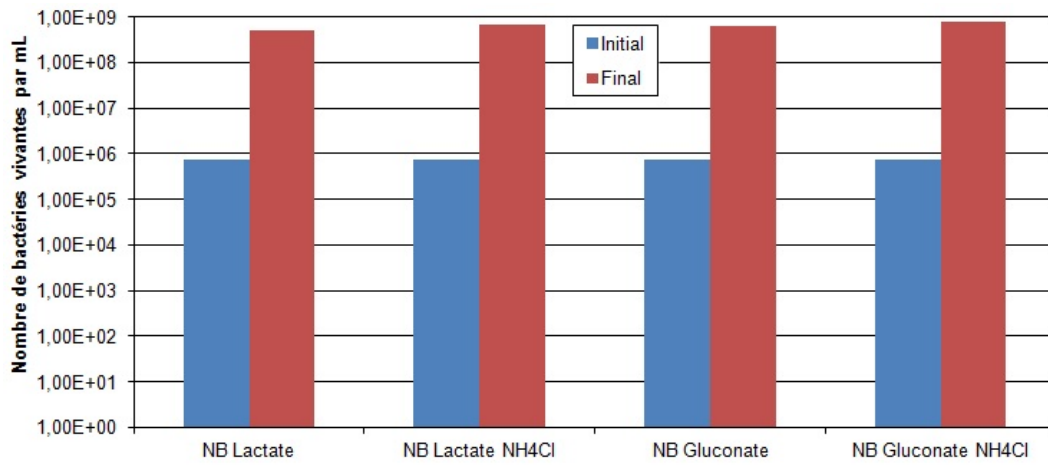


Figure 6.27 Évolution de la concentration bactérienne, milieux NB (3 g/L) avec *B. cohnii*.

### Comparaison des milieux avec Nutrient Broth et extrait de levure

Les croissances de *B. pseudofirmus* et *B. cohnii* ont également été évaluées en présence d'extrait de levure. Le milieu NB (3 g/L) avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,2 g/L) est réutilisé pour permettre la comparaison avec les milieux composés de 3 g/L d'extrait de levure.

La figure 6.28 montre les variations de la DBO dans les différents milieux ensemencés avec *B. pseudofirmus*. La courbe représentant le milieu NB avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$  devrait correspondre à la courbe de ce même milieu présenté en figure 6.23. Cependant, dans la figure 6.28, la concentration en oxygène semble plafonner à 600 mg/L au lieu des 1000 g/L. L'inoculum semble moins actif ici. Les milieux avec extrait de levure et lactate de calcium semblent offrir des conditions plus favorables à la croissance de *B. pseudofirmus*. La croissance avec gluconate de calcium est plus lente, sans qu'il n'y ait de différences claires entre les différents milieux. Dans les milieux avec lactate de calcium et gluconate de calcium, l'ajout de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ne semble pas modifier la cinétique de croissance.

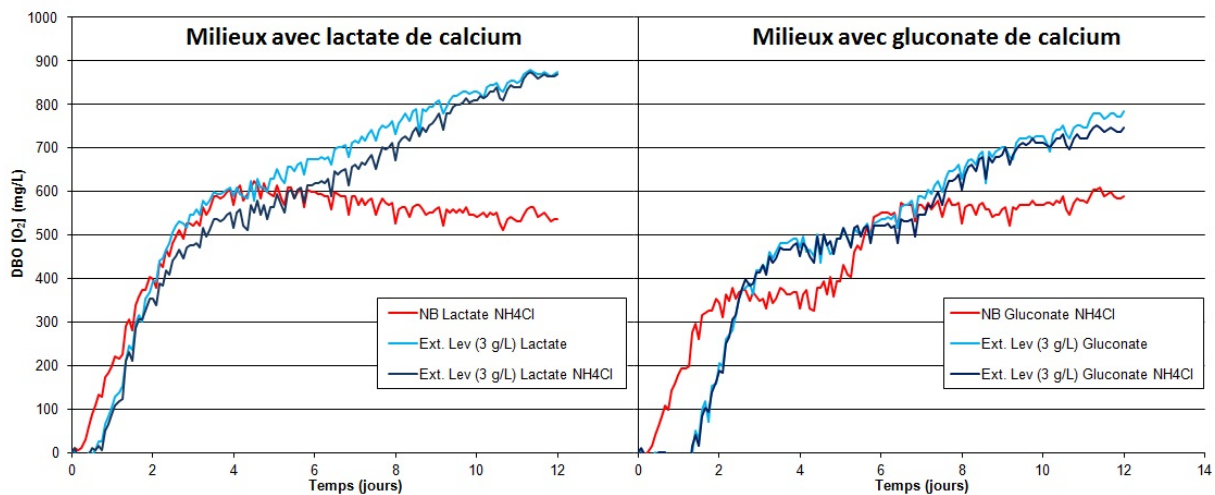


Figure 6.28 Demande biologique en oxygène, milieux avec NB et extrait de levure en présence de *B. pseudofirmus*.

La figure 6.29 présente les consommations en précurseurs dans chaque milieu. Les milieux avec extrait de levure et lactate de calcium présentent les plus fortes baisses de la concentration en précurseurs. Malgré les mesures de DBO qui pouvaient suggérer une croissance plus lente, les bactéries ont été capables de consommer une large proportion de précurseurs, jusqu'à 0,08 mol/L en 12 jours dans le milieu contenant l'extrait de levure, du lactate et du  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

La concentration en cellules bactériennes est présentée à la figure 6.30. Une forte croissance de la population bactérienne a été observée dans tous les milieux testés. Toutefois, les

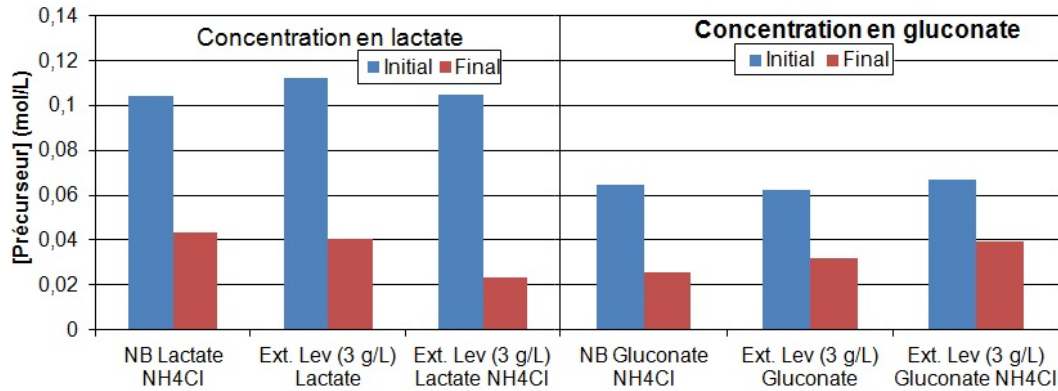


Figure 6.29 Évolution de la concentration en précurseurs, milieux avec NB et extrait de levure avec *B. pseudofirmus*.

milieux avec extrait de levure et lactate de calcium ont montré la plus forte concentration bactérienne, plus de  $1.10^9$  bactéries vivantes par mL.

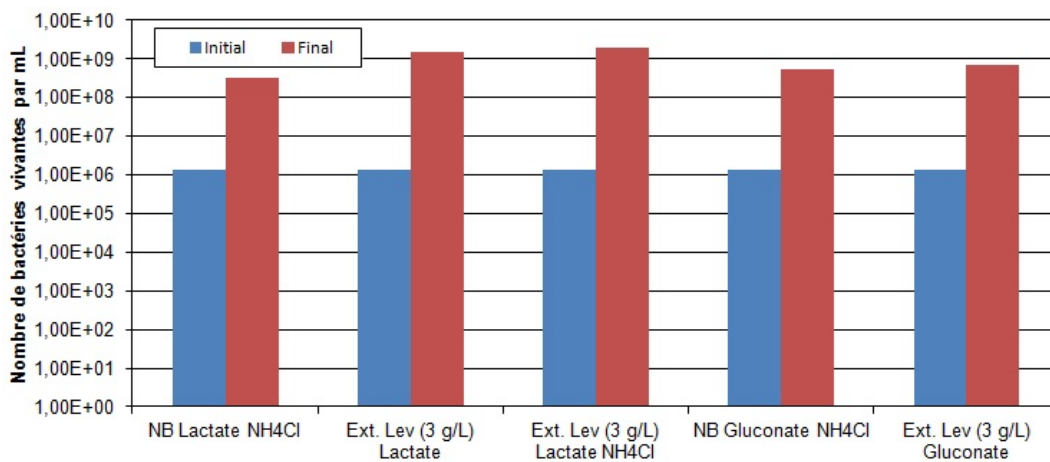


Figure 6.30 Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec NB et extrait de levure avec *B. pseudofirmus*.

L'évolution du pH est présentée à la figure 6.31. Le pH augmente dans les milieux avec lactate de calcium et diminue dans les milieux avec gluconate de calcium. Les variations sont néanmoins relativement faibles, à l'exception des milieux avec extrait de levure et NH<sub>4</sub>Cl : une augmentation de 1 unité avec le lactate de calcium et une baisse de 1,5 unités avec le gluconate de calcium.

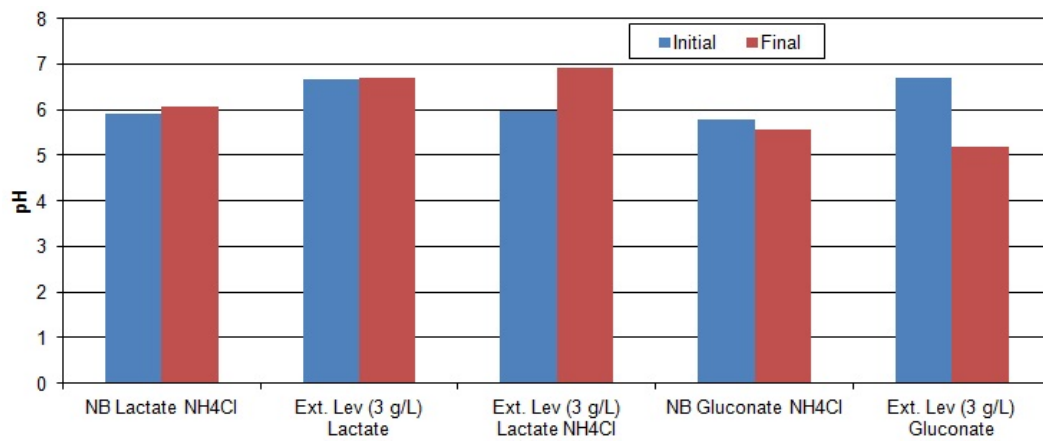


Figure 6.31 Évolution du pH, milieux avec NB et extrait de levure avec *B. pseudofirmus*.

Les mêmes milieux sontensemencés avec *B. cohnii* et suivis de la même manière.

La figure 6.32 présente l'évolution de la DBO. Les courbes pour les milieux avec lactate de calcium atteignent le maximum de 1000 mg/L en 5 jours. L'évolution est plus lente avec le gluconate de calcium. La source de nutriment, extrait de levure ou milieu NB, ne semble pas influencer la cinétique de croissance, tout comme l'ajout de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

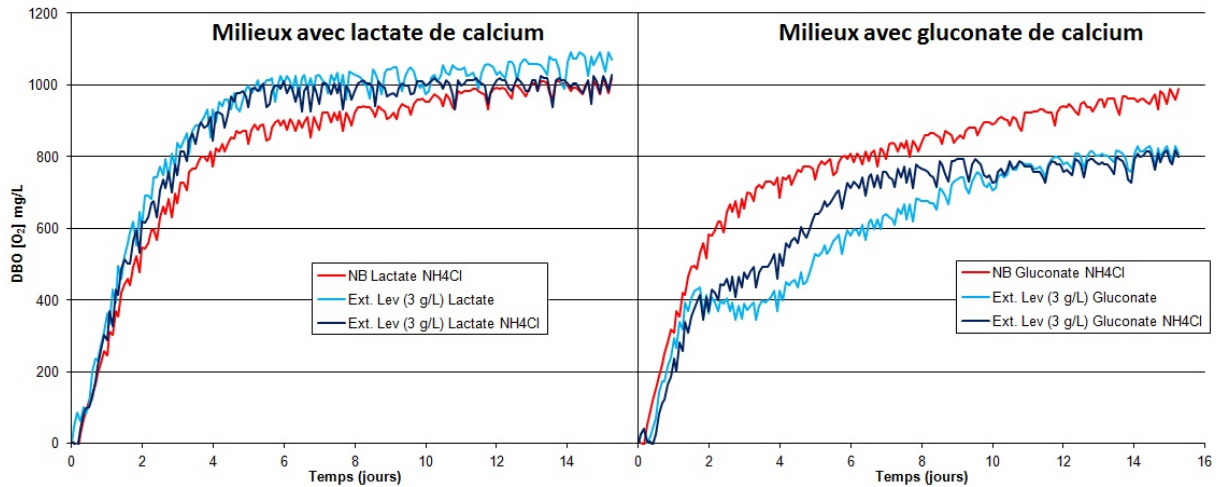


Figure 6.32 Demande biologique en oxygène, milieu avec NB et extrait de levure avec *B. cohnii*.

La figure 6.33 présente la concentration en précurseurs dans les milieux au temps initial et au temps final. Le milieu NB avec gluconate et  $\text{NH}_4\text{Cl}$  n'a pas d'évolution marquée de la concentration en précurseurs. Le gluconate est fortement consommé en présence d'extrait de levure, avec une baisse de la concentration de 0,034 mmol/L. Le lactate montre une consommation de 0,041 mol/L en moyenne.

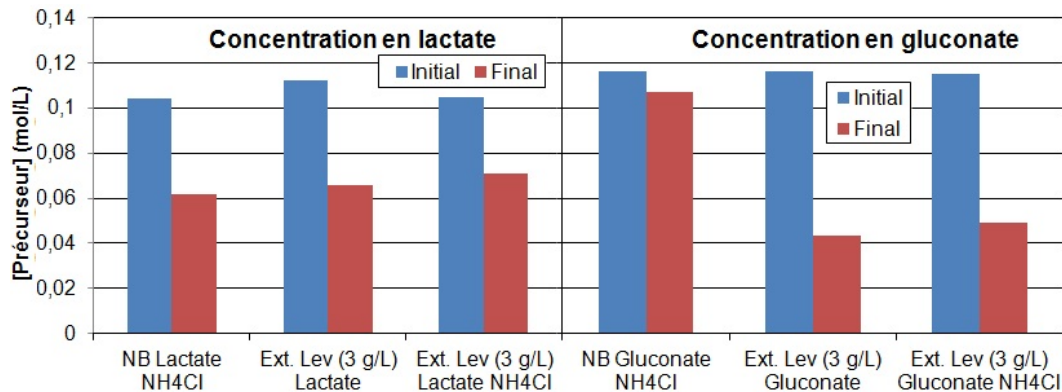


Figure 6.33 Évolution de la concentration en précurseurs, milieu avec NB et extrait de levure avec *B. cohnii*.

La taille de la population bactérienne à la fin de l'essai est importante dans tous les milieux, supérieure à  $4.10^8$  bactéries vivantes par mL. Certains milieux dépassent même  $1.10^9$  bactéries vivantes par mL.

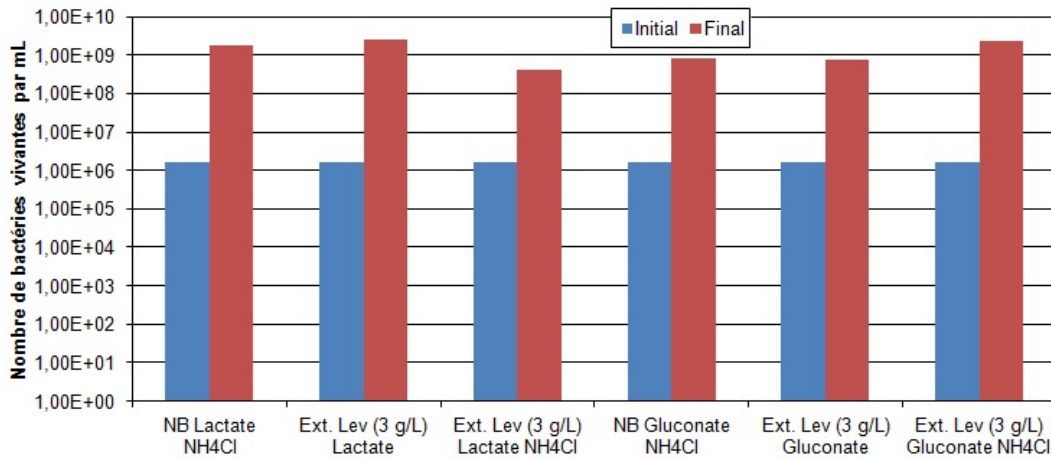


Figure 6.34 Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec NB et extrait de levure avec *B. cohnii*.

Les variations de pH illustrées à la figure 6.35 montrent une augmentation du pH dans les milieux avec lactate de calcium et une diminution dans les milieux avec gluconate de calcium. Seule exception, le milieu avec NB gluconate de calcium et  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , où le pH augmente. Cette augmentation est à mettre en lien avec la très faible consommation du gluconate dans ce milieu et la croissance bactérienne néanmoins forte à  $8,4.10^8$  bactéries par mL. Il semble que ce soit la consommation du gluconate qui conduise à une diminution du pH.

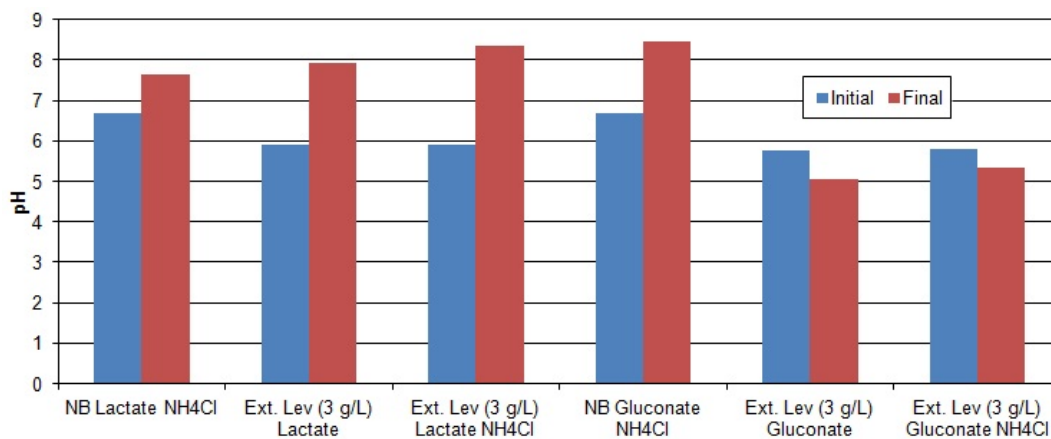


Figure 6.35 Évolution du pH, milieux avec NB et extrait de levure avec *B. cohnii*.

### 6.2.3 Mécanisme de dégradation du lactate

Lors des mesures par chromatographie ionique, des produits issus de la décomposition du lactate sont apparus. La figure 6.36 présente les pics qui apparaissent lors du dosage en chromatographie ionique. L'échantillon testé provient d'un prélèvement fait à la fin d'un essai en Oxitop sur le milieu de culture contenant le milieu NB (3 g/L), du lactate de calcium (9,73 g/L soit 0,045 mol/L) et du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,2 g/L), ensemencé avec *B. pseudofirmus*. Le premier pic est identifié par son temps de rétention (abscisse) comme étant du lactate. L'aire des pics permet de doser la quantité de produit présent dans la solution. Lors de ce dosage, il est donc observé la présence de deux autres composés inconnus, apparus suite à l'activité bactérienne.

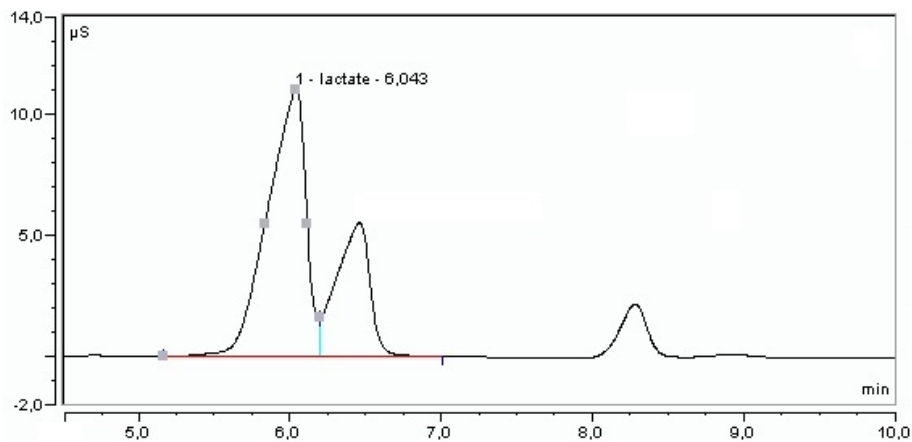


Figure 6.36 Analyse à la chromatographie ionique d'un milieu de culture avec lactate partiellement dégradé par les bactéries.

La littérature [33, 50], concernant le métabolisme de bactéries en présence de lactate montre que les composés produits seraient de l'acétate ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ ), du propionate ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2^-$ ) ou du formiate ( $\text{CHOO}^-$ ). La figure 6.37 schématise la dégradation possible du lactate par les bactéries.

Afin d'identifier les composés nouvellement formés, il a été choisi de faire des ajouts dosés avec les différents candidats. La figure 6.38 montre les différents pics apparaissant dans les mélanges obtenus par chromatographie ionique. La figure **A** présente le milieu de culture étudié sans ajout, avec les deux pics correspondant aux produits à identifier. Les figures **B**, **C** et **D** présentent le milieu de culture auquel a été ajouté, respectivement, 30 mg/L d'acétate, 10 mg/L de propionate et 10 mg/L de formiate.

Les comparaisons entre les pics de la figure **A** et les pics du milieu avec ajouts permet d'identifier les produits formés. Le pic proche de celui du lactate apparaît être le pic



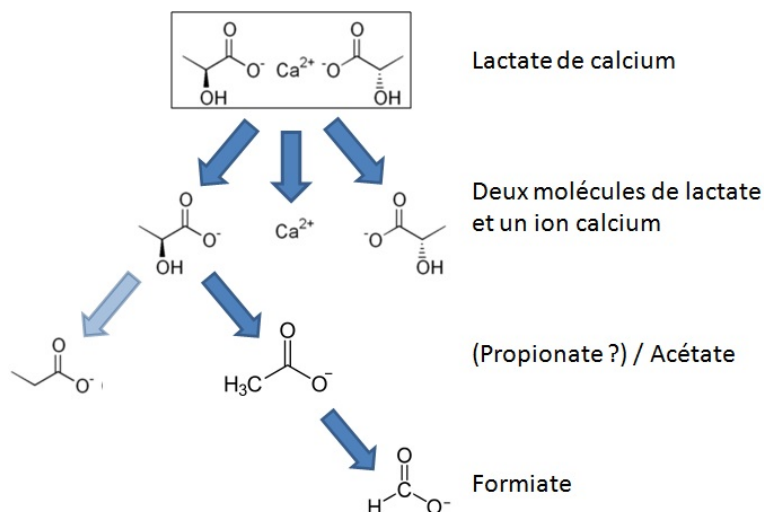


Figure 6.37 Schéma de décomposition possible du lactate.

correspondant à l'acétate (figure **B**). Le second pic ne correspond pas au propionate (figure **C**), mais au formiate (figure **D**).

L'observation de produits supplémentaires dans les milieux est relativement rare. Il correspond à un état intermédiaire, où les bactéries ont commencé à consommer le lactate mais n'ont pas totalement consommé les produits nouvellement formés. Généralement, seul le pic de lactate est visible.

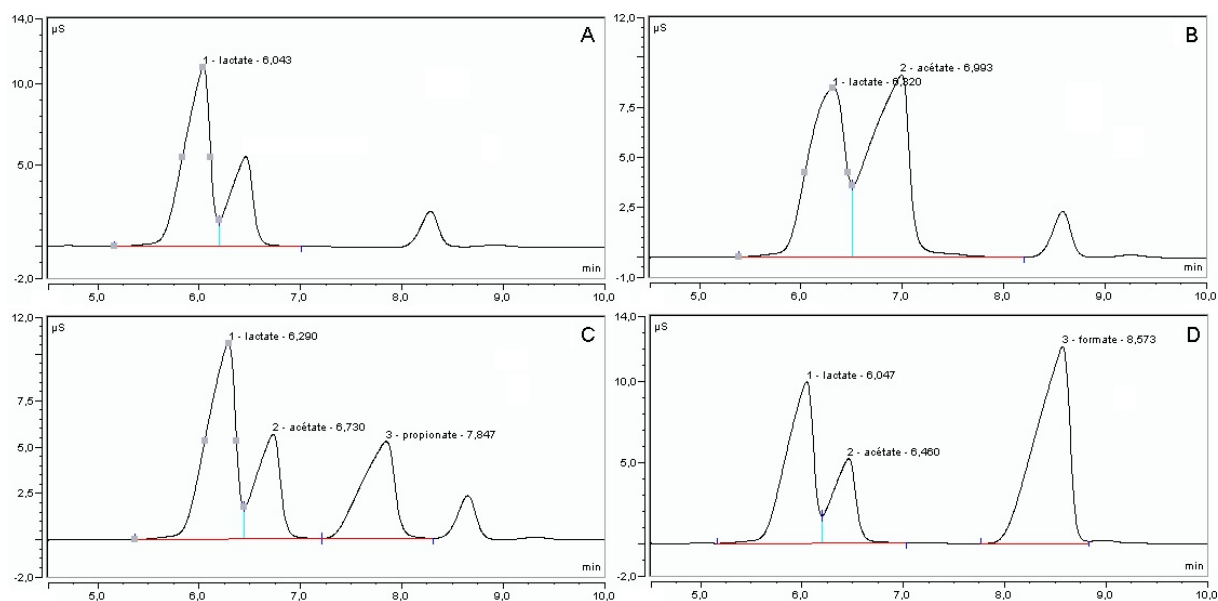


Figure 6.38 Analyse à la chromatographie ionique du milieu prélevé avec ajouts dosés.

### 6.2.4 Conclusion de la phase 2

Les essais en erlenmeyers et en oxitop<sup>®</sup> amènent à des conclusions cohérentes. Seul l'essai en erlenmeyer avec extrait de levure, lactate de calcium et NH<sub>4</sub>Clensemencé avec *B. cohnii* donne des résultats contradictoires avec l'essai en oxitop<sup>®</sup>. Il est possible que l'absence de consommation de lactate de calcium dans cet essai en erlenmeyer soit dû à un inoculum peu actif.

Les résultats obtenus permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Les souches bactériennes *B. pseudofirmus* et *B. cohnii* présentent de grande similitudes et les même tendances en terme de cinétique de croissance ;
- La présence de nutriments (NB ou extrait de levure) apportés en quantités suffisantes (3 g/L) permettent de développer une population bactérienne importante ;
- L'ajout de NH<sub>4</sub>Cl a peu d'influence sur l'activité bactérienne, les nutriments (extrait de levure et Nutrient Broth) semblent constituer une source d'azote suffisante ;
- En présence de gluconate de calcium, les deux souches bactériennes testées présentent une activité moins importante qu'en présence de lactate de calcium, comme le montre le suivi de la consommation en oxygène.
- Les milieux avec lactate de calcium présentent une augmentation du pH lorsque le précurseur à été consommé ;
- Les milieux avec gluconate de calcium présentent une légère diminution du pH lorsque le précurseur a été consommé ;

Les mesures de DBO ne sont pas forcément en adéquation avec la consommation en précurseurs. Dans le milieu avec NB gluconate et NH<sub>4</sub>Clensemencé avec *B. cohnii*, le précurseur est peu dégradé malgré une consommation notable d'oxygène par les bactéries.

Compte tenu des résultats obtenus avec les deux souches bactériennes testées, le milieu contenant l'extrait de levure, le lactate de calcium sans NH<sub>4</sub>Cl a été retenu comme base pour les milieux des essais suivants.

La combinaison entre extrait de levure et lactate de calcium permet une bonne activité bactérienne, du point de vue de la DBO, de la concentration bactérienne, de la consommation en précurseur et de l'augmentation du pH. Un pH qui augmente est un paramètre qui favorise la précipitation du carbonate de calcium.

---

### 6.3 Phase 3 : Croissance en présence de lactate de calcium avec différents ajustements du pH

Durant la phase 3, les nutriments dans les milieux étudiés sont apportés par de l'extrait de levure à 3 g/L. Le lactate de calcium est sélectionné comme précurseur à 9,73 g/L (0,045 mol/L). Différents ajustement du pH sont faits, avec une solution tampon ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ) ou avec de l'hydroxyde de sodium. Les milieux sontensemencés avec *B. cohnii* et *B. pseudofirmus*. L'objectif étant de déterminer l'influence du pH sur l'activité bactérienne en présence du précurseur de précipitation, le lactate de calcium. La figure 6.39 schématise les différents essais menés dans cette troisième phase des essais de croissance.

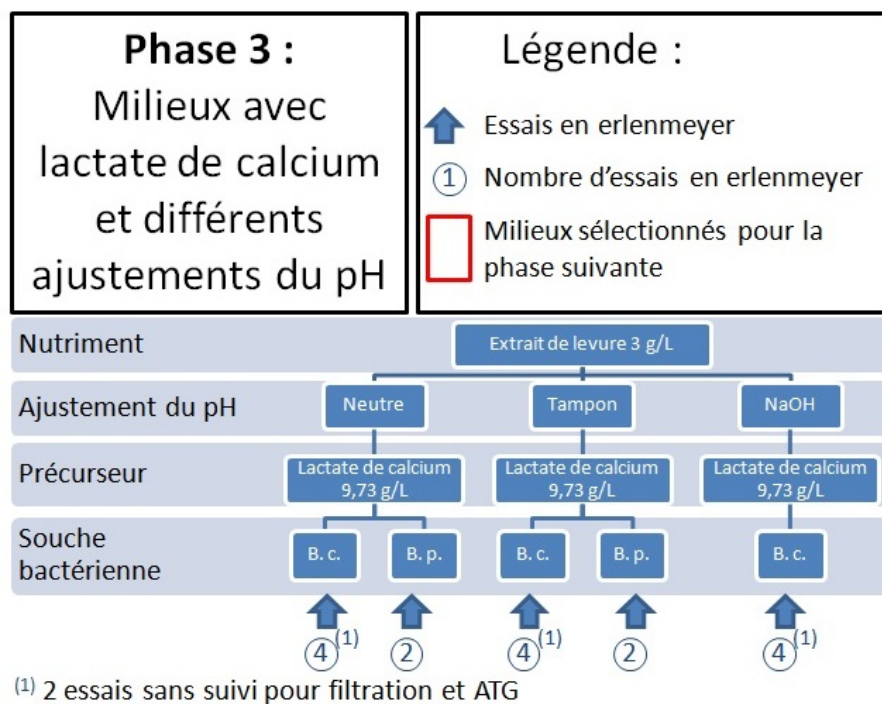


Figure 6.39 Schéma des essais de croissance menés en phase 3.

Les détails de l'élaboration des milieux sont présentés en annexe F. La nomenclature des milieux est faite selon les règles suivantes :

- "L" indique l'utilisation du lactate de calcium à 9,73 g/L (0,045 mol/L)
- "N" indique un milieu au pH non ajusté
- "T" indique l'ajustement du pH avec la solution tampon
- "S" indique l'ajustement du pH avec la soude

### 6.3.1 Essais en présence de lactate de calcium et de différents ajustements du pH

#### *B. cohnii*

La figure 6.40 présente l'évolution du pH dans les milieuxensemencés avec *B. cohnii*. Le milieu ajusté avec une solution tampon, LT, a son pH qui augmente régulièrement de 8,5 à un peu plus de 9 après 19 jours de croissance bactérienne. Le pH de la solution ajusté avec la soude, LS, voit son pH chuter rapidement au début de l'essai puis augmenter de 7,5 à presque 8,5. Les milieux non ajustés ont les plus fortes augmentations de pH, passant de 6,5 à 8,5 en 19 jours.

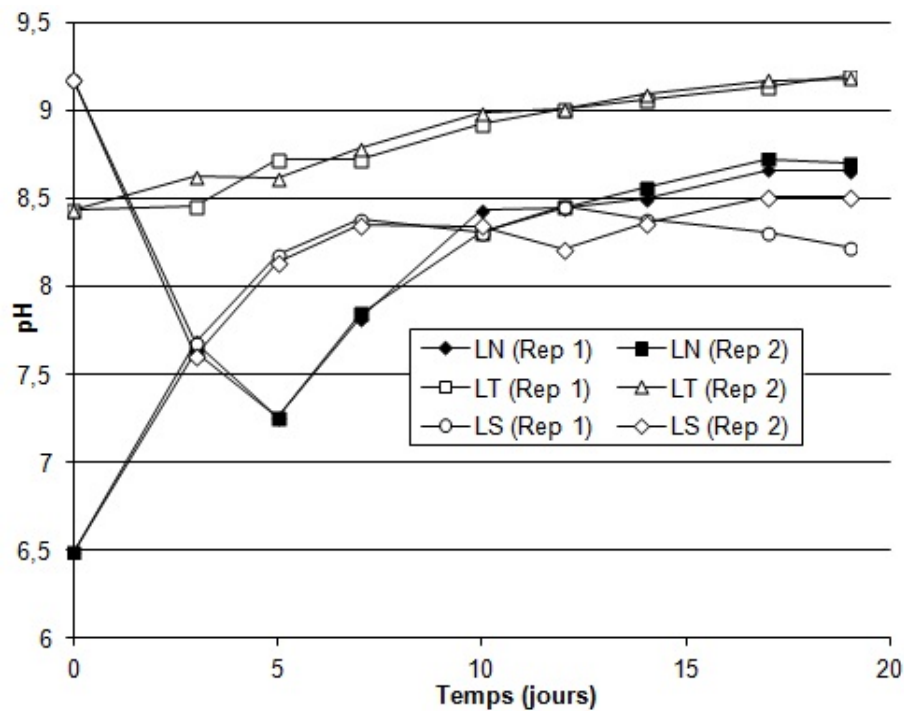


Figure 6.40 Évolution du pH, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. cohnii*.

Les figures 6.41 et 6.42 illustrent le développement de la population bactérienne. Les mesures de densité optique de la figure 6.41 sont affectées par la formation de précipités dans les milieux, en plus de l'augmentation du nombre de cellules bactériennes. La densité optique mesure ainsi la turbidité des milieux liée à l'augmentation du nombre de cellules bactérienne et à la formation de précipités sans qu'il ne soit possible de distinguer les deux phénomènes. Néanmoins, la formation de précipités étant la conséquence de l'action des bactéries, les mesures de densité optique permettent de suivre l'activité bactérienne dans sa phase de croissance. Il apparaît que l'activité bactérienne dans le milieu sans

ajustement LN est plus importante que dans les milieux avec ajustement du pH, LT et LS. Dans ces derniers, le nombre de bactéries par mL reste 10 fois inférieur à celui du milieu sans ajustement mais reste très important, à 1 milliard de cellules par mL.

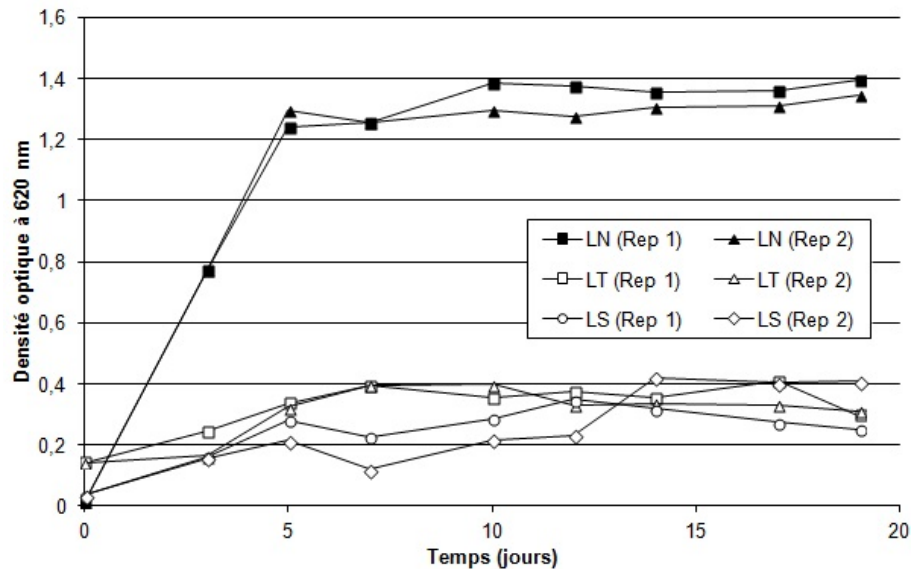


Figure 6.41 Évolution de la densité optique, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. cohnii*.

Illustré par la figure 6.43, la consommation du lactate n'est totale, au bout de 7 jours, uniquement pour le milieu non ajusté LN. Les autres milieux n'ont pas de diminution de la concentration en lactate. Dans le milieu LN les bactéries dégradent le lactate au rythme de 0,033 mol/L/jours lorsque l'activité métabolique est la plus intense.

La figure 6.44 met en parallèle la diminution de la concentration en lactate avec la concentration du calcium en solution. La diminution de la concentration du calcium en solution résulte de la formation d'un précipité.

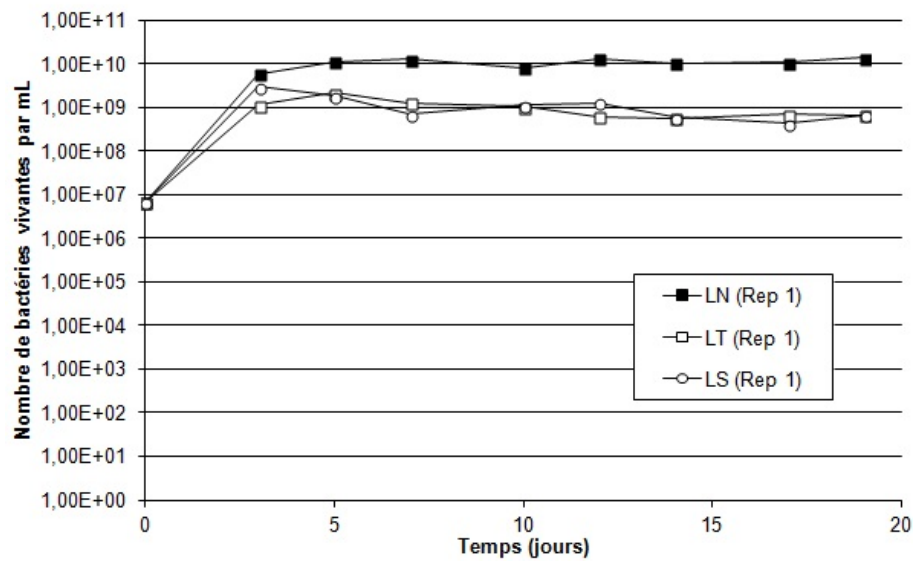


Figure 6.42 Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. cohnii*.

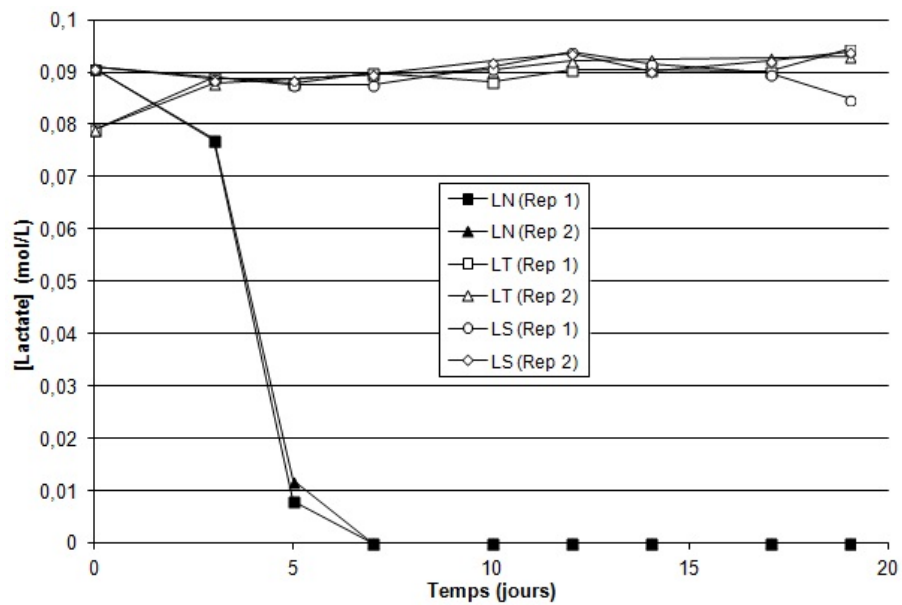


Figure 6.43 Évolution de la concentration en lactate, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. cohnii*.

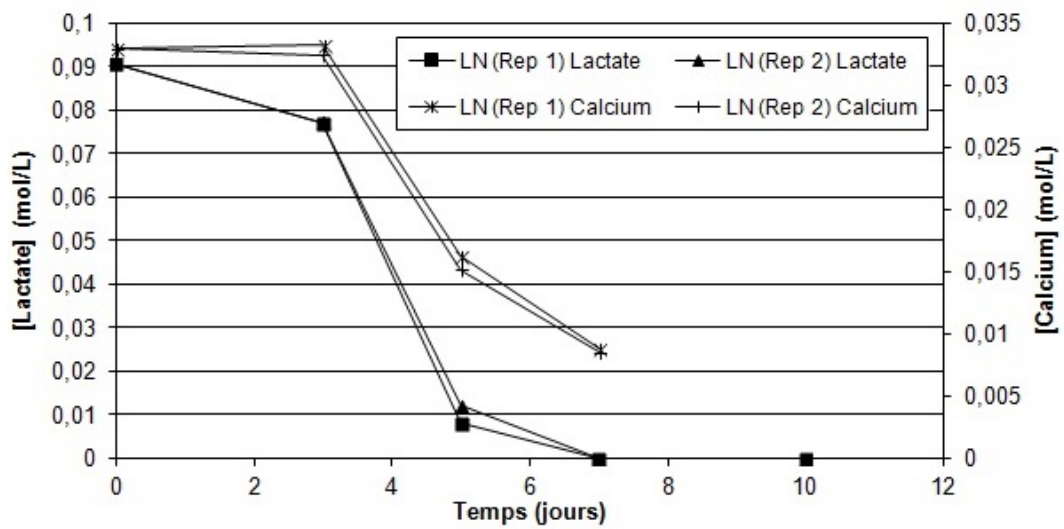


Figure 6.44 Évolution de la concentration en lactate et du calcium en solution, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. cohnii*.



Afin de quantifier et d'analyser le précipité formé, les mêmes milieux sontensemencés dans les erlenmeyers sans être suivi. L'absence de suivi permet d'éviter les prélèvements réguliers dans le milieu, qui affectent la quantité finale de précipités formés. Après 20 jours de culture, les milieux sont filtrés à  $0,45 \mu\text{m}$ . Le précipité recueilli est soumis à l'analyse thermogravimétrique.

Les mesures initiales et finales de la concentration en lactate sont présentées à la figure 6.45. Les milieux sans ajustement du pH montrent une consommation totale du lactate. Pour le milieu LT, composé d'extrait de levure à 3 g/L, de lactate de calcium à 9,73 g/L ( $0,045 \text{ mol/L}$ ) avec le pH ajusté, le réplicat 1 montre une baisse de  $0,055 \text{ mol/L}$  de la concentration en lactate. L'essai avec suivi n'avait pas montré de consommation du lactate dans ce milieu (voir figure 6.43 ). Cependant, la baisse n'est constaté que pour un seul des deux réplicats.

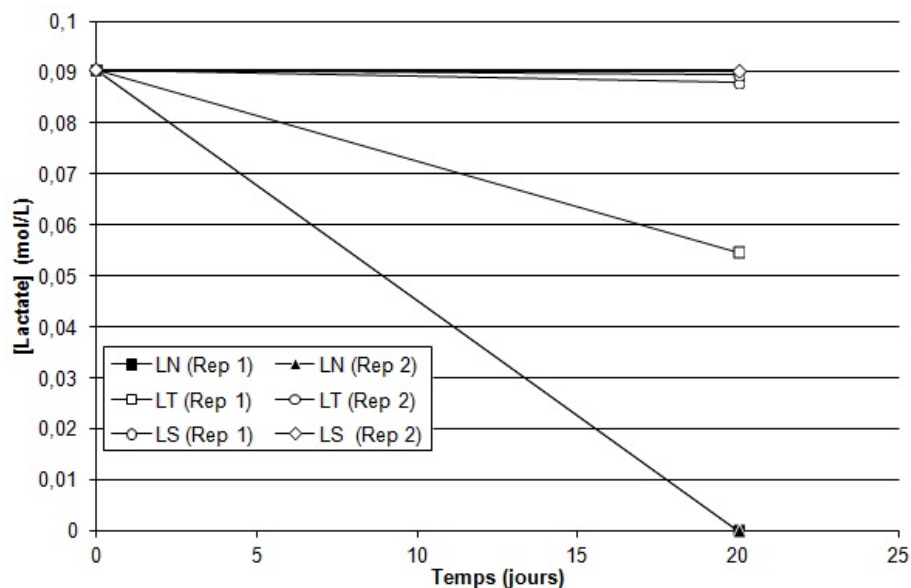


Figure 6.45 Évolution de la concentration en lactate, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. cohnii* pour filtration.

Le tableau 6.3 montre les quantités de précipité recueillies après filtration et séchage de 100 mL de milieux de culture. La quantité de carbonate de calcium qui les compose est estimée à partir de l'analyse thermogravimétrique.

La courbe de la figure 6.46 montre la perte de masse en fonction de la température d'un échantillon du précipité recueilli dans le milieu LN réplicat 1. La perte de masse à température de  $750^\circ\text{C}$  -  $800^\circ\text{C}$  correspond à la décarbonatation du carbonate de calcium,  $\text{CaCO}_3$ , qui forme du dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  et de la chaux vive  $\text{CaO}$ . La masse perdue, ici  $40,30 \%$ , correspond théoriquement à la masse de  $\text{CO}_2$  dégagé. À partir de la perte de

masse, la formule (6.1) permet de remonter à la quantité de carbonate de calcium théorique.  $M_{CO_2}$  est la masse molaire du  $CO_2$ ,  $M_{CaCO_3}$  est la masse molaire du carbonate de calcium, %  $masse_{CO_2}$  est le pourcentage de la perte de masse mesurée et %  $masse_{CaCO_3}$  est le pourcentage massique théorique de carbonate de calcium.

$$\frac{\% \text{ masse}_{CO_2}}{M_{CO_2}} \times M_{CaCO_3} = \% \text{ masse}_{CaCO_3} \quad (6.1)$$

réplicats	LN		LT		LS	
	1	2	1	2	1	2
Masse recueillie (g)	0,75	0,62	0,44	0,41	0,06	0,07
CaCO <sub>3</sub>	92%	-	92%	-	-	-

Tableau 6.3 Résultats des filtrations et de l'analyse thermogravimétrique des précipités formés dans les milieux avec *B. cohnii*.

La quantité de précipité formée est la plus importante dans le milieu de culture où l'activité bactérienne était la plus forte : 0,75 g et 0,62 g recueilli dans 100 mL du milieu LN. Cependant, les précipités recueillis dans le milieu LT font 0,44 g et 0,41 g, malgré une population bactérienne plus faible et une consommation du lactate nulle ou incomplète. La formation de carbonate de calcium doit provenir des ions carbonate issus de la respiration bactérienne et pas forcément de la décomposition du lactate. Les ions carbonate forment ensuite du carbonate de calcium avec le calcium apporté par le précurseur.

Les réplicats 1 et 2 du milieu LS ne sont pas en quantité suffisante pour pouvoir être analysés.

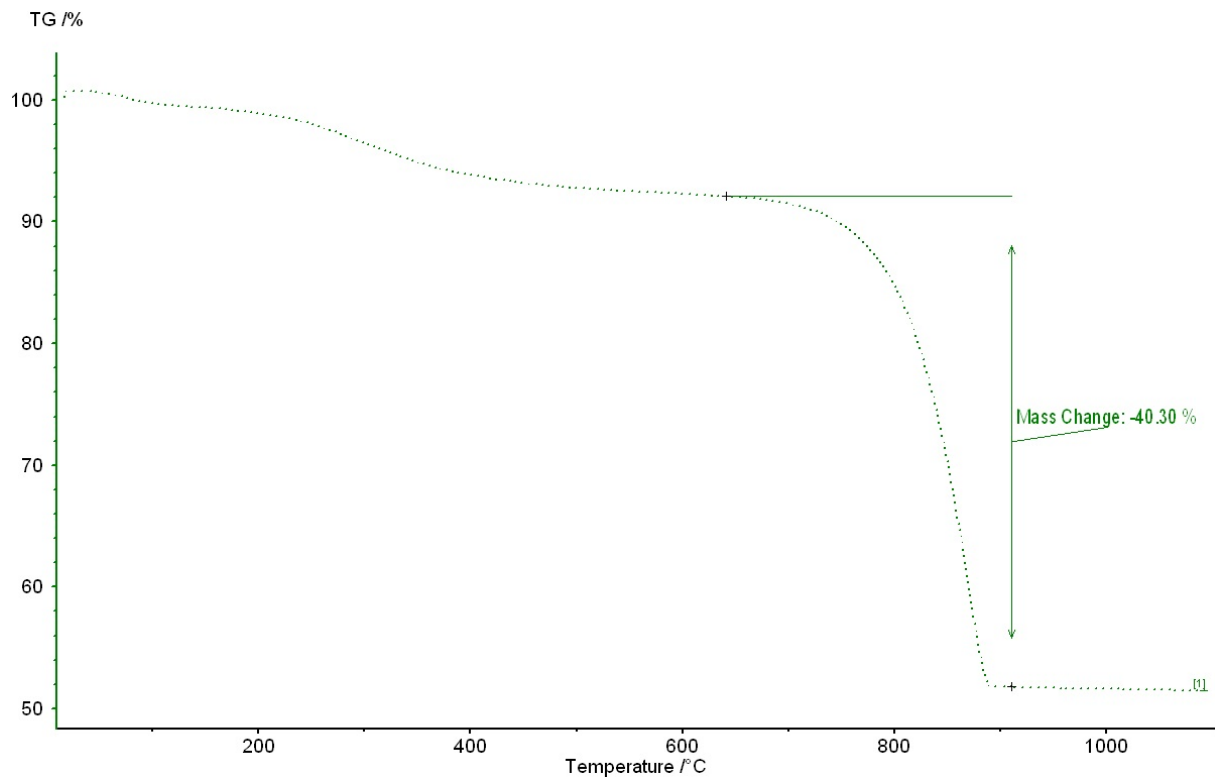


Figure 6.46 Analyse thermogravimétrique du précipité recueilli dans le milieu LN avec *B. cohnii*.

***B. pseudofirmus***

Les milieux LN et LT ont été réutilisés etensemencés avec *B. pseudofirmus*.

La figure 6.47 présente l'évolution du pH dans les différents milieux. Comme avec *B. cohnii*, le pH du milieu non ajusté augmente, passant de 6,5 à plus de 8,5 et le pH du milieu ajusté avec la solution tampon baisse initialement pour augmenter ensuite de 8 à 9,5. La durée de l'essai avec *B. pseudofirmus* est plus longue que pour l'essai avec *B. cohnii*.

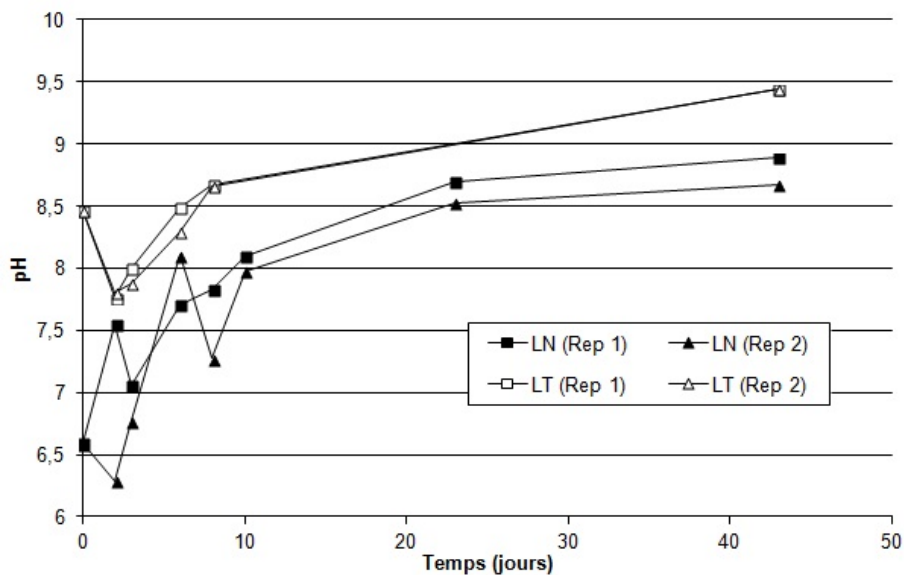


Figure 6.47 Évolution du pH, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. pseudofirmus*.

Les mesures de la densité optique et de la concentration bactérienne (figures 6.48 et 6.49) confirment les tendances observées avec l'évolution du pH. Si les deux milieux LN et LT présentent une bonne croissance bactérienne, celle de LN semble meilleure que celle de LT. Les concentrations bactériennes sont proches de  $1.10^{10}$  bactéries par mL pour LT et de  $1.10^{11}$  bactéries par mL pour LN.

Le lactate est consommé en 6 jours par tous les milieux, comme le montre la figure 6.50. Le taux moyen de dégradation du lactate par les bactéries est en moyenne de 0,020 mol/L/jours durant les 4 premiers jours.

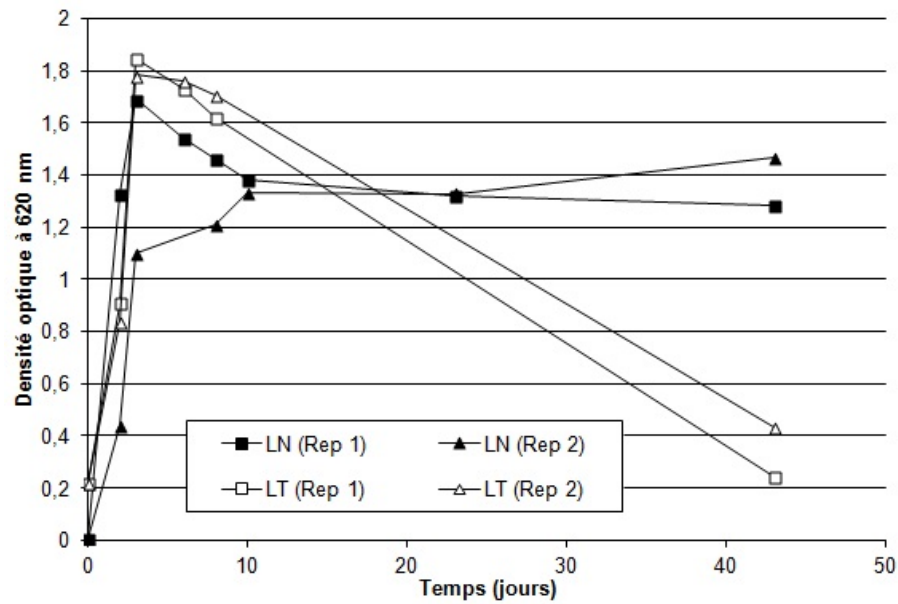


Figure 6.48 Évolution de la densité optique, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. pseudofirmus*.

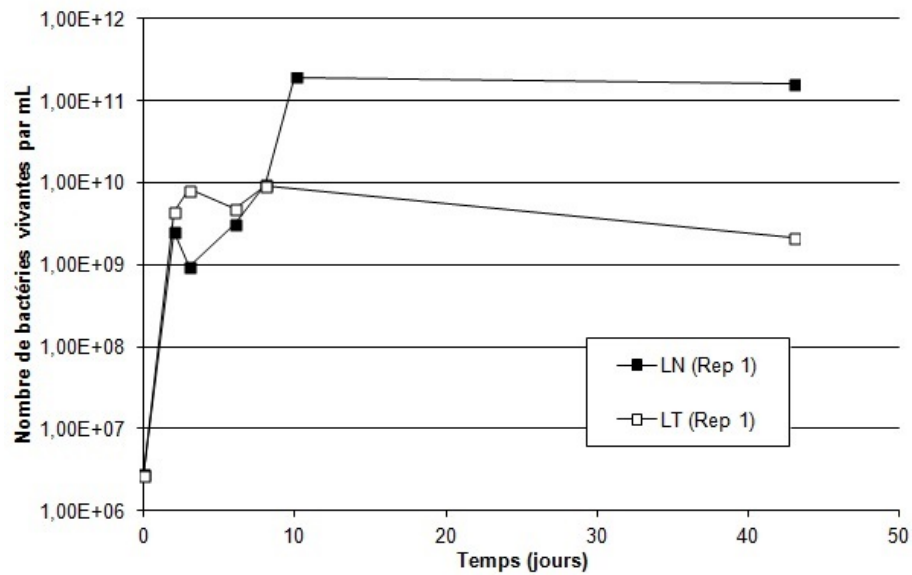


Figure 6.49 Évolution de la concentration bactérienne, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. pseudofirmus*.

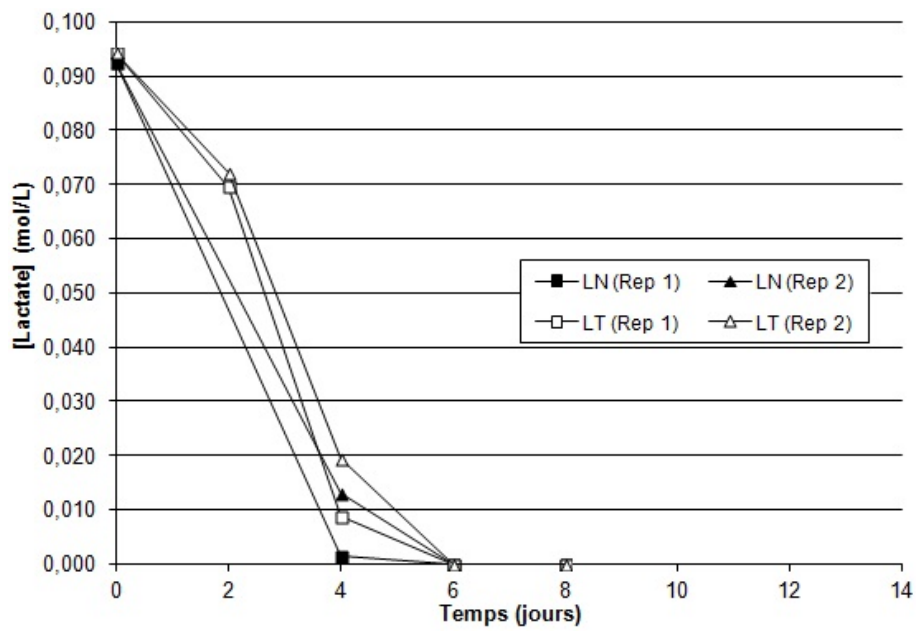


Figure 6.50 Évolution de la concentration en lactate, milieux avec extrait de levure et lactate de calcium, avec *B. pseudofirmus*.

### 6.3.2 Conclusion de la phase 3

Les milieux LN et surtout LT semblent abriter une activité bactérienne plus intense avec *B. pseudofirmus* qu'avec *B. cohnii* lorsque l'on compare les concentrations en cellules bactériennes. La consommation du lactate est complète en 6 jours pour les deux milieux avec *B. pseudofirmus*.

*B. cohnii* n'est capable de consommer le lactate que dans le milieu LN. L'aptitude de la souche bactérienne à décomposer les précurseurs à un pH basique est fondamental dans l'optique du développement d'une solution de biocicatrisation dans les matériaux cimentaires. Les essais suivant reprennent donc uniquement la souche *B. pseudofirmus* et cherchent à évaluer la concentration optimale en précurseur.

## 6.4 Phase 4 : Croissance de *B. pseudofirmus* dans les milieux sélectionnés

Durant la phase 4, la souche bactérienne sélectionnée est *B. pseudofirmus*. Les milieux testés sont composés de 3 g/L d'extrait de levure. La concentration en lactate de calcium a été fixée à 75 g/L (0,344 mol/L), proche de la solubilité maximale à 30°C ( $\approx 79$  g/L). Le nitrate de calcium a été utilisé comme source de calcium supplémentaire. La concentration en nitrate de calcium est initialement de 2 mol/L. Certains auteurs [101, 102] ont développé des milieux de culture avec 2 mol/L de chlorure de calcium. Cependant, cette concentration semble trop forte pour permettre le développement de la souche bactérienne utilisée, *B. pseudofirmus*. Des essais en erlemeyers sont menés pour déterminer la concentration en nitrate de calcium optimale. Cette concentration doit permettre le développement bactérien, tout en apportant le maximum de calcium possible, afin de former un précipité en quantité importante.

En vue d'une utilisation *in fine* de ces milieux comme technique de réparation dans les bétons, possiblement armés, le nitrate de calcium  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  est préféré au chlorure de calcium. Le chlore est en effet un agent agressif pour les armatures, provoquant des corrosions par piqûres des aciers. Au contraire, le nitrate de calcium ajouté à l'état frais du béton permet d'augmenter la résistance à long terme et constitue un inhibiteur de corrosion par les ions chlorure [66]. Sa présence dans les milieux de culture ne semble donc pas préjudiciable pour les matériaux cimentaires.

Les différents milieux testés durant cette phase sont les suivants :

- Le milieu LN75, composé de 3 g/L d'extrait de levure et de 75 g/L de lactate de calcium ;
- Les milieux LN $\text{Ca}$ -0,2, LN $\text{Ca}$ -0,5, LN $\text{Ca}$ -1 et LN $\text{Ca}$ -2, composés de 3 g/L d'extrait de levure, de 75 g/L de lactate de calcium et, respectivement, de 0,2 mol/L, 0,5 mol/L, 1 mol/L et 2 mol/L de nitrate de calcium ;
- Le milieu LN $\text{Ca}$ -0,2, qui semble avoir la concentration en nitrate de calcium optimale, est rebaptisé LN $\text{Ca}$  pour la suite des essais.

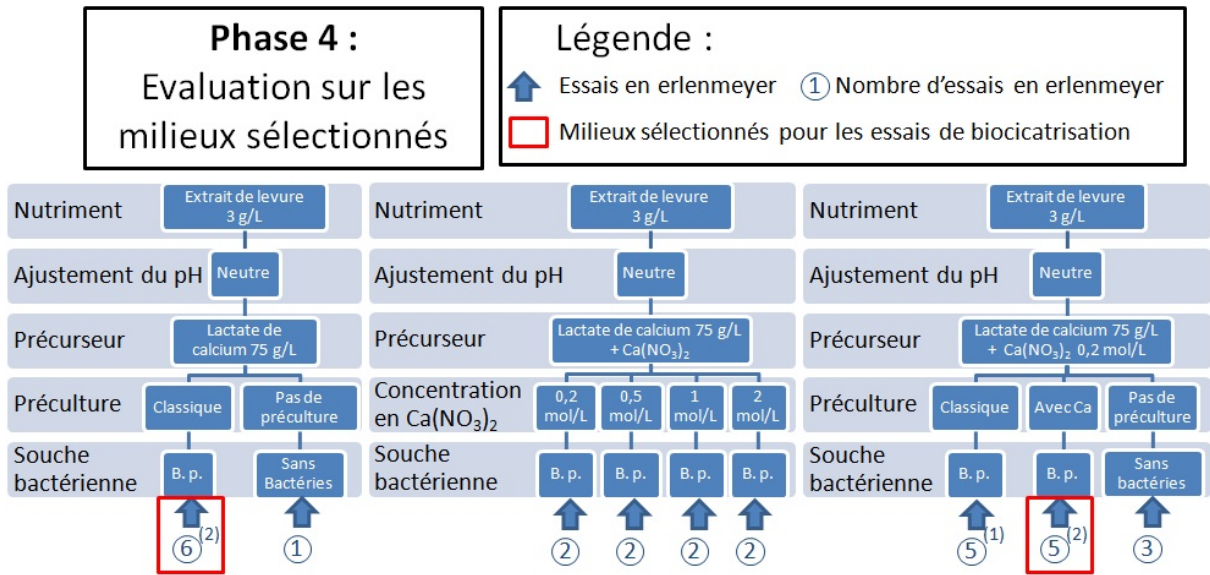
Cette phase de l'étude a pour objectif de connaître la cinétique de croissance de *B. pseudofirmus* dans les différents milieux. Dans les deux milieux sélectionnés LN75 et LN $\text{Ca}$ , les précipités qui se sont formés durant l'activité bactérienne sont quantifiés et analysés.

---



Parallèlement des essais témoins sont menés : les milieux LN75 et LNCa sans bactéries sont suivis, permettant de s'assurer que les évolutions constatées dans les milieux sont bien imputables aux bactéries.

La figure 6.51 synthétise la première partie des essais menés dans la phases 4.



(1) 2 essais sans suivi pour filtration et ATG

(2) 3 essais sans suivi pour filtration et ATG

Figure 6.51 Schéma des essais menés en phase 4.

### 6.4.1 Croissance bactérienne dans le milieu LN75

Les figures suivantes présentent les évolutions dans le milieu LN75 ensemencé avec *B. pseudofirmus*. Le milieu LN75 stérile est également suivi, sans avoir été ensemencé par les bactéries. Trois réplicats sont suivis pour garantir la répétabilité des essais. Trois erlenmeyers supplémentaires contenant le milieu LN75 sont ensemencés mais non suivis. Seuls des prélèvements initiaux et finaux sont réalisés. Le contenu de chacun de ces erlenmeyers est filtré à la fin de la période de mesure. Les précipités recueillis sont séchés, pesés et analysés à l'ATG. Il sont notés par la lettre F et représentés sur les courbes par des croix uniquement au temps initial et au temps final.

La figure 6.52 montre l'évolution du pH dans le milieu LN75 avec *B. pseudofirmus*. Le pH des milieux ensemencés avec les bactéries augmente, passant de 6,5 à 8, tandis que celui du milieu stérile reste constant.

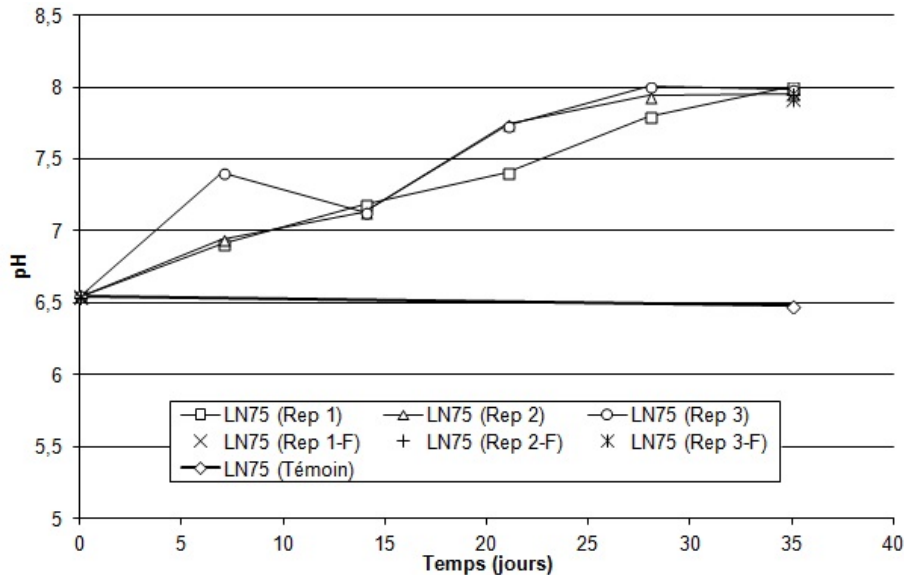


Figure 6.52 Évolution du pH dans le milieu LN75 ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

Les figures 6.53 et 6.54 présentent les mesures de densité optique et de comptage bactérien. Les courbes montrent une bonne activité bactérienne et une bonne répétabilité.

Les concentrations en lactate et en calcium présentées dans les figures 6.55 et 6.56 témoignent de l'activité métabolique des bactéries. À la fin de l'essai, après 35 jours, le précurseur est presque totalement consommé dans les milieux ensemencés. Le taux de dégradation est maximal entre 7 et 14 jours, soit en fin de phase exponentielle et en début de phase stationnaire. Il est alors de 0,042 mol/L/jours. Après 20 jours de culture la concentration en lactate n'évolue presque plus.

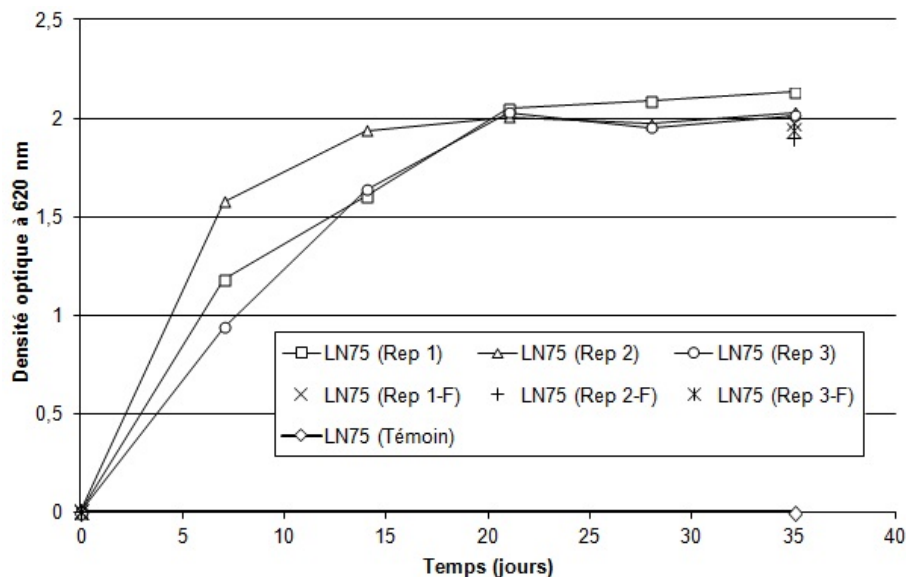


Figure 6.53 Évolution de la densité optique dans le milieu LN75 ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

Le milieu stérile ne connaît aucune évolution de sa composition, ni avec le lactate, ni avec le calcium en solution. La consommation du précurseur et surtout la diminution du calcium en solution témoigne de la formation d'un précipité. Dans l'hypothèse où l'intégralité du précipité formé est du carbonate de calcium, la baisse de 0,1 mol/L du calcium dans 250 mL de milieu doit se traduire par la formation de 2,5 g de précipité. Malgré la forte diminution de la concentration en lactate, la concentration en calcium reste relativement élevée autour de 0,15 mol/L.

Le tableau 6.4 regroupe les quantités de précipité recueillies et leur teneur en carbonate de calcium. Les quantités recueillies dans les trois réplicats sont égales à 2,76 g, 2,56 g et 2,70 g. Ils sont composés de carbonate de calcium respectivement à 91 %, 89 % et 84 %. La quantité de carbonate de calcium pur est de 2,51 g pour le réplicat 1-F, de 2,28 g pour le réplicat 2-F et de 2,3 g pour le réplicat 3-F. Le reste des précipités est peut-être formé par de la matière organique, issue des cellules bactériennes vivantes et mortes.

	LN75		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
Masse recueillie (g)	2,76	2,56	2,70
CaCO <sub>3</sub>	91%	89%	84%

Tableau 6.4 Quantification et analyse du précipité formé dans le milieu LN75.

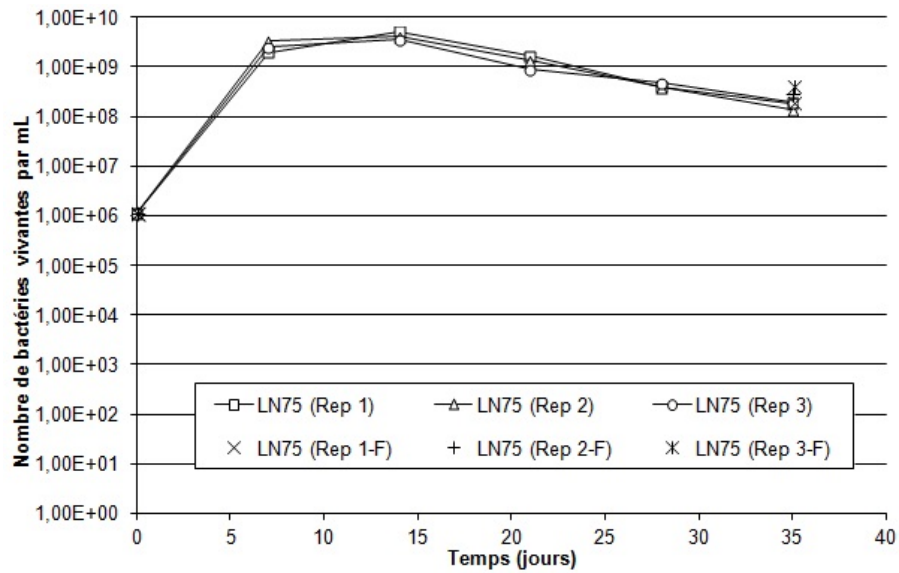


Figure 6.54 Évolution de la taille de la population bactérienne dans le milieu LN75 ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

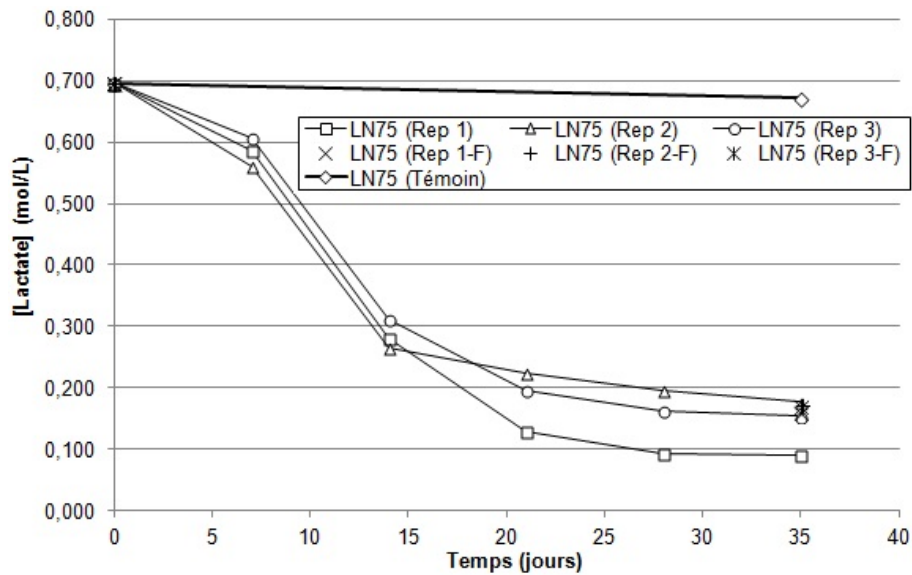


Figure 6.55 Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LN75 ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

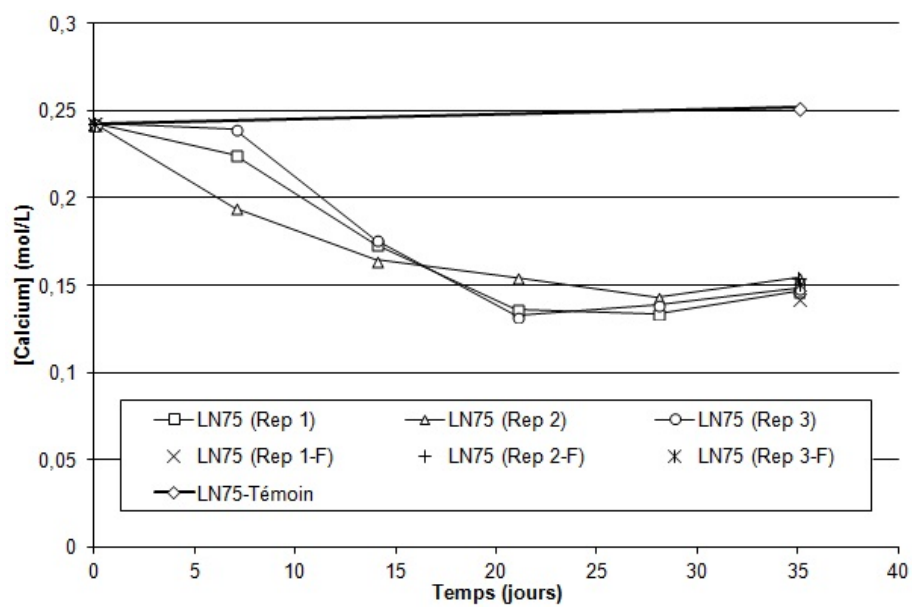


Figure 6.56 Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LN75 ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

### 6.4.2 Croissance bactérienne dans le milieu LN75 avec différentes concentrations de nitrate de calcium

La concentration optimale en nitrate de calcium dans les milieux a été étudiée. Dans le milieu contenant du lactate de calcium (75 g/L ou 0,344 mol/L) et de l'extrait de levure (3 g/L), différentes concentrations en nitrate de calcium ont été testées, allant de 0,2 mol/L à 2 mol/L. Les essais ont été menés en duplicats dans des erlenmeyers avec 250 mL de milieu de culture.

La figure 6.57 présente l'évolution du pH dans les milieux. Le pH du milieu à 0,2 mol/L de nitrate de calcium augmente de façon plus importante que celui des autres milieux. Cependant, avec ce milieu l'écart entre les deux réplicats est significatif.

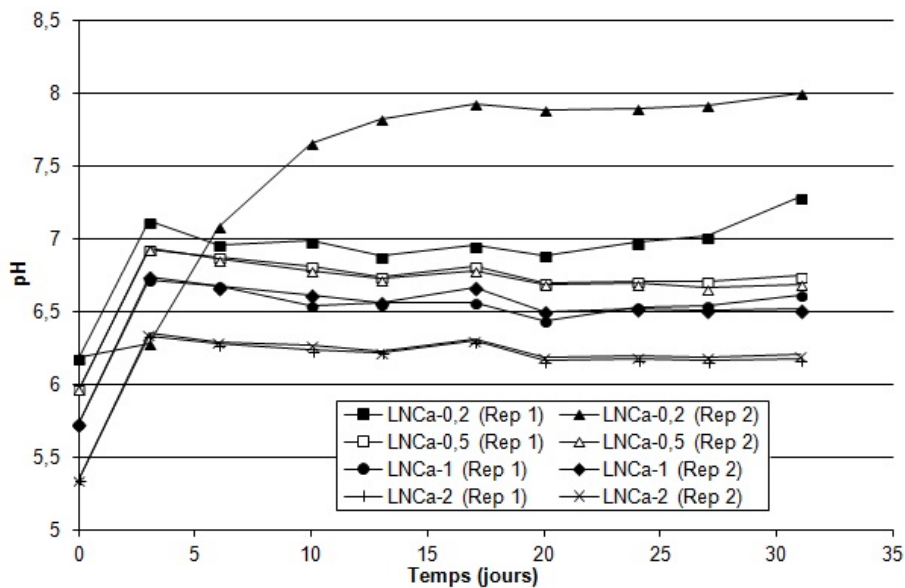


Figure 6.57 Évolution du pH, milieux à différentes concentrations en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  *B. pseudofirmus*.

Les figures 6.58 et 6.59 confirment, par des mesures de densité optique et des comptages bactériens, que le milieu à 0,2 mol/L offre des conditions favorables au développement des bactéries, à la différence des autres milieux. Néanmoins, avec le milieu à 0,2 mol/L la répétabilité est mauvaise. Le réplicat 2 montre une phase de latence plus longue que le réplicat 1.

La figure 6.60 montre l'évolution de la concentration en lactate dans les milieux testés. Le lactate n'est consommé que dans le milieu avec 0,2 mol/L de nitrate de calcium. Pour les deux réplicats une diminution de la concentration du lactate est observée à un niveau

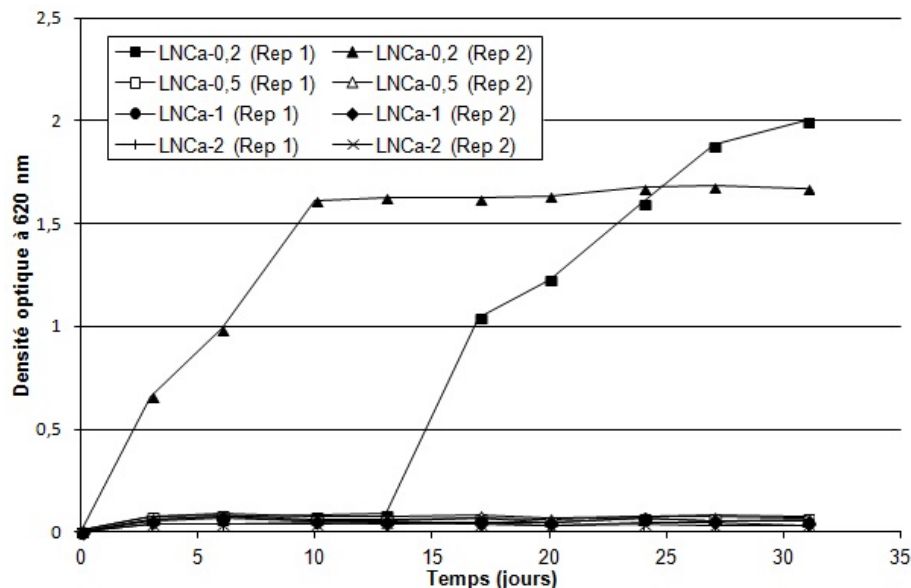


Figure 6.58 Évolution de la densité optique, milieux à différentes concentrations en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  *B. pseudofirmus*.

comparable au bout de 30 jours, bien qu'une phase de latence soit observée pour le réplicat 1.

Au vu des résultats obtenus, le milieu renfermant 0,2 mol/L de nitrate de calcium est celui qui a été retenu. Parmi tous les milieux avec nitrate de calcium testés, ce milieu offre les meilleures conditions pour une bonne activité bactérienne. Il présente cependant une mauvaise répétabilité. L'un des deux réplicats a une période de latence de presque 2 semaines, tandis que l'autre réplicat ne présente pas de période de latence visible.

Durant les observations réalisées au microscope optique à épifluorescence, les bactéries se présentent sous la forme de petites sphères. Cette morphologie a été observée dans le réplicat 2 du milieu de culture avec 0,2 mol/L de nitrate de calcium, après 6 jours de culture. La forme de petites sphères est apparue plus tardivement dans le réplicat 1, après 13 jours. Quelques bactéries sous forme de sphère ont également été observées dans les autres milieux mais en quantité moindre. Cette morphologie des bactéries pourrait s'expliquer par la composition du milieu, la composition ionique influant sur l'activité bactérienne. Le milieu de croissance est vraisemblablement plus agressif avec l'ajout supplémentaire de 0,2 mol/L de nitrate de calcium. Les essais avec différentes concentrations en nitrate de calcium ont prouvé qu'un ajout plus important de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  pouvait empêcher le développement des bactéries. Les bactéries seraient sous la forme de sphères, contraintes par les conditions ioniques du milieu.

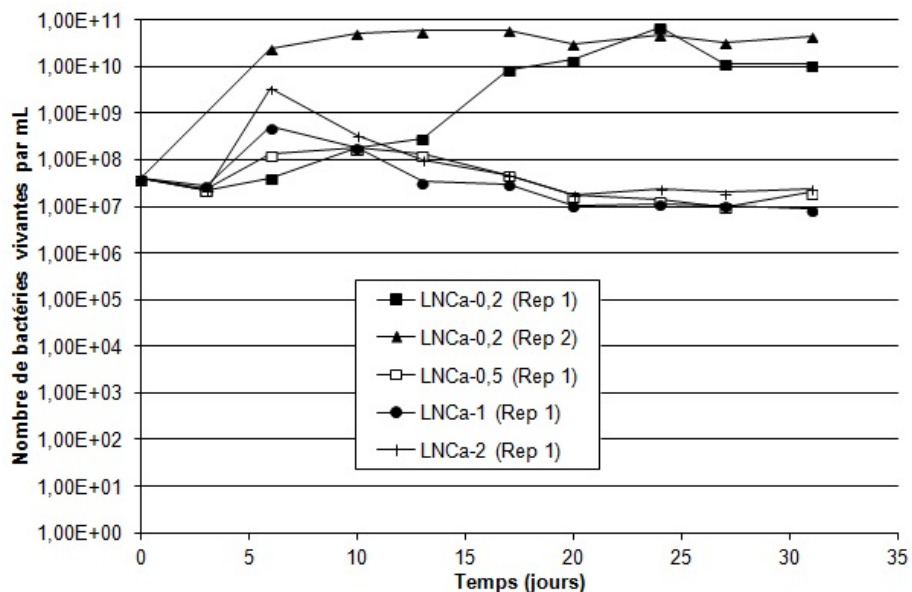


Figure 6.59 Évolution de la taille de la population de *B. pseudofirmus* dans les milieux avec différentes concentrations en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

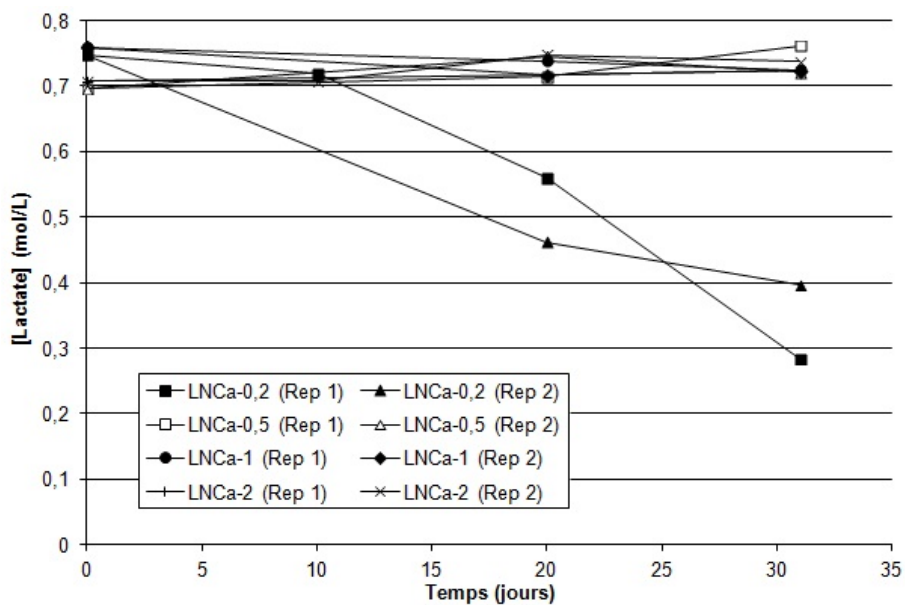


Figure 6.60 Évolution de la concentration en lactate, milieux à différentes concentrations en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  *B. pseudofirmus*.



### 6.4.3 Croissance bactérienne dans le milieu LNCa,ensemencé à partir d'une préculture classique

Le milieu LNCa-0,2 est rebaptisé LNCa. Les essais avec le milieu LNCa sont menés de la même façon qu'avec le milieu LN75. Trois erlenmeyers sont ensemencés avec *B. pseudofirmus* pour lesquels des prélèvements et des mesures sont faits régulièrement. Deux autres erlenmeyers sont ensemencés sans être suivis, seul des prélèvements initiaux et finaux sont réalisés. Ces deux erlenmeyers sont filtrés à la fin de l'essai. Un essai contenant du milieu de culture stérile est également suivi.

Dans un premier temps, le milieu LNCa est ensemencé de la même façon que tous les autres milieux évalués jusqu'à présent.

La figure 6.61 illustre les variations du pH dans le milieu LNCa. Le pH du milieu stérile reste constant. Les erlenmeyers ensemencés suivent des évolutions différentes. Le pH augmente rapidement, à partir de 15 jours pour l'un des erlenmeyers et se stabilise à 7,3. Le pH d'un second erlenmeyer n'augmente qu'après plus de 20 jours et se stabilise à une valeur inférieure à 7. Le troisième erlenmeyer suivi ne connaît aucune évolution de son pH. Les deux erlenmeyers ensemencés, sans suivi, et destinés à être filtrés ont des pH finaux entre 7 et 7,3.

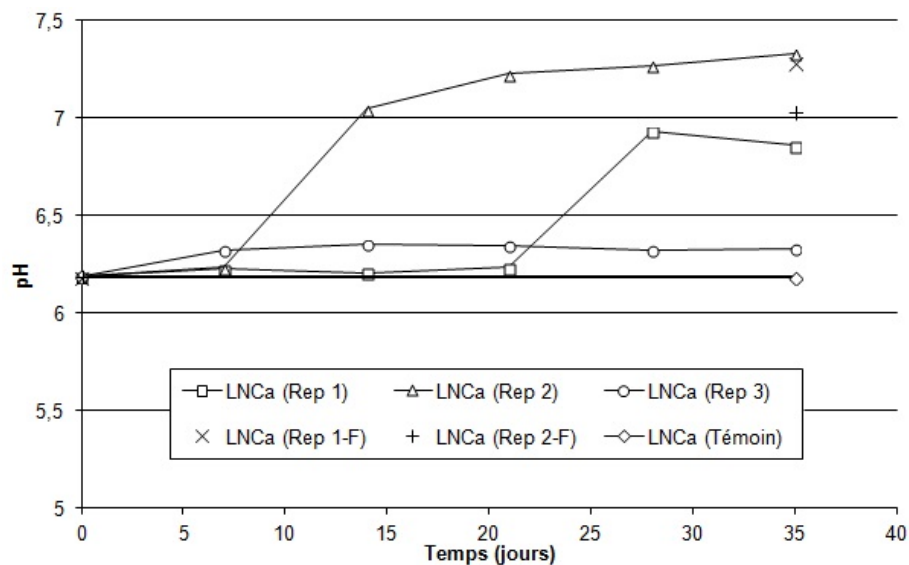


Figure 6.61 Évolution du pH dans le milieu LNCa ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

Les courbes des figures 6.62 et 6.63 présentent l'évolution de la densité optique et de la concentration bactérienne. Elles confirment les tendances observées avec l'évolution du pH. L'un des erlenmeyers ensemencé n'a aucune activité bactérienne. Un autre des

erlenmeyers présente une longue phase de latence. Seul, un seul des trois milieux suivis présente une activité bactérienne satisfaisante, sans phase de latence. Les erlenmeyers sans suivi semblent présenter une bonne activité bactérienne, les mesures finales sont proches de celles de l'erlenmeyer ayant montré une bonne croissance bactérienne.

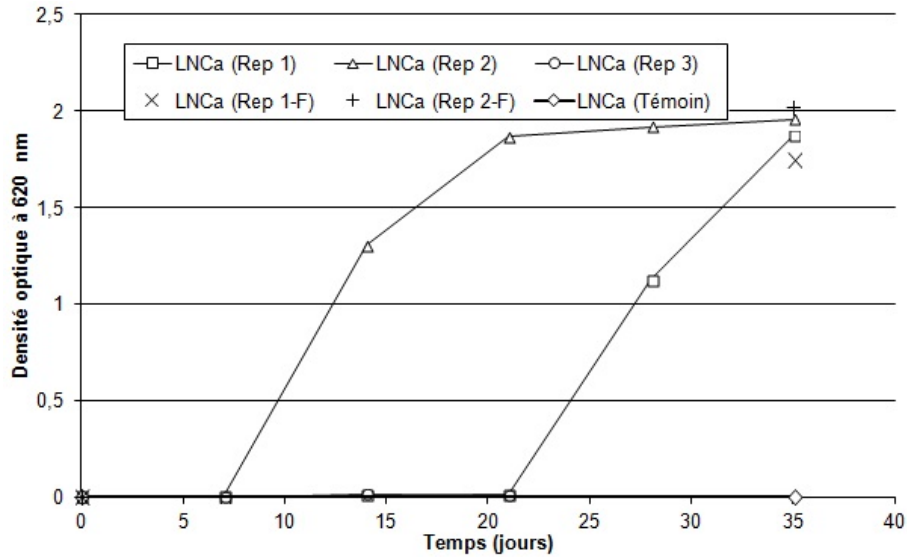


Figure 6.62 Évolution de la densité optique dans le milieu LNCa ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

Les concentrations du lactate et du calcium en solution appuient les conclusions faites à partir des autres courbes. Les essais présentent une mauvaise répétabilité.

Dans les erlenmeyers ayant abrité une bonne activité bactérienne, la diminution du calcium en solution est de 0,12 mol/L environ, ce qui correspond, théoriquement, dans un milieu de 250 mL, à la formation de 3 g de carbonate de calcium.

Le tableau 6.5 réfère les quantités et les teneurs en carbonate de calcium des précipités recueillis. Les précipités sont essentiellement formés de carbonate de calcium. Cependant, la quantité de 2,13 g recueillie est inférieure à ce que la diminution du calcium en solution pouvait laisser penser.

	LNCa	
	Rep 1	Rep 2
Masse recueillie (g)	2,13	2,13
CaCO <sub>3</sub>	80%	81%

Tableau 6.5 Quantification et analyse du précipité formé dans le milieu LNCa.

Lors des mesures de comptage par épifluorescence, les bactéries sont apparues sous la forme de petites sphères et non sous la forme de bâtonnets comme c'est habituellement le

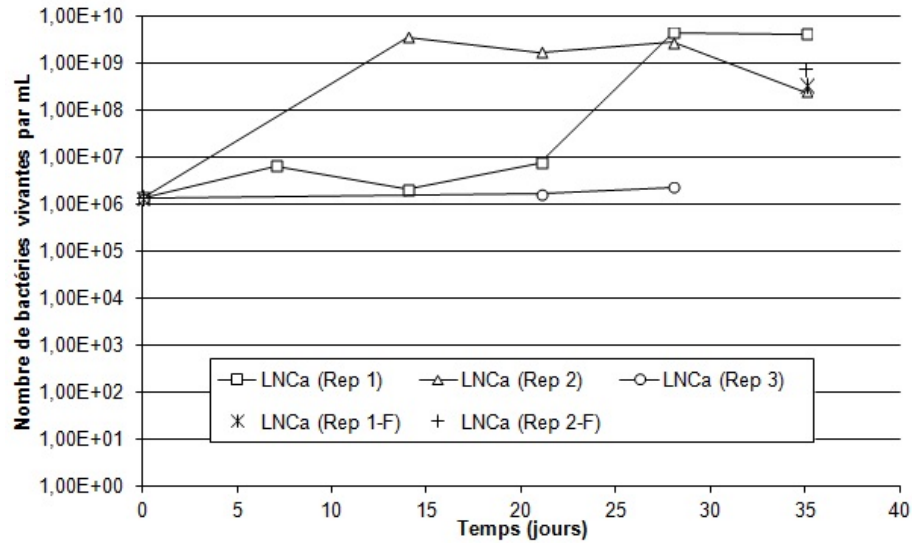


Figure 6.63 Évolution de la taille de la population bactérienne dans le milieu LNCa ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

cas. Cette morphologie a déjà été observée dans des milieux de culture où le calcium était apporté par des sels minéraux (chlorure de calcium, nitrate de calcium).

Durant la préculture dans le milieu recommandé, la morphologie des bactéries était celle observée d'ordinaire : sous la forme de bâtonnets. L'hypothèse a été avancée que la phase de latence dans LNCa est due à une période de transition pendant laquelle les bactéries passent de la forme de bâtonnets à celle de petites sphères. Afin d'éliminer cette phase de latence dans le milieu LNCa, l'inoculum doit apporter des bactéries déjà sous forme de petites sphères. Ainsi, il a été choisi d'ajouter 0,05 mol/L de nitrate de calcium dans le milieu de préculture pour cultiver les bactéries sous cette forme. Avec l'ajout de nitrate de calcium, la préculture est beaucoup plus longue à atteindre le milliard de bactéries par mL nécessaire pour constituer un inoculum valable. Cette durée ne dépassera pas la semaine.

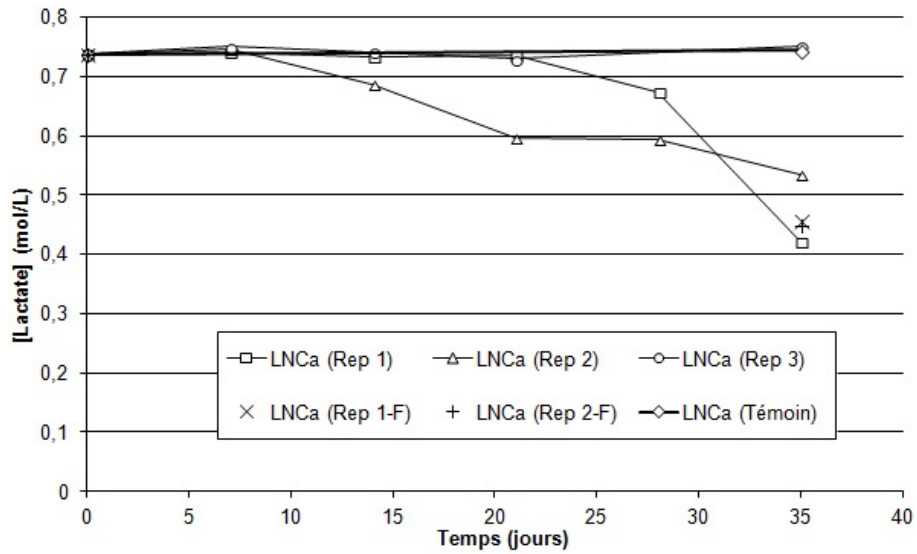


Figure 6.64 Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LNCa ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

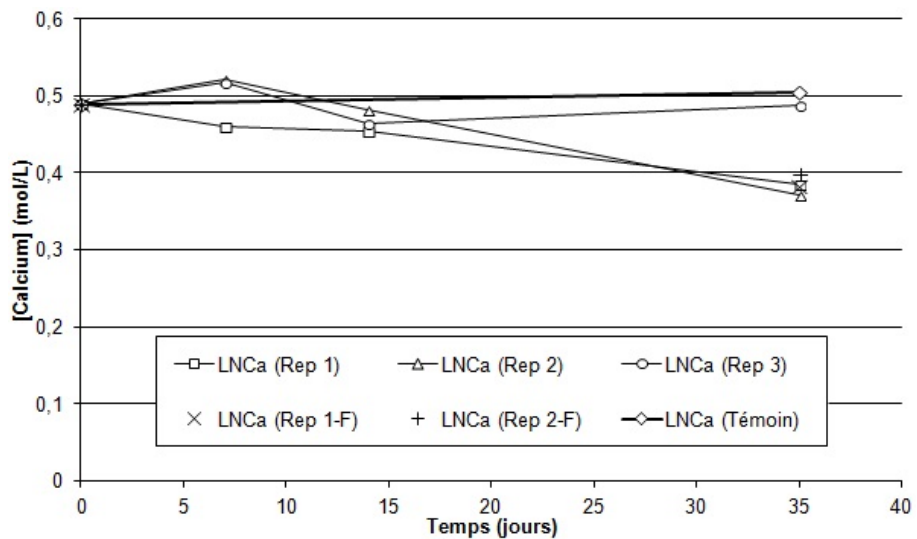


Figure 6.65 Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LNCa ensemencé avec *B. pseudofirmus*.

#### 6.4.4 Croissance bactérienne dans le milieu LNCa,ensemencé à partir d'une préculture avec nitrate de calcium

Le milieu LNCa a été ensemencé à partir d'une préculture contenant 0,05 mol/L de nitrate de calcium. La préculture a duré 11 jours, afin de s'assurer de développer une concentration bactérienne suffisante avec la morphologie souhaitée.

##### Suivi de la croissance bactérienne

Deux erlenmeyers sont ensemencés et suivi en parallèle.

La figure 6.66 montre les variations du pH. Le pH augmente rapidement et fini par atteindre 7,2 à la fin du mois d'essai. On constate une bonne répétabilité dans les deux erlenmeyers.

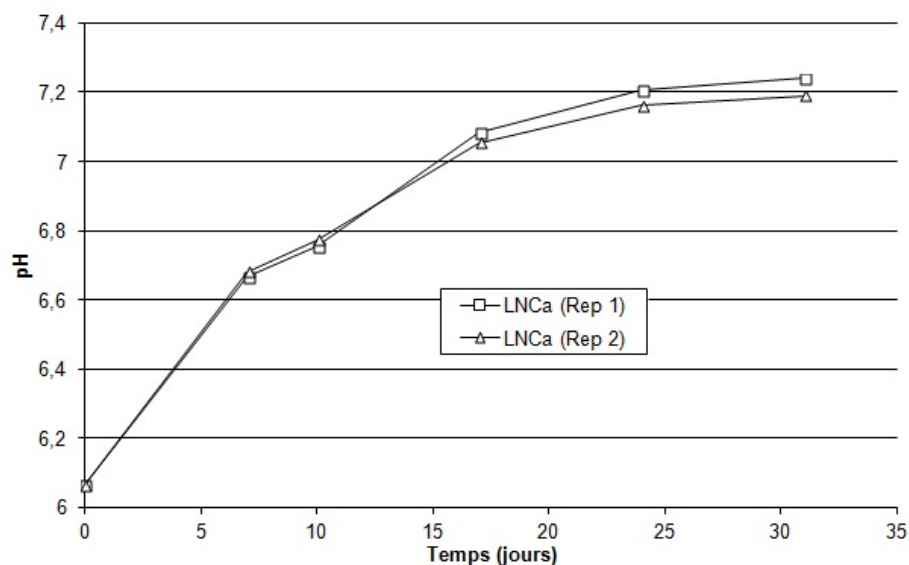


Figure 6.66 Évolution du pH dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium.

Les figures 6.67 et 6.68 présentent les évolutions des mesures de densité optique et de comptages bactériens. La croissance est rapide, sans phase de latence, et la population bactérienne dépasse  $1.10^{10}$  bactéries par mL. Les bactéries sont sous forme de petites sphères agglomérées les unes aux autres.

L'ajout de calcium dans la préculture et l'allongement de sa durée ont permis d'éliminer la phase de latence. Les deux essais montrent une bonne répétabilité. L'activité bactérienne est aussi optimale que dans le milieu LN75.

Le suivi des concentrations du lactate et du calcium montrent une bonne activité métabolique des bactéries (figures 6.69 et 6.70). Le lactate est entièrement consommé en moins

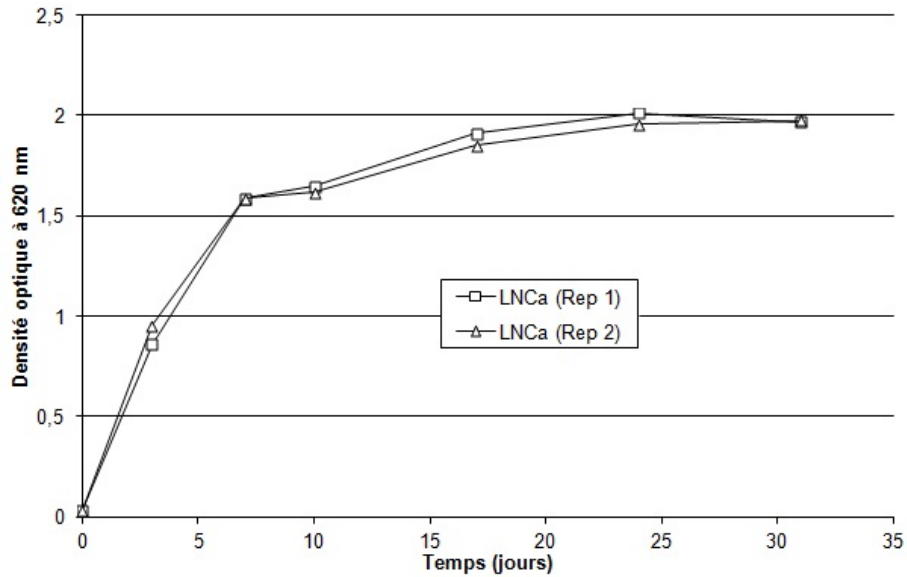


Figure 6.67 Évolution de la densité optique dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium.

de 25 jours. C'est en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire que le taux de dégradation du lactate est le plus élevé. Dans ce milieu, le taux de dégradation en relativement constant durant toute la phase stationnaire, avec en moyenne de consommation du lactate de 0,032 mol/L/jours.

Durant la durée de l'essai de croissance, la concentration en calcium baisse de 0,12 mol/L. Comme avec le milieu LN75, le calcium n'est pas entièrement précipité, il reste près de 0,35 mol/L de calcium en solution.

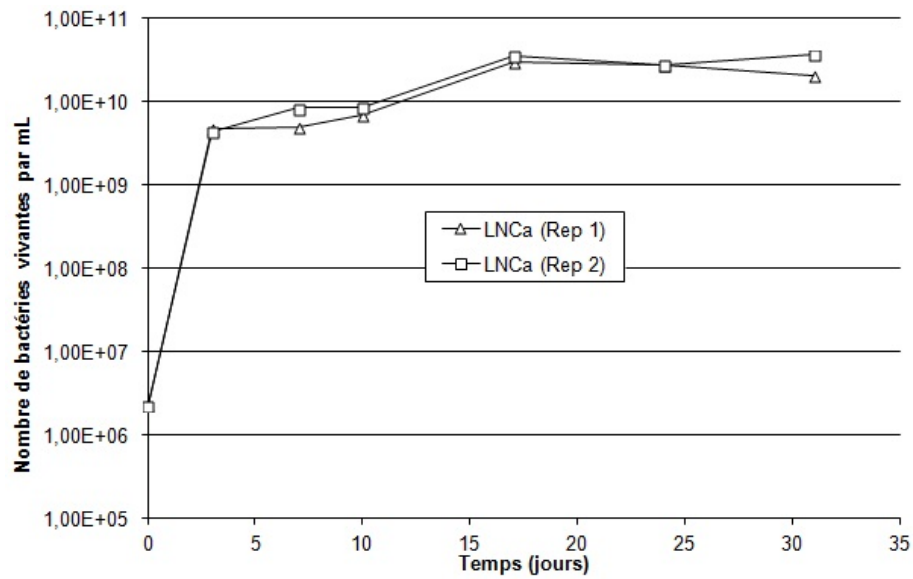


Figure 6.68 Évolution de la taille de la population bactérienne dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium.

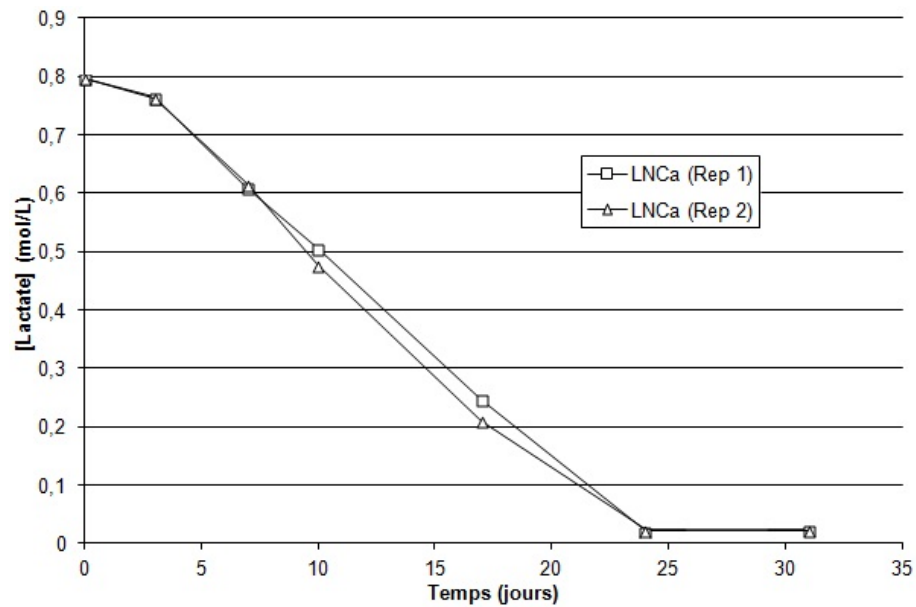


Figure 6.69 Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium.

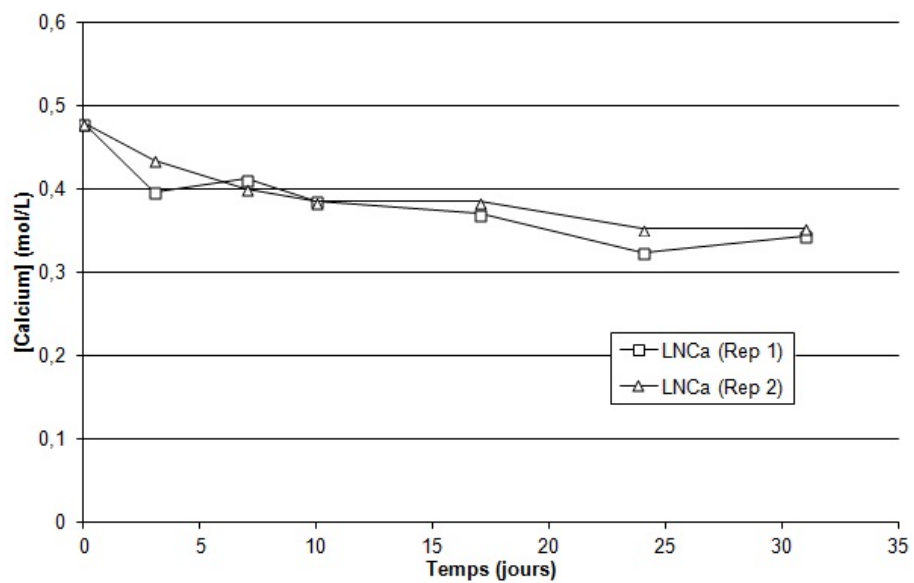


Figure 6.70 Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LNCa ensemencé avec une préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium.



### Quantification du précipité formé

Le milieu LNCa a étéensemencé à nouveau avec une préculture contenant du calcium. La préculture a duré 3 jours, durée au bout de laquelle les bactéries sont apparues sous la forme de petites sphères. Les 3 erlenmeyersensemencés n'ont été prélevés qu'au moment initial et au moment final, à 37 jours, ils ont ensuite été filtrés. Le précipité recueilli a été pesé, filtré et analysé à l'ATG.

Les courbes des figures 6.71 et 6.72 présentent la variation du pH et du nombre de bactéries vivantes par mL. Elles témoignent d'une bonne activité dans les milieuxensemencés.

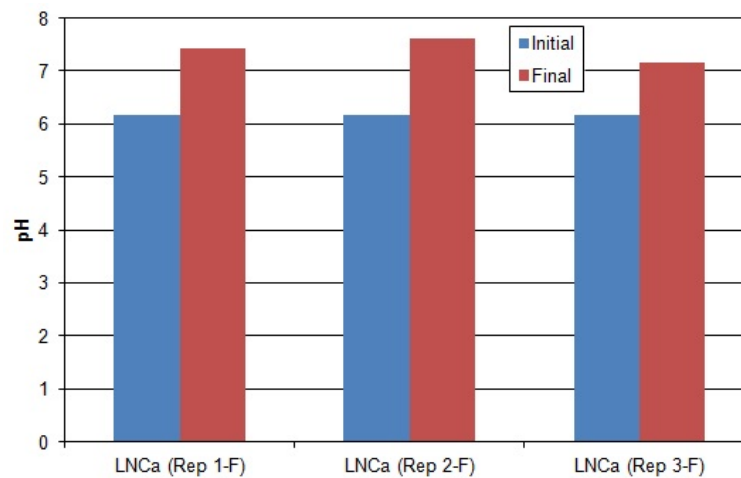


Figure 6.71 Évolution du pH dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium).

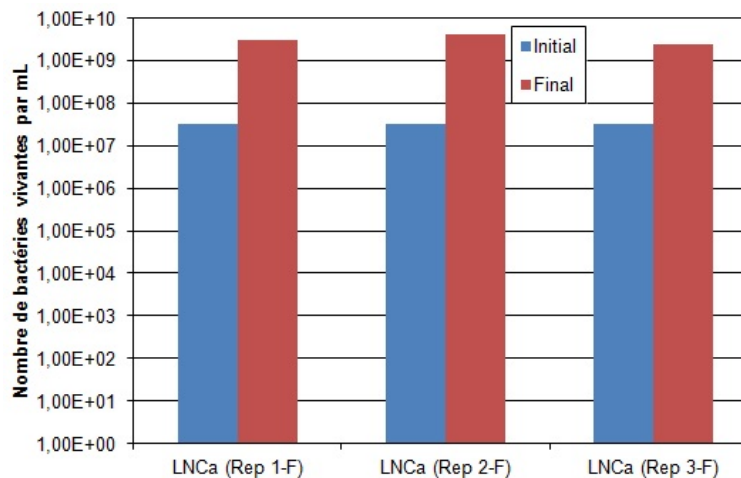


Figure 6.72 Évolution de la concentration bactérienne dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium).

Les courbes 6.73 et 6.74 montrent les variations de la concentration en lactate et en calcium. La consommation du lactate est nettement inférieure à la consommation des essais

précédents dans le même milieu, LNCa, avec un suivi régulier. Le lactate était complètement consommé en moins de 25 jours. Ici, après 37 jours de croissance, moins de 0,330 mol/L ont été consommés sur les 0,738 mol/L au moment initial. Cette consommation du lactate est comparable à celle constatée lors des essais avec le milieu LNCa ensemencé avec une préculture classique, sans nitrate de calcium. Il semblerait que la durée de la préculture utilisée ici, avec nitrate de calcium, ait été légèrement trop courte pour permettre d'obtenir un inoculum pleinement adapté au milieu LNCa (3 jours de préculture). En effet, lors de l'essai de croissance avec suivi, la préculture avait duré 11 jours avant que les bactéries ne se présentent sous la forme de petites sphères. Cependant, à la différence des essais avec LNCa ensemencés avec une préculture classique, les réplicats montrent ici une bonne répétabilité.

Le calcium, en revanche, baisse de 0,12 g/L, dans des proportions comparables à l'essai avec suivi. La quantité de précipités attendue avec une telle baisse est de 3 g/L.

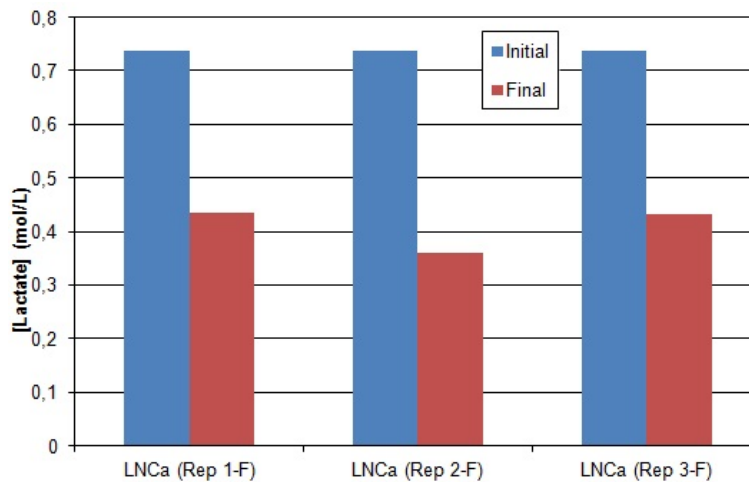


Figure 6.73 Évolution de la concentration en lactate dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium).

Le tableau 6.6 regroupe les quantités de précipité recueillies et la teneur en carbonate de calcium formé. Les quantités sont inférieures à la quantité attendue de 3,1 g. Néanmoins, la quantité de précipité est non négligeable, constituée de 2,1 g en moyenne à plus de 90 % de carbonate de calcium, soit 1,9 g de calcite.

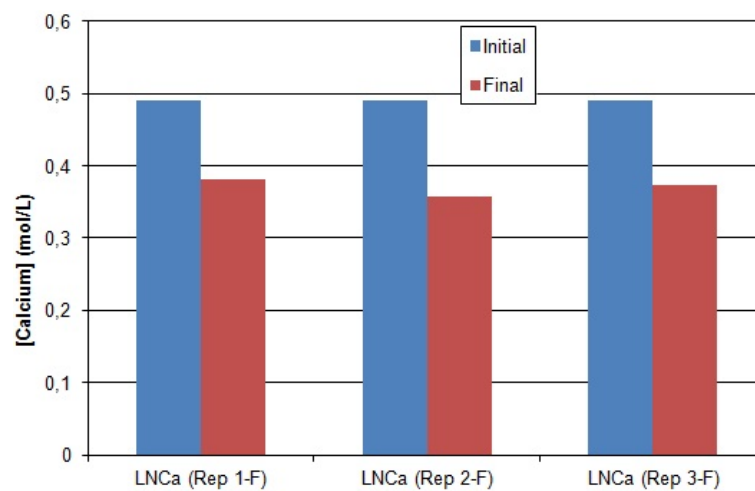


Figure 6.74 Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LNCa pour filtration (préculture de *B. pseudofirmus* avec calcium).

	LNCa(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -0,2		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
Masse recueillie (g)	1,93	2,40	1,99
CaCO <sub>3</sub> %	92	92	90

Tableau 6.6 Quantification et analyse du précipité formé dans le milieu LNCa, (préculture avec calcium).

## 6.5 Conclusion sur l'étude de la croissance bactérienne

Les essais de croissance bactérienne ont permis de déterminer deux milieux de culture et la souche bactérienne qui répondent au mieux aux objectifs fixés pour constituer une solution technique de biocicatrisation des fissures. La composition des milieux retenus, LN75 et LNCa, est constituée de 3 g/L d'extrait de levure, 75 g/L (0,344 mol/L) de lactate de calcium, et, pour LNCa, de 0,2 mol/L de nitrate de calcium. La souche bactérienne sélectionnée est *B. pseudofirmus*. Ces deux milieux permettent une croissance rapide des bactéries, avec une population de plus d'un milliard de bactéries par mL en quelques jours. L'activité bactérienne est maintenue durant plus d'un mois et aboutit à la formation de 2,5 g de précipité en moyenne, constitué à plus de 80 % de carbonate de calcium. Dans les deux milieux sélectionnés, le calcium n'est pas complètement précipité durant la croissance bactérienne. Les ions carbonate semblent donc être le réactif limitant la formation de calcite.

La composition des milieux retenus est le fruit d'une démarche menée progressivement en partant initialement des milieux de culture recommandés par le fournisseur des souches bactériennes testées. Les ajouts des précurseurs et des compléments nutritifs ainsi que l'ajustement de leur concentration se sont faits étape par étape, afin d'identifier les effets de chaque paramètre sur l'activité bactérienne.

Ces connaissances seront mises à profit dans l'élaboration d'une solution de biocicatrisation qui sera évaluée dans le chapitre suivant.

# CHAPITRE 7

## Résultats des essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés

Les essais sont réalisés sur des mortiers dont les fissures sont déjà partiellement autocicatrisées puisque le traitement par biocicatrisation étudié est développé dans le cadre d'une réparation. D'autre part, pour bien mettre en évidence l'effet des bactéries par rapport à l'effet des constituants du milieu, des essais sans bactéries ont également été réalisés.

La phase d'étude de la croissance bactérienne a permis de sélectionner deux milieux de culture, LN75 et LNCa, et une souche bactérienne *Bacillus pseudofirmus*. Ceci conduit à réaliser deux essais de biocicatrisation et deux essais témoins sans bactéries :

- immersion mensuelle de 24 h dans le milieu LN75 avec bactéries (*B. pseudofirmus*)
- immersion mensuelle de 24 h dans le milieu LN75 sans bactéries, dans lequel un biocide est ajouté pour éviter une contamination.
- immersion mensuelle de 24 h dans le milieu LNCa avec bactéries (*B. pseudofirmus*)
- immersion mensuelle de 24 h dans le milieu LNCa sans bactéries avec l'ajout d'un biocide

Chacun des quatre essais est réalisé sur deux éprouvettes de mortier, afin de réaliser les essais en doublon.

### 7.1 Évolution des ouvertures de fissures

Les figures 7.1 et 7.2 présentent l'évolution des ouvertures apparentes obtenues par les mesures de débit d'air. Les courbes avec les marqueurs noirs correspondent aux éprouvettes traitées avec les bactéries, tandis que les courbes avec les marqueurs blancs correspondent aux éprouvettes témoins sans bactéries.

Sur la figure 7.1, correspondant au milieu LN75, l'ouverture des fissures sans bactéries n'évoluent pas. Les milieux de culture stériles n'ont pas d'effets sur la cinétique de cicatrisation pour un mortier déjà partiellement autocicatrisé, comme cela avait été mis en évidence avec les précurseurs seuls (chapitre 5). Les fissures traitées avec bactéries voient

leur ouverture diminuer au cours des deux premiers mois de façon similaire. Par la suite, seule une fissure poursuit sa cicatrisation, jusqu'à atteindre une ouverture apparente de  $87 \mu\text{m}$ , soit une épaisseur apparente de produit de cicatrisation de  $83 \mu\text{m}$ . Le taux apparent de cicatrisation est de 66 %. La seconde fissure a son ouverture qui augmente légèrement pour se stabiliser à  $209 \mu\text{m}$ , soit un taux apparent de cicatrisation de 25 % et une épaisseur apparente de produit de cicatrisation de  $35 \mu\text{m}$ . Le tableau 7.1 résume les évolutions des fissures pour le milieu LN75.

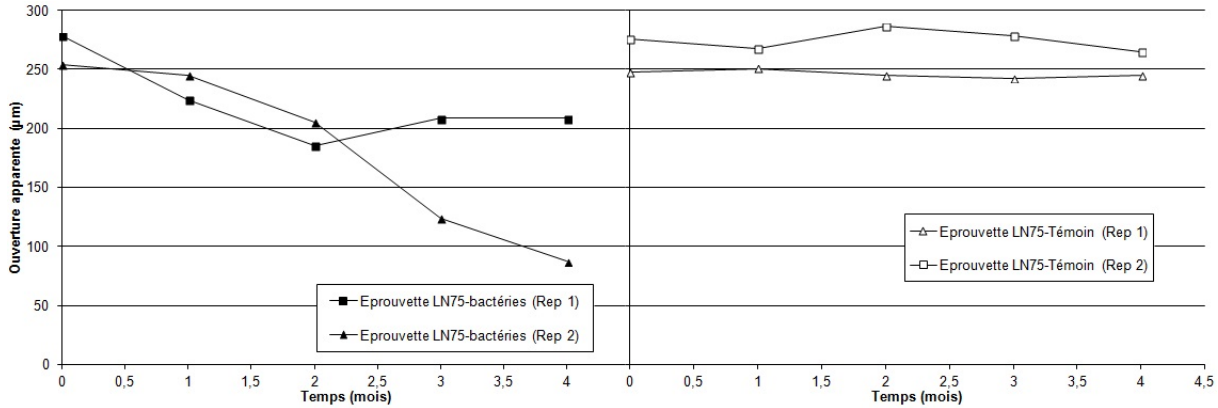


Figure 7.1 Évolution des ouvertures apparentes de fissures immergées dans le milieu LN75, avec et sans *B. pseudofirmus*.

Type	Ouverture apparente ( $\mu\text{m}$ )					Taux apparent de cicatrisation (%)	Épaisseur apparente de cicatrisation ( $\mu\text{m}$ )
	Initiale	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois		
Stérile	248	251	245	242	245	1	2
	276	268	286	278	265	4	5
Bactéries	278	224	186	209	209	25	35
	254	245	206	124	87	66	83

Tableau 7.1 Évolution des ouvertures apparentes de fissures imprégnées du milieu LN75 avec et sans bactéries.

La figure 7.2 montre que le milieu LN75, sans bactéries, n'a qu'un très faible effet sur l'ouverture des fissures. Les taux apparents de cicatrisation pour ces éprouvettes sont de 19 % et 6 %. Ces taux sont semblables à ceux des éprouvettes pré-carbonatées, pour les essais témoins sans précurseur  $C_{3\text{mois}} = 12 \%$  et pour les essais avec immersion dans le lactate de calcium  $C_{3\text{mois}} = 13 \%$  (chapitre 5). En comparaison, les éprouvettes traitées avec le milieu LN75 avec bactéries conduisent à une plus forte réduction de l'ouverture des fissures. Les taux apparents de cicatrisation pour les deux fissures sont de 82 % et 70 %. Les épaisseurs apparentes de produits de cicatrisation sont de  $90 \mu\text{m}$  et  $77 \mu\text{m}$ . Les évolutions entre les deux réplicats montrent une bonne répétabilité, pour les essais avec bactéries ou sans bactéries.

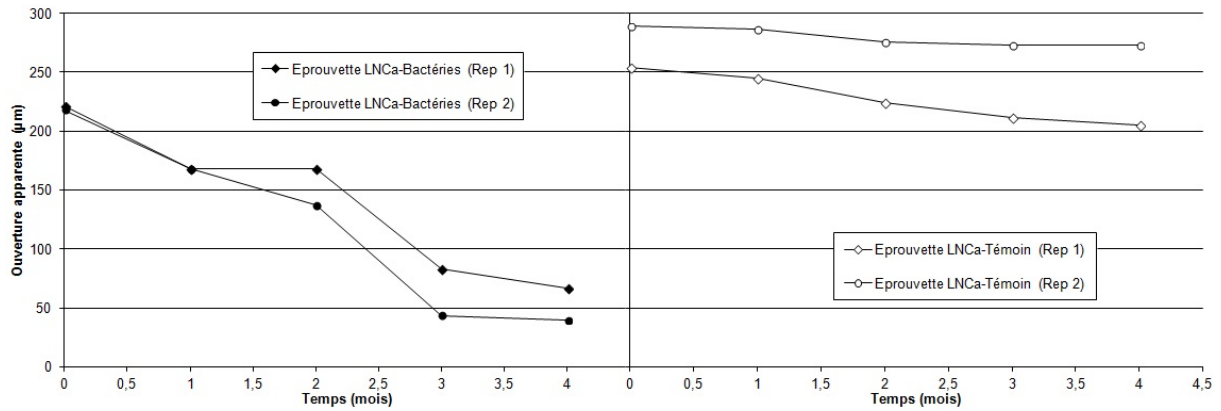


Figure 7.2 Évolution des ouvertures apparentes de fissures immergées dans le milieu LNCa, avec et sans *B. pseudofirmus*

Type	Ouverture apparente ( $\mu\text{m}$ )					Taux apparent de cicatrisation (%)	Épaisseur apparente de cicatrisation ( $\mu\text{m}$ )
	Initiale	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois		
Stérile	254	245	224	212	206	19	24
	289	286	276	273	273	6	8
Bactéries	218	168	137	44	39	82	90
	221	168	168	83	67	70	77

Tableau 7.2 Évolution des ouvertures apparentes de fissures imprégnées du milieu LNCa avec et sans bactéries

## 7.2 Suivi de l'activité bactérienne au cours des essais de biocicatrisation

Pendant les essais de biocicatrisation, l'activité bactérienne a été suivie indirectement par un comptage bactérien dans l'eau de brumisation récupérée au fond des systèmes de stockage.

Aucune activité bactérienne n'a été décelée dans les systèmes de stockage contenant les éprouvettes de mortier témoins. En revanche, des bactéries vivantes sont bien présentes dans l'eau qui a ruisselé au fond des systèmes de stockage contenant les éprouvettes de mortier traitées par les milieux avec bactéries.

Le premier prélèvement a été fait 15 jours après la première immersion. Les deux derniers prélèvements ont été fait à 3 mois et à 4 mois, juste avant de sortir les éprouvettes et de les immerger dans les suspensions bactériennes, respectivement pour la 4ème et 5ème fois. La figure 7.3 présente les concentrations bactériennes mesurées. Le tableau montre la proportion de bactéries vivantes pour chaque prélèvement.

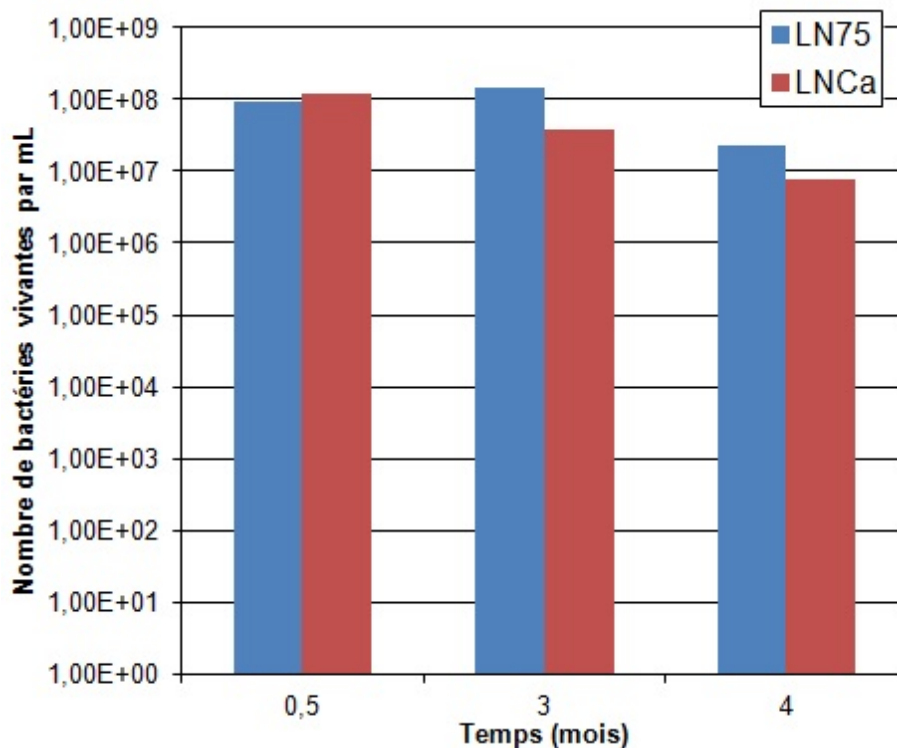


Figure 7.3 Comptages bactériens dans l'eau des systèmes de stockages

Les comptages bactériens montrent une population bactérienne de plus de  $10^7$  bactéries par mL tout au long des essais. En revanche, après le premier mois, la proportion de bactérie-



Mois de prélèvement	LN75		LNCa	
	Bactéries/mL	Vivantes	Bactéries/mL	Vivantes
1	1,08E+08	84 %	1,49E+08	81 %
3	5,89E+08	25 %	1,22E+08	32 %
4	5,12E+07	46 %	2,00E+07	39 %

Tableau 7.3 Comptage bactérien et proportion de bactéries vivantes dans l'eau des systèmes de stockage

ries vivantes diminue. Il faut considérer que les bactéries observées ont été prélevées dans de l'eau, avec peu de nutriments, presque un mois après la dernière immersion des mortiers dans la suspension bactérienne. La forte mortalité des bactéries n'est pas forcément représentative des cultures à l'intérieur des fissures de mortier. Néanmoins, les comptages montrent que l'activité bactérienne semble se maintenir entre chaque période d'immersion.

## 7.3 Observations microscopiques des mortiers fissurés

Les observations, à la loupe binoculaire ou au microscope électronique à balayage, permettent de visualiser les effets des différents traitements sur les fissures. Les observations à la loupe binoculaire sont effectuées tous les mois lors de chaque renouvellement. Celles au microscope électronique à balayage ont été réalisées uniquement à la fin des essais, les fissures devant être ouvertes et les éprouvettes sacrifiées.

### 7.3.1 Observations à la loupe binoculaire

Les figures suivantes présentent les observations réalisées à la loupe binoculaire. Un seul réplikat est présenté pour chaque catégorie d'essai. Les aspects visuels initiaux et finaux des fissures sont comparés.

Les figures 7.4 et 7.5 illustrent l'aspect visuel classique de l'ouverture de fissures pré-carbonatées avant leurs immersions dans les différents milieux qui serviront de référence.

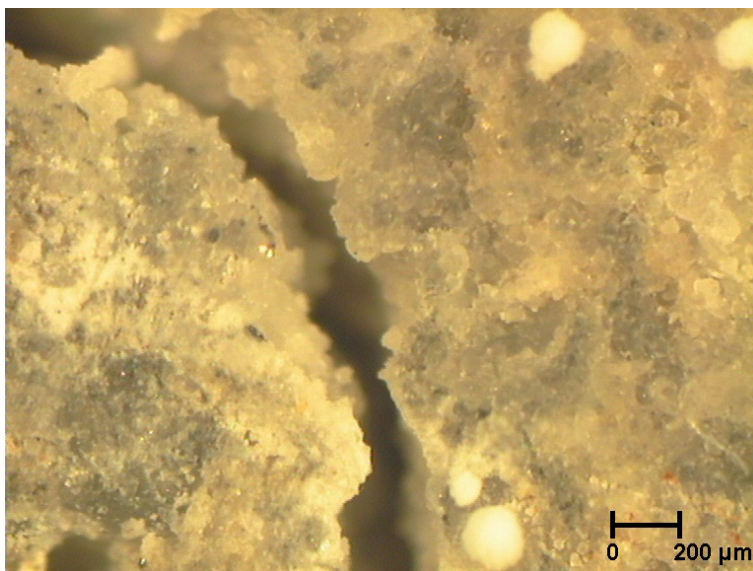


Figure 7.4 Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure avant immersion dans le milieu LN75 avec bactéries.

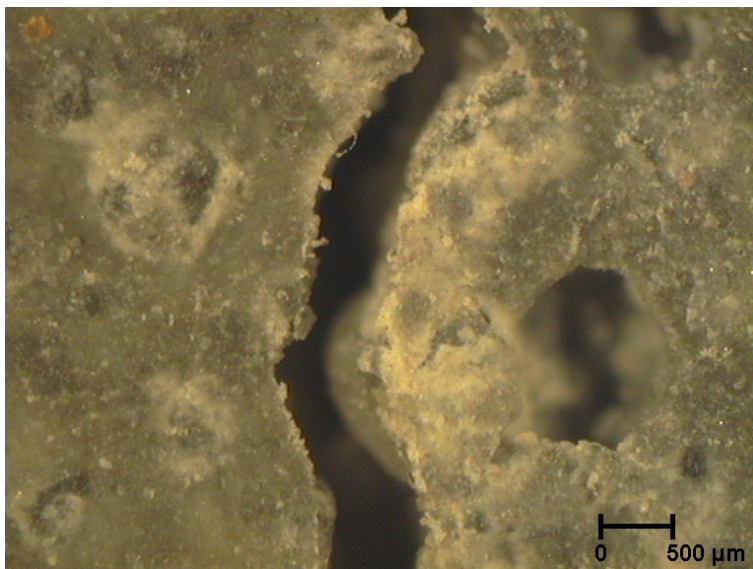


Figure 7.5 Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure avant immersion dans le milieu LNCA avec bactéries.

### Éprouvettes de mortier immergées dans le milieu LN75 avec bactéries

La figure 7.6 présente l'aspect de l'ouverture d'une fissure traitée avec le milieu LN75 avec bactéries, après 4 mois d'essai. L'aspect extérieur est le même pour les deux répliquats malgré les ouvertures apparentes finales différentes. Le traitement semble avoir permis la formation de fins filaments qui sont bien visibles au niveau des lèvres de la fissure. La cicatrisation n'est cependant pas homogène sur toute la longueur de la fissure. La partie de la fissure près du cœur expansif paraît avoir mieux cicatrisé que la partie à la circonférence de l'éprouvette de mortier.

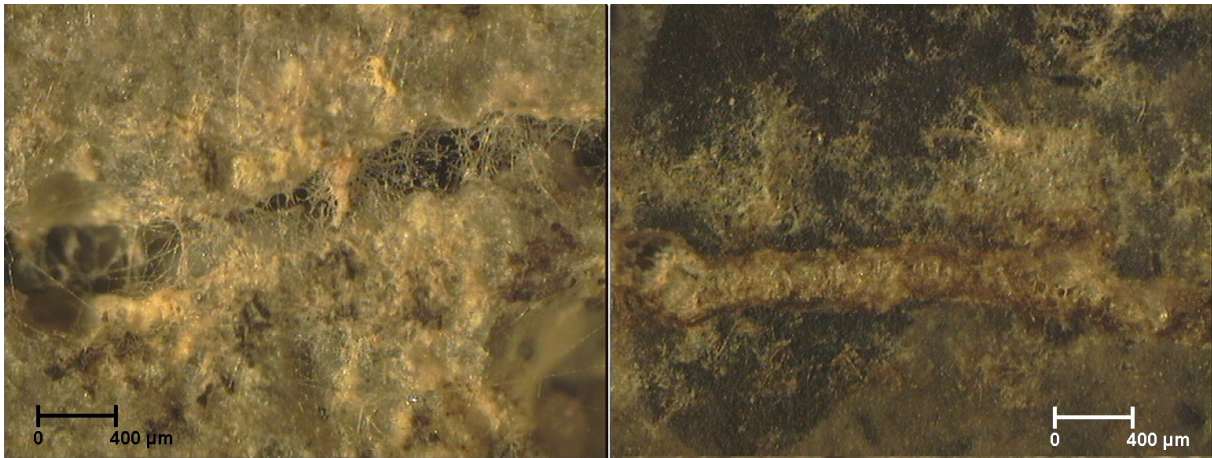


Figure 7.6 Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LN75 avec bactéries.

### Éprouvettes de mortier immergées dans le milieu LN75 sans bactéries

La figure 7.7 montre l'aspect d'une fissure traitée avec le milieu LN75 sans bactéries, après 4 mois d'essai. La morphologie est fondamentalement différente en l'absence de bactéries. Les fins filaments en surface ne sont pas observés. Les fissures n'ont pas évolué sensiblement durant l'essai, en accord avec la mesure de l'ouverture apparente.

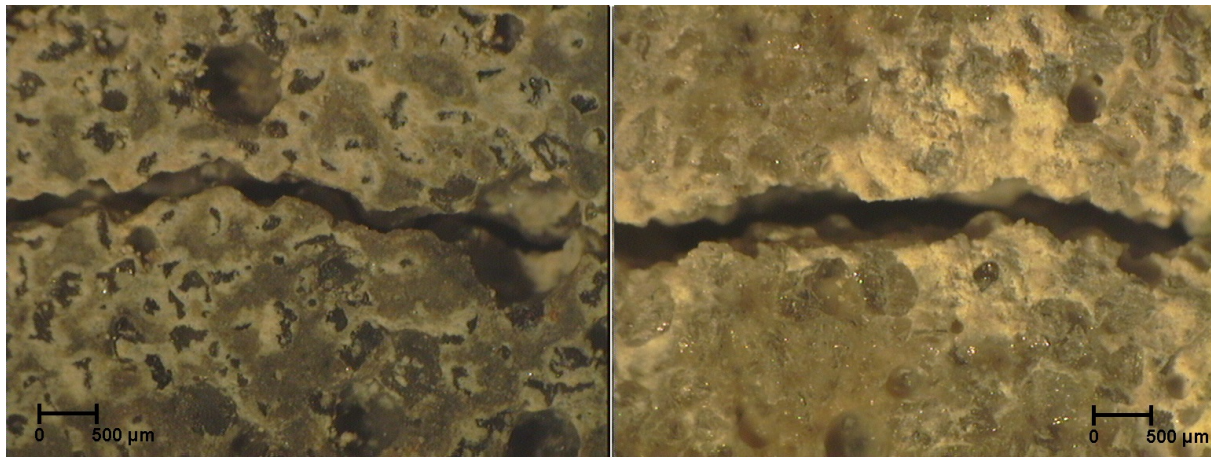


Figure 7.7 Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LN75 sans bactéries.

### Éprouvettes de mortier immergées dans le milieu LNCa avec bactéries

Après imprégnations dans le milieu LNCa avec bactéries, la fissure apparaît presque entièrement refermée sur toute sa longueur (figure 7.8). De fins filaments recouvrent en partie la surface de l'éprouvette de mortier au point qu'il est parfois difficile de distinguer la fissure.

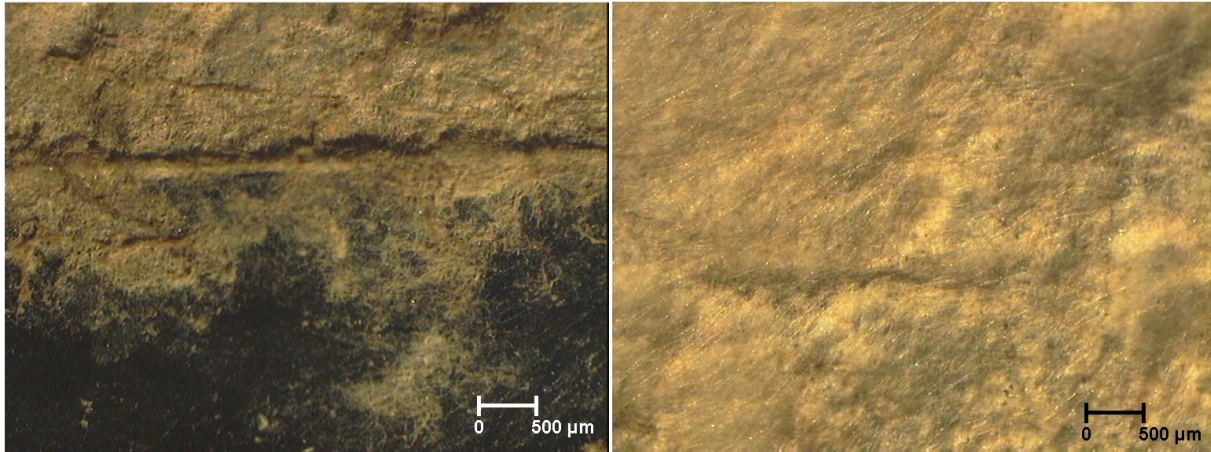


Figure 7.8 Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LNCa avec bactéries.

### Éprouvettes de mortier immergées dans le milieu LNCa sans bactéries

Sans bactéries, les immersions dans le milieu LNCa ont un effet limité sur la cicatrisation. La figure 7.9 montre l'aspect de l'ouverture d'une fissure après 4 mois de traitement dans LNCa sans bactéries. L'ouverture de la fissure n'a pas évolué sur la plupart des sections observées. Cependant, en certains endroits, la fissure s'est partiellement cicatrisée. Il n'y a pas de filaments visibles et des cristaux sont visibles sur les lèvres de la fissure. Cette réduction localisée de l'ouverture de la fissure semble être due à la précipitation d'un composé minéral.

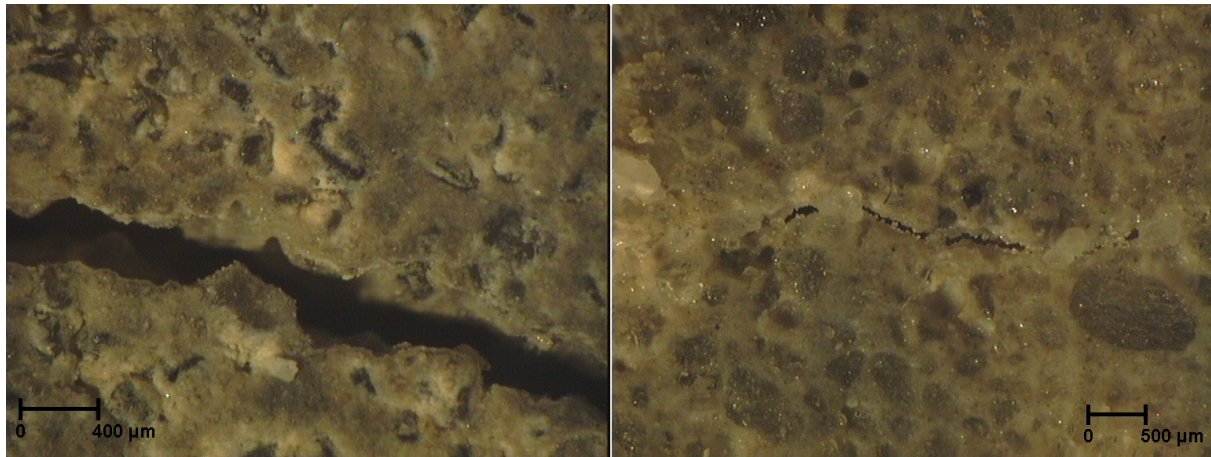


Figure 7.9 Observations à la loupe binoculaire de l'ouverture de la fissure à différents endroits après 4 mois de traitement avec le milieu LNCa sans bactéries.

### 7.3.2 Analyse par DRX des phases formées sur la surface interne des fissures

Les observations au microscope électronique à balayage ont été réalisées à la fin des essais de biocicatrisation.

L'une des deux faces internes de la fissure est grattée légèrement, afin de recueillir le solide qui est analysé en DRX. L'autre face, restée intacte, est mise sous vide, métallisée et observée au microscope électronique à balayage.

La figure 7.10 présente le résultat de l'analyse DRX du solide recueilli sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa avec bactéries. Les analyses pour toutes les autres fissures sont identiques. Les produits mis en évidence par cette analyse sont de la calcite et du quartz. Le quartz provient des grains de sables utilisés pour la fabrication du mortier. La calcite semble donc le seul élément cristallin dans les produits de cicatrisation, quel que soit le traitement appliqué aux fissures. La calcite avait été également le seul composé observé dans les fissures durant les essais de cicatrisation des mortiers pré-carbonatés en présence de précurseurs (chapitre 5).

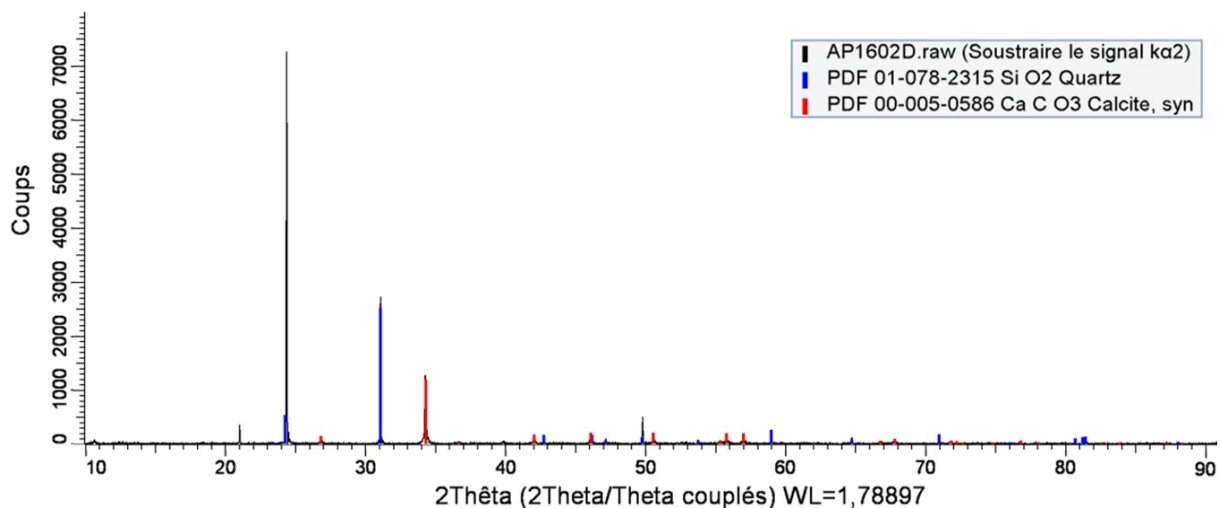


Figure 7.10 Analyse de diffraction des rayons X de la surface interne de fissure biocicatrisée, traitée avec le milieu LNCa avec bactéries.

### 7.3.3 Observations au microscope électronique à balayage des surfaces internes des fissures

#### Fissure traitée avec LN75 avec bactéries

Les figures 7.11, 7.12 et 7.13 montrent des observations faites au microscope électronique à balayage sur une fissure traitée avec le milieu LN75 avec bactéries. Cette fissure avait un taux de cicatrisation à 4 mois de 66%.

La figure 7.11 montre la surface interne de la fissure proche du bord de l'éprouvette. Des structures filamenteuses ont colonisé la surface du mortier. Ces structures semblent être un biofilm sur lequel des cristaux de calcite se sont formés. Il s'agit vraisemblablement des structures filamenteuses observées en surface à la loupe binoculaire (figures 7.6 et 7.8).

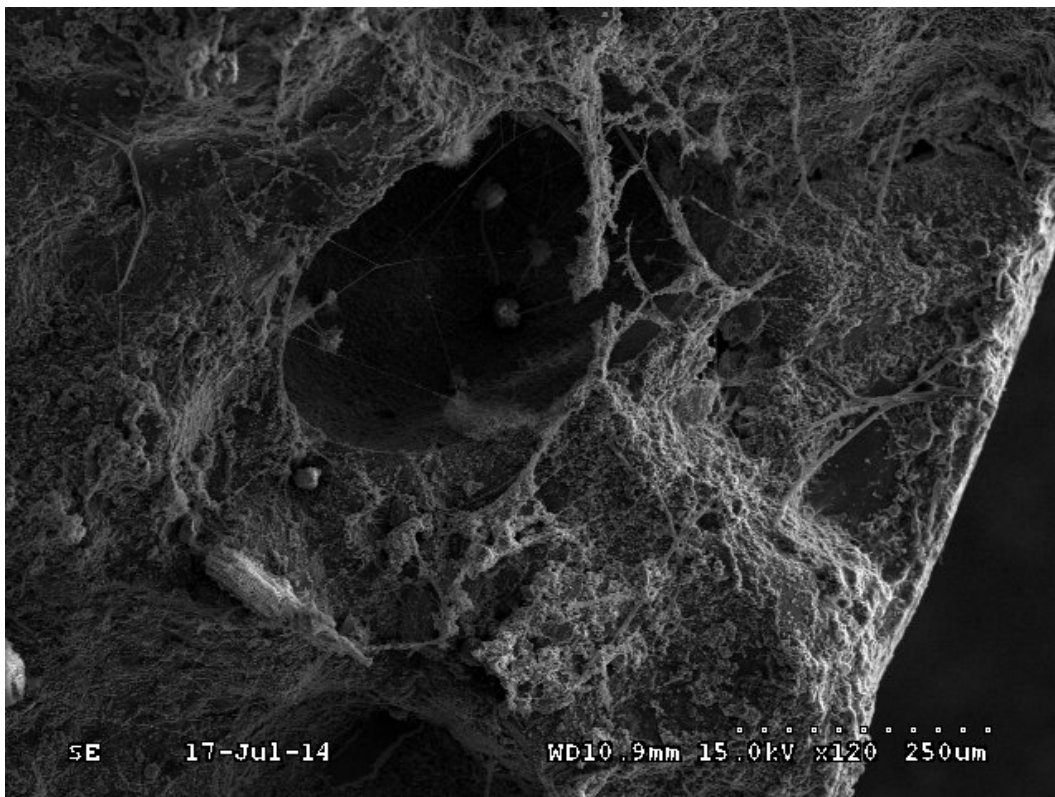


Figure 7.11 Observation de la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LN75 et bactéries.

Les figures 7.12 et 7.13 montrent des cristaux de calcite mêlés aux biofilms, qui se sont développés dans la fissure.



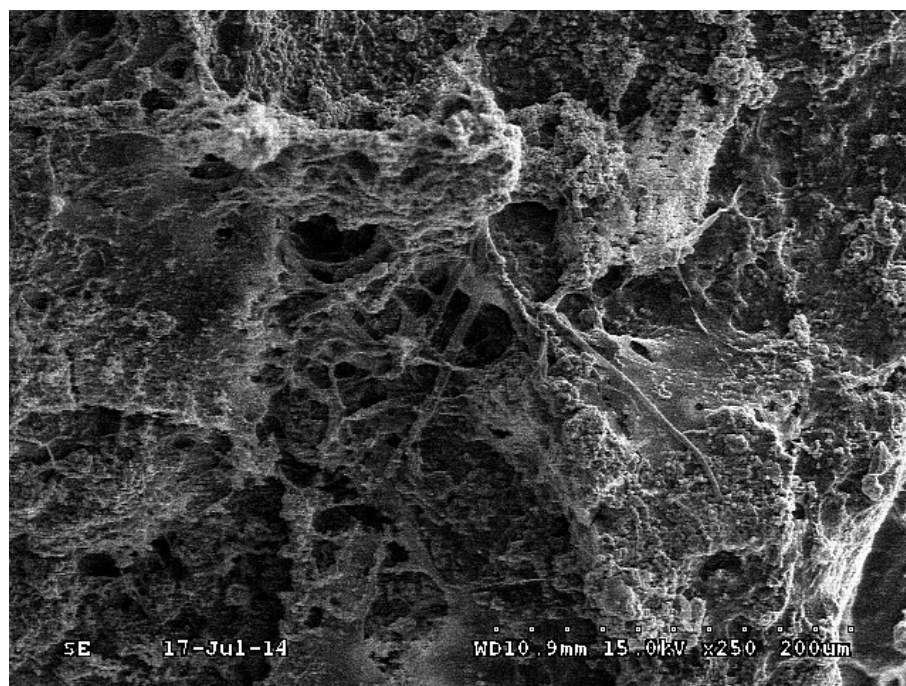


Figure 7.12 Observations du biofilm et de cristaux de calcite enchevêtrés à la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LN75 et bactéries.

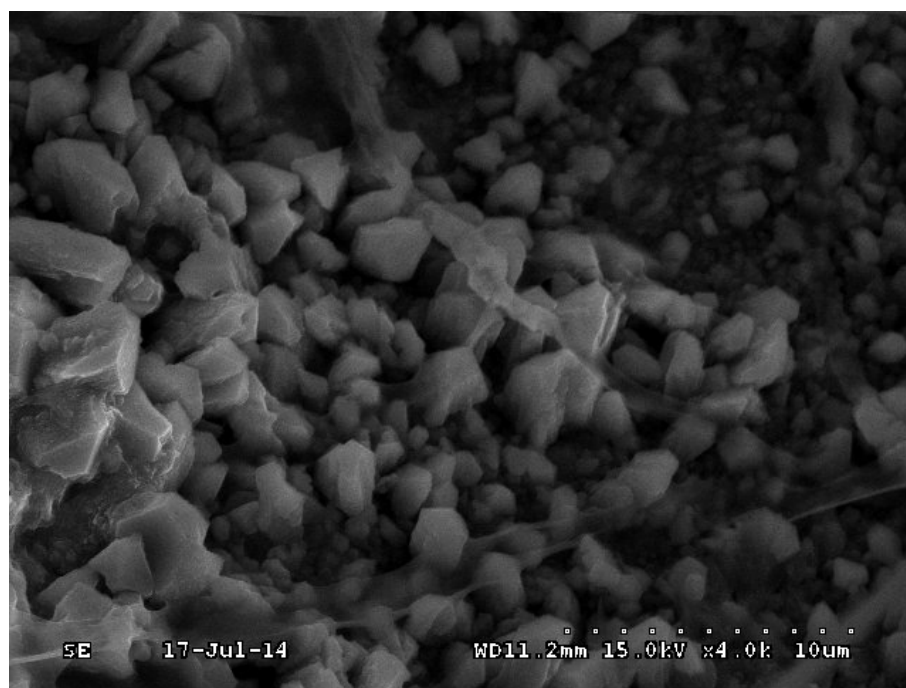


Figure 7.13 Cristaux de calcite et de fragments de biofilm à la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LN75 et bactéries.

### Fissure traitée avec LN75 sans bactéries

Les figures 7.14 présentent les surfaces internes d'une fissure traitée avec le milieu LN75, sans bactéries.

La figure 7.14 montre la couche de calcite formée à l'intérieur de la fissure avec une morphologie classique. Cette couche est le résultat de la phase de pré-carbonatation des fissures.

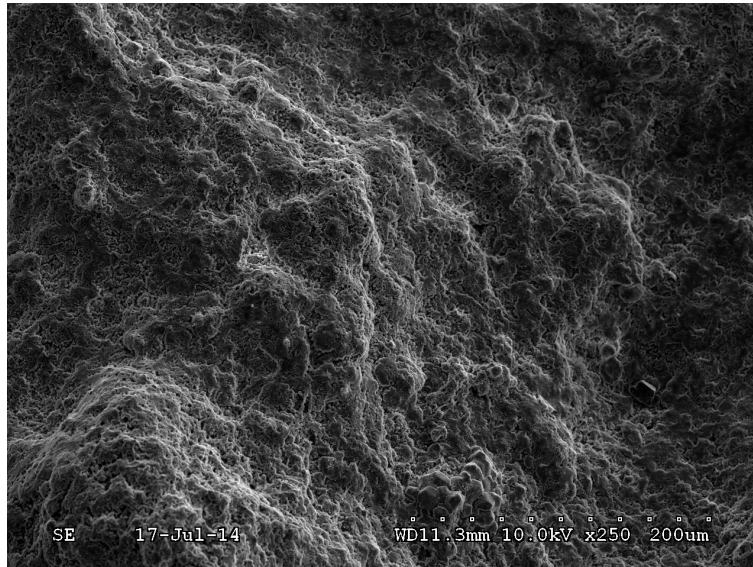


Figure 7.14 Observation de la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LN75 sans bactéries.

### Fissure traitée avec LNCa avec bactéries

Les figures 7.15, 7.18, 7.16, 7.17 et 7.19 montrent la surface interne d'une fissure imprégnée par le milieu LNCa avec bactéries.

Les figures 7.15 et 7.16 révèlent des structures recouvertes de calcite. Il s'agit apparemment d'un biofilm qui s'est développé, sur lequel la calcite a précipité.

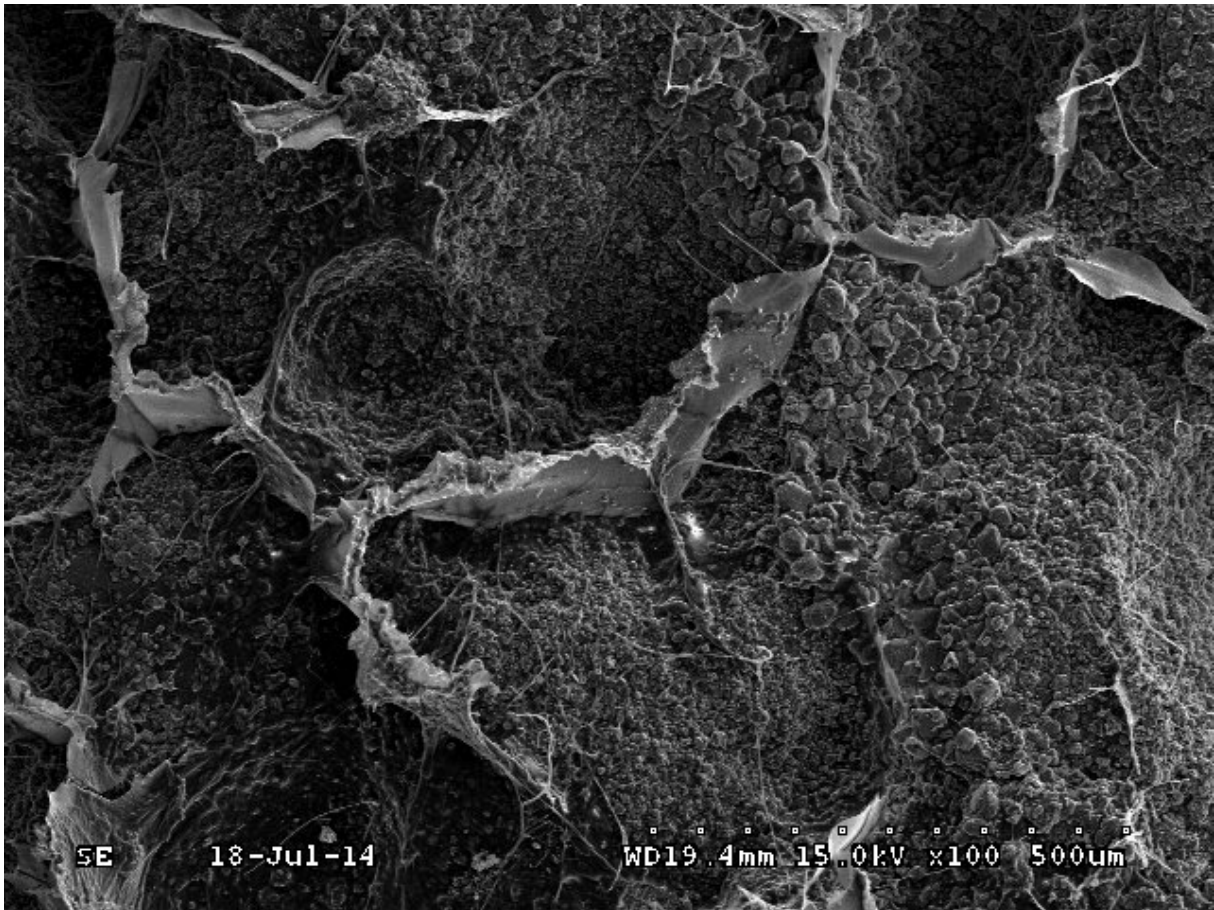


Figure 7.15 Observation de la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries.

Les figures 7.17 et 7.18 montrent la présence d'un biofilm à la surface interne de la fissure enchevêtré avec des cristaux de calcite. Dans certaines zones, les cristaux de calcite ont une forme cubique caractéristique (figure 7.19)

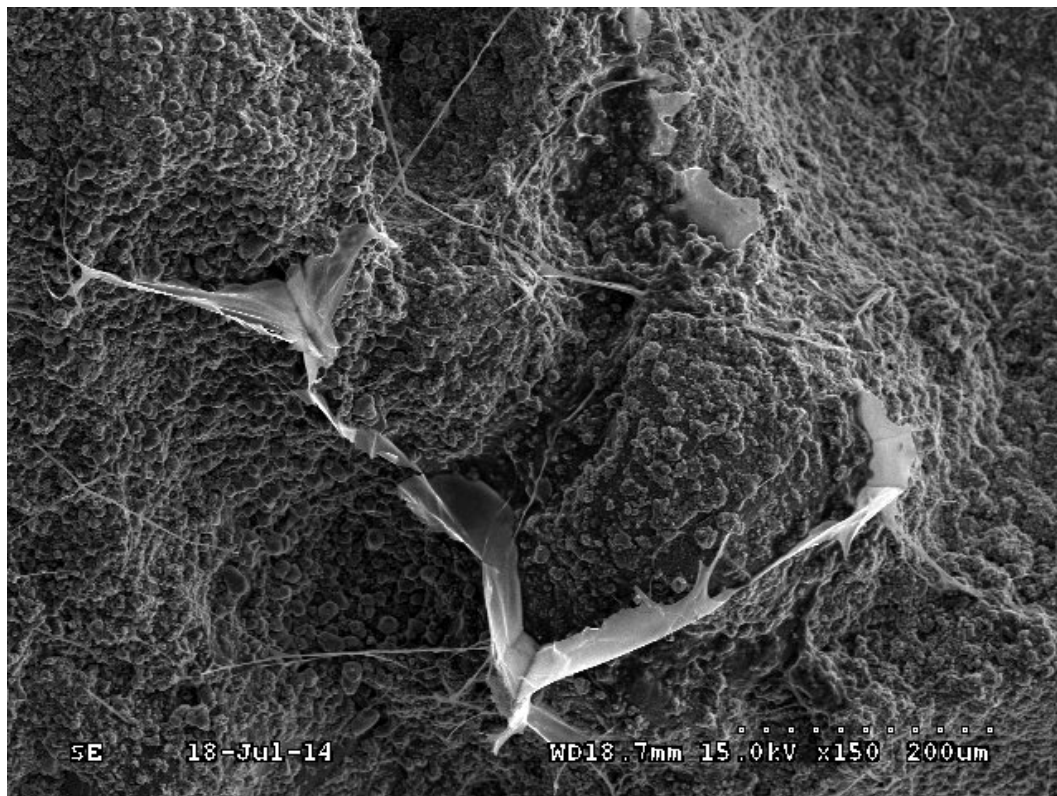


Figure 7.16 Cristaux de calcite et biofilm sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries.

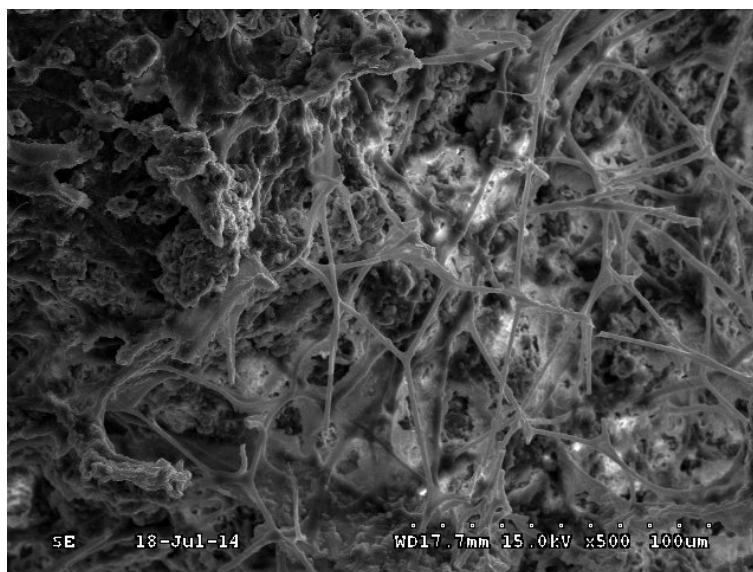


Figure 7.17 Biofilm sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries.

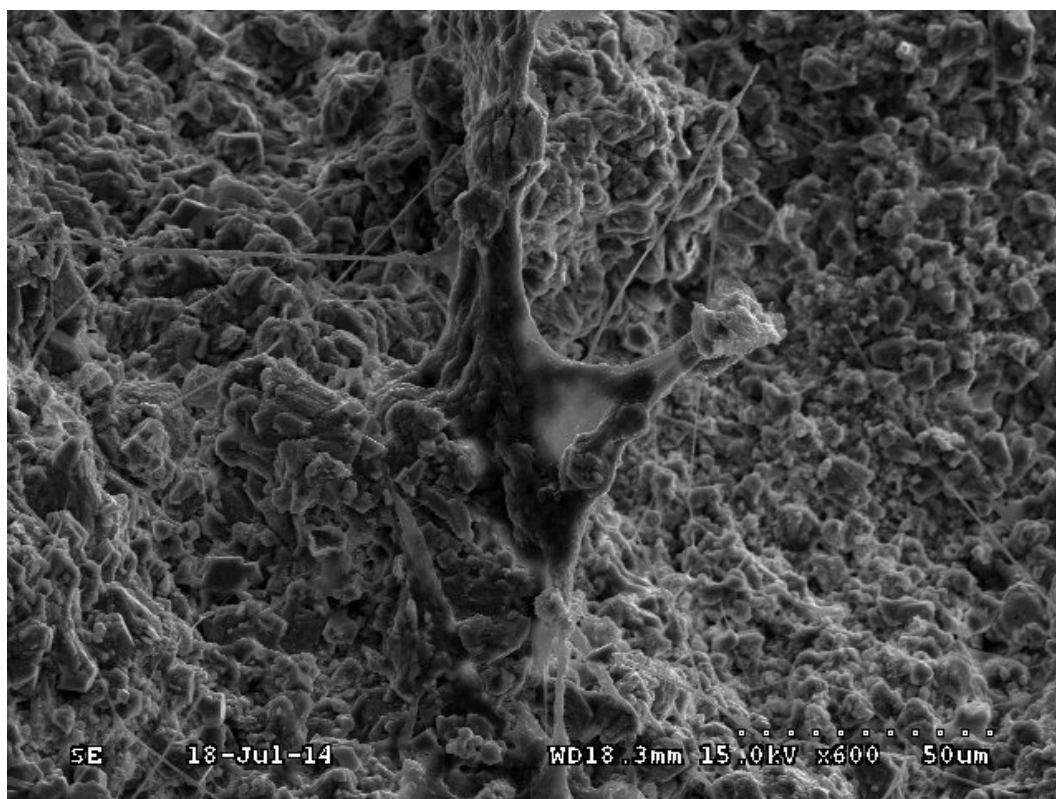


Figure 7.18 Cristaux de calcite et une portion de biofilm enchevêtrés sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries.

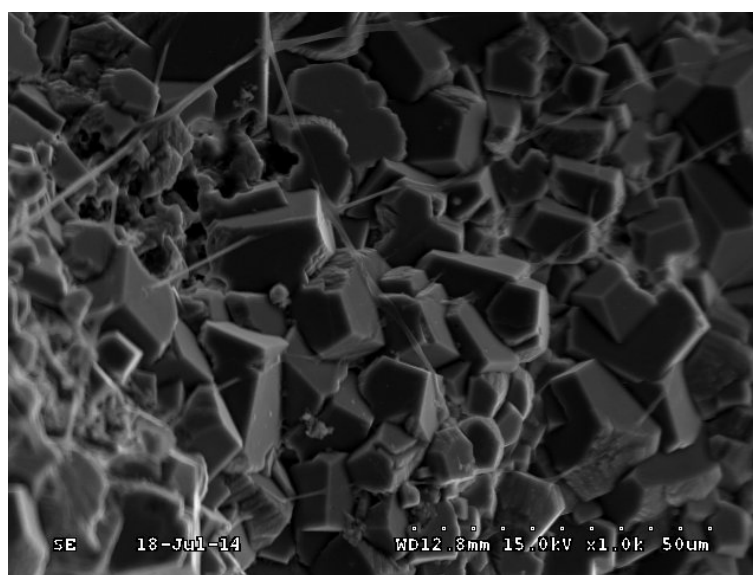


Figure 7.19 Cristaux de calcite dans une fissure traitée avec le milieu LNCa et bactéries.

**Fissure traitée avec LNCa sans bactéries**

La figure 7.20 présente les observations faites sur la surface interne d'une fissure traitée avec le milieu LNCa sans bactéries. La surface interne de la fissure est couverte de calcite.

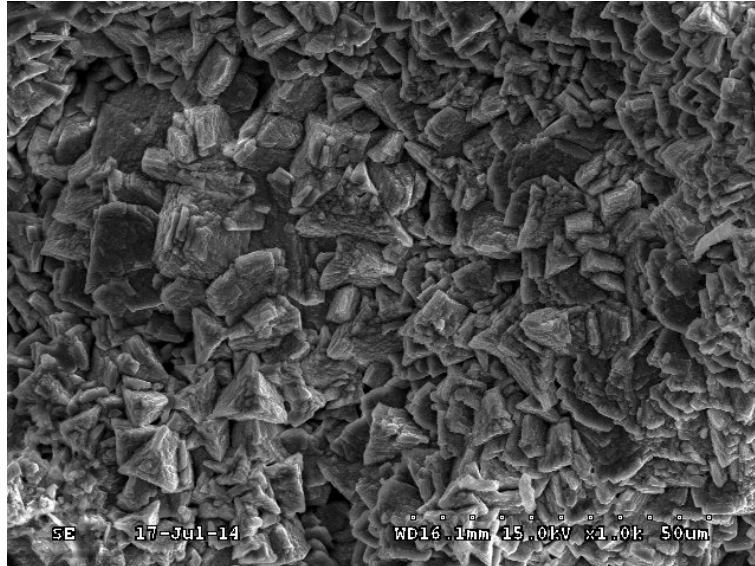


Figure 7.20 Cristaux de calcite dans une fissure traitée avec le milieu LNCa sans bactéries.

### 7.3.4 Observations au microscope électronique à balayage d'une coupe transversale à la fissure

Le traitement bactérien avec le milieu LNCA a montré une bonne performance pour la biocicatrisation des mortiers fissurés. Afin de visualiser l'épaisseur de la couche de cicatrisation dans les parties profondes de la fissure, une surface polie d'une section transversale a été réalisée sur une éprouvette traitée avec le milieu LNCA avec bactéries. La section choisie se situe à mi-hauteur de l'éprouvette, soit au centre du plan de fissuration (figure 4.7, chapitre 4).

La découpe de la section de l'éprouvette et la nécessité de couper l'armature d'acier a légèrement ouvert la fissure. Ainsi, les observations de la coupe transversale de la fissure ne sont pas adéquates pour mesurer précisément l'ouverture de la fissure. En revanche, il est possible de quantifier l'épaisseur de la couche de calcite formée.

Les analyses EDS, en certains points, permettent d'identifier la composition chimique des différentes couches observées. Les figures 7.21 et 7.22 montrent les pointages EDS réalisés sur deux zones de la fissure. Les grains de sable, en quartz pur, sont aisément repérables. En revanche, la délimitation entre la couche de calcite et la pâte de ciment n'est pas toujours évidente.

Sur la figure 7.21, les analyses EDS aux points 1, 6, 7 et 8 indiquent que la couche recouvrant la pâte de ciment est constituée de carbonate de calcium. Les analyses EDS aux points 3 et 9 permettent d'identifier la pâte de ciment. L'analyse au point 2 confirme qu'il s'agit d'un grain de sable, en quartz pur. Les éléments identifiés aux points 4 et 5 suggèrent la présence de monosulfoaluminate de calcium (AFm) compte tenu de la proportion importante d'aluminium.

Dans la figure 7.22, la couche de calcite est facilement identifiable. L'analyse EDS aux points 1 et 2 tend à le confirmer. L'analyse au point 3 identifie les éléments constitutifs de la pâte de ciment.

Les figures 7.23, 7.24, 7.25 et 7.26 montrent l'épaisseur de la couche de calcite qui recouvre les parois internes de la fissure. Les figures 7.25 et 7.26 montrent une section de la fissure proche de l'ouverture centrale de l'éprouvette, au niveau du cœur expansif. La figure 7.25 présente la fissure débouchant dans une bulle d'air. La figure 7.26 est un agrandissement de la zone où la fissure et la bulle d'air se rejoignent.

Sur la section transversale observée, la fissure n'est pas complètement remplie de calcite. L'épaisseur de la couche est proche de 30  $\mu\text{m}$  au cœur de l'éprouvette de mortier et elle

---

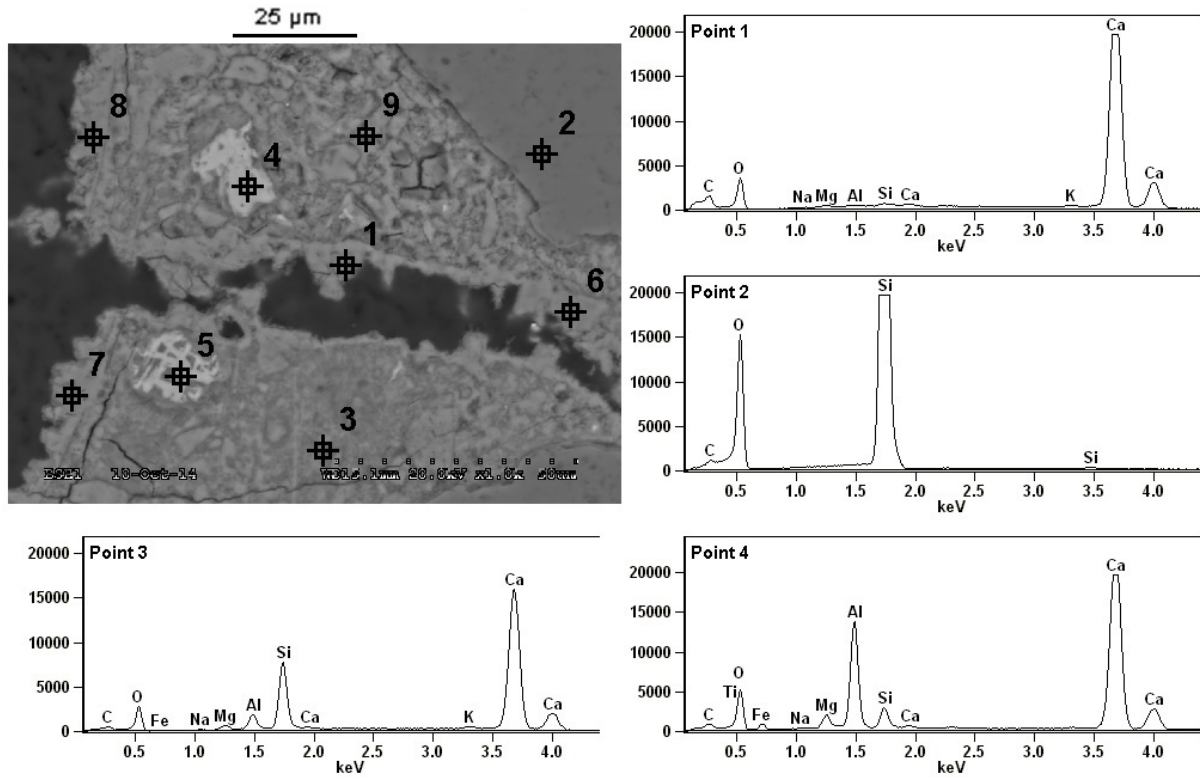


Figure 7.21 Analyses EDS de la zone proche du bord de la fissure.

est bien plus fine dans les zones proches de l'ouverture centrale de l'éprouvette, au niveau du cœur expansif. Ces observations suggèrent que les principales zones biocatratisées se situent dans les zones proches des bords externes de l'éprouvettes de mortier, c'est à dire dans les parties de la fissure directement exposées lors des immersions dans les milieux de culture.



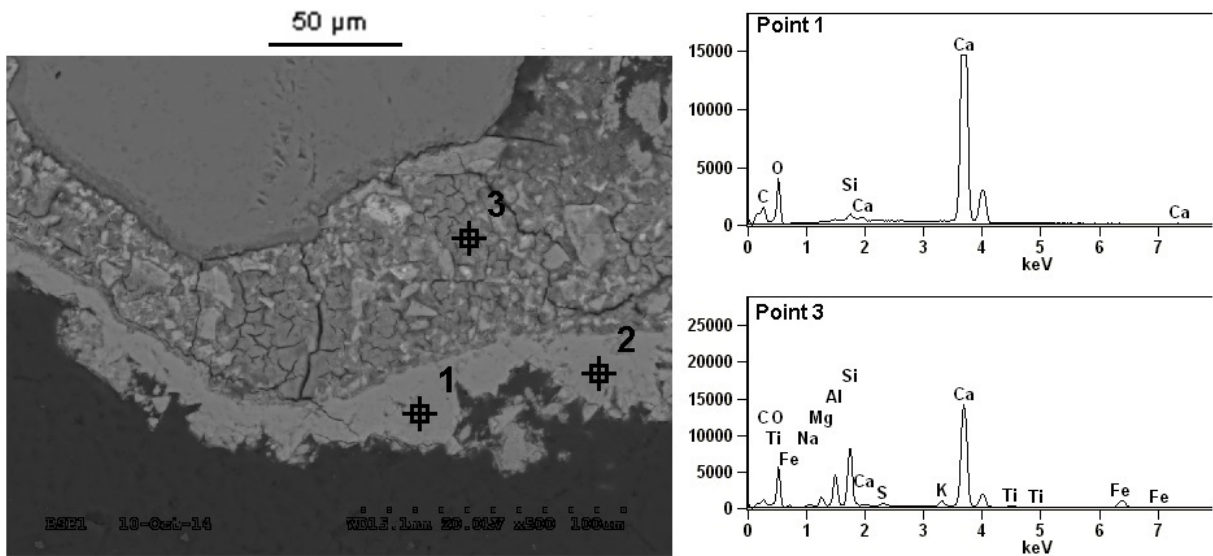


Figure 7.22 Analyses EDS d'une zone au centre de la fissure.

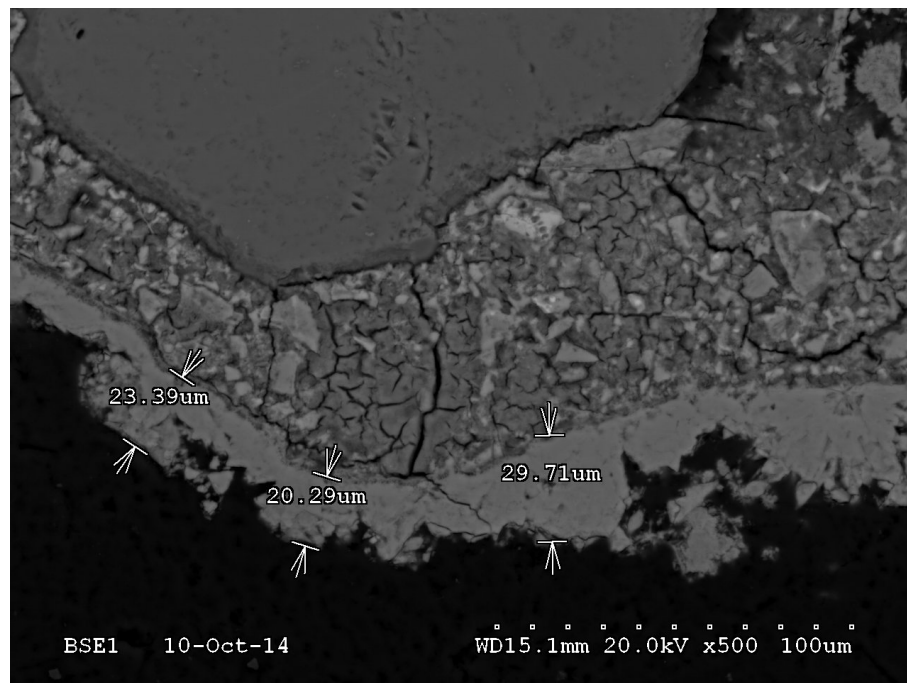


Figure 7.23 Couche de calcite formée au cœur de la fissure.

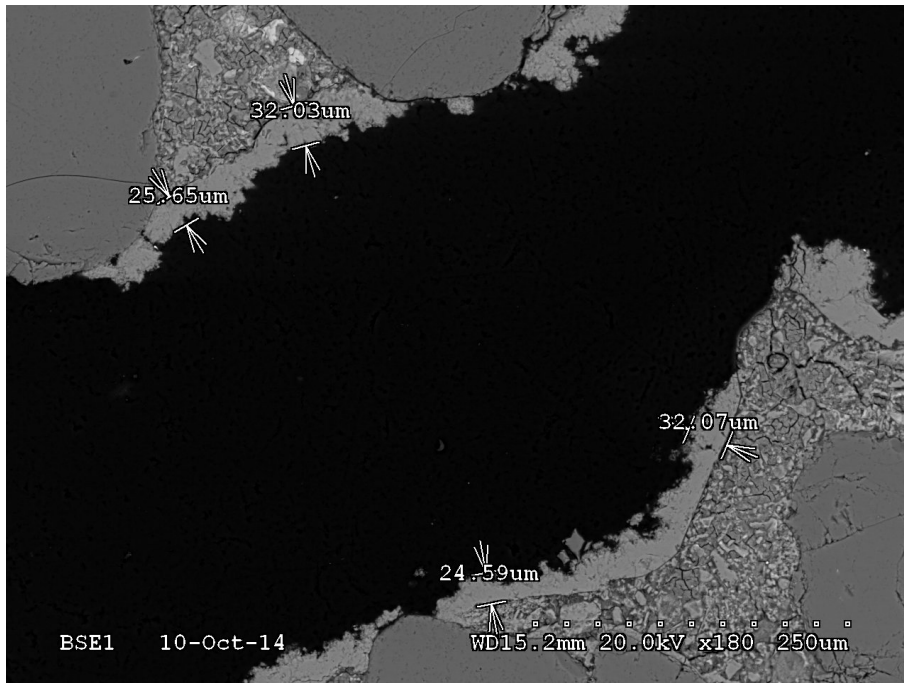


Figure 7.24 Couche de calcite formée de part et d'autre de la fissure.

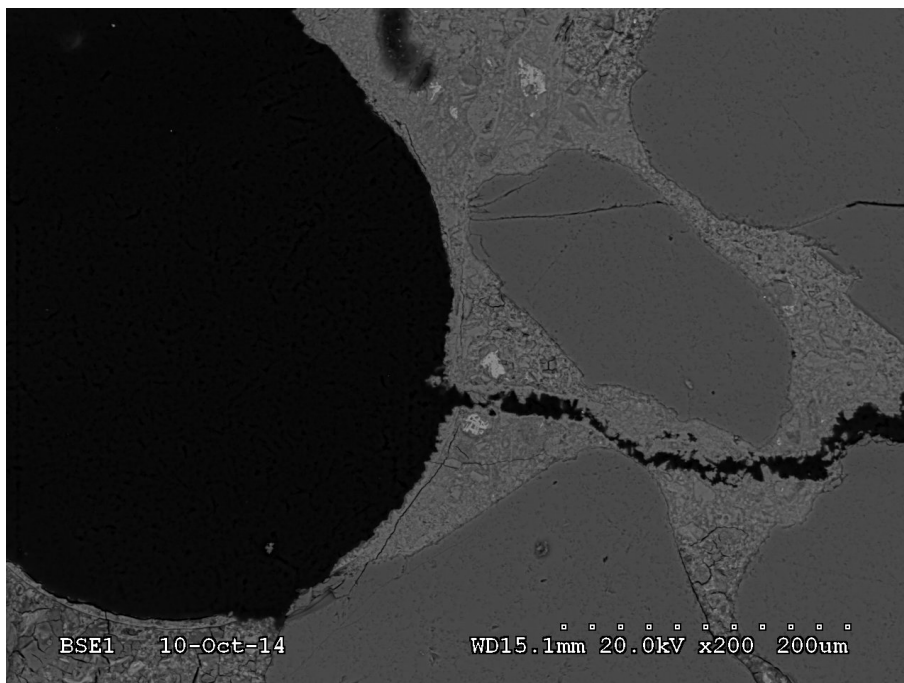


Figure 7.25 Observations de la fissure dans une zone proche du bord de l'éprouvette de mortier.

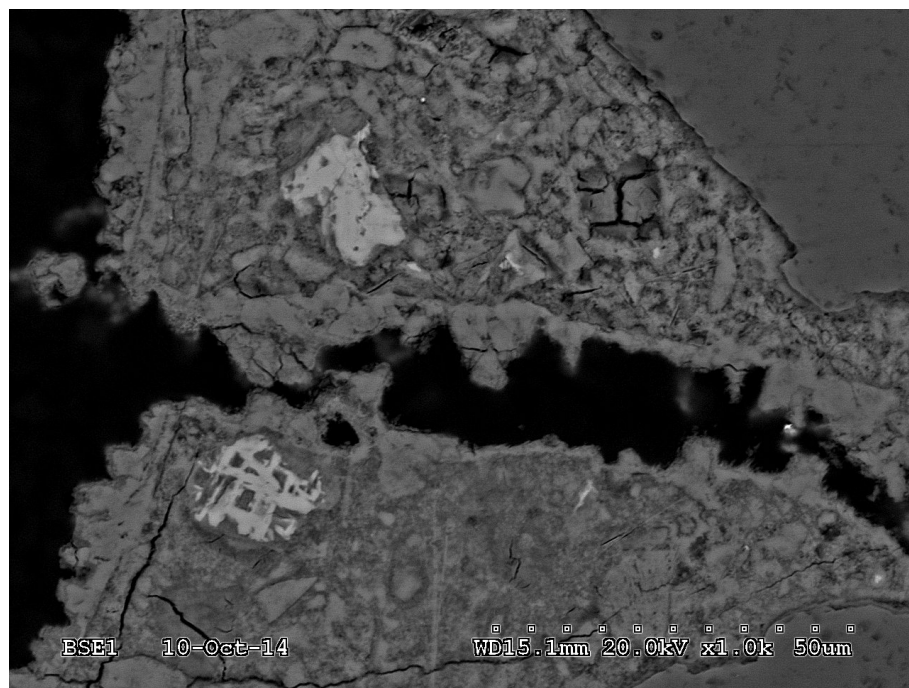


Figure 7.26 Observations de la couche de calcite dans une zone proche du bord de l'éprouvette de mortier.

## 7.4 Discussion sur les essais de biocicatrisation

L'évolution de l'ouverture apparente des fissures montre un effet bactérien indéniable dans le processus de cicatrisation. Au contraire, les éprouvettes de mortier qui ont été imprégnées avec les milieux stériles présentent peu d'évolution. Ceci permet de conclure que l'effet chimique des milieux de culture sur les fissures pré-carbonatées est limité. La diminution de l'ouverture apparente pour les fissures imprégnées par les milieux avec bactéries est donc imputable à l'activité bactérienne.

Les éprouvettes traitées avec le milieu LN75 avec bactéries montrent une mauvaise répétabilité. L'une des deux fissures suivies voit son ouverture diminuer progressivement durant toute la durée de l'essai. L'ouverture apparente de la seconde fissure connaît une évolution similaire à la première durant les deux premiers mois. Ensuite, l'ouverture augmente légèrement pour se stabiliser jusqu'à la fin de l'essai. Les éprouvettes traitées avec LN75 avec bactéries ont une ouverture apparente à 4 mois de  $87 \mu\text{m}$  et  $209 \mu\text{m}$ . Si elle était homogène, l'épaisseur apparente de la couche de cicatrisation serait, respectivement de  $83 \mu\text{m}$  et de  $35 \mu\text{m}$ .

Les éprouvettes traitées avec le milieu LNCa avec bactéries suivent, au contraire, une évolution identique. Leur ouvertures apparentes diminuent durant toute la durée de l'essai. L'ouverture apparente à 4 mois est autour de  $50 \mu\text{m}$  pour les deux réplicats. L'épaisseur apparente de la couche de cicatrisation serait de  $90 \mu\text{m}$  et  $77 \mu\text{m}$ .

Avec les deux milieux de culture avec bactéries, le produit de cicatrisation semble dense et remplir une grande partie des fissures. Les éprouvettes traitées avec le milieu LNCa ont leur surface recouverte par les produits de cicatrisation fibreux de façon plus importante qu'avec LN75. Cependant, il ne semble pas y avoir de différences dans la nature du composé formé avec les deux traitements.

Les observations au microscope électronique mettent en évidence la présence de calcite et de biofilms au sein des fissures. La couche de cicatrisation formée semble essentiellement constituée de calcite mêlée au biofilm. Ce dernier semble être fondamental dans la formation de la couche de calcite, puisque les cristaux de calcite se forment à la surface du biofilm.

Pour l'essai avec LNCa et bactéries, l'ouverture initiale de la fissure est légèrement plus faible que pour l'essai LN75 avec bactéries (environ  $40 \mu\text{m}$  de moins). Dans une fissure plus fine, la précipitation de solides a un impact plus important sur le taux apparent

---

de cicatrisation. En revanche, les épaisseurs apparentes de cicatrisation sont relativement indépendantes de l'ouverture initiale de la fissure (chapitre 5).

L'épaisseur apparente de la couche de cicatrisation est de  $90\ \mu\text{m}$  et  $77\ \mu\text{m}$  pour les éprouvettes traitées avec LNCa. Ces valeurs sont proches de celles de la fissure traitée avec LN75 qui a bien cicatrisé ( $83\ \mu\text{m}$ ). Malgré l'ouverture initiale plus grande, cette éprouvette traitée avec le milieu LN75 semble avoir aussi bien cicatrisé que les fissures traitées avec le milieu LNCa. L'avantage du milieu LNCa sur le milieu LN75 repose donc principalement sur la bonne répétabilité entre les deux réplicats. Les bactéries avec LNCa apparaissent sous la forme de petites sphères. Le nitrate de calcium semble conférer aux bactéries une meilleure résistance et adaptabilité aux conditions internes de la fissure.

La couche formée est en moyenne de  $30\ \mu\text{m}$ , soit une réduction de la fissure de  $60\ \mu\text{m}$ , une valeur proche de ce que peut apporter l'autocicatrisation naturelle (environ une soixantaine de microns). Cette couche de calcite est le cumul d'un an et demi de carbonatation en plus de l'effet du traitement avec LNCa avec bactéries. Le traitement semble donc avoir un effet réduit sur les couches profondes de la fissure, le traitement ne pénétrant peut-être pas suffisamment en profondeur. En revanche, les observations à la loupe binoculaire montrent que, proche des bords, le produit formé referme presque totalement les fissures et recouvre certaines parties de la surface de l'éprouvette. Le processus de biocicatrisation s'autolimiterait lorsque l'ouverture se fermerait.

## 7.5 Conclusion des essais de biocicatrisation

Les essais de biocicatrisation des fissures de mortier ont permis d'identifier une solution prometteuse et d'apporter des informations précieuses sur le processus impliqué.

Il ressort ainsi que la cicatrisation est effectivement la conséquence de l'activité bactérienne. Le milieu de culture stérile a un effet faible sur la cinétique de cicatrisation dans les fissures carbonatées.

Les observations à la loupe binoculaire montrent que les produits de cicatrisation se présente sous la forme de fins filaments qui relient les lèvres de la fissure. Ces derniers semblent être un mélange de biofilm avec des cristaux de calcite formés à sa surface. Avec le milieu LNCa, le produit formé recouvre abondamment la surface de l'éprouvette. Avec le milieu LN75, seule la fissure est affectée par la formation du produit de cicatrisation.

Parmi les deux milieux testés, le milieu LNCa avec bactéries permet une bonne répétabilité et une cicatrisation importante. La cicatrisation n'est pas totale mais le taux apparent

---

de cicatrisation est de 70 % et de 82 % pour les deux répliquats, avec la formation d'une couche de cicatrisation apparente de plus de 75  $\mu\text{m}$ .

La DRX et les observations au microscope électronique à balayage montrent que la calcite constitue la majeure partie du produit de cicatrisation. La calcite semble se former à la surface du biofilm. La formation d'un biofilm est constatée avec toutes les éprouvettes imprégnées avec bactéries. Les observations suggèrent qu'il joue un rôle dans la localisation de la cristallisation de la calcite, et notamment dans le volume poral, où le biofilm peut constituer une matrice support sur laquelle la calcite peut se former. Ce système permettrait une meilleure efficacité pour combler la fissure ou augmenter sa tortuosité, diminuant ainsi la perméabilité de la fissure.

La cicatrisation avec le milieu LNCa avec bactéries semble plus importante dans les zones proches du bord de la fissure que dans les zones au cœur. Le traitement semble pénétrer difficilement en profondeur et peut ensuite être autolimité lorsque la fissure est presque entièrement rebouchée à son ouverture. L'oxygène et les nutriments nécessaires pour l'activité bactérienne peuvent ne plus être disponibles au cœur de la fissure.

Le milieu LNCa avec *B. pseudofirmus* paraît constituer le système de réparation le plus prometteur pour refermer les fissures dans un matériau cimentaire. Ce travail se situe dans une logique de traitement vis à vis des échanges et de la perméabilité du matériau et non pas dans l'optique de regagner en résistance mécanique.

---

# CHAPITRE 8

## Conclusions et perspectives

La biocicatrisation, ou plus généralement l'utilisation de bactéries au sein des matériaux cimentaires sont les sujets d'un nombre croissant de travaux scientifiques. Cette approche écologique permet de conférer au matériau des capacités de réparation et de résistance inédites, et semble promise à de nombreuses applications futures. Cette thématique de recherche fait appel à des notions pluri-disciplinaires, mêlant la microbiologie et le génie civil. Le développement de solutions techniques pour des applications rapides est parfois privilégié au détriment de la maîtrise et de la compréhension en profondeur du phénomène de biocicatrisation.

Le présent projet de recherche a cherché à construire, étape par étape, une méthode de biocicatrisation en isolant chaque paramètre d'influence. La première partie de l'étude s'est ainsi portée sur l'influence de l'environnement et de différents composés chimiques sur le processus de cicatrisation du matériau cimentaire, sans l'interférence des bactéries. La deuxième partie de l'étude a porté sur l'élaboration de milieux de culture et à la sélection d'une souche bactérienne pour constituer une potentielle solution de biocicatrisation. Cette phase cherche à suivre et à identifier les interactions entre l'activité bactérienne et le milieu de culture. La troisième et dernière phase de l'étude a mis à contribution les résultats apportés par les deux phases précédentes. Elle a permis d'évaluer et de comprendre le processus de biocicatrisation dans un matériau cimentaire fissuré, mis en présence d'un des deux milieux de culture et de la souche bactérienne sélectionnée. Cette stratégie a mis en lumière des mécanismes et des éléments qui renforcent le socle des connaissances existantes et sur lesquels peuvent se construire des solutions de biocicatrisation plus efficaces.

## 8.1 Essais de cicatrisation abiotique de mortiers fissurés

Le phénomène de l'autocicatrisation naturelle dans les matériaux cimentaires fraîchement fissurés a été mis en évidence dans les conditions environnementales choisies : à 23°C et 100 % H.R. L'évaluation de ce phénomène s'inscrit dans la continuité d'autres études [7, 40] et les essais confirment les conclusions avancées par ces travaux :

- L'autocicatrisation naturelle est plus rapide durant le premier mois.
- Le taux apparent de cicatrisation est différent selon les ouvertures initiales des fissures.
- Les petites fissures ( $105 \pm 5 \mu\text{m}$ ) ont un taux apparent de cicatrisation d'environ 60 % à 6 mois.
- Les fissures larges ( $195 \pm 30 \mu\text{m}$ ) ont un taux apparent de cicatrisation d'environ 30 % à 6 mois.
- L'épaisseur apparente de la couche de produits de cicatrisation est sensiblement la même quelle que soit l'ouverture initiale de la fissure.
- Les fissures fines forment une couche de  $34 \mu\text{m}$  d'épaisseur apparente à 6 mois.
- Les fissures larges forment une couche de  $28 \mu\text{m}$  d'épaisseur à 6 mois.
- Les produits de l'autocicatrisation naturelle sont principalement constitués de cristaux de calcite et dans une moindre part d'ettringite.
- Dans le cas des petites fissures, les cristaux de calcite sont préférentiellement formés près de l'embouchure des fissures, l'ettringite au centre.

Si ces tendances ont déjà été mises en évidence concernant la problématique de l'autocicatrisation, les essais suivants contribuent à enrichir les connaissances actuelles du phénomène. L'évolution de l'ouverture des fissures a été suivie sur des fissures déjà autocicatrisées (carbonatées) durant un an et demi. L'influence de l'imprégnation de composés chimiques (lactate de calcium, gluconate de calcium et urée) a été également évaluée sur des fissures fraîches et carbonatées.

Deux principales informations ressortent de ces essais :

---



- Les fissures fraîches, larges, voient leur taux apparent de cicatrisation fortement augmenter avec l'imprégnation de lactate ou de gluconate de calcium (respectivement 70 % et 60 % comme taux apparent de cicatrisation).
- Les fissures carbonatées ont une faible évolution de leur ouverture, avec ou sans précurseur.

La principale contribution apportée par ces essais est d'avoir établie que la formation d'ettringite dans les fissures fraîches est le principal moteur de la cicatrisation avec le lactate et le gluconate de calcium. Ces deux composés permettent la formation d'ettringite en réagissant avec la matrice cimentaire et offrent des conditions pour la stabiliser. À la fin de la période d'essai, les observations au MEB montrent que l'ettringite est carbonatée, seuls des cristaux de calcite sont visibles après 11 mois sur la surface interne des fissures. Cependant, ce processus de carbonatation n'engendre aucunes modifications de l'ouvertures des fissures.

Avec la mise en évidence de ce phénomène, le processus de cicatrisation pour des fissures fraîches peut emprunter de nouvelles pistes. La formation d'ettringite, sur lequel repose la cicatrisation avec ces précurseurs, pourrait être améliorée en ajoutant une source de soufre et d'aluminium. L'ettringite est un produit expansif qui peut occuper un grand volume et constituer un produit de colmatage très performant. Il faut cependant tenir compte des problèmes de pathologie que peut engendrer la formation non contrôlée d'un tel produit expansif dans le matériau. La stabilité sur le long terme doit également être démontrée.

## 8.2 Essais de croissance bactérienne

Les essais de croissance, avec différents milieux de culture et différentes souches bactériennes, constituent l'étape indispensable à l'élaboration d'une solution de cicatrisation. Le système formé par le milieu de culture et la souche bactérienne doit répondre à de nombreuses contraintes :

- Offrir une activité bactérienne satisfaisante, (croissance optimale, consommation des nutriments et des précurseurs) ;
- Permettre aux bactéries de survivre au contact du matériau cimentaire ;
- Amener à la formation d'un précipité, la calcite, pouvant colmater les fissures.

Afin d'atteindre au mieux les exigences présentées, différentes concentrations, différents types de nutriment et différents précurseurs de précipitation ont été testés, ainsi que deux souches bactériennes.

Il est apparu, pour les différents paramètres évalués, les conclusions suivantes :

- Les deux souches bactériennes testées, *Bacillus pseudofirmus* et *Bacillus cohnii* supportent un pH allant jusqu'à 10,5 soit le pH d'un matériau cimentaire carbonaté.
  - La température de 30°C permet une croissance plus rapide qu'à 20°C, quelle que soit la souche testée.
  - La taille des deux populations bactériennes testées à la fin de la phase exponentielle est comparable à 20°C et à 30°C.
  - L'ajustement du pH à 9,3 par la solution tampon ( $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) permet une meilleure croissance bactérienne qu'avec un ajustement par une solution de NaOH, quelle que soit la souche testée.
  - La croissance des deux souches bactériennes testées est néanmoins satisfaisante avec un ajustement par une solution de NaOH.
  - Le milieu doit apporter suffisamment de nutriments pour obtenir une croissance bactérienne satisfaisante, comme le permet une concentration de 3 g/L de Nutrient Broth ou d'extrait de levure à 3 g/L.
  - La dégradation par les bactéries du gluconate de calcium entraîne une diminution du pH, alors que pour le lactate de calcium une augmentation du pH est observée.
-

- Le milieu Nutrient Broth en présence de gluconate de calcium constitue un milieu de croissance moins probant que celui renfermant de l'extrait de levure et du lactate de calcium.
- Une source d'azote supplémentaire n'est pas nécessaire en présence d'une concentration suffisante de nutriments (3 g/L).
- *B. pseudofirmus* est plus active en milieu basique avec précurseur que *B. cohnii*.
- La concentration en lactate de calcium peut être proche de la solubilité maximale tout en maintenant une croissance bactérienne optimale, elle a été fixée à 75 g/L.
- Une concentration de 0,2 mol/L en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , ajoutée dans le milieu à base d'extrait de levure et de lactate de calcium, permet de maintenir une croissance bactérienne active tout en apportant le maximum d'ions calcium.
- Les bactéries sont sous forme de petites sphères lors de l'ajout de 0,2 mol/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .
- Une phase de latence est observée dans le milieu avec 0,2 mol/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ensemencé avec une préculture dont les bactéries sont sous forme de bacilles.
- Cette phase de latence disparaît quand ce même milieu est ensemencé avec une préculture dont les bactéries sont sous forme de petites sphères.
- L'ajout de 0,05 mol/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  dans la préculture permet une croissance des bactéries sous forme de petites sphères.
- La dégradation du lactate par les bactéries génère des métabolites et notamment de l'acétate et du formiate.
- Le précipité, qui se forme dans les milieux avec précurseurs, est de la calcite.
- La formation de calcite semble être limitée par les ions carbonate et non les ions calcium.

L'ensemble de ces enseignements a permis de sélectionner deux milieux de culture et une souche bactérienne :

- LN75, composé de 3 g/L d'extrait de levure et de 75 g/L de lactate de calcium, ensemencé avec une préculture classique de *B. pseudofirmus*.
-

- LNCa, composé de 3 g/L d'extrait de levure, de 75 g/L de lactate de calcium et de 0,2 mol/L de nitrate de calcium,ensemencé avec une préculture de *B. pseudofirmus* contenant 0,05 mol/L de nitrate de calcium.

Ces deux systèmes présentent une bonne répétabilité et semblent suffisamment robustes pour une utilisation en contact du matériau cimentaire. La croissance bactérienne atteint plus de  $1.10^9$  bactéries par mL en quelques jours. La souche bactérienne *B. pseudofirmus* peut se développer dans un milieu alcalin, jusqu'à un pH de 10,5. Pour 250 mL de milieu, la quantité de précipité formé est de 2,5 g en moyenne, composé à plus de 80 % de carbonate de calcium sous forme de calcite.

Des perfectionnements à apporter au système sont encore possibles. Le réactif limitant la formation de carbonate de calcium semble être les ions carbonate. Ainsi, une piste d'améliorations possible est de chercher à faire produire plus de carbonates par les bactéries. Les ions carbonate peuvent provenir de la dégradation d'un composé organique ou de la respiration bactérienne. Il est ainsi possible d'augmenter la production d'ions carbonate en ajoutant un autre composé organique et en augmentant la concentration en nutriment.

## 8.3 Essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés

La phase finale du projet de recherche consiste à tester sur les fissures de mortier les deux systèmes de biocicatrisation proposés dans la phase précédente : LN75 et LNCa ensemencés avec *B. pseudofirmus*.

Les clés de compréhension apportées durant les phases précédentes sont mises à contribution pour mener cette dernière étape.

Il est choisi d'évaluer le processus de biocicatrisation sur des fissures déjà carbonatées. Plusieurs facteurs ont rendu la pré-carbonatation des fissures nécessaire. Les essais ont montré que, sur des fissures carbonatées, l'autocicatrisation et surtout les précurseurs ont une faible influence sur le processus de cicatrisation. La plus grande partie de la cicatrisation qui est constatée dans les essais est alors imputable à l'activité bactérienne. Néanmoins, des essais témoins avec les milieux de culture sans bactéries sont menés en parallèle pour s'assurer de leur faible impact sur la cicatrisation. Les essais de croissance ont montré que *B. pseudofirmus* ne peut se développer dans des milieux où le pH dépasse 10,5. Sur une surface de mortier fraîchement fissurée, le pH peut atteindre les 13,5. Afin de permettre une croissance bactérienne, la carbonatation des fissures est nécessaire. Sur une surface carbonatée, le pH est alors proche de 9. Le dernier facteur qui justifie la carbonatation des fissures est le fait que rarement, dans un ouvrage réel exposé aux intempéries, un traitement soit appliqué sur une fracture fraîche. Le temps qui s'écoule entre la fissuration, l'identification du dommage et l'administration du traitement est généralement suffisamment long pour qu'une carbonatation ait déjà touchée les fissures. Ainsi, les essais de biocicatrisation sur des fissures carbonatées simulent un cas réaliste.

Les résultats de cette phase d'essai de biocicatrisation ont mis en évidence que :

- L'effet des milieux seuls, sans bactéries, est faible sur le processus de cicatrisation.
  - L'effet de la cicatrisation est imputable à l'activité bactérienne.
  - Le milieu LNCa avec *B. pseudofirmus* permet une biocicatrisation presque complète, avec un taux apparent de cicatrisation de plus de 70 % sur les deux réplicats.
  - Un seul réplicat sur les deux offre une biocicatrisation importante (66 %) avec le milieu LN75 et avec la même souche *B. pseudofirmus*.
  - L'essai de biocicatrisation avec LNCa et *B. pseudofirmus* est bien répétable, contrairement à l'essai avec LN75 et avec la même souche bactérienne.
-

- L'analyse par DRX montre que la phase cristalline du produit de cicatrisation est composée essentiellement de calcite.
- Les observations à la loupe binoculaire et au microscope électronique à balayage montrent que le produit de cicatrisation est composé par de la calcite mêlée à un biofilm.
- Ces observations suggèrent que la formation de la calcite est favorisée par la présence du biofilm.
- Le traitement avec LNCa et *B. pseudofirmus* produit une épaisse couche de produits de cicatrisation sur les bords de la fissure, mais plus fine dans les zones au cœur.

Du fait de la plus grande efficacité du traitement bactérien avec LNCa par rapport à LN75, le nitrate de calcium semble conférer, directement ou indirectement, un avantage au système. La morphologie de bactéries sous la forme de petites sphères due à la présence de nitrate de calcium, pourrait permettre une meilleure résistance et adaptabilité des bactéries aux conditions internes de la fissure.

Lors des essais de croissance de *B. pseudofirmus*, le nitrate de calcium apparaissait pénalisant pour l'activité bactérienne, en causant une phase de latence, et sans permettre la formation de précipités supplémentaires. En revanche, il ressort que, dans les essais en contact avec le matériau cimentaire, sa présence concourt fortement à l'efficacité du système.

Malgré les nombreux éclairages qu'apportent ces essais, quelques zones d'ombres subsistent. La formation de la calcite et du biofilm nécessitent des investigations supplémentaires. Le mécanisme principal de la biocicatrisation semble résider dans les interactions entre ces deux éléments. Pour pouvoir perfectionner davantage la biocicatrisation, il est primordial de comprendre les processus de nucléation des cristaux de calcite à la surface des biofilms que les bactéries forment. Les conditions environnementales durant l'étude de biocicatrisation ont été fixées à 20°C et à 100 % d'humidité relative. Pourtant les changements de température et d'humidité ont un impact important sur toutes les composantes du système de biocicatrisation : sur les équilibres chimiques, sur l'activité bactérienne et sur le phénomène d'autocicatrisation naturelle. Exposer les éprouvettes de mortier à des conditions changeantes, des cycles de mouillage/séchage ou *in situ*, est une étape qui sera fondamentale pour parvenir à une technique de réparation effective sur les ouvrages réels. Dans le cadre d'une exposition en conditions *in situ*, une étude de la diversité de la population bactérienne capable de se développer dans les fissures pourrait être envisagée. Il serait alors possible d'isoler des souches indigènes ayant une bonne aptitude à la biocicatrisation.

---

Parallèlement, les possibles améliorations du système sont nombreuses. Les modifications proposées qui sont apparues dans les phases d'essais précédentes s'additionnent : la possibilité de renforcer la formation d'ettringite en ajoutant au milieu de culture du soufre et de l'aluminium. Il est également possible de précipiter plus de calcite, en ajoutant un précurseur de précipitation qui apporterait plus d'ions carbonate, ou en augmentant la concentration en nutriments.

Le mode d'application du traitement est aussi susceptible d'être perfectionné. Une injection du système sous pression, sur une période plus longue que les 24 h d'immersion testées, peuvent offrir une cicatrisation plus rapide et en profondeur des fissures. Une température de la solution d'injection plus élevée peut accélérer localement la cinétique de l'activité bactérienne, les cultures à 30°C montrant en effet une croissance plus rapide qu'à 20°C.

La biocicatrisation est une technique de réparation complexe qui demande encore des approfondissements. Néanmoins, son potentiel est prometteur en permettant des réparations durables par des mécanismes écologiques. L'application et l'exploitation de ce système mêlant le minéral et le vivant exige une connaissance approfondie des nombreux mécanismes qui le composent. Cette thèse apporte sa pierre à l'édifice en ayant adopté une démarche méthodique pour identifier l'influence spécifique de chaque composant du processus de biocicatrisation. L'intérêt et les progrès apportés dans ce domaine par la communauté scientifique amènent à penser que des applications pratiques sur des cas d'ouvrages réels pourront être mises en œuvre dans un avenir proche.





# ANNEXE A

## Notation cimentière

Oxydes	Notation cimentière
CaO	C
SiO <sub>2</sub>	S
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	A
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	F
SO <sub>3</sub>	$\overline{S}$
MgO ( $\leq 5.0$ %)	-

Tableau A.1 Notations cimentières



## ANNEXE B

# Validation du modèle de régression entre le débit d'air et l'ouverture de la fissure

Cette annexe expose le développement et la validation du modèle de régression qui tente d'expliquer la mesure de débit d'air en fonction de l'ouverture d'une fissure. Afin de proposer un modèle le plus fiable et robuste possible, les mesures obtenues durant les phases d'essais de cette thèse ont été ajoutées aux mesures initiales. Les éprouvettes présentant une géométrie de fissures irrégulières, au plan de fissuration oblique ou d'ouvertures inégales ont été écartées. Les 71 points de mesures ainsi retenus sont présentés dans le tableau B.1.

Les points de mesures sont concentrés en majorité autour de 3 valeurs :  $50 \mu\text{m}$ ,  $100 \mu\text{m}$  et  $200 \mu\text{m}$ . Il s'agit des trois catégories de fissures étudiées dans les travaux de M. Argouge [7] et dans cette thèse.

Ouverture mesurée au vidéomicroscope ( $\mu\text{m}$ )	Débit d'air mesuré (L/min)	Ouverture mesurée au vidéomicroscope ( $\mu\text{m}$ )	Débit d'air mesuré (L/min)
41	0,19	172	8,41
45	0,85	179	9,92
47	0,29	181	6,55
49	0,42	183	8,00
51	0,41	183	5,36
52	0,47	187	7,51
56	1,27	189	7,97
58	0,33	190	8,65
61	0,47	192	10,03
64	0,66	195	10,20
81	1,72	195	9,76
93	3,21	196	7,97
93	2,06	196	8,64
94	1,65	196	11,60
95	3,48	196	7,80
96	2,59	198	9,67
97	2,06	200	8,70
98	1,75	200	10,30
99	1,61	200	9,84
99	2,40	203	9,52
101	3,61	208	9,01
102	2,34	212	11,70
102	2,21	213	12,25
105	2,43	219	12,60
105	4,14	224	13,10
109	3,08	226	13,20
117	4,32	232	12,30
117	2,65	240	12,08
118	3,18	248	11,57
120	2,21	254	13,40
123	3,91	264	16,08
136	7,54	265	12,50
142	5,26	333	22,40
150	3,20	335	20,90
151	5,88	346	24,80
156	7,15		

Tableau B.1 Ouvertures initiales des fissures observées au vidéomicroscope et les mesures du débit d'air correspondantes

---

## B.1 Ajustement des données par des régressions non linéaires

Le modèle de régression choisi est une régression polynomiale passant par l'origine. Le débit d'un gaz en fonction de la largeur de la fissure est parfois exprimé dans la littérature par un polynôme de degrés 3 [79, 116]. Dans le cas présent, un tel modèle de régression ne paraît pas pertinent. La figure B.1 illustre l'écart entre une régression avec un polynôme de degrés 2 et une régression avec un polynôme de degrés 3 où les coefficients de détermination  $R^2$  sont, respectivement, de 0,952 et de 0,957. La différence entre les deux courbes de tendance est minime et les deux régressions semblent toutes deux aussi bien s'adapter aux données.

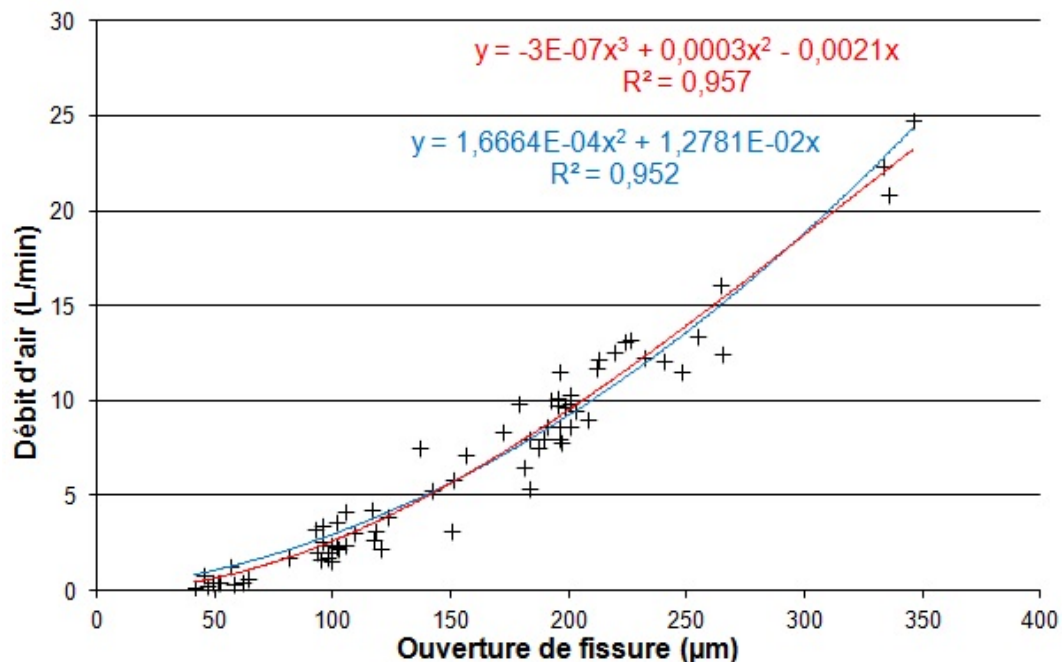


Figure B.1 Modèles de régression du débit d'air en fonction de l'ouverture des fissures par un polynôme de degrés 3 et un polynôme de degrés 2

Le tableau B.2 présente les valeurs des coefficients des deux polynômes de régression et leurs écarts-types obtenus avec le logiciel R. Les écarts-types des coefficients du polynôme de degrés 3 sont élevés, comparativement à leur valeur. Par ailleurs, le coefficient " a " n'est pas significativement différent de zéro. Le coefficient de degrés 3, " c ", est négatif, ce qui n'a pas de sens physique. Le débit deviendrait ainsi négatif pour des ouvertures de fissures suffisamment grandes. En revanche, les écarts-types des deux coefficients du polynôme de degrés 2 sont assez faibles et le logiciel R indique que ces deux coefficients sont significativement différents de zéro (risque inférieur à 0,00125%).

Le modèle de régression retenu est donc un polynôme de degrés 2 passant par l'origine. L'équation (B.1) montre la relation ainsi obtenue entre le débit d'air  $Q$  en L/min et l'ouverture de la fissure  $x$  en  $\mu\text{m}$  :

$$Q = 1,667 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 + 1,2751 \cdot 10^{-2} \cdot x \quad (\text{B.1})$$

Coefficients	$y = a.x + b.x^2$		$y = a.x + b.x^2 + c.x^3$	
	valeur	écart-type	valeur	écart-type
a	1,2751E-02	2,708E-03	-2,089E-03	6,236E-03
b	1,667E-04	1,190E-05	3,136E-04	1,629E-04
c	-	-	-3,277E-07	1,252E-07

Tableau B.2 Coefficients des deux polynômes de régression et leurs écarts-types

Le graphique présenté figure B.2 montre la nouvelle courbe de corrélation obtenue. La nouvelle équation régissant la relation entre le débit d'air et l'ouverture de la fissure est légèrement différente de l'ancienne équation présentée au chapitre 4 Matériels et méthodes. Néanmoins la différence est mineure malgré l'ajout et la suppression de certains points. L'estimation de l'ouverture des fissures diffère au maximum de 5  $\mu\text{m}$  dans le cas des fissures les plus larges (350  $\mu\text{m}$ ), soit une différence de 1,5 %. Pour les fissures les plus larges utilisées dans le cadre de cette thèse, d'une largeur d'ouverture de 250  $\mu\text{m}$ , la différence est de 3  $\mu\text{m}$ , soit 1,2% d'écart. Du fait du nombre important d'éprouvettes utilisées, l'estimation de l'ouverture des fissures par les mesures de débit d'air est assez robuste.

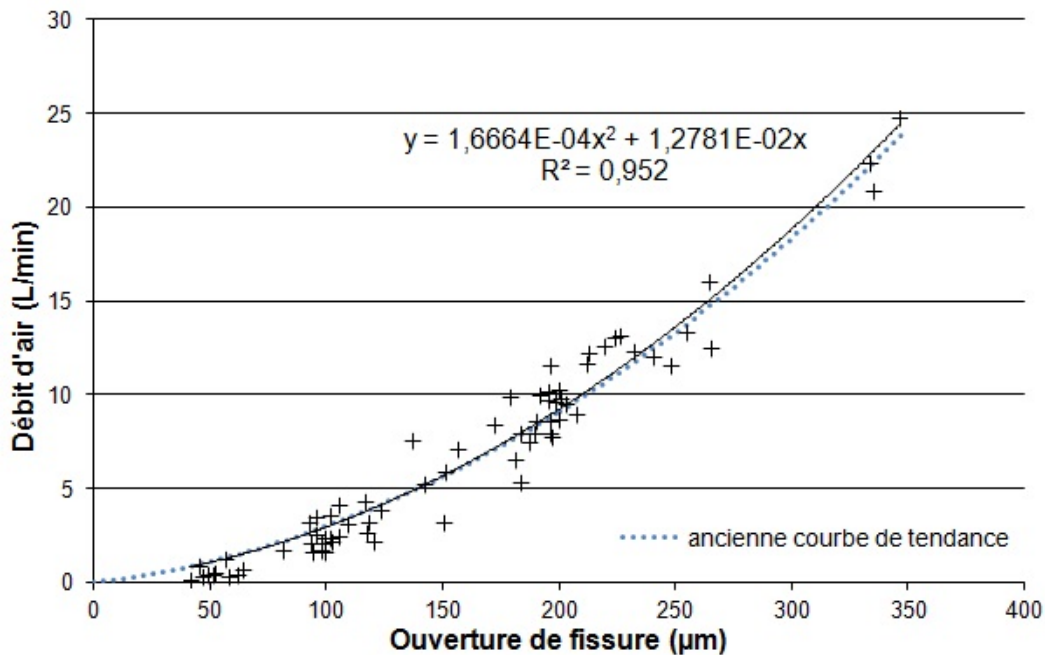


Figure B.2 Nouvelle courbe de corrélation entre le débit expérimental et l'ouverture initiale d'une fissure.

## B.2 Validation du modèle

La validation du modèle de régression passe par l'analyse des résidus. Les résidus, ou les "erreurs", sont les écarts entre les valeurs mesurées et celles prédites par le modèle. Dans le cas présent, les résidus " $e_i$ " sont définis par l'équation (B.2) suivante :

$$e_i = Q_i - (1,667 \cdot 10^{-4} \cdot x_i^2 + 1,2751 \cdot 10^{-2} \cdot x_i) \quad (\text{B.2})$$

Avec  $Q_i$  le débit d'air en L/min, mesuré sur l'éprouvette "i" ayant une ouverture de fissure  $x_i$  exprimée en  $\mu\text{m}$ .

La figure B.3 présente les résidus en fonction de l'ouverture de la fissure. Les points doivent être répartis "au hasard" de part et d'autre de 0.

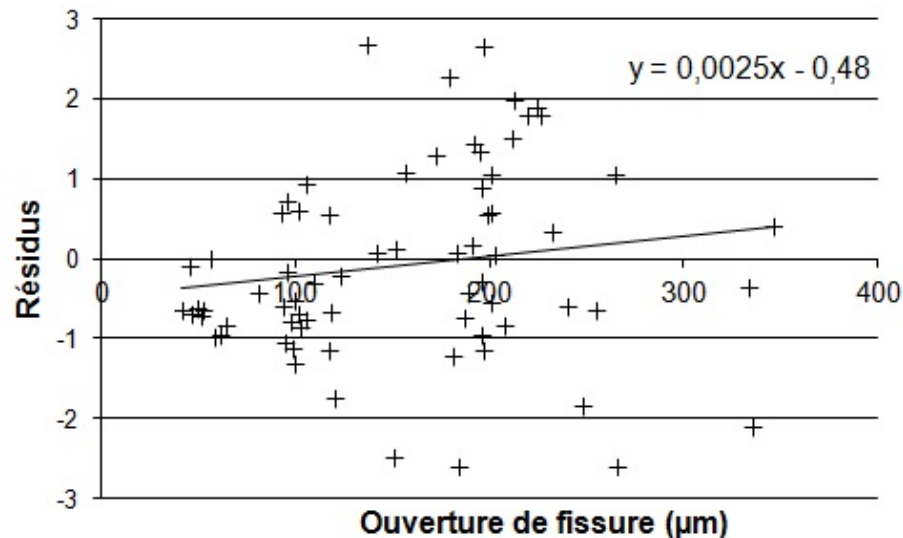


Figure B.3 Résidus en fonction de l'ouverture de la fissure

### B.2.1 Normalité des résidus

Dans le cas d'un modèle de régression correct, les résidus sont normalement distribués. C'est-à-dire que les écarts entre les valeurs prédites et les valeurs observées sont imputables aux erreurs aléatoires qui affectent le processus de mesure.

Afin de tester la normalité des résidus, un test de Shapiro-Wilk est effectué. Le risque d'erreur de première espèce  $\alpha$  est fixé à 5 %. "W", la statistique de Shapiro-Wilk donnée par le logiciel R est de 0,97122 et la p-value est de 0,10216. Ceci qui nous permet de décider que la condition de normalité est satisfaite. Pour le test de Shapiro-Wilk, le risque de seconde espèce  $\beta$  (le risque de rejeter à tort l'hypothèse de normalité) est limité lorsque l'effectif de l'échantillon est supérieur à 30 [38].

La moyenne des résidus est de  $-0,081616$ . Un test de Student indique que la différence de cette moyenne à  $0$  n'est pas significative. La p-value bidirectionnelle du test est de  $0,5653$ , bien supérieure au seuil de  $5\%$  fixé.

La droite de Henry présentée en figure B.4 est un outil graphique qui permet de visualiser la normalité des résidus et leur moyenne. Les résidus sont classés dans l'ordre croissant et les effectifs cumulés sont calculés. Les points tracés sont obtenus en faisant correspondre la valeur de chaque résidu à la valeur d'une variable aléatoire suivant une loi normale centrée réduite ayant la même fréquence cumulée. Si les résidus suivent parfaitement une loi normale, les points sont alignés sur une droite. La pente de cette droite est l'inverse de l'écart type et la droite coupe l'axe des abscisses en une valeur égale à la moyenne des résidus. Les points obtenus dans le cas présent s'alignent relativement bien selon une droite.

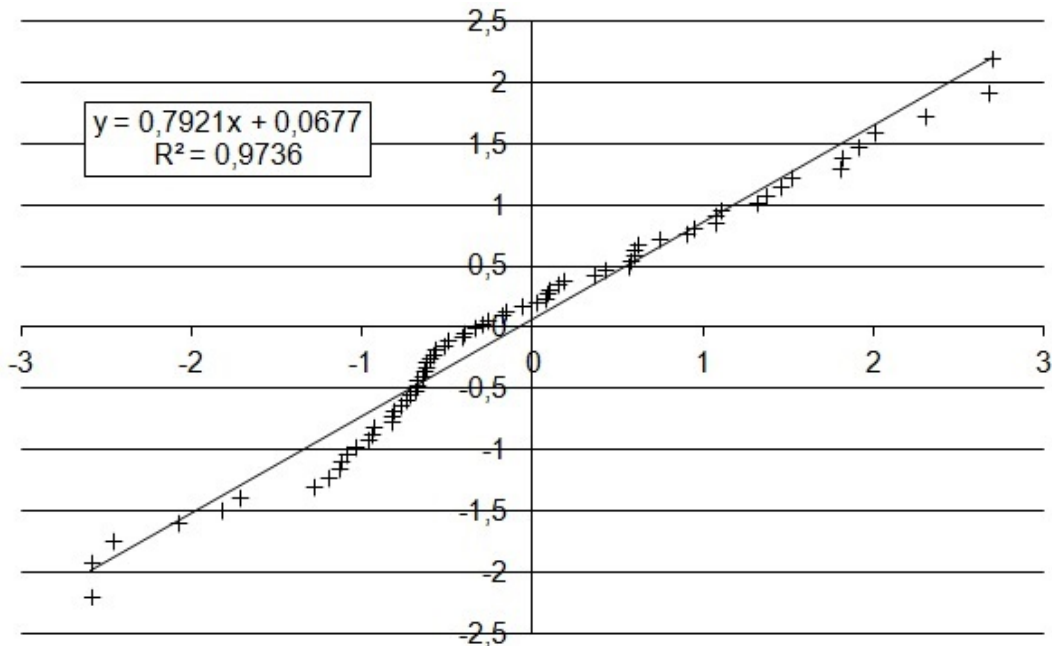


Figure B.4 Droite de Henry des résidus

## B.2.2 Homoscédasticité des résidus

Trois groupes sont créés. Ils regroupent les résidus des mesures effectuées sur des éprouvettes ayant une ouverture située autour des trois principales valeurs :  $50 \mu\text{m} \pm 10\%$ ,  $100 \mu\text{m} \pm 10\%$  et  $200 \mu\text{m} \pm 10\%$ . 41 éprouvettes ont été ainsi sélectionnées. Il est alors possible de vérifier l'hypothèse d'homoscédasticité de ces trois différents groupes, c'est-à-dire l'égalité de leur variances. Le tableau B.3 présente l'analyse de l'homoscédasticité des résidus effectuée en utilisant le test de Bartlett. Dans le groupe 50 (regroupant les éprouvettes ayant une fissure d'environ  $50 \mu\text{m}$  d'ouverture), les résidus ne sont pas normalement distribués selon le test de Shapiro-Wilk ( $\alpha = 5\%$ ). Ceci est dû au faible nombre d'éprouvettes. L'hypothèse d'homoscédasticité est donc vérifiée seulement sur les groupes



100 et 200 regroupant respectivement les éprouvettes de fissures d'environ 100  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$  d'ouverture.

Tests statistiques sur les 3 groupes		50	100	200
	Effectif	5	15	22
<b>Test de normalité</b>	Statistique W (Shapiro-Wilk)	0,6641	0,8928	0,9839
	p-value (Shapiro-Wilk)	0,0039	0,0740	0,9654
	Normalité ( $\alpha=5\%$ )	non	oui	oui
<b>Test de nullité des moyennes</b>	Moyenne	-0,5327	-0,3365	0,2623
	Test t avec $\alpha=5\%$	-	Validé	Validé
<b>Test d'homoscédasticité entre les groupes 100 et 200</b>	Variance corrigée	0,0688	0,5282	1,5449
	Statistique B (Bartlett)	-	4,550	
	Valeur critique à 5%	-	3,841	
	Variances homogènes	-	non	

Tableau B.3 Tableau d'analyse statistique des résidus pour les trois groupes constitués

Le test de Bartlett montre que les variances ne sont pas égales (avec  $\alpha = 5\%$ ). Ce constat confirme les observations de la figure B.3. Les résidus semblent plus "dispersés" pour les éprouvettes ayant une fissure autour de 200  $\mu\text{m}$  d'ouverture, comparativement aux résidus des éprouvettes ayant une fissure autour de 100  $\mu\text{m}$  d'ouverture.

Cette différence dans les variances peut s'expliquer en partie par le fait que les éprouvettes les plus larges sont plus soumises à des imperfections géométriques que les fissures plus fines. Le principe de fissuration radiale peut engendrer facilement un problème dans le parallélisme des surfaces internes des fissures. Les parois de la fissure sont souvent plus rapprochées dans la partie près du centre de l'éprouvette que dans la partie de la fissure près des bords extérieurs. Malgré une sélection des éprouvettes, cette source d'erreur demeure et est d'autant plus marquée que la fissure est large.

Néanmoins, compte tenu de la normalité des résidus, du coefficient de détermination de 0,952 et de la significativité des coefficients du polynôme de régression, la régression peut être validée.



# ANNEXE C

## Évolution théorique lors d'une croissance bactérienne

L'évolution d'une croissance bactérienne suit théoriquement le schéma présenté en figure C.1.

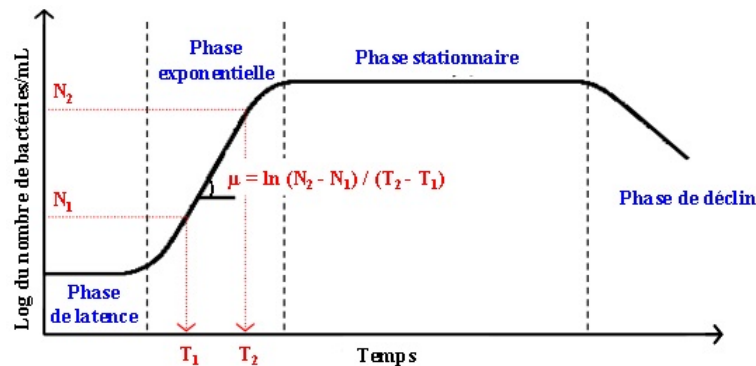


Figure C.1 Schéma de l'évolution théorique de la croissance bactérienne. [Modifié de Encyclopédie Universalis, 1977]

La croissance bactérienne se caractérise par quatre phases successives :

- Premièrement, une phase de latence ;
- Deuxièmement, une phase exponentielle ;
- Troisièmement, une phase stationnaire ;
- Quatrièmement, une phase de déclin.

La phase de latence est la période correspondant à l'adaptation des microorganismes aux conditions du milieu dans lequel ils se trouvent. Durant cette phase, il n'y a pas de reproduction cellulaire. Il est toutefois possible que la phase de latence soit inexistante pour certains milieux très favorables aux souches étudiées.

La phase exponentielle correspond à la phase de croissance où le nombre de bactéries augmente de façon exponentielle en fonction du temps.

La phase stationnaire correspond à la phase pendant laquelle la concentration bactérienne atteint son maximum. La croissance globale s'arrête, même si les cellules conservent une activité métabolique. Les bactéries épuisent peu à peu leurs réserves intracellulaires et leur mortalité vient équilibrer leur multiplication.

La phase de déclin correspond à la chute progressive de la masse cellulaire par autodes-truction ; le taux de mortalité devenant supérieur au taux de reproduction.



# ANNEXE D

## Méthodes de stérilisation

La principale méthode de stérilisation est l'autoclavage qui consiste à amener le matériel à 120°C pendant 15 à 20 minutes dans un récipient hermétique sous pression. Les équipements ne supportant pas les conditions de l'autoclave sont stérilisés par un rinçage à l'alcool.

Pour éviter la contamination, toutes les manipulations sont faites sous atmosphère stérile : sous hotte à flux laminaire. Les flacons sont refermés avant de les exposer au milieu environnant.

La stérilisation des milieux de culture peut se faire selon deux méthodes : autoclavage ou filtration à 0,2  $\mu\text{m}$ . La filtration est plus longue, elle n'est utilisée que lorsque l'autoclavage engendre une altération du milieu de culture comme la formation de précipités dans les solutions.

Certains milieux sont obtenus à partir de deux solutions autoclavées séparément, puis mélangées de façon à obtenir le milieu final aux concentrations souhaitées. L'interaction entre les constituants chimiques lors de l'autoclavage peut être ainsi évitée.

De la même façon, pour éviter de filtrer l'intégralité d'une solution, le milieu de culture peut être obtenu en mélangeant une solution autoclavée et une solution filtrée.



# ANNEXE E

## Utilisation d'un biocide

Connaître l'effet sur la cicatrisation des milieux seuls, sans bactéries, est capital pour pouvoir estimer le rôle spécifique des bactéries. Dans certains essais, maintenir une atmosphère stérile et se prémunir de toute contamination des milieux par les microorganismes environnants est impossible. Un biocide, le bronopol, 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol, est donc ajouté à certains milieux de culture pour empêcher tout développement bactérien. La figure E.1 montre sa formule topologique du bronopol.

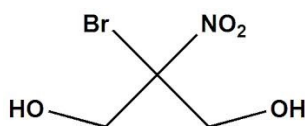


Figure E.1 Formule topologique du 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol)

Le bronopol a été choisi, car il permet d'éviter le développement d'un large spectre de microorganismes : bactéries Gram-positives ou Gram-négatives, champignons, levures. De plus, il n'est pas toxique pour les mammifères à des concentrations inférieures à 0,1 % comme en témoignent des études sur les cosmétiques [12]. Le choix du biocide devait préférentiellement ne pas contenir de chlore ; les ions chlorure étant responsables de nombreux cas de corrosion d'armatures dans les bétons.

Le mécanisme du bronopol en tant que biocide réside dans sa capacité à oxyder les groupes thiols en disulfures [107]. Les thiols sont des composants essentiels pour les bactéries notamment pour leurs activités d'oxydo-réduction, pour le maintien de l'homéostasie ou pour la production d'enzyme. Dans un milieu avec dioxygène, le bronopol est un catalyseur de la réaction d'oxydation des thiols, ces composés ne sont donc pas consommés. Dans les milieux sans oxygène, la réaction d'oxydation produit des composés, qui peuvent induire une consommation du bronopol.

La concentration de 0,1 g/L a été retenue, car elle semble suffisante pour empêcher le développement de la plupart des microorganismes [103]. Cette concentration est largement supérieure à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de nombreux microorganismes ; par exemple la CMI pour *Escherichia coli* est de 13 mg/L [107].





# ANNEXE F

## Milieux de culture

### F.1 Milieu de culture, phase 1

Le tableau F.1 présente la composition du milieu recommandé pour la culture des souches bactériennes retenues.

Milieux	Tampon (recommandé)	NaOH
NB (g)	8	8
Eau milli Q (L)	1	1
Solution tampon (ml)	50	-
NaOH à 1 mol/L (ml)	-	15
pH	9,6	
Stérilisation	autoclavage	

Tableau F.1 Composition du milieu de la phase 1 à pH recommandé

La composition de la solution tampon utilisée tout au long des essais est composée de 0,5 mol/L de  $\text{NaHCO}_3$  et de 0,5 mol/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La solution est stérilisée à l'autoclave.

Le tableau F.2 présente la composition des milieux de culture ajusté à différent pH. Le milieu à pH 9,62 n'est évalué qu'avec *Bacillus pseudofirmus* ; le milieu à pH 9,5 n'est évalué qu'avec *Bacillus cohnii*. Tous les autres milieux sont communs au deux souches.

Milieux	Volume (mL)	NB (g/L)	Solution tampon (mL)	NaOH à 2 mol/L (mL)	pH	Stérilisation
<b>pH 7,5</b>	500	8	1,450	-	7,50	Autoclavage
<b>pH 8</b>	200	8	1,300	-	8,00	Filtration
<b>pH 9,5</b>	500	8	27,000	-	9,44	Autoclavage
<b>pH 9,6</b>	1000	8	40,000	1	9,62	Autoclavage
<b>pH 10,5</b>	1000	8	40,000	12	10,44	Autoclavage
<b>pH 11,5</b>	1000	8	30,000	21	11,69	Autoclavage

Tableau F.2 Composition des milieux à différents pH

## F.2 Milieux de culture, Phase 2

Milieu	NB g/L	Extrait de levure (g/L)	Lactate de Ca (g/L)	Gluconate de Ca (g/L)	NH <sub>4</sub> Cl g/L	pH
M1	-	0.1	9.73	-	0.2	7.5
M2	-	0.1	-	10	0.2	6.7
M3	3	-	9.73	-	0.2	6.8
M4	3	-	-	10	0.2	6.7
M5	-	-	9.73	-	0.2	6.8
M6	-	-	-	10	0.2	6.8
M7	-	0.1	9.73	-	-	6.7
M8	-	0.1	-	10	-	6.7
M9	-	3	9.73	-	0.2	5.6
M10	-	3	-	10	0.2	5.8
M11	-	3	9.73	-	-	5.8
M12	-	3	-	10	-	5.6
M15	-	3	-	-	-	6.7
M16	3	-	9.73	-	-	6.6
M17	3	-	-	10	-	6.7

Tableau F.3 Composition des milieux avec précurseurs : phase 2

L'autoclavage engendrant la formation d'un précipité, les milieux M3, M4, M16 et M17 avec une concentration de 3 g/L de milieu NB sont filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$ . L'autoclavage est la méthode de stérilisation adoptée pour tous les autres milieux.

### F.3 Milieux de culture, Phase 3

#### F.3.1 Milieux de culture avec lactate de calcium et ajout de calcium à faible concentration, Phase 3

Milieux	LN	LT	LS
Extrait de levure	3 g/L	3 g/L	3 g/L
Lactate de calcium	9,73	9,73	9,73
NaOH	-	-	oui
Tampon	-	oui	-
pH	6,504	8,188	9,338

Tableau F.4 Composition des milieux avec précurseurs (concentrations faibles) : phase 3

La plupart des milieux sont stérilisés par autoclavage. Seul le LN79 est stérilisé par filtration.

Les pH sont ajustés dans certains milieux par les solutions tampons (milieux LT) ou par la soude (milieux LS et CaCl<sub>2</sub>S). Les autres milieux n'ont pas leur pH ajusté (LN, CaCl<sub>2</sub>N et LN79).

Le volume de solution tampon ou de soude ajouté n'est pas précisé ici, ces solutions sont versées progressivement dans les milieux pour obtenir les pH souhaités. Ce volume versé est pris en compte pour le calcul de la concentration et pour le volume final des milieux.

### F.4 Milieux de culture, Phase 4

#### F.4.1 Milieux de culture à différentes concentrations en nitrate de calcium, Phase 4

Milieux	LNCa-2	LNCa-1	LNCa-0,5	LNCa-0,2
Extrait de levure (g/L)	3,00	3,00	3,00	3,00
Lactate de calcium (g/L)	75,00	75,00	75,00	75,00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	472,30 g/L 2 mol/L	236,15 g/L 1 mol/L	118,08 g/L 0,5 mol/L	47,23 g/L 0,2 mol/L

Tableau F.5 Composition des milieux avec deux précurseurs : lactate de calcium et nitrate de calcium

Les milieux LNCa-2, LNCa-1, LNCa-0,5 et LNCa-0,2 sont stérilisés par filtration.

**F.4.2 Milieux de culture sélectionnés, Phase 4**

Milieux	LN75	LNCa
Extrait de levure (g/L)	3	3
Lactate de calcium (g/L)	75	75
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	47,23 g/L 0,2 mol/L

Tableau F.6 Composition finale des milieux avec précurseurs

Les milieux LN75 et LNCa(NO<sub>3</sub>)-0,2 sont les mêmes que ceux utilisés dans les phases antérieures. Dans un souci de simplification le milieu LNCa(NO<sub>3</sub>)-0,2 est rebaptisé LNCa. Ils sont stérilisés par filtration.



## ANNEXE G

### Système d'humidification des mortiers, conditions stériles

Le système d'humidification des mortiers est décrit dans la figure G.1.

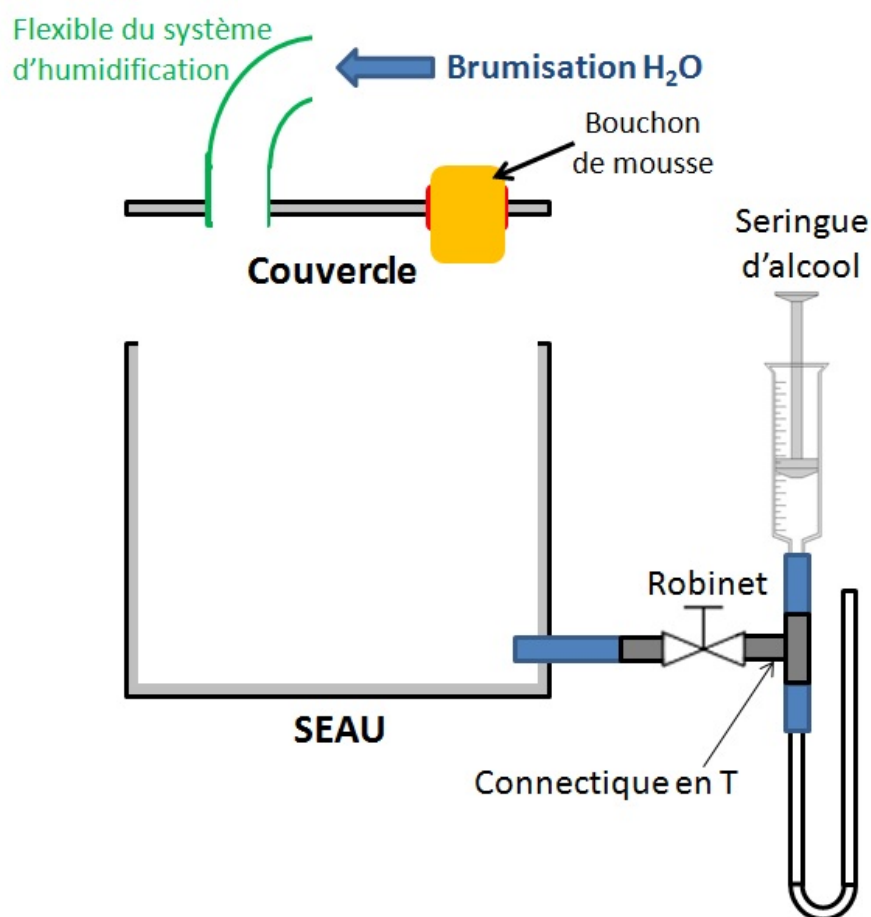


Figure G.1 Système d'humidification des mortiers

Le seau, le couvercle, le système d'humidification et les tubes d'évacuation de l'eau sont désinfectés à l'alcool sous la hotte à flux laminaire. Un bouchon de mousse placé sur le couvercle permet à l'air de sortir du seau tout en empêchant une pénétration des bactéries extérieures. La sortie de l'air permet une circulation du flux d'humidification à travers le flexible, jusque dans le seau. L'eau accumulée au cours du temps est évacuée par le tube fixé en partie basse du seau. Le siphon avec alcool permet de maintenir le système stérile. Après avoir évacué l'eau, la seringue d'alcool est pressée pour remettre l'alcool dans le siphon.





# ANNEXE H

## Milieux d'immersion pour les essais de biocicatrisation

Date	Type	Milieu	Lactate (g/L)		Calcium (g/L)		Bactéries totales (cellule/mL)
			avant immersion	après immersion	avant immersion	après immersion	
Immersion initiale	<i>B. pseudofirmus</i>	LN75-B	42,6	37,4			3,76E+10
			42,6	38,7			3,76E+10
		LNCa-B	45,4	52,0			7,05E+09
	45,4		54,6			7,05E+09	
	Témoin	LN75-S	81,1	60,4			-
			81,1	56,9			-
LNCa-S		79,8	57,0			-	
	79,8	59,2			-		
Immersion à 1 mois	<i>B. pseudofirmus</i>	LN75-B	50,4	37,4	8,5	8,7	2,40E+09
			50,4	38,7	8,5	8,9	2,40E+09
		LNCa-B	69,0	52,0	19,3	19,8	1,74E+09
	69,0		54,6	19,3	19,4	1,74E+09	
	Témoin	LN75-S	49,5	60,4	8,1	8,4	-
			49,5	56,9	8,1	8,5	-
LNCa-S		57,6	57,0	17,3	17,8	-	
	57,6	59,2	17,3	18,6	-		
Immersion à 2 mois	<i>B. pseudofirmus</i>	LN75-B	49,9	52,7	9,3	9,2	4,07E+09
			49,9	56,0	9,3	9,5	4,07E+09
		LNCa-B	54,6	66,7	16,5	21,0	3,77E+09
	54,6		65,3	16,5	20,2	3,77E+09	
	Témoin	LN75-S	48,0	52,2	8,5	8,9	-
			48,0	55,6	8,5	9,8	-
LNCa-S		55,1	58,4	16,2	17,7	-	
	55,1	60,4	16,2	18,8	-		
Immersion à 3 mois	<i>B. pseudofirmus</i>	LN75-B	52,0	55,8	11,3	8,8	5,18E+09
			52,0	53,3	11,3	8,7	5,18E+09
		LNCa-B	38,0	38,8	17,7	18,4	7,96E+09
	38,0		41,3	17,7	19,3	7,96E+09	
	Témoin	LN75-S	57,7	59,7	9,5	10,1	-
			57,7	61,4	9,5	9,2	-
LNCa-S		41,3	44,3	15,1	16,3	-	
	41,3	44,2	15,1	16,3	-		

Tableau H.1 Composition des milieux d'immersion pour les essais de biocicatrisation



# LISTE DES RÉFÉRENCES

- [1] Achal, V., Mukerjee, A. et Reddy, M. S. (2013). Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. *Construction and Building Materials*, volume 48, numéro 0, p. 1 – 5.
- [2] Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C. et Reddy, M. S. (2009). Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, volume 36, p. 433–438.
- [3] Achal, V., Pan, X. et Özyurt, N. (2011). Improved strength and durability of fly ash-amended concrete by microbial calcite precipitation. *Ecological Engineering*, volume 37, p. 554–559.
- [4] Ahn, T.-H. et Kishi, T. (2010). Crack self-healing behavior of cementitious composites incorporating various mineral admixtures. *Journal of Advanced Concrete Technology*, volume 8, numéro 2, p. 171–186.
- [5] Aiko Shirakawa, M., Kaori Kaminishikawahara, K., Moacyr John, V., Kahn, H. et Massao Futai, M. (2011). Sand bioconsolidation through the precipitation of calcium carbonate by two ureolytic bacteria. *Materials Letters*, volume 65, p. 1730–1733.
- [6] Andersson, K., Allard, B., Bengtsson, M. et Magnusson, B. (1989). Chemical composition of cement pore solutions. *Cement and Concrete Research*, volume 19, numéro 3, p. 327 – 332.
- [7] Argouges, M. (2010). *Etude des mécanismes et de la cinétique de l'autocicatrisation dans des mortiers cimentaires fissurés*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.
- [8] Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R. et Bang, S. S. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, volume 93, p. 171–181.
- [9] Bang, S. S., Galinat, J. K. et Ramakrishnan, V. (2001). Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and Microbial Technology*, volume 28, p. 404–409.
- [10] Biswas, M., Majumdar, S., Chowdhury, T., Chattopadhyay, B., Mandal, S., Halder, U. et Yamasaki, S. (2010). Bioremediase a unique protein from a novel bacterium *bkh1*, ushering a new hope in concrete technology. *Enzyme and Microbial Technology*, volume 46, p. 581–587.
- [11] Braissant, O., Decho, A. W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K. M. et Visscher, P. T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria : Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*, volume 5, p. 401–411.

- 
- [12] Brandt, K. (1984). *Addendum to the final Report on the Safety Assessment of 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol* (Rapport technique). Journal of the american college of toxicology.
- [13] Cailleux, E. et Pollet, V. (2009). Investigations on the development of self-healing properties in protective coatings for concrete and repair mortars. Dans *Proceedings of the second international conference on self-healing materials*. p. 120.
- [14] Camilleri, J. (2011). Characterization of modified calcium-silicate cements exposed to acidic environment. *Materials Characterization*, volume 62, numéro 1, p. 70 – 75.
- [15] Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. et Perthuisot, J.-P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, volume 126, p. 9–23.
- [16] Castanier, S., Levrel, G. et Loubière, J.-F. (1995). Nouvelle compositions pour mortier biologique, procédé de recouvrement d'une surface ou de comblement d'une cavité à l'aide des compositions.
- [17] Chahal, N. et Siddique, R. (2013). Permeation properties of concrete made with fly ash and silica fume : Influence of ureolytic bacteria. *Construction and Building Materials*, volume 49, numéro 0, p. 161 – 174.
- [18] Chattopadhyay, B., Biwas, M., Ghosh, S. et Mandal, S. (2008). Microbial activity on microstructures of concrete. Dans *1st International Conference on Microstructure Related Durability of Cementitious Composites*.
- [19] Chunxiang, Q., Jianyun, W., Ruixing, W. et Liang, C. (2009). Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of  $\text{CaCO}_3$  by *Bacillus pasteurii*. *Materials Science and Engineering*, volume 29, p. 1273–1280.
- [20] Clear, C. (1985). Effects of autogenous healing upon the leakage of water through cracks in concrete. *Technical Report - Cement and Concrete Association*, volume 559, p. 1–31.
- [21] Colleparidi, M., Monosi, S., Moriconi, G. et Pauri, M. (1984). Influence of gluconate, lignosulfonate or glucose on the  $\text{C}_3\text{A}$  hydration in the presence of gypsum with or without lime. *Cement and Concrete Research*, volume 14, numéro 1, p. 105 – 112.
- [22] Şahmaran, M., Keskin, S. B., Ozerkan, G. et Yaman, I. O. (2008). Self-healing of mechanically-loaded self consolidating concretes with high volumes of fly ash. *Cement and Concrete Composites*, volume 30, p. 872–879.
- [23] Day, J. L., Ramakrishnan, V. et Bang, S. S. (2003). Microbiologically induced sealant for concrete crack remediation. Dans *Proceedings of the 16th Engineering Mechanics Conference, Seattle, WA*.
- [24] De Belie, N. et De Muynck, W. (2009). Crack repair in concrete using biodeposition. *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting*, volume 2, p. 777–781.
-

- 
- [25] De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N. et De Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, volume 22, p. 875–885.
- [26] De Muynck, W., De Belie, N. et Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials : A review. *Ecological Engineering*, volume 36, p. 118–136.
- [27] De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. et Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research*, volume 38, p. 1005–1014.
- [28] De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N. et Willy, V. (2010). Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecological Engineering*, volume 36, p. 99–111.
- [29] de Rooij, M., Van Tittelboom, K., De Belie, N. et Schlangen, E. (2013). *Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials*. Springer Dordrecht Heideklberg.
- [30] Decho, A. W. (2010). Overview of biopolymer-induced mineralization : What goes on in biofilms? *Ecological Engineering*, volume 36, p. 137–144.
- [31] DeJong, J. T., Fritzges, M. B. et Nüsslein, K. (2006). Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering* © ASCE, volume 132, p. 1381–1392.
- [32] Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N. et Verstraete, W. (2006). Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by bacillus species. *Biodegradation*, volume 17, p. 357–367.
- [33] Distler, W. et Kröncke, A. (1981). The lactate metabolism of the oral bacterium veillonella from human saliva. *Archives of Oral Biology*, volume 26, numéro 8, p. 657 – 661.
- [34] Dupraz, S., Ménez, B., Gouze, P., Leprovost, R., Bénézech, P., Pokrovsky, O. S. et Guyot, F. (2009). Experimental approach of  $CO_2$  biomineralization in deep saline aquifers. *Chemical Geology*, volume 265, p. 54–62.
- [35] Edvardsen, C. (1999). Water penetrability and autogenous healing of separation cracks in concrete. *ACI Materials Journal*, volume 96-M56, p. 448–454.
- [36] Elmoaty, A. (2011). Self-healing of polymer modified concrete. *Alexandria Engineering Journal*, volume 50, p. 171–178.
- [37] Ercole, C., Cacchio, P., Botta, A. L., Centi, V. et Lepidi, A. (2007). Bacterially induced mineralization of calcium carbonate : The role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy Microanalysis*, volume 13, p. 42–50.
- [38] Ferrigno, S., Muller-Gueudin, A., Marx, D., Bertrand, F. et Maumy-Bertrand, M. (2013). *Mathématiques pour les sciences de l'ingénieur : 120 fiches de cours, 460*
-

- exercices résolus, exemples d'applications et bonus web*. Tout le cours en fiches, Dunod.
- [39] Ferris, F. G., Phoenix, V., Fujita, Y. et Smith, R. W. (2003). Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20°C in artificial groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, volume 67, p. 1701–1722.
- [40] Gagné, R. et Argouges, M. (2012). A study of the natural self-healing of mortars using air-flow measurements. *Materials and Structures*, volume 45, numéro 11, p. 1625–1638.
- [41] Ghosh, P., Mandal, S., Chattopadhyay, B. et Pal, S. (2005). Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cement and Concrete Research*, volume 35, p. 1980–1983.
- [42] Gollapudi, U., Knutson, C., Bang, S. et Islam, M. (1995). A new method for controlling leaching through permeable channels. *Chemosphere*, volume 30, numéro 4, p. 695 – 705.
- [43] Grabiec, A. M., Klama, J., Zawal, D. et Krupa, D. (2012). Modification of recycled concrete aggregate by calcium carbonate biodeposition. *Construction and Building Materials*, volume 34, p. 145–150.
- [44] Granger, S., Loukili, A., Pijaudier-Cabot, G. et Chanvillard, G. (2007). Experimental characterization of the self-healing of cracks in an ultra high performance cementitious material : Mechanical tests and acoustic emission analysis. *Cement and Concrete Research*, volume 37, p. 519–527.
- [45] Hammes, F. et Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Environmental Science & Bio/Technology*, volume 1, p. 3–7.
- [46] Harkes, M. P., van Paassen, L. A., Booster, J. L., Whiffin, V. S. et van Loosdrecht, M. C. (2010). Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, volume 36, numéro 2, p. 112 – 117.
- [47] Hearn, N. (1998). Self-sealing, autogenous healing and continued hydration : What is the difference ? *Materials and Structures*, volume 31, p. 563–567.
- [48] Hilloulin, B., Grondin, F., Matallah, M. et Loukili, A. (2013). Numerical modelling of autogenous healing and recovery of mechanical properties in ultra-high performance concrete. Dans *Fourth International Conference on Self Healing Materials*.
- [49] Homma, D., Mihashi, H. et Nishiwaki, T. (2009). Self-healing capability of fibre reinforced cementitious composites. *Journal of Advanced Concrete Technology*, volume 7, numéro 2, p. 217–228.
- [50] Hoshino, E., Karino, H. et Yamada, T. (1981). Lactate metabolism by human dental plaque and veillonella under aerobic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, volume 26, numéro 1, p. 17 – 22.
-

- 
- [51] Hosoda, A., Higushi, T., Eguchi, M., Yoshida, H. et Aoki, H. (2012). Self healing of longitudinal cracks in utility concrete pole. *Journal of Advanced Concrete Technology*, volume 10, p. 278–284.
- [52] Huang, H. et Ye, G. (2012). Simulation of self-healing by further hydration in cementitious materials. *Cement and Concrete Composites*, volume 34, numéro 4, p. 460 – 467.
- [53] Huang, H. et Ye, G. (2013). Possibility of self-healing by using capsules and vascular system to provide water in cementitious materials. Dans *Fourth International Conference on Self Healing Materials*.
- [54] Huang, H., Ye, G. et Damidot, D. (2013). Characterization and quantification of self-healing behaviors of microcracks due to further hydration in cement paste. *Cement and Concrete Research*, volume 52, numéro 0, p. 71 – 81.
- [55] Ismail, M. (2006). *Etude des transferts et de leurs interactions avec la cicatrisation dans les fissures pour prolonger la durée de service des infrastructures (ponts, centrales nucléaires)*. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- [56] Jacobsen, S., Marchand, J. et Boisvert, L. (1996). Effect of cracking and healing on chloride transport in opc concrete. *Cement and Concrete Research*, volume 26, p. 869–881.
- [57] Jacobsen, S., Marchand, J. et Gérard, B. (1998). Concrete crack i : Durability and self-healing. *Proceedings of Concrete Under Severe Condition 2 Environment and Loading*, volume 1, p. 217–231.
- [58] Jacobsen, S., Marchand, J. et Hornain, H. (1995). S.e.m. observations of the microstructure of frost deteriorated and self-healed concrete. *Cement and Concrete Research*, volume 25, p. 1781–1790.
- [59] Jacobsen, S. et Sellevold, E. J. (1995). Self healing of high strength concrete after deterioration by freeze-thaw. *Concrete and cement Research*, volume 26, numéro 1, p. 55–62.
- [60] Jefferson, A., Joseph, C., Lark, R., Isaacs, B., Dunn, S. et Weager, B. (2010). A new system for crack closure of cementitious materials using shrinkable polymers. *Cement and Concrete Research*, volume 40, numéro 5, p. 795 – 801.
- [61] Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar Larrubia, G., Rodriguez-Gallego, M. et González-Muñoz, M. T. (2008). Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *International Biodeterioration & Biodegradation*, volume 62, p. 352–363.
- [62] Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar, G., Carrillo-Rosúa, F., Rodriguez-Gallego, M. et Gonzalez-Muñoz, M. (2007). Consolidation of degraded ornamental
-

- porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*, volume 68, p. 1929–1936.
- [63] Jonkers, H. M., Palin, D., Flink, P. et Thijssen, A. (2013). Microbially mediated carbonation of marine alkaline minerals : potential for concrete crack healing. Dans *Fourth International Conference on Self Healing Materials*.
- [64] Jonkers, H. M. et Schlangen, E. (2008). Properties and micro-structural analysis of organic compound-enriched self-healing concrete. Dans *1st International Conference on Microstructure Related Durability of Cementitious Composites 13-15 October, Nanjing, China*.
- [65] Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O. et Schlangen, E. . (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, volume 36, p. 230–235.
- [66] Justnes, H. (2010). Calcium nitrate as a multifunctional concrete admixture. *Concrete Magazine*, volume 44, numéro 1, p. 34.
- [67] Kan, L.-l. et Shi, H.-s. (2012). Investigation of self-healing behavior of engineered cementitious composites (ecc) materials. *Construction and Building Materials*, volume 29, p. 348–356.
- [68] Kawaguchi, T. et Decho, A. (2002). A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (eps) in influencing *caco*<sub>3</sub>. *Journal of Crystal Growth*, volume 240, p. 230–235.
- [69] Kim, H., Park, S., Han, J. et Lee, H. (2013). Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete. *Construction and Building Materials*, volume 38, p. 1073–1082.
- [70] Kishi, T., Ahn, T.-H., Hosoda, A., Suzuki, S. et Hiedaki, T. (2007). Self-healing behaviour by cementitious recrystallization of cracked concrete incorporating expansive agent. Dans *Proceedings of the First International Conference on Self Healing Materials*.
- [71] Kumar Annamalai, S., Arunachalam, K. D. et Sathyanarayanan, K. (2012). Production and characterization of bio caulk by bacillus pasteurii and its remediation properties with carbon nano tubes on concrete fractures and fissures. *Materials Research Bulletin*, volume 47, numéro 11, p. 3362 – 3368.
- [72] Kunieda, M., Choonghyun, K., Ueda, N. et Nakamura, H. (2012). Recovery of protective performance of cracked ultra high performance-strain hardening cementitious composites (uhp-shcc) due to autogenous healing. *Journal of Advanced Concrete Technology*, volume 10, p. 313–322.
- [73] Kuzel, H.-J. (1996). Initial hydration reactions and mechanisms of delayed ettringite formation in portland cements. *Cement and Concrete Composites*, volume 18, numéro 3, p. 195 – 203.
-



- [74] Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubière, J.-F. et Perthuisot, J.-P. (1999). Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology*, volume 126, p. 25–34.
- [75] Lee, J. C., Chung, C.-W., Kim, W. J. et Lee, C. J. (2013). Effect of jc-1 microorganism on compressive strength of cement paste. *Materials Letters*, volume 105, numéro 0, p. 224 – 226.
- [76] Lovley, D. R. (1991). Dissimilatory fe(iii) and mn(iv) reduction. *Microbiological Reviews*, volume 55, numéro 2, p. 259–287.
- [77] Mortensen, B., Haber, M., Dejong, J., Caslake, L. et Nelson, D. (2011). Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation. *Journal of Applied Microbiology*, volume 111 issue 2, p. 338–349.
- [78] Na, S. H., Hama, Y., Tanigushi, M., Katsura, O., Sagawa, T. et Zakaria, M. (2012). Experimental investigation on reaction rate and self-healing ability in fly ash blended cement mixtures. *Journal of Advanced Concrete Technology*, volume 10, p. 240–253.
- [79] Nagano, T., Kowada, A., Matumura, T., Inada, Y. et Yajima, K. (1989). Experimental study of leakage through residual shear cracks on r/c walls. Dans *Transactions of the 10th international conference on structural mechanics in reactor technology*.
- [80] Nemati, M., Greene, E. et Voordouw, G. (2005). Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate : comparison with enzymic option. *Process Biochemistry*, volume 40, p. 925–933.
- [81] Nemati, M. et Voordouw, G. (2003). Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. *Enzyme and Microbial Technology*, volume 33, p. 635–642.
- [82] Nishiwaki, T., Koda, M., Yamada, M., Mihashi, H. et Kikuta, T. (2012). Experimental study on self-healing capability of frcc using different types of synthetics fibres. *Journal of Advanced Concrete Techniology*, volume 10, p. 195–206.
- [83] Okwadha, G. D. et Li, J. (2010). Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, volume 81, p. 1143–1148.
- [84] Okwadha, G. D. et Li, J. (2011). Biocontainment of polychlorinated biphenyls (pcbs) on flat concrete surfaces by microbial carbonate precipitation. *Journal of Environmental Management*, volume 92, p. 2860–2864.
- [85] Olivier, K., Darquennes, A., Benboudjema, F. et Gagné, R. (2013). Experimental studies of self-healing cementitious materials incorporating mineral admixtures. Dans *Fourth International Conference on Self Healing Materials*.
- [86] Ollivier, J.-P., Vichot, A. et de l'École Nationale des Ponts et chaussées (ENPC), C. P. (2008). *La durabilité des bétons*. Presses de l'école nationale des Ponts et Chaussées (ENPC).
-

- 
- [87] Parks, J., Edwards, M., Vikesland, P. et Dudi, A. (2010). Effects of bulk water chemistry on autogenous healing of concrete. *Journal of materials in civil engineering*, volume 22, p. 515–524.
- [88] Patil, H., Raijiwala, D., Prashant, H. et Vijay, B. (2008). Bacterial concrete - a self healing concrete. *International Journal of Applied Engineering Research*, volume 3, numéro 12, p. 1719–1725.
- [89] Pei, R., Liu, J., Wang, S. et Yang, M. (2013). Use of bacterial cell walls to improve the mechanical performance of concrete. *Cement & Concrete Composites*, volume 39, p. 122–130.
- [90] Perito, B. et Mastromei, G. (2003). Conservation of monumental stones by bacterial biomineralization. *Microbiology Today*, volume 30, p. 113–114.
- [91] Pettipher, G. L., Mansell, R., McKinnon, C. H. et Consins, C. M. (1980). Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 39, numéro 2, p. 423–429.
- [92] Pimienta, P. et Chanvillard, G. (2005). Durability of uhpfr specimens kept in various aggressive environments. Dans *10DBMC International Conference On Durability of Building Materials and Components*.
- [93] Qian, S., Zhou, J., De Rooij, M., Schlangen, E., Ye, G. et Van Breugel, K. (2009). Self-healing behavior of strain hardening cementitious composites incorporating local waste materials. *Cement & Concrete Composites*, volume 31, p. 613–621.
- [94] Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V. et Bang, S. S. (2001). Remediation of concrete using micro-organisms. *Materials Journal*, volume 98-M1, p. 3–9.
- [95] Ramakrishnan, V. Panchalan, R. K. B. S. S. (2005). Improvement of concrete durability by bacterial mineral precipitation. Dans *11th International conference on Fracture*, ICF.
- [96] Ramm, W. et Biscopio, M. (1998). Autogenous healing and reinforcement corrosion of water-penetrated separation cracks in reinforced concrete. *Nuclear Engineering and Design*, volume 179, p. 191–200.
- [97] Rastiello, G., Boulay, C., Pont, S. D., Tailhan, J. et Rossi, P. (2014). Real-time water permeability evolution of a localized crack in concrete under loading. *Cement and Concrete Research*, volume 56, numéro 0, p. 20 – 28.
- [98] Reinhardt, H.-W. et Jooss, M. (2003). Permeability and self-healing of cracked concrete as a function of temperature and crack width. *Cement and Concrete Research*, volume 33, p. 981–985.
- [99] Rodriguez-Navarro, C., Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A., Gonzalez-Muñoz, M. T. et Rodriguez-Gallego, M. (2007). Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, volume 71, p. 1197–1213.
-

- 
- [100] Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K. et Gonzalez-Munõz, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by myxococcus xanthus-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 69, p. 2182–2193.
- [101] Rong, H., Qian, C. et Li, L. (2013). Influence of injection times on mechanical properties of sandstone cemented by microbe cement. *Advances in Cement Research*, volume 25, numéro 6, p. 307–313.
- [102] Rong, H., Qian, C.-x. et Li, L.-z. (2012). Influence of molding process on mechanical properties of sandstone cemented by microbe cement. *Construction and Building Materials*, volume 28, p. 238–243.
- [103] Saito, H. et Onoda, T. (1974). Antibacterial action of bronopol on various bacteria, especially on pseudomonas aeruginosa. *Chemotherapy*, volume 22, numéro 9, p. 1466–1473.
- [104] Sangadji, S. et Schlangen, E. (2013). Mimicking bone healing process to self repair concrete structure novel approach using porous network concrete. *Procedia Engineering*, volume 54, numéro 0, p. 315 – 326.
- [105] Sangadji, S., Wiktor, V., Jonkers, H. et Schlangen, E. (2013). Injecting a liquid bacteria-based repair system to make porous network concrete healed. Dans *Fourth International Conference on Self Healing Materials*.
- [106] Sharma, M., Chang, Y. et Yen, T. (1985). Reversible and irreversible surface charge modification of bacteria for facilitating transport through porous media. *Colloids and Surfaces*, volume 16, numéro 2, p. 193 – 206.
- [107] Shepherd, J. A., Waigh, R. D. et Gilbert, P. (1988). Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, volume 32, numéro 11, p. 1693–1698.
- [108] Sierra-Beltran, M. G., Jonkers, H. et Schlangen, E. (2014). Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair. *Construction and Building Materials*, volume 67, numéro 0, p. 344–352.
- [109] Sisomphon, K., Copuroglu, O. et Koenders, E. (2013). Effect of exposure conditions on self healing behavior of strain hardening cementitious composites incorporating various cementitious materials. *Construction and Building Materials*, volume 42, numéro 0, p. 217 – 224.
- [110] Snoeck, D., Dubruel, P. et Belie, N. D. (2013). Microfibres and hydrogels to promote autogenous healing in cementitious materials. Dans *Fourth International Conference on Self Healing Materials*.
- [111] Stabnikov, V., Naeimi, M., Ivanov, V. et Chu, J. (2011). Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement. *Cement and Concrete Research*, volume 41, numéro 11, p. 1143 – 1149.
-

- 
- [112] Stark, J. (1999). Delayed ettringite formation in concrete. Dans of NCR, T. C., *Nordic Concrete Research, NCR*. p. 4–28.
- [113] Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K. et Bang, S. S. (1999). Microbiological precipitation of  $\text{CaCO}_3$ . *Soil Biology and Biochemistry*, volume 31, p. 1563–1571.
- [114] Stuckrath, C., Serpell, R., Valenzuela, L. M. et Lopez, M. (2014). Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation : Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures. *Cement and Concrete Composites*, volume 50, numéro 0, p. 10–15.
- [115] Sukhotskaya, S. S., Mazhorova, V. P. et Terekhin, Y. N. (1983). Effect of autogenous healing of concrete subjected to periodic freeze-thaw cycles. *Power Technology and Engineering (formerly Hydrotechnical Construction)*, volume Volume 17, number 6, p. 294–296.
- [116] Suzuki, T., Takiguchi, K., Hotta, H. et Ide, Y. (1988). Experimental study on the leakage of gas through cracked concrete walls. *Nippon Kenchiku Gakkai Kozokei Ronbun Hokokushu*, volume 384, p. 15–25.
- [117] Termkhajornkit, P., Nawa, T., Yamashiro, Y. et Saito, T. (2009). Self-healing ability of fly ash-cement systems. *Cement & Concrete Composites*, volume 31, p. 195–203.
- [118] Tiano, P. (1995). Stone reinforcement by calcite crystal precipitation induced by organic matrix macromolecules. *Studies in Conservation*, volume 40, p. 171–176.
- [119] Tiano, P., Biagiotti, L. et Mastromei, G. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation : methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, volume 36, p. 139–145.
- [120] Tiano, P., Cantisani, E., Sutherland, I. et Paget, J. (2006). Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. *Journal of Cultural Heritage*, volume 7, p. 49–55.
- [121] Van Tittelboom, K., De Belie, N., Lehmann, F. et Grosse, C. U. (2012). Acoustic emission analysis for the quantification of autonomous crack healing in concrete. *Construction and Building Materials*, volume 28, numéro 1, p. 333 – 341.
- [122] Van Tittelboom, K., De Belie, N., Loo, D. V. et Jacobs, P. (2011). Self-healing efficiency of cementitious materials containing tubular capsules filled with healing agent. *Cement and Concrete Composites*, volume 33, numéro 4, p. 497 – 505.
- [123] Van Tittelboom, K., De Belie, N., Muynck, W. D. et Verstraete, W. (2010). Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research*, volume 40, p. 157–166.
- [124] Wagner, E. F. (1974). Autogenous healing of cracks in cement-mortar linings for gray-iron an ductile-iron water pipe. *Journal / American Water Works Association*, volume 66, p. 358–360.
-

- 
- [125] Wang, J., Snoeck, D., Vlierberghe, S. V., Verstraete, W. et Belie, N. D. (2014). Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. *Construction and Building Materials*, volume 68, numéro 0, p. 110 – 119.
- [126] Wang, J., Soens, H., Verstraete, W. et Belie, N. D. (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cement and Concrete Research*, volume 56, numéro 0, p. 139 – 152.
- [127] Wang, J., Van Tittelboom, K., De Belie, N. et Verstraete, W. (2012). Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and Building Materials*, volume 26, p. 532–540.
- [128] Wang, R., Wang, J. et Qian, C. (2011). Bio-deposition of a calcite layer on cement-based materials by brushing with agar-immobilised bacteria. *Advances in Cement Research*, volume 23(4), p. 185–192.
- [129] Webster, A. et May, E. (2006). Bioremediation of weathered-building stone surfaces. *TRENDS in Biotechnology*, volume 24, p. 255–260.
- [130] Wiktor, V. et Jonkers, H. M. (2011). Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement & Concrete Composites*, volume 33, p. 763–770.
- [131] Wu, M., Johannesson, B. et Geiker, M. (2012). A review : Self-healing in cementitious materials and engineered cementitious composite as a self-healing material. *Construction and Building Materials*, volume 28, p. 571–583.
- [132] Xu, J. et Yao, W. (2014). Multiscale mechanical quantification of self-healing concrete incorporating non-ureolytic bacteria-based healing agent. *Cement and Concrete Research*, volume 64, numéro 0, p. 1 – 10.
- [133] Yang, Y., Lepech, M. D., Yang, E.-H. et Li, V. C. (2009). Autogenous healing of engineered cementitious composites under wet-dry cycles. *Cement and Concrete Research*, volume 39, p. 382–390.
- [134] Yang, Z., Hollar, J., He, X. et Shi, X. (2011). A self-healing cementitious composite using oil core/silica gel shell microcapsules. *Cement & Concrete Composites*, volume 33, p. 506–512.
- [135] Zeng, Z. et Tice, M. M. (2011). Iron reduction and carbonate precipitation by shewanella oneidensis. Dans *American Geophysical Union, Fall Meeting*.
- [136] Zhang, J., Deng, X., Feng, X., Han, N. X. et Jonkers, H. M. (2013). Improvement on bacteria-induced calcium mineralization ability of bacillus pseudofirmus by an integrated high-throughput screening strategy. Dans *Fourth International Conference on Self Healing Materials*.
- [137] Zhong, W. et Yao, W. (2008). Influence of damage degree on self-healing of concrete. *Construction and Building Materials*, volume 22, p. 1137–1142.
-

- [138] Zivica, V. et Bajza, A. (2001). Acidic attack of cement based materials - a review : Part 1. principle of acidic attack. *Construction and Building Materials*, volume 15, numéro 8, p. 331 – 340.
-



## RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse est de comprendre les mécanismes de la biocicatrisation des matériaux cimentaires afin d'optimiser le colmatage de fissures importantes ( $>200 \mu\text{m}$ ) grâce à l'action des bactéries. L'approche de biocicatrisation étudiée consiste à imprégner les fissures d'un milieu de culture (milieu précurseur) contenant des bactéries. 3 aspects sont étudiés : les mécanismes abiotiques de cicatrisation (sans bactéries) de mortiers fissurés, la croissance bactérienne *in vitro*, et la biocicatrisation de mortiers fissurés. L'étude des mécanismes abiotiques porte sur l'autocicatrisation naturelle et sur l'influence des milieux précurseurs (urée, lactate et gluconate de calcium). L'influence d'une carbonatation initiale des fissures est aussi évaluée. L'étude sur les bactéries vise à suivre leur développement et à sélectionner le milieu de culture. L'étude de la biocicatrisation vise à suivre la cicatrisation de fissures grâce aux traitements bactériens sélectionnés. Il ressort que le lactate et le gluconate de calcium ont un rôle important sur la cicatrisation de fissures fraîchement ouvertes, favorisant la formation d'ettringite qui comble partiellement les fissures. Il n'y a pas d'effet de ces précurseurs sur les fissures carbonatées. Sur des fissures carbonatées, le milieu à base de lactate de calcium, de nitrate de calcium et d'extrait de levure, avec *Bacillus pseudofirmus*, confère au mortier une capacité de cicatrisation accrue pour des fissures larges ( $>200 \mu\text{m}$ ). La réduction de l'ouverture de la fissure est de plus de 70 %, avec la formation d'une couche de calcite mêlée à un biofilm, de plus de 75  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

**Mots clés :** Autocicatrisation, biocicatrisation, matériaux cimentaires, bactéries alcalinophiles, *Bacillus*, durabilité, fissuration, perméabilité

## ABSTRACT

The objective of this research was to achieve a better understanding of the bio-healing mechanisms in cementitious materials in order to optimize the sealing of large cracks ( $>200 \mu\text{m}$ ). The studied bio-healing approach consisted of soaking the cracks with a culture medium (precursor medium) containing bacteria. This thesis had 3 topics: abiotic healing mechanisms of cracked mortars, *in vitro* growth of bacterial strains and bio-healing of cracked mortars. The study of abiotic mechanisms specifically focused on natural self-healing, but also addressed the influence of precursors (urea, calcium lactate, and calcium gluconate). The influence of the cracks' initial carbonation is also evaluated. The study of the tested bacteria growth aimed at selecting a bacterial strain and a culture medium able to produce a significant amount of  $\text{CaCO}_3$  and to allow an optimal bacterial growth. The study of bio-healing followed the bio-healing kinetics of carbonated cracked mortars and evaluated the sealing effectiveness provided by the treatment. It appeared from this research that calcium lactate and calcium gluconate conferred an opening width reduction of fresh cracks of 70 % and 60 % respectively, resulting from the formation of ettringite. This effect was not observed on previously carbonated cracks. The results obtained with carbonated cracks showed that the calcium lactate, calcium nitrate and yeast extract based medium, inoculated with *Bacillus pseudofirmus* was able to improve the healing ability of large cracks ( $>200 \mu\text{m}$ ). The crack opening reduction was more than 70 %, resulting from the formation of a layer of calcite mixed with a biofilm, having a thickness of 75  $\mu\text{m}$ .

**Key words:** Self-healing, bio-healing, cementitious materials, alkaliphilic bacteria, *Bacillus*, durability, sustainability, cracking, permeability