

Quinzième édition des Journées Scientifiques
du Regroupement Francophone pour la Recherche et la Formation sur le Béton
(RF)²B

Douai, France
03-04 juillet 2014

Etude de la biocicatrisation de mortiers fissurés

J. Ducasse-Lapeyrousse^{A,B}, C. Lors^A, D. Damidot^A, R. Gagné^B

A Ecole Nationale Supérieure des Mines de Douai, Douai, France

B Centre de recherche sur les infrastructures en béton, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

RESUME :

Un moyen prometteur pour la réparation des grosses micro-fissures (de l'ordre de 250 µm) est la biocicatrisation. Ce système de réparation utilise la capacité des bactéries à promouvoir la formation de carbonate de calcium, CaCO₃, afin de colmater les fissures. Le principe est appelé Microbiologically Induced Carbonate Precipitation (MICP). Le phénomène de biocicatrisation est complexe, faisant intervenir l'activité bactérienne, le milieu de culture nécessaire à la croissance bactérienne, la composition du matériau et les conditions environnementales (température et humidité). Ce projet de recherche vise à élaborer un procédé de biocicatrisation tout en permettant de comprendre l'influence spécifique des différents paramètres d'influence. L'étude nécessite dans un premier temps de mettre au point un milieu conduisant à une croissance optimale de la souche bactérienne étudiée appartenant au genre *Bacillus* et générant une quantité significative de carbonate de calcium. L'application de la suspension bactérienne obtenue est ensuite mise en contact d'éprouvettes de mortier fissurées (de l'ordre de 250 µm) et carbonatées. L'efficacité de la biocicatrisation est estimée en mesurant l'évolution des ouvertures des fissures par des mesures de débit d'air.

1. INTRODUCTION

Le béton est un matériau de construction exceptionnel. Il est le plus utilisé dans le monde et peut faire face à des environnements agressifs. Des chercheurs ont récemment développé un procédé novateur de cicatrisation du béton à l'aide des bactéries, soit en les intégrant directement dans la formulation du béton, soit en les appliquant à la surface du béton dégradé. Ces recherches permettent de conférer au béton une meilleure durabilité et de réduire les coûts économiques et environnementaux d'une reconstruction. En effet, les fissures sont l'un des paramètres clés dans la durabilité d'un béton, elles constituent un chemin préférentiel pour la pénétration des substances agressives. Ce système de réparation prometteur utilise la capacité des bactéries à promouvoir la formation de carbonate de calcium, CaCO₃, afin de colmater les fissures (Jonkers, 2007). Le principe est appelé Microbiologically Induced Carbonate Precipitation (MICP) car la précipitation de carbonate de calcium est induite par un procédé microbiologique. Le carbonate de calcium est un minéral stable en présence d'une pâte de ciment durcie. Ce dernier offre donc un moyen prometteur pour une réparation durable (De Muynck, De Belie et al. 2010). Les bactéries, en se développant dans un milieu approprié, changent leur environnement, modifient le pH, forment de nouveaux composés chimiques et favorisent la nucléation de cristaux de calcite (Castanier, Le Métayer-Levrel et al. 1999). Diverses méthodes sont employées pour la précipitation microbienne de carbonate de calcium, mais beaucoup d'auteurs choisissent d'ajouter des précurseurs dans les milieux de culture (Van Tittelboom, De Belie et al. 2010, De Muynck, Debrouwer et al. 2008, Stocks-Fischer, Galinat et al. 1999, Ramachandran, Ramakrishnan et al. 2001, Jonkers, Thijssen et al. 2010, Wiktor, Jonkers 2011). Un précurseur est un composé chimique qui apporte certains des réactifs nécessaires à la formation du carbonate de calcium : l'ion calcium Ca²⁺ et l'ion carbonate CO₃²⁻. Par exemple, des sels de calcium, tels que le lactate de calcium, [CH₃CH(OH)COO]₂Ca qui apporte à la fois une source d'ions calcium et du carbone conduisant à un dégagement de CO₂ par la respiration cellulaire, peuvent être utilisés (Jonkers, Thijssen et al. 2010, Wiktor et Jonkers 2011). Il convient également de tenir compte des nutriments apportés pour maintenir une bonne activité bactérienne qui dépendront du type de bactéries utilisées. Par

exemple l'urée $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ est souvent employée (Van Tittelboom, De Belie et al. 2010, De Muynck, Debrouwer et al. 2008, Stocks-Fischer, Galinat et al. 1999, Ramachandran, Ramakrishnan et al. 2001). Hydrolysée par les bactéries, l'urée apporte des ions carbonate, mais aussi augmente le pH avec la production d'ions ammonium NH_4^+ . Une augmentation du pH est un facteur favorable à la précipitation du carbonate de calcium. Ainsi, les systèmes de biocicatrisation des matériaux cimentaires consistent à mettre dans les fissures un milieu adapté à la croissance bactérienne afin de maximiser la précipitation de carbonate de calcium. L'enjeu est de comprendre l'interaction des différents composants de ce système : le milieu de culture, les bactéries, le matériau cimentaire et les conditions environnementales (température et humidité). De ces connaissances doit résulter une solution technique de biocicatrisation efficace et robuste.

2. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

La compréhension et la quantification du phénomène de biocicatrisation sont complexes. La composition du milieu de culture doit répondre à plusieurs impératifs : permettre le développement des bactéries (croissance et survie) et apporter les précurseurs de précipitation. Les bactéries doivent être capables de se développer au contact d'un matériau hostile pouvant conduire à un environnement hostile, le béton possède un pH très basique autour de 13, même si la surface de ce dernier est rapidement carbonatée. Par leur activité métabolique, les bactéries doivent également produire suffisamment de carbonate de calcium permettant la cicatrisation de la fissure.

L'objectif du présent projet de recherche est de mettre au point en laboratoire, un procédé de biocicatrisation dans une logique de réparation de bétons endommagés pour colmater les grosses micro-fissures (de taille supérieure à $250\ \mu\text{m}$) qui sont trop larges pour être cicatrisées par auto-cicatrisation. Ainsi, le procédé de biocicatrisation mis au point a été appliqué à un mortier une fissure déjà subi une carbonatation par auto-cicatrisation qui n'avait pas conduit à son colmatage.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1 Eprouvettes de mortiers

La composition du mortier est conforme à la norme ASTM C109-C109M. Le rapport sable/ciment est de 2,75 et le rapport eau/ciment est égal à 0,485. Le ciment est un ciment Portland canadien GU (General Use), (similaire à CEM1 et ASTM type 1), composé de C_3S , C_2S , C_3A et C_4AF , respectivement à 60%, 13%, 7,50% et 7% (composition Bogue). La finesse Blaine est de $381\ \text{m}^2 / \text{kg}$. Le sable est un sable normalisé d'Ottawa conformément à la norme ASTM C778: sable de silice naturelle principalement classé entre le tamis de $600\ \mu\text{m}$ ($n^\circ 30$) et le $150\ \mu\text{m}$ ($n^\circ 100$) tamis. Sa densité est de 2,65.

Les éprouvettes de mortier sont cylindriques avec un diamètre de 150 mm et une hauteur de 50 mm. Un trou central cylindrique ayant un diamètre de 55 mm permet l'insertion d'un cœur expansif (Figure 1). Ce dispositif est utilisé pour créer des fissures radiales réalistes. Le cœur expansif et la fissuration contrôlée sont présentés en détail dans une étude précédente (Gagné et Argouges 2012). Un anneau en acier est intégré dans l'échantillon de mortier avec un diamètre intérieur de 95,2 mm et un diamètre de 4,8 mm de section.



Figure 1 : Schéma de l'éprouvette de mortier et du cœur expansif

3.2 Mesure de débit d'air et ouverture apparente des fissures

Une cellule de perméabilité à l'air (Figure 2) permet des mesures précises du débit d'air à travers une fissure unique sous des conditions d'écoulement bien contrôlées : température et gradient de pression constants (Ismail 2006, Gagné, Argouges 2012).

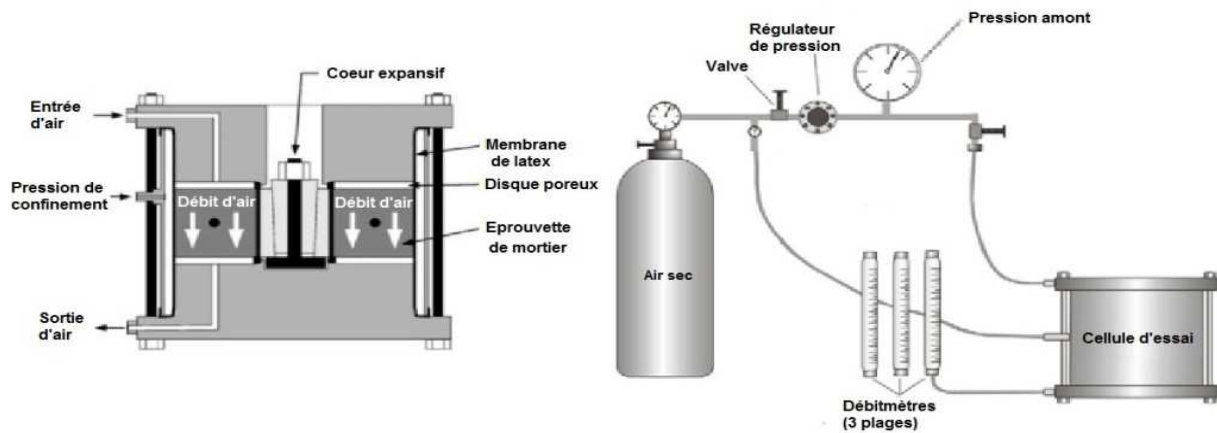


Figure 2 : Schéma du dispositif de mesure du débit d'air

Les observations au vidéo-microscope sont rendues difficiles lorsque les produits de cicatrisation se forment, recouvrant les lèvres de la fissure. Les mesures de débit d'air permettent de suivre l'évolution de l'ouverture des fissures tout au long du processus de cicatrisation. Des études antérieures (Gagné et Argouges 2012, Ismail 2006) montrent une corrélation entre le flux d'air à travers une fissure unique et son ouverture dans des conditions contrôlées (pression, température, géométrie de la fissure). L'équation (1) décrit la relation entre Q (flux d'air en litres par minutes) et W_a (l'ouverture apparente dans μm) :

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

Cette équation a été obtenue par des essais sur plus de 60 mortiers où le flux d'air est comparé avec les mesures au vidéo-microscope avant cicatrisation. L'ouverture apparente est calculée à partir des racines de l'équation (1). Au cours de la cicatrisation, l'ouverture de la fissure peut ne pas être uniforme. Certaines portions peuvent être entièrement cicatrisées et d'autres largement ouvertes. Cependant, la valeur de l'ouverture apparente, obtenue par la mesure de débit d'air, permet une estimation du processus de cicatrisation. Cette méthode donne l'ouverture d'une fissure équivalente, (avec un débit d'air identique) dont la largeur est constante sur toute la section.

3.3 Essais de croissance bactérienne

La souche bactérienne sélectionnée est une souche alcalinophile appartenant au genre *Bacillus*, capable de survivre à des pH basiques proches de 11. La bactérie est également aérobie. En présence d'oxygène, elle est capable de consommer les matières organiques et de produire du dioxyde de carbone par la respiration bactérienne.

Le milieu de culture sélectionné (LNCa) est constitué d'extrait de levure, de lactate de calcium et de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. L'extrait de levure apporte les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne. Le lactate de calcium et le nitrate de calcium sont les précurseurs de précipitation.

Pour les essais de croissance bactérienne, 250 mL du milieu LNCa sontensemencés avec 250 μL de la pré-culture de la bactérie étudiée, puis incubés à 30°C sous agitation pendant un mois. Les essais sont réalisés en cinq répliquas : deux sont suivis au cours du temps par des prélèvements périodiques effectués chaque semaine et trois autres sont sacrifiés en fin d'expérimentation pour quantifier la quantité totale de carbonate de calcium formée.

La croissance bactérienne est évaluée par :

- Le comptage des bactéries par épifluorescence, qui consiste à compter au microscope optique à épifluorescence les bactéries recueillies sur une membrane en polycarbonate à pores cylindriques calibrés à 0,2 μm et marquées par un fluorochrome (acridine orange). Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries totales par mL,

- Le dosage du lactate et du calcium respectivement par chromatographie ionique et ICP. La quantification du précipité formé en fin d'expérimentation est réalisée par analyse thermogravimétrique (ATG).

3.4 Essais de biocicatrisation sur éprouvettes de mortier fissurées

Les essais de biocicatrisation sont réalisés sur des éprouvettes de mortier fissurées et carbonatées suite à une autocicatrisation pendant une année. L'ouverture de la fissure est de l'ordre de 250 μm . Après séchage, deux éprouvettes sont immergées sous hotte à flux laminaire dans une suspension bactérienne réalisée dans le milieu LNCa et contenant plus de 10^9 bactéries vivantes / mL (correspondant à un état de croissance bactérienne optimal). Deux autres éprouvettes sont immergées dans le milieu LNCa non inoculé, servant d'essais témoins. Les éprouvettes de mortier sont ensuite placées dans des systèmes de stockage humide stériles à 20°C. Le système d'humidification est constitué d'un bidon de 20 L auquel est branché un brumisateuseur. L'eau déminéralisée alimentant ce brumisateuseur est stérilisée. Un biocide est également ajouté à l'eau déminéralisée pour les essais témoins, afin d'éviter toute contamination microbienne.

4. RESULTATS

4.1 Essais de croissance bactérienne

La croissance bactérienne dans le milieu LNCa est rapide. La concentration en cellules bactériennes croît de façon exponentielle durant la première semaine (Figure 3). Par la suite, la concentration se stabilise autour de 15 milliards de bactéries par mL. Cette forte concentration et l'absence de phase de latence montrent que le milieu LNCa offre des conditions adaptées pour la croissance de la souche bactérienne étudiée pendant plusieurs semaines. Parallèlement à l'évolution de la taille de la population bactérienne, la concentration en lactate dans le milieu diminue pour complètement disparaître au cours de la troisième semaine (Figure 4). Le calcium en solution diminue également tout au long de l'essai, avec une baisse autour de 5 g/L en fin d'expérimentation (Figure 5). Cette diminution de la quantité en ions calcium est à corrélérer avec la formation d'un précipité dont l'analyse par ATG confirme qu'il s'agit bien de calcite à plus de 90% (Tableau 1).

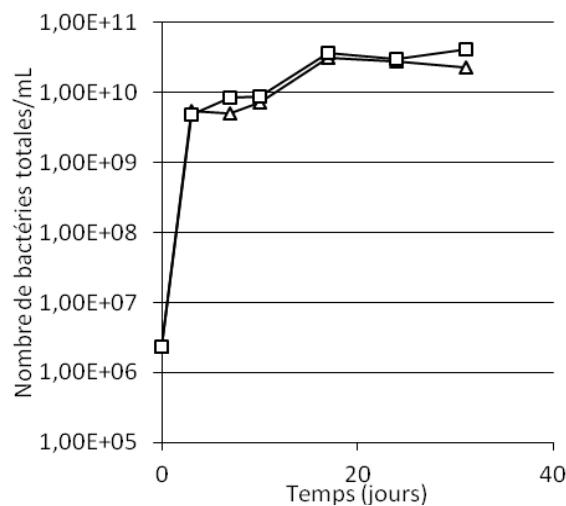


Figure 3 : Evolution de la taille de la population bactérienne dans le milieu LNCa inoculé

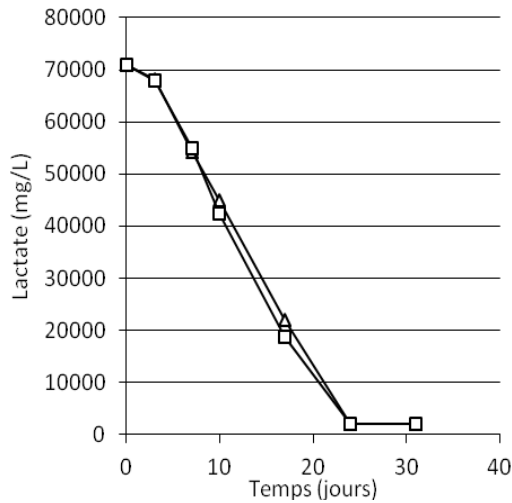


Figure 4 : Évolution de la concentration lactate dans le milieu LNCa inoculé

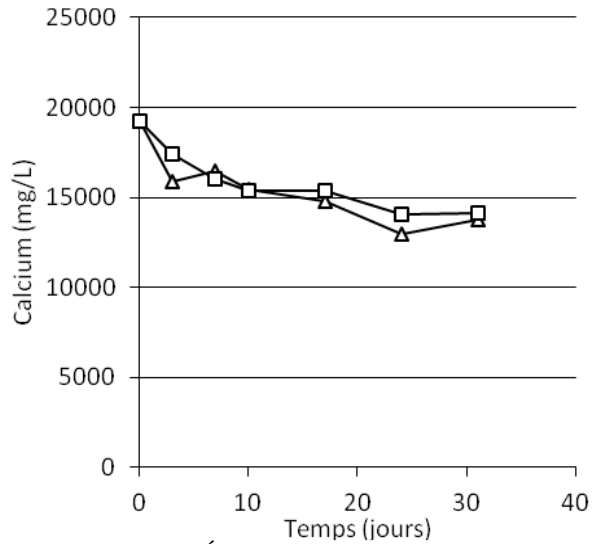


Figure 5 : Évolution de la concentration en calcium dans le milieu LNCa inoculé

Tableau 1 : Masse et analyse par ATG du précipité recueilli

Masse recueillie (g)	1,9282	2,4008	1,9863
Carbonate de calcium	92%	92%	90%

4.2 Essais de biocicatrisation sur éprouvettes de mortier fissurées

L'évolution de l'ouverture apparente montre clairement un effet de l'activité bactérienne sur la cicatrisation des éprouvettes (Figure 6). Les fissures immergées dans la suspension bactérienne réalisée dans le milieu LNCa sont presque totalement cicatrisées (les courbes Bactéries-A et Bactéries-B), soit une diminution de 70% et 82% respectivement de la taille de l'ouverture apparente. De façon opposée, les fissures immergées dans le milieu LNCa (en l'absence de bactéries) (les courbes Témoin-A et Témoin-B) ont une très faible diminution des ouvertures de fissures.

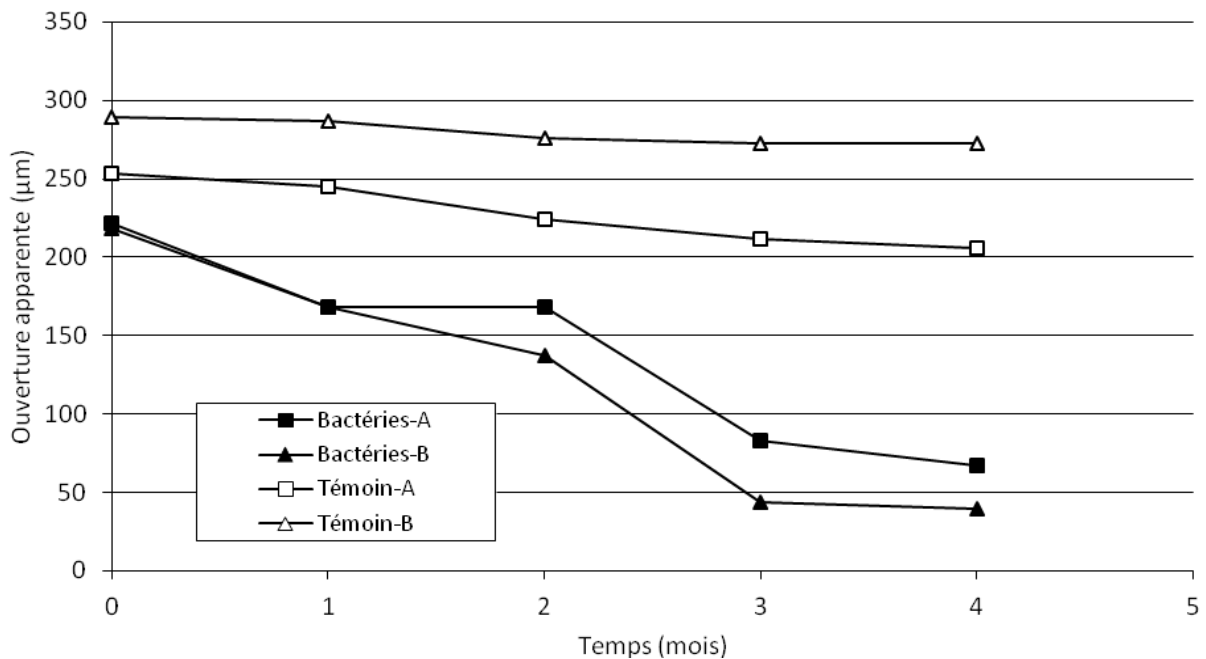


Figure 6 : Evolution de l'ouverture apparente des fissures des éprouvettes de mortier imprégnées de la suspension bactérienne et des éprouvettes de mortier témoin

Les photographies des fissures confirment visuellement l'effet des différents traitements sur la cicatrisation des fissures après 4 mois (Figures 7 et 8). En présence de bactérie, les quantités additionnelles de calcite formée, comblent la fissure mais également conduisent à un recouvrement de la surface de l'échantillon (Figure 7). En Revanche, le milieu LNCa (sans bactéries) ne semble pas apporter de modification visible à la fissure du moins ici au niveau de son ouverture (Figure 8).

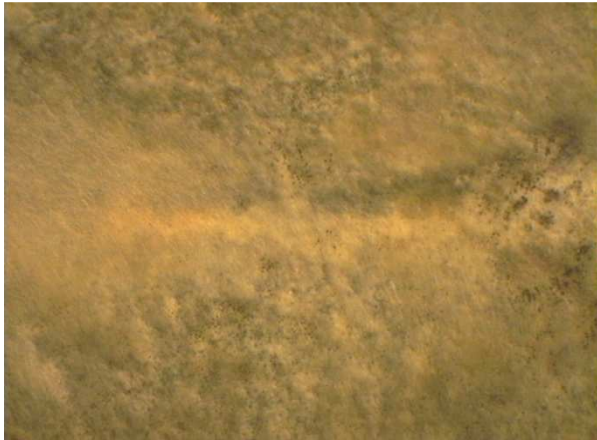


Figure 7 : Observation à la loupe binoculaire d'une fissure biocicatrisée après 4 mois d'expérimentation (Bactéries-A)



Figure 8 : Observation à la loupe d'une fissure témoin (sans bactéries), immergée après 4 mois d'expérimentation (Témoin-B)

5. CONCLUSION

Les essais de biocicatrisation confirment la pertinence de cette méthode pour cicatriser des fissures trop larges pour être autocicatrisées;

- l'ouverture apparente des fissures de l'ordre de 250 μm initialement diminue entre 70% et 80% lors des immersions mensuelles dans la suspension bactérienne réalisée dans le milieu LNCa,
- les observations visuelles corroborent les mesures de l'ouverture apparente,
- les constituants du milieu de culture n'ont pratiquement aucun effet sur la cicatrisation des fissures qui est donc uniquement attribuée à l'activité bactérienne.

Le choix de la suspension bactérienne réalisée dans le milieu LNCa apporte ainsi une solution efficace de biocicatrisation;

- le milieu LNCa offre des conditions très favorables au développement de la souche bactérienne sélectionnée. Les bactéries se développent rapidement en grand nombre (plus de 10^9 bactéries vivantes / mL) et survivent pendant plusieurs semaines en conditions humides,
- le lactate de calcium est consommé et un précipité de carbonate de calcium se forme en grande quantité.

La prochaine étape sera de passer de l'échelle du laboratoire à l'échelle du terrain pour mettre au point un mode d'application efficace et facilement utilisable sur des ouvrages réels.

6. REFERENCES

- Castanier S., Le Métayer-Levrel G., Perthuisot J. (1999) Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist point of view. *Sediment Geol* 126:9-23
- De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecol Eng* 36:118-136
- De Muynck W., Debrouwer D., De Belie N., Verstraete W. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cem Concr Res* 38:1005-1014
- Gagné R. et Argouges M. (2012) A study of the natural self-healing of mortars using air-flow measurements. *Mater Struct* 45:1625-1638

- 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
- Jonkers H., Thijssen A., Muyzer G., Copuroglu O., Schlangen E. (2010) Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecol Eng* 36:230-235
- Jonkers H. (2007) Self Healing Concrete: A Biological Approach. In: Zwaag S (ed) . Springer Netherlands, pp 195-204
- Ramachandran S.K., Ramakrishnan V., Bang S.S.(2001) Remediation of Concrete Using Micro-Organisms. *Materials Journal* 98:3-9
- Stocks-Fischer S., Galinat J.K., Bang S.S. (1999) Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biol Biochem* 31:1563-1571
- Van Tittelboom K., De Belie N., De Muynck W., Verstraete W. (2010) Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cem Concr Res* 40:157-166
- Wiktor V. et Jonkers H.M. (2011) Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites* 33:763-770