

Impact de la matrice cimentaire sur le développement de biofilms dans les réseaux d'assainissement

Marielle GUÉGUEN-MINERBE^{1*}, Jean HERISSON^{1,2}, Pascal TAQUET² et Thierry CHAUSSADENT¹

¹ Université Paris-Est, Institut Français de Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux, 58 boulevard Lefebvre, 75732 Paris Cedex 15, France

² Kerneos, 1 rue Le Chatelier, Parc Technologique, 38090 Vaulx Milieu, France

*Auteur de correspondance : marielle.gueguen@ifsttar.fr

Résumé – Le milieu régnant dans les réseaux d'assainissement est agressif pour les matériaux et notamment pour les matériaux cimentaires. La présence de sulfure de dihydrogène (H_2S) va permettre le développement de bactéries sulfuroxydantes qui vont oxyder les molécules soufrées en acide sulfurique qui va réagir avec les matériaux cimentaires pour former des matériaux sans consistance ou expansifs pouvant provoquer une rupture de la structure. Tous les matériaux n'ont pas la même résistance vis-à-vis de ce milieu. Ainsi les bétons à base de ciment d'aluminate de calcium présentent une meilleure résistance que les bétons à base de ciment Portland. Nous nous sommes intéressés à un des paramètres pouvant expliquer cette différence à savoir une différence de colonisation des mortiers par les espèces microbiennes. Des échantillons de mortiers à base des deux types de ciment ont été placés dans une enceinte recréant les conditions des réseaux d'assainissement puis observés au microscope à épifluorescence avec une coloration Live/Dead puis en microscopie électronique à balayage. Il a ainsi pu être mis en évidence que les mortiers à base de ciment d'aluminate de calcium présentent un plus faible développement microbien. Ceci peut être expliqué par la présence d'ions aluminium, inhibiteur de la croissance bactérienne, et par la modification des propriétés de surface des mortiers par la formation d'un gel d'alumine.

Mots-clés : Biodétérioration, réseau d'assainissement, matériau cimentaire, biofilm, microscopie

Abstract – Cementitious material effects on biofilm growth in sewer networks.

The environment in sewer systems is aggressive for materials and in particular for cementitious materials. The dihydrogen sulphide (H_2S) presence allows the development of sulfo-oxidizing bacteria which oxidize sulfur molecules into sulphuric acid which in turn reacts with cementitious materials to form noncohesive or expansive materials causing a collapse of the structure. All the materials don't have the same resistance towards this environment. Concretes with calcium aluminate cement present a better resistance than concretes with Portland cement. We were interested in one of the parameters that can explain this difference: mortar colonization by microorganisms. Mortar samples of both cement types were placed in a chamber recreating the sewer conditions then observed by fluorescence microscopy with Live/Dead staining and by scanning electron microscopy. The mortars with calcium aluminate cement present a lower microbial development. This can be explained by the presence of aluminum ions, inhibitor of the bacterial growth, and by the modification of the surface properties of mortars by the formation of an alumina gel.

Keywords: Biodeterioration, sewer network, cementitious material, biofilm, microscopy

INTRODUCTION

Les réseaux d'assainissement français sont vieillissants et nécessitent d'être changés (Herisson *et al.*, 2012). Le

choix des matériaux pour ce renouvellement n'est pas évident à réaliser. En effet, les conditions environnementales dans ces réseaux sont très spécifiques. La présence de sulfure de dihydrogène (H_2S) peut induire la détérioration

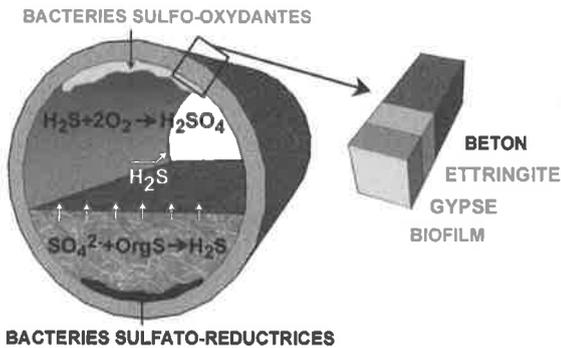


Fig. 1. Schéma du processus de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d’assainissement.

Fig. 1. Diagram of the cementitious material biodeterioration process in sewer networks.

des matériaux et notamment des matériaux cimentaires. Ce phénomène est le résultat de l’interaction entre deux biofilms (Vincke *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2008; Herisson *et al.*, 2012; fig. 1).

Ainsi des bactéries sulfato-réductrices vont réduire le soufre organique présent naturellement dans l’effluent. Ce soufre réduit va former du sulfure de dihydrogène. L’H₂S va diffuser dans l’atmosphère puis être réduit de manière biotique ou abiotique (Jolley et Forster, 1985; Wilmot *et al.*, 1988) pour former majoritairement du soufre élémentaire. Celui-ci va ensuite être oxydé par des bactéries sulfo-oxydantes. Ces dernières, en utilisant les éléments soufrés réduits comme accepteur d’électron (Kuenen et Beudeker, 1982), vont former de l’acide sulfurique qui va réagir avec le béton pour former des produits non cohésifs ou expansifs tels que le gypse ou l’ettringite, induisant la détérioration de la structure. Les mesures préventives mises en place afin de limiter la formation d’H₂S ne permettent pas d’éliminer totalement les agents corrosifs, il est donc important de mettre en place des matériaux résistants à l’attaque par l’acide sulfurique et/ou étant capables de limiter la croissance des bactéries sulfo-oxydantes.

Afin de pouvoir déterminer les matériaux les plus adaptés à cet environnement extrême, des échantillons de mortier ont été exposés *in situ* dans un réseau d’assainissement. Par ailleurs, des expérimentations en laboratoire ont été réalisées afin de découpler les différentes phases de la biodétérioration depuis la présence d’H₂S dans l’atmosphère jusqu’à l’attaque du mortier par l’acide sulfurique. Ces études (Herisson *et al.*, 2012) ont permis de déterminer les conditions optimales de biodétérioration ainsi que les étapes clés. Un essai accéléré de biodétérioration a ainsi pu être développé. Les expositions d’échantillons de mortiers *in situ* ont permis de mettre en évidence des différences de comportement en fonction du type de ciment employé.

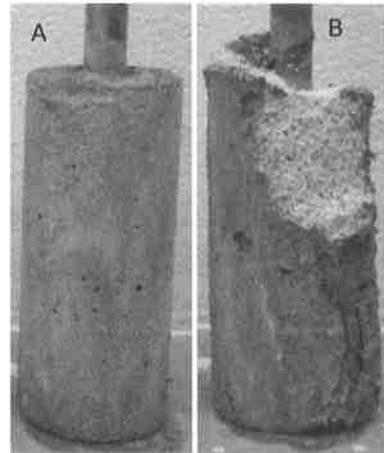


Fig. 2. Éprouvettes de mortier à base ciment d’aluminat de calcium (A) et de ciment Portland (B) après 16 mois d’exposition dans un réseau d’assainissement.

Fig. 2. Cylindrical mortar samples made of calcium aluminate cement (A) and Portland cement (B) after 16 months in a sewer network.

Ainsi les mortiers à base de ciment d’aluminat de calcium présentent une meilleure tenue après 16 mois d’exposition que ceux à base de ciment Portland (fig. 2).

Cette différence de comportement peut s’expliquer de différentes manières, soit les mortiers à base d’aluminat de calcium présentent des capacités de neutralisation à l’acide plus importantes, soit ces matériaux sont moins colonisés par les bactéries sulfo-oxydantes, soit les deux phénomènes sont conjugués.

C’est à ce deuxième point que va s’intéresser notre étude. Son objectif est d’observer les divergences de comportement des bactéries à la surface de différents matériaux cimentaires (ciment Portland et ciment d’aluminat de calcium) dans le cadre de l’essai accéléré de biodétérioration.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Essai accéléré

Des échantillons de mortier à base de ciment Portland et à base d’aluminat de calcium (Herisson *et al.*, 2012), 2 × 2 × 2 cm, ont été exposés dans l’enceinte de biodétérioration de 1 m³. La température a été maintenue à 30 ± 1 °C, avec une humidité relative à saturation. De l’H₂S a été introduit dans l’enceinte en faisant réagir du sulfure de sodium (0,32 M) et de l’acide chlorhydrique (1 M). Cette réaction a permis d’obtenir une concentration dans l’enceinte de 38 ± 5 ppm. Une pulvérisation de souches bactériennes a été effectuée de façon journalière. Cette pulvérisation comprenait un mélange de 4 espèces bactériennes sulfo-oxydantes

fréquemment impliquées dans la biodégradation (Roberts *et al.*, 2002 ; Okabe *et al.*, 2007), à savoir *Starkeya novella* (DSMZ 506), *Thiomonas intermedia* (DSMZ 18155), *Halothiobacillus neapolitanus* (DSMZ 15147) et *Acidithiobacillus thiooxidans* (DSMZ 14887).

Observations microscopiques

L'enceinte de biodétérioration a été ouverte mensuellement. Des échantillons de mortier y ont été prélevés puis préparés pour être observés au microscope à épifluorescence puis au microscope électronique à balayage. Les échantillons ont été, dans un premier temps, fixés au glutaraldéhyde (5 %). Un dépôt de coloration Live/Dead® (BacLight™ bacterial Viability Kit, L7012) a été réalisé et incubé 20 mn à l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été rincés à l'H₂O distillée puis au propanol -2 pendant 2 mn. Les échantillons ont été séchés avant observations au microscope à épifluorescence (Zeiss, Axio Scope A1 Vario). Cette coloration, avec l'utilisation de filtres, a permis d'observer les cellules vivantes (filtre GFP : Green Fluorescent Protein) et les cellules mortes (Filtre AF 546 : Alexia Fluor).

Après la première série d'observations, les échantillons ont été déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol successifs de 10 mn (éthanol à 25 %, 50 %, 75 % et 100 %). Ils ont ensuite été séchés à l'air avant d'être métallisés à l'or puis observés en microscopie électronique à balayage (FEI Quanta 400, tension : 25 kV, pression : 0,30 torrs).

Lixiviation en milieu acide

Des échantillons de mortiers à base de ciment Portland et de ciment d'aluminate de calcium, 2 × 2 × 2 cm, ont été immergés dans 500 mL d'acide sulfurique à pH = 1. 20 mL de solution ont été prélevés toutes les 24 heures afin d'effectuer une analyse par spectrométrie par torche plasma (ICP) du passage des ions en solution.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les observations microscopiques (fig. 3) ont permis de mettre en évidence la présence de bactéries aussi bien à la surface des mortiers à base de ciment Portland que des mortiers à base de ciment d'aluminate de calcium. Par microscopie à épifluorescence avec un marquage Live/Dead (fig. 3A, B, D, E), il est possible de souligner que les biofilms à la surface des matériaux sont majoritairement constitués de cellules mortes (fig. 3A, D) ce qui est en accord avec les différentes observations de la littérature menées sur les biofilms (Webb *et al.*, 2003). De plus, les

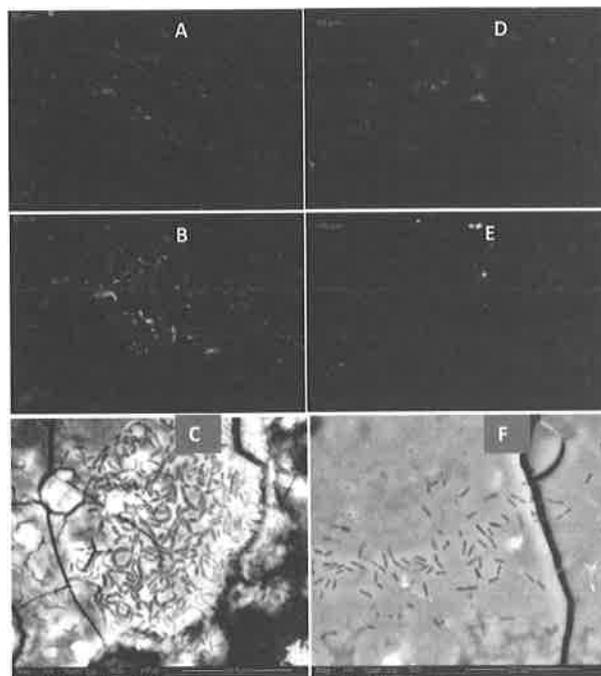


Fig. 3. Observations par microscopie à épifluorescence de la surface de mortier à base de ciment Portland (A, B) et à base d'aluminate de calcium (D, E) des cellules mortes (A, D) et des cellules vivantes (B et E) et par microscopie électronique à balayage des mêmes mortiers (C : à base de ciment Portland et F : à base d'aluminate de calcium).

Fig. 3. Fluorescence microscopy observations of mortar surfaces made of Portland cement (A,B) and of calcium aluminate cement (D,E) of dead (A,D) and live cells (B, E) and scanning electron microscopy observations of the same mortar (C: Portland cement and F: calcium aluminate cement).

observations par épifluorescence (fig. 3A, B, D, E) et par balayage électronique (fig. 3C et F) ont permis de noter que le mortier à base de ciment Portland présentait une colonisation plus importante de sa surface par les microorganismes que le mortier à base d'aluminate de calcium. Pour le premier type de mortier, les bactéries forment des chaînettes pouvant atteindre jusqu'à 6 cellules contre seulement 2 cellules à la surface du second, indiquant un meilleur état physiologique sur le mortier à base de ciment Portland.

Le moins bon développement des cellules bactériennes sur le ciment à base d'aluminate de calcium peut s'expliquer par la présence d'ions aluminium. Les ions aluminium sont connus pour leur capacité à limiter le développement microbien (Garcidueña Piña et Cervantes, 1996). Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus *in situ* indiquant une limitation puis une inhibition du

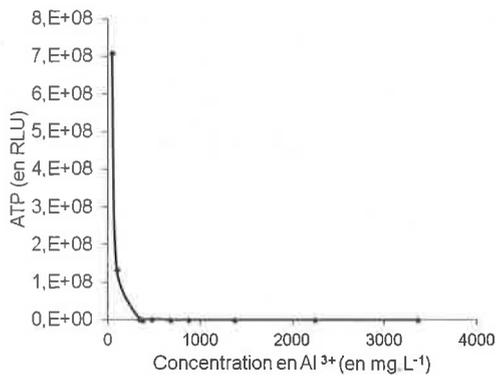


Fig. 4. Quantité d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) en fonction de la concentration en ions aluminium Al^{3+} d'après des résultats obtenus sur site.

Fig. 4. ATP (Adenosine Tri Phosphate) quantity in relation with aluminum ions Al^{3+} from *in situ* results.

développement bactérien pour des concentrations en ions aluminium dès 350 mg.L^{-1} d' Al^{3+} (fig. 4).

De plus, les essais de lixiviation en milieu acide ($\text{pH} = 1$) des deux matériaux ont permis de mettre en évidence que 10 mg.cm^{-2} d'aluminium sont dissous pour le mortier à base de ciment d'aluminate de calcium contre seulement 1 mg.cm^{-2} pour le mortier à base de ciment Portland (fig. 5). Cette différence peut provenir des teneurs en Al_2O_3 présentes dans les ciments. En effet, le ciment Portland est composé de 5 % d' Al_2O_3 contre 10 fois plus pour le ciment d'aluminate de calcium. On peut remarquer que les deux types de mortier présentent une lixiviation des ions calciums d'environ 10 mg.cm^{-2} alors que la composition en CaO est de l'ordre de 64 % de la masse pour le ciment Portland et 37 % pour le ciment d'aluminate de calcium.

Un autre facteur non négligeable est la formation d'un gel d'alumine ($\text{Al}(\text{OH})_3$) à la surface des échantillons de mortier à base d'aluminate de calcium. Ce gel se forme pour des valeurs de pH comprises entre 4 et 10 (Lambert *et al.*, 2008). Pour des valeurs de pH inférieures à 4, le gel d'alumine va se dissoudre pour former des ions aluminium Al^{3+} . Si le pH environnant repasse au dessus de 4, le gel d'alumine va se reformer à la surface du mortier d'aluminate de calcium (fig. 6).

Ce gel d'alumine se développe en surface du mortier, bouchant la porosité et modifiant ainsi les propriétés de surface du matériau, ce qui peut induire un moins bon attachement des cellules bactériennes. Il serait ainsi intéressant d'étudier la nature des molécules mises en place lors de l'attachement et lors du développement du biofilm. En effet, les cellules bactériennes vont produire des substances polymériques extracellulaires (EPS : extracellular polymeric substances), constituées principalement de sucres et de lipides

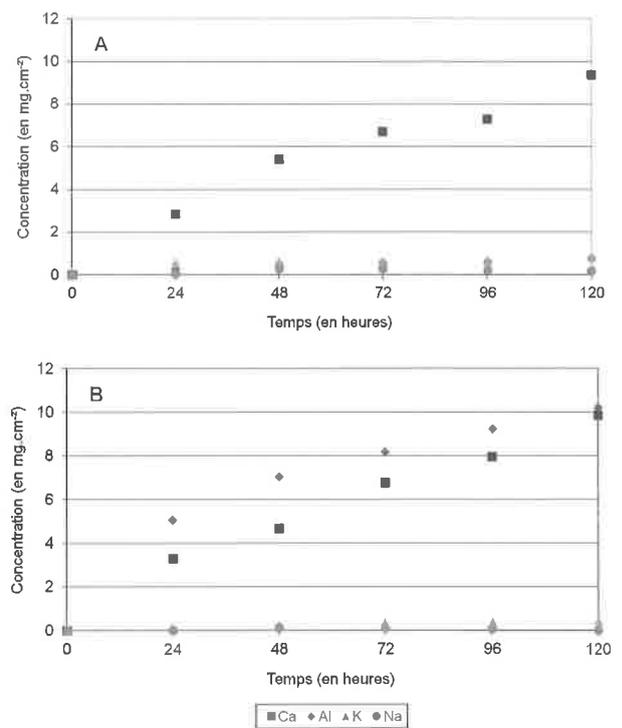


Fig. 5. Dissolution des ions calcium, aluminium, potassium et sodium au cours du temps lors d'une attaque acide ($\text{pH} = 1$) de mortier à base de ciment Portland (A) et à base d'aluminate de calcium (B).

Fig. 5. Calcium, aluminum, potassium and sodium ion dissolution under an acid attack ($\text{pH}=1$) of mortar made of Portland cement (A) and calcium aluminate cement (B).

(Gehrke *et al.*, 1998), essentielles à leur attachement au substrat (Sand et Gehrke, 2006). La composition des EPS est propre à chaque espèce, mais elle varie également en fonction du substrat (Sand et Gehrke, 2006). De plus, les EPS sont les composants essentiels de l'architecture de la matrice des biofilms (Sutherland, 2001). Cette matrice va varier fortement en fonction des cellules présentes, de leurs états physiologiques, des nutriments disponibles et des conditions physico-chimiques (Sutherland, 2001). C'est pourquoi il serait intéressant de mener une étude spécifique sur la nature de ces molécules en utilisant par exemple des fluorochromes spécifiques des protéines, des polysaccharides ou des lipides... Cette expérience permettrait d'apprécier l'impact du gel d'alumine et d'observer si la reconnaissance des mortiers à base de ciment Portland et d'aluminate de calcium est la même par les bactéries.

Un autre point important pour mieux comprendre cette différence de colonisation est d'étudier étape par étape la formation du biofilm et d'être capable de déterminer quelles espèces bactériennes se développent à la surface



Fig. 6. Formation du gel d'alumine (dépôt blanchâtre) à la surface d'un échantillon de mortier à base de ciment d'aluminat de calcium exposé 24 h dans une solution acide de pH 3 puis pendant 39 jours à pH 4,5.

Fig. 6. Alumina gel formation on the surface of a mortar sample made of calcium aluminate cement exposed in an acid solution at pH = 3 for 24 h and at pH = 4.5 for 39 days.

des échantillons et de vérifier si ce développement suit bien les successions décrites dans la littérature (Roberts *et al.*, 2002; Okabe *et al.*, 2007). Enfin, une étude sur l'évolution du pH au cours de la colonisation microbienne semble également importante à mener afin d'évaluer la capacité de neutralisation à l'acide des deux matériaux cimentaires.

CONCLUSION

Les observations microscopiques de la colonisation des mortiers à base de ciment Portland et à base de ciment d'aluminat de calcium permettent de mettre en évidence une moins bonne colonisation du mortier contenant du ciment d'aluminat de calcium. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence d'ions aluminium à la surface des mortiers et par le changement des propriétés de surface lié à la formation du gel d'alumine. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires afin d'expliquer la différence de comportement des bactéries sur ces deux mortiers. Il est en effet fondamental de savoir si les bactéries sont inhibées par la présence de l'aluminium ou par les propriétés de surface. Pour cela, l'utilisation de sondes spécifiques à chaque nature de molécule semble être un choix intéressant. Cette connaissance permettra de mieux comprendre les mécanismes entrant en jeu lors de la biodétérioration et d'apporter des pistes pour déterminer quels matériaux sont les plus adaptés à l'environnement des réseaux d'assainissement.

Remerciements : Les auteurs remercient Kerneos pour son soutien financier.

RÉFÉRENCES

- Garcidueña Piña R. et Cervantes C., 1996. Microbial interactions with aluminium. *Biometals*, 9, 311–316.
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D. et Sand W., 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2743–2747.
- Herisson J., van Hullebush E.D., Moletta-Denat M., Taquet P. et Chaussadent T., 2012. Toward an accelerated biodeterioration test to understand the behavior of Portland and calcium aluminate cementitious materials in sewer networks. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, in press.
- Jensen H.S., Nielsen A.H., Hvitved-Jacobsen T. et Vollertsen J., 2008. Hydrogen sulfide initiated corrosion in concrete sewers – a conceptual approach for prediction. 11th International Conference on Urban Drainage, Edinburgh, Scotland, UK, 1–10.
- Jolley R.A. et Forster C.F., 1985. The kinetics of sulphide oxidation. *Environ. Tech. Lett.*, 6, 1–10.
- Kuenen J.G. et Beudeker R.F., 1982. Microbiology of thiobacilli and other sulphur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 298, 473–497.
- Lamberet S., Guinot D., Lempereur E., Talley J. et Alt C., 2008. Field investigations of high performance calcium aluminate mortar for wastewater applications. In: Fentiman C.H., Mangabhai R.J. et Scrivener K.L. (eds.), *Calcium aluminate Cements*, Avignon.
- Okabe S., Odagiri M., Ito T. et Satoh H., 2007. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 971–980.
- Roberts D.J., Nica D., Zuo G. et Davis J.L., 2002. Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 49, 227–234.
- Sand W., et Gehrke T., 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.*, 157, 49–56.
- Sutherland I.W., 2001. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9, 222–227.
- Vincke A., Vertichel S., Monteny J. et Verstraete W., 1999. A new test procedure for biogenic sulfuric acid corrosion in concrete. *Biodegradation* 10, 421–428.
- Webb J.S., Thompson L.S., James S., Charlton T., Tolker-Nielsen T., Koch B., Givskov M. et Kjelleberg S., 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.*, 185, 4585–4592.
- Wilmot P.D., Cadee K., Katinic J.J. et Kavanagh B.V.J., 1988. Kinetics of sulfide oxidation by dissolved oxygen. *J. WPCF*, 60, 1264–1270.