

Projet National PERFDUB

approche PERFormantielle de
la DURabilité des ouvrages en
Béton

Site internet : www.perfdub.fr
Plateforme collaborative : www.omnispace.fr/perfdub

Groupe de travail : **GT1 – Essai de durabilité**
Titre du document : **Essai accéléré de biodétérioration**

Essai accéléré de biodétérioration pour qualifier les matériaux cimentaires destinés à l'assainissement en présence d'hydrogène sulfuré

Ce document est issu des travaux du Projet National Perfdub.

INDICE	INTITULE	Contributeurs	DATE
0	Mode opératoire provisoire – V0	M. Guéguen A. Bertron	24/01/2022

Sommaire

Sommaire	2
Introduction	3
1 Généralités et domaine d'application.....	3
2 Références normatives	4
3 Termes et définitions, symboles et unités.....	4
4. Essai accéléré biodétérioration en présence d'hydrogène sulfuré (H₂S)	4
5. Essai accéléré de biodétérioration utilisant le tétrathionate (S₄O₆²⁻) comme source de soufre réduit (BAC Test)	9
6. Procédure pour valider le potentiel sulfo-oxydant d'un consortium microbien environnemental.....	17
Bibliographie	18

Introduction

Dans le cadre de l'essai de performance des matériaux cimentaires en environnement d'assainissement en présence d'hydrogène sulfuré, deux modes opératoires ont été retenus. Il s'agit d'essais de vieillissement accéléré sur éprouvettes de béton qui consistent en l'exposition à une activité biologique sulfo-oxydante. Les différents paramètres d'essais ont été choisis de manière à accélérer suffisamment l'attaque pour obtenir un test discriminant sur béton ou mortier sur une durée de 12 ou 24 semaines.

Deux méthodes sont disponibles pour la détermination de la résistance du béton à la biodétérioration par l'acide sulfurique biogénique, elles diffèrent notamment par la nature de la source de soufre réduit :

- Méthode 1 « Essai accéléré de biodétérioration en présence d'hydrogène sulfuré (H_2S) ». Cette méthode a été initiée au Fraunhofer UMSICHT Oberhausen [1] et est développée à l'Université Gustave Eiffel [2-3] (partie 4).
- Méthode 2 « Essai accéléré de biodétérioration utilisant le tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$) comme source de soufre réduit (BAC Test) ». Cette méthode a été développée à l'INSA Toulouse, au cours de plusieurs travaux [4]-[7] (partie 5).

Le choix entre deux protocoles dépend de l'équipement disponible dans le laboratoire d'analyse.

Les protocoles nécessitent l'utilisation d'un consortium microbien dont l'activité sulfo-oxydante doit être vérifiée préalablement à l'essai (partie 6).

1 Généralités et domaine d'application

L'attaque du béton par l'acide sulfurique biogénique (parfois appelée corrosion par l'acide sulfurique biogénique) se produit dans un certain nombre de situations, notamment dans les réseaux d'assainissement, les systèmes de drainage des bâtiments, les stations d'épuration et les ouvrages de méthanisation. La production d'acide sulfurique biogénique (H_2SO_4), par le métabolisme lithotrophe des bactéries oxydant le soufre ou les composés sulfurés, conduit à une attaque biochimique sur les surfaces. La production d'acide sulfurique est le résultat de divers processus métaboliques dans le cycle biologique du soufre, qui est réalisé par les bactéries sulfato-réductrices (SRB) et sulfo-oxydantes (SOB). La figure 1 illustre le cycle du soufre à l'origine de l'attaque sur le béton dans les canalisations d'assainissement.

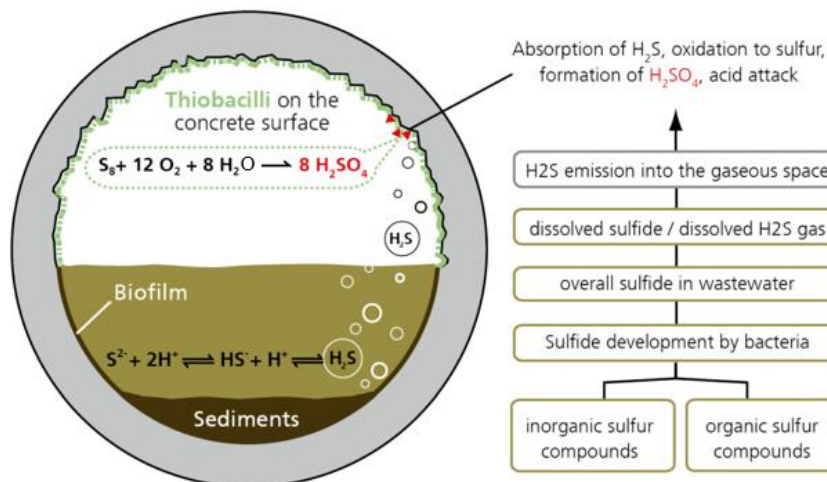


Fig. 1: Mécanisme de formation de l'acide sulfurique biogénique dans l'exemple d'une canalisation d'assainissement en béton d'après Bock et al[8]

Dans les eaux usées, le sulfure est produit en condition aérobie à partir de composés organiques sulfurés par des micro-organismes méthylophiles ainsi qu'en condition anaérobie dans les dépôts de boues à partir de composés inorganiques comme le sulfate par des bactéries sulfato-réductrices, qui sont ensuite transformés en sulfure d'hydrogène (H_2S). Le gaz H_2S émis dans la partie aérienne de la canalisation condense à la surface (alcaline) des tuyaux et subit une auto-oxydation en produits intermédiaires tels que le soufre et d'autres composés sulfurés réduits, notamment les polythionates. Les SOB comme les Thiobacilli convertissent ensuite le H_2S et/ou les intermédiaires réactionnels (soufre élémentaire et polythionates) en acide sulfurique, attaquant les matériaux cimentaires.

Les interactions entre la microflore et le substrat cimentaire conditionnent les mécanismes et la sévérité de l'attaque. Des tests incluant une composante biologique sont donc nécessaires. Les tests de biodétérioration présentés ci-après sont adaptés à tout environnement où l' H_2S est présent et sont applicables aux matériaux cimentaires mortiers et bétons.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

FD P 18-011 : Béton -Définition et classification des environnements chimiquement agressifs -Recommandations pour la formulation des bétons.

NF EN 206/CN, Béton — *Partie 1 : Spécification, performances, production et conformité.*

NF EN 12390-2, *Essais pour béton durci — Partie 2 : Confection et conservation des éprouvettes pour essais de résistance.*

NF EN 12390-3, *Essais pour béton durci - Partie 3 : Résistance à la compression des éprouvettes.*

NF P18-459, *Essai de porosité à l'eau et masse volumique sur béton durci.*

EN ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique - Spécification et méthodes d'essai.*

EN 196-1, *Méthodes d'essais des ciments - Partie 1 : détermination des résistances*

3 Termes et définitions, symboles et unités

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions, symboles et unités sont présentés dans les parties 4 et 5.

4. Essai accéléré biodétérioration en présence d'hydrogène sulfuré (H₂S)

L'essai de vieillissement accéléré de biodétérioration en présence d'H₂S consiste en un préconditionnement d'éprouvettes de mortier ou de béton pendant 15 jours à 100 ppm d'H₂S, puis à l'inoculation de boue activée et enfin à l'incubation pendant 6 mois des éprouvettes à une concentration en H₂S supérieure à 60 ppm.

4.1. Termes et définitions, symbole et unités

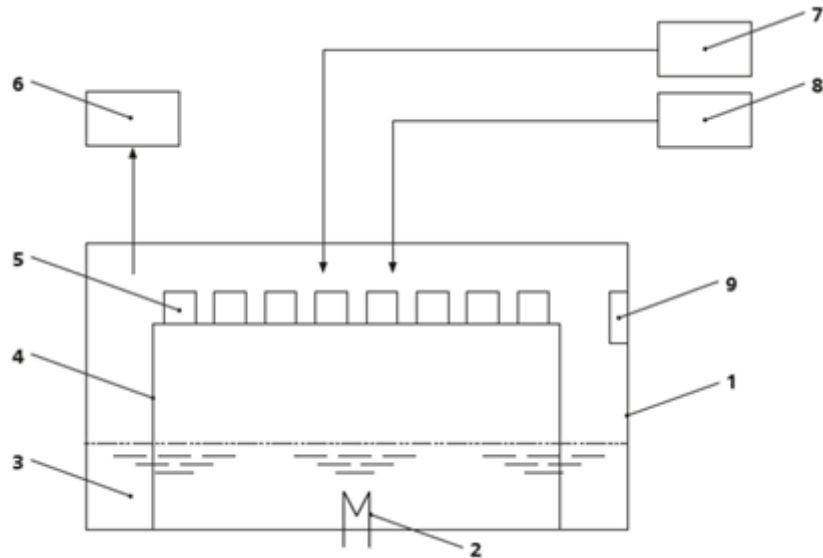
$I_{bio/tem}$: indice de dégradation normalisé par rapport à celui d'un matériau témoin à base de CEMI SR0

I_{bio} : Epaisseur dégradée du matériau à analyser

I_{tem} : Epaisseur dégradée du matériau témoin à base de CEMI SR0

4.2. Matériel

- Enceinte de biodétérioration : Elle doit être hermétique pour éviter tout risque de fuite d'H₂S. Sa géométrie peut varier en fonction du volume souhaité (nombre d'échantillons à étudier). L'exemple donné sur la figure 1 correspond à une enceinte de géométrie cylindrique ou cubique de volume 75 jusqu'à 300 L, fermée par un couvercle avec un joint. En partie basse de l'enceinte un système d'évacuation de la phase liquide est nécessaire. Le liquide est rempli jusqu'à une hauteur de 20 cm et la température est maintenue par une ceinture chauffante extérieure ou un système d'échangeur de chaleur. Le couvercle est adapté aux entrées de matière (pulvérisation de nutriments, apport d'H₂S) et aux sorties de gaz contenant de l'H₂S.



- | | |
|------------------------------------|---|
| 1- Enceinte | 6- Sortie |
| 2- Système de régulation thermique | 7 - Apport en nutriment |
| 3- Eau | 8- Apport en H ₂ S |
| 4- Support pour les échantillons | 9- Capteurs H ₂ S, Température, HR |
| 5- Echantillons | |

Fig. 2 : Schéma de l'installation d'essai

- Des conteneurs (en verre ou en plastique) pour les réactifs ou dans lesquels les réactions sont opérées sont placés dans ou hors de l'enceinte.
- Pompes péristaltiques pour introduire les réactifs avec précision
- Capteur de mesure de concentration d'H₂S asservi au système de production d'H₂S
- Capteur de température
- Capteur d'humidité
- Système de pulvérisation pour les nutriments
- Ceinture chauffante ou système de chauffage pour obtenir une température de 30°C à l'intérieur de l'enceinte
- Raccords de tuyaux et tuyaux
- Support pour chaque formulation de matériaux à étudier. La surface de contact entre l'échantillon et le support doit être drastiquement limitée pour éviter toute rétention de liquide
- Etuve à 40°C à circulation d'air
- Balance avec une précision de 0,01 g
- Pied à coulisse
- Appareil photo
- Papier indicateur de pH ou pH-mètre avec électrode de surface
- Centrifugeuse

4.2. Réactifs

Sauf spécification contraire, les produits chimiques utilisés sont des produits chimiques de pureté analytique.

- Eau distillée, eau déminéralisée ou eau de pureté équivalente (pH compris entre 5 et 7,5) avec une conductivité inférieure à 0,1 (ou 0,5) mS.m⁻¹ conformément à la qualité 2 (ou 3) spécifiée dans EN ISO 3696
- Sulfure de sodium Na₂S
- Acide hydrochlorique HCl
- Acétate de zinc
- CaCl₂.2H₂O
- MgCl₂.2H₂O
- NH₄Cl
- Na₂S₂O₃.5H₂O

4.3. Corps d'épreuve

Pour l'essai, des échantillons de matériau cimentaire représentatifs sont utilisés. Dans le cas de mortiers ils ont une dimension de 2 cm x 2 cm x 2 cm extraits par sciage à partir d'un mortier coulé dans un moule 4x4x16 ou 2x2x16. Dans le cas de béton, ils sont prélevés sur un cylindre de béton 11 cm x 22 cm par sciage afin d'obtenir des demi-rondelles d'épaisseur 2 cm.

Les échantillons testés sont fabriqués selon la procédure spécifiée par le demandeur. L'échantillon de mortier témoin est formulé avec un ciment CEM I SR0 et est préparé selon la norme EN 196-1. L'échantillon de béton témoin est formulé avec un ciment CEM I SR0 dosé à 350 kg/m³, avec un rapport eau sur ciment de 0,5 et des granulats de référence siliceux conformes aux exigences de la norme NF EN 480-1 (un adjuvant réducteur d'eau peut être utilisé si nécessaire).

Le nombre d'échantillons à préparer est de 5 pour chaque formulation (formulations témoin ou à tester).

Après démoulage, les échantillons de mortier ou de béton témoin sont conservés dans des sacs scellés (hydratation endogène) pendant 28 jours. Sans recommandation du demandeur, la même procédure est appliquée aux échantillons de mortier et de béton à qualifier. Après le sciage des échantillons de mortiers et de bétons, toutes les surfaces des prismes obtenus doivent être poncées avec du papier abrasif humide de qualité 320, en appliquant une pression uniforme sur chaque surface pendant environ 15 secondes. Toute poussière abrasive adhérente est ensuite soigneusement enlevée de la surface.

4.4. Essais sur matériau préalablement à l'essai

Les échantillons de matériaux étudiés sont référencés. Etant donné qu'une écriture sur les échantillons peut disparaître pendant le test, il est recommandé de prendre une photo des échantillons et du support d'échantillon avec la référence de l'échantillon inscrite sur le support d'échantillon. De plus, les positions des échantillons sur le support doivent être enregistrées en utilisant une nomenclature.

Mesurer la masse de tous les échantillons. Ensuite, la masse sèche de tous les échantillons est mesurée après 3 jours dans une étuve à 40°C.

Mesurer les dimensions des échantillons (+/- 0,1 mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

Mesurer le pH de surface de l'échantillon (+/- 0,2 pH) avec un indicateur de papier pH ou un pH-mètre avec une électrode de surface. Si les surfaces des échantillons sont sèches, placer une goutte d'eau déminéralisée (environ 0,1 ml) au milieu de la surface, attendre 15 secondes et effectuer la mesure.

Prendre une photo de chaque côté de chaque échantillon. Une échelle graduée doit figurer sur les photographies (incrément +/- 1 mm).

4.5. Conduite de l'essai

4.5.1. Préconditionnement

Le but de ce pré-traitement est de diminuer le pH de surface de l'échantillon testé pour permettre l'implantation de l'activité micro-biologique.

Introduire de l'eau au fond de l'enceinte et démarrer le système de température (réglage de la température à 30°C). Vérifier l'humidité relative dans l'enceinte à 100 %.

Disposer tous les échantillons sur leur support dans l'enceinte de biodétérioration.

Préparer une solution d'acétate de zinc (2 L à 50 g/L) dans un bécher (afin de neutraliser l'H₂S en sortie d'enceinte) ou utiliser un système d'évacuation.

Préparer une solution de sulfure de sodium (Na₂S) (2 L à 0,08 mol/L) et une solution d'acide chlorhydrique (2 L à 1,40 mol/L) dans deux béchers séparés.

NB : Les concentrations de Na₂S et HCl sont données à titre indicatif pour les concentrations H₂S ciblées. Cependant, des ajustements peuvent être nécessaires pour obtenir ces concentrations (corrélation concentration/débit). La production d'H₂S peut être réalisée dans l'enceinte ou à l'extérieur de l'enceinte par un réacteur séparé.

Fermer l'enceinte et établir les connexions entre l'enceinte et la pompe doseuse, l'alimentation en H₂S, l'alimentation en nutrition et la solution d'acétate de zinc ou le système d'évacuation des gaz.

Démarrer l'alimentation en H₂S et vérifier que des bulles apparaissent dans la solution d'acétate de zinc ou que le système d'évacuation fonctionne.

Régler la pompe doseuse qui contrôle l'injection de solutions Na₂S et HCl pour une concentration moyenne en H₂S de 100 ppm ou utiliser une commande de pompe reliée au capteur H₂S pour avoir une valeur de 100 ppm.

Démarrer la pompe doseuse.

Cette étape de pré-traitement dure 2 semaines.

4.5.2. Inoculation de la surface des échantillons avec de la boue activée

Après vérification du potentiel sulfo-oxydant d'un consortium microbien (partie 6), centrifuger 50 ml de boues activées issues de station d'épuration dans des tubes Falcon® de 50 ml (un tube par échantillon à couvrir) à 3000 g pendant 20 minutes, puis éliminer le surnageant.

Répartir les boues activées sur toute la surface de chaque côté des échantillons à l'aide d'un pinceau.

Sécher pendant une heure afin que la boue puisse adhérer à la surface du matériau.

Replacer les échantillons dans l'enceinte à l'aide de supports et lancer le test de biodétérioration (veiller à conserver la position définie dans la première étape).

4.5.3. Test de biodétérioration

Mettre en place toutes les connexions entre le système de pulvérisation et l'enceinte. Pour l'alimentation en H₂S préparer 2 L de solution Na₂S à 0,08 mol/L et 2 L de solution HCl à 1,40 mol/L et connecter les conteneurs à la pompe doseuse.

Lancer l'injection d'air et vérifier que les bulles apparaissent bien dans la solution d'acétate de zinc. En cas d'utilisation d'un système d'évacuation du gaz, vérifiez que le système fonctionne.

Régler la pompe doseuse qui contrôle la production d'H₂S, par réaction des solutions Na₂S.9H₂O et HCl pour atteindre une concentration moyenne en H₂S supérieure à 60 ppm.

Préparer 2L de solutions nutritives (0,25 g/L de CaCl₂.2H₂O, 0,4 g/L de MgCl₂.2H₂O, 1,4 g/L de NH₄Cl et 5 g/L de Na₂S₂O₃.5H₂O).

Démarrer le système de contrôle pour la pulvérisation d'éléments nutritifs. Pendant le fonctionnement du test, les échantillons sont régulièrement aspergés d'une solution nutritionnelle pour apporter aux bactéries de l'azote, du phosphate et des micronutriments (oligo-éléments). Un volume de 1 L par semaine doit être utilisé pour une surface d'échantillon de 6000 cm².

NB Maintenance pendant l'essai : (i) vérifier le fonctionnement du capteur H₂S selon les instructions du fournisseur et (ii) vérifier et renouveler les différentes solutions si nécessaire (Na₂S.9H₂O, HCl, nutriments, acétate de zinc) et vidanger le béccher à l'intérieur de l'enceinte au cas où du H₂S serait produit.

4.6. Mesures

Au cours du test de biodétérioration, chaque mois procéder à l'arrêt et à l'ouverture de l'enceinte.

Arrêter l'alimentation en H₂S et attendre que la concentration en H₂S atteigne 0 ppm. Ouvrir l'enceinte et sortir les échantillons.

- Peser tous les échantillons (+/- 0,01 g).
- Mesurer des dimensions des échantillons (+/- 0,1 mm).
- Prendre une photo de tous les échantillons (une échelle doit figurer sur les photographies avec incrément de 1 mm).
- Mesurer le pH des échantillons (+/- 0,1 valeur pH).

A la fin de l'essai, après avoir procédé aux analyses précédentes, sécher les échantillons pendant 1 semaine à 40°C dans l'étuve, les résiner puis les couper en 2.

Prendre une photo ou scanner les échantillons (une échelle doit figurer sur les photographies incrément de 1 mm) puis déterminer l'aire saine de l'échantillon. A partir de la différence entre l'aire initiale de l'échantillon et l'aire saine mesurée en déduire l'épaisseur dégradée.

4.7. Présentation des résultats

Le rapport d'essai doit préciser :

- Les caractéristiques des échantillons étudiés, des échantillons témoin documentées par la prise de photos de chaque échantillon (avec échelle).
- Les conditions environnementales (T, H₂S) dans l'enceinte, qui ont été suivies et enregistrées pendant le test.
- La masse et pH de surface résultant de chaque échantillon au cours et à la fin du test.
- Les calculs de valeurs moyennes qui seront utilisées pour déterminer l'indice de dégradation
- L'indice de dégradation normalisé par rapport à celui d'un matériau témoin à base de CEM I SR0 pour tous les échantillons à tester :

$$I_{\text{bio/tem}} = \text{Epaisseur dégradée de l'échantillon} / \text{Epaisseur dégradée du témoin}$$

4.7.1 Avant l'essai

Le tableau 1 présente les données collectées avant le début de l'essai pour un échantillon à tester (noté Ech) et le matériau témoin (noté Tem). Tous les matériaux sont testés en cinq exemplaires, donc 10 échantillons sont exposés.

Tableau 1: données à collecter pour chaque échantillon de matériau avant l'essai.

Echantillons de matériau	Masse (g)	Dimensions (en mm)	pH
Tem_1			
Tem_2			
Tem_3			
Tem_4			
Tem_5			
Ech_1			
Ech_2			
Ech_3			
Ech_4			
Ech_5			

L'activité de consortium sulfo-oxydant a été vérifiée suivant le protocole de la partie 6 du présent document.

4.7.2 Rapport au cours de l'essai

Les conditions d'exposition à l'H₂S (Tableau 2) dans l'enceinte doivent être indiquée mensuellement en indiquant la valeur moyenne, l'écart-type, la médiane, le 3ème quartile ainsi que la valeur maximale par mois. Ces mêmes indications seront données pour l'ensemble de la durée d'exposition.

Tableau 2: données à collecter mensuellement pour la teneur en H₂S.

	Moyenne	Ecart Type	Médiane	3ème quartile	Maximum
Pré-traitement					
Mois 1					
Mois 2					
Mois 3					
Mois 4					
Mois 5					
Mois 6					
Bilan sur 6 mois					

Le tableau 3 présente les données et les résultats collectés pour un matériau exposé après le pré-traitement puis à chaque mois.

Tableau 3 : données à collecter pendant l'essai à chaque mois d'échantillonnage.

	Masse (g)	Dimensions (en mm)	pH
Pré-traitement			
Mois 1			
Mois 2			
Mois 3			
Mois 4			
Mois 5			
Mois 6			



5.4.2 Rapport en fin d'essai

Tracer les variations moyennes et les écart types de masse, dimension et pH de chaque formulation en fonction du temps.

Présenter les photos des échantillons pour chaque mois d'exposition pour tous les échantillons exposés.

Présenter les photos/scan des échantillons de chaque échantillon résiné et scié puis en déduire l'épaisseur moyenne dégradée par formulation puis en déduire $I_{bio/tem} = \text{Epaisseur dégradée de l'échantillon} / \text{Epaisseur dégradée du témoin}$

Tableau 4 : Coupes transversales des différentes formulations après 6 mois d'incubation.

	6 mois d'incubation	
Tem		
Ech		

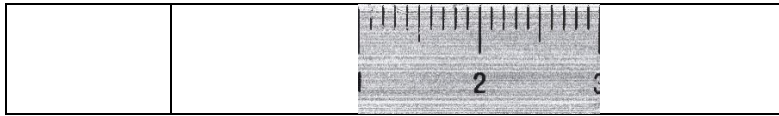


Tableau 6 : Epaisseur moyenne dégradée des différentes formulations après 6 mois d'incubation et indice $I_{\text{bio/tem}}$.

Echantillon de matériau	Epaisseur moyenne dégradée	$I_{\text{bio/tem}}$
Tem		
Ech		

5. Essai accéléré de biodétérioration utilisant le tétrathionate ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) comme source de soufre réduit (BAC Test)

Le test de biodétérioration est adapté à tout environnement où le H_2S est présent et est applicable à tous les mortiers et bétons, avec ou sans adjuvants (produits chimiques, biocide, etc.). Les échantillons de matériaux cimentaires sont d'abord inoculés avec un consortium microbien environnemental (une boue activée), puis sont exposés au ruissellement d'une solution d'alimentation contenant une source de soufre réduit, le tétrathionate ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$), et des nutriments. En présence d'oxygène (naturellement présent dans l'air), les microorganismes oxydant le soufre présent dans le consortium se développent préférentiellement et oxydent le tétrathionate ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) en acide sulfurique biogène à la surface des échantillons cimentaires exposés. Pour garantir la performance de l'essai, l'activité d'oxydation du soufre de la boue activée doit être validée en utilisant la procédure présentée en partie 6.

Un mortier ou béton témoin est systématiquement testé, afin de (i) valider le bon fonctionnement de l'essai (dégradation du matériau) et (ii) de fournir une référence pour l'évaluation des performances des autres matériaux.

La durée d'exposition des échantillons à la solution de ruissellement est de 3 mois. La solution ruisselante est prélevée toutes les semaines en aval de chaque échantillon pour analyser la concentration en ions calcium et sulfate et mesurer le pH. Pour classer les mortiers et bétons en fonction de leur résistance à la biodétérioration par l'acide sulfurique biogène, on utilise le rapport entre le calcium lessivé cumulé, normalisé par le calcium initialement présent dans les matériaux exposés en fonction de la quantité totale de sulfate produit (correspondant à l'acide biogénique produit).

5.1. Symboles

d_n : jour d'échantillonnage de la solution de lixiviation (jour)

m_0 : masse sèche d'un échantillon après protocole de séchage, sans résine époxy (en grammes)

m_1 : masse sèche d'un échantillon recouvert de résine époxy (en grammes)

L : longueur de l'échantillon (m)

w : largeur de l'échantillon (m)

t_h : épaisseur de l'échantillon (m)

S : surface exposée (m^2)

mv_0 : masse initiale du flacon vide destiné à recueillir la solution de lixiviation pour chaque échantillon de matériau (en grammes)

mv_n : masse du flacon contenant la solution de lixiviation collectée pour chaque échantillon de matériau au jour d'échantillonnage d_n (en grammes)

$\text{Tot}(\text{Ca})_{\text{ini}}$: teneur initiale en calcium dans le matériau exposé (en mol)

t_n : temps d'échantillonnage au jour d'échantillonnage d_n (en heures)

Q_{d_n} : débit d'eau ruisselant à la surface du matériau exposé le jour de l'échantillonnage d_n .

$[i]_{d_n}$: concentration mesurée dans la solution de lixiviation au jour d'échantillonnage d_n (en mol/L)

$F(\text{SO}_4^{2-})_{d_n}$: flux ponctuel de sulfate produit pour chaque échantillon au jour d'échantillonnage d_n (en mol/d)

$F(\text{SO}_4^{2-})_{d_{n+1}}$: flux ponctuel de sulfate produit pour chaque échantillon au jour d'échantillonnage d_{n+1} (en mol/j)

$\text{Tot}(\text{SO}_4^{2-})_{d_{n+1} - d_n}$: quantité de sulfate produite pour chaque échantillon entre le jour d'échantillonnage d_n et le jour d'échantillonnage d_{n+1} (en mol)

$\text{Tot}(\text{SO}_4^{2-})_{d_n}$: quantité totale de sulfate produite pour chaque échantillon depuis le début de l'exposition à l'essai jusqu'au jour de prélèvement d_n (en moles).

$\text{FLixi}(\text{Ca}^{2+})_{d_n}$: flux ponctuel de calcium lixivié pour chaque échantillon au jour d'échantillonnage d_n (en mol/j)

$\text{Lixi}(\text{Ca}^{2+})_{d_{n+1} - d_n}$: quantité de calcium lixivié pour chaque échantillon entre le jour d'échantillonnage d_n et le jour d'échantillonnage d_{n+1} (en mol).

$Lixi(Ca^{2+})_{dn}$: quantité totale de calcium lixivié pour chaque échantillon depuis le début de l'exposition à l'essai jusqu'au jour de prélèvement dn (en moles).

CaTot : quantité totale de calcium contenu dans le matériau exposé (mol)

$(LixiCa/CaTot)_{dn}$: quantité totale de calcium lixivié pour chaque échantillon divisée par la teneur initiale en calcium dans le matériau exposé depuis le début de l'exposition à l'essai jusqu'au jour de prélèvement dn (en mol/mol).

I_{LixiCa} : Indice de lixiviation du calcium ($molCa^{2+}/molCa^{2+}/molSO_4^{2-}$)

$I_{bio/tem} = I_{bio}/I_{tem}$: indice de dégradation normalisé par rapport à celui d'un matériau témoin à base de CEM I SR0

I_{bio} : Indice de lixiviation du Calcium du matériau à analyser

I_{tem} : Indice de lixiviation du Calcium du matériau témoin à base de CEM I SR0

5.2. Méthode d'essai

5.2.1 Vue d'ensemble

Le principe général est d'exposer la surface d'un échantillon de mortier cimentaire inoculé avec un consortium microbien à une solution de ruissellement contenant une forme soluble de soufre réduit (tétrathionate) pour développer une activité biologique d'oxydation du soufre en contact avec l'échantillon exposé. Cette activité sulfuroxydante produit de l'acide sulfurique à la surface du matériau cimentaire, ce qui entraîne sa biodétérioration. La durabilité du matériau est évaluée par comparaison avec un mortier ou béton témoin (à base de CEM I SR0) exposé dans les mêmes conditions. Le critère de performance est le rapport entre le calcium lessivé cumulé, normalisé par le calcium initialement présent dans le matériau exposé par mètre carré de surface exposée, et le sulfate produit (correspondant à l'acide produit).

5.2.2 Echantillonnage et corps d'épreuve

La taille recommandée de l'échantillon de mortier est de $8x4x2\text{ cm}^3$ (typiquement obtenu par le sciage en 4 parties égales d'échantillons de mortier de $4x4x16\text{ cm}^3$). La taille recommandée de l'échantillon de béton est de $8x4x2\text{ cm}^3$ (prélevé dans une éprouvette cylindrique de diamètre 11 cm et hauteur 22 cm).

Les échantillons testés sont fabriqués selon la procédure spécifiée par le demandeur. L'échantillon de mortier témoin est formulé avec un ciment CEM I SR0 et est préparé selon la norme EN 196-1. L'échantillon de béton témoin est formulé avec un ciment CEM I SR0 dosé à 350 kg/m^3 , avec un rapport eau sur ciment de 0,5 et des granulats de référence siliceux conformes aux exigences de la norme NF EN 480-1 (un adjuvant réducteur d'eau peut être utilisé si nécessaire).

Le nombre d'échantillons à préparer est de 3 pour chaque formule de mortier (mortier témoin et mortier à qualifier).

Le nombre d'échantillons à préparer est de 5 pour chaque formule de béton (béton témoin et béton à qualifier).

Après démoulage, les échantillons de mortier et de béton témoin sont conservés dans des sacs scellés (cure endogène) pendant 28 jours. Sans recommandation spécifique du demandeur, la même procédure est appliquée aux échantillons de mortier et de béton à qualifier.

Après le sciage des échantillons de mortier ou de béton, toutes les surfaces des prismes obtenus doivent être poncées avec du papier abrasif (320), en appliquant une pression uniforme sur chaque surface pendant environ 15 secondes. En fin de ponçage, retirer par soufflage à l'air comprimé toute trace de poussière sur l'échantillon.

5.2.2 Réactifs et équipement d'essai

Sauf indication contraire, la pureté des produits chimiques utilisés doit être adaptée à l'analyse.

L'eau utilisée doit être une eau distillée, déminéralisée, déionisée ou eau de pureté équivalente (5-pH-7,5) avec une conductivité inférieure à 0,1 (ou 0,5) $mS.m^{-1}$ conformément à la qualité 2 (ou 3) spécifiée dans la norme EN ISO 3696

Le milieu nutritif pour le consortium microbien doit contenir les composés suivants :

- $K_2S_4O_6$
- NH_4Cl
- $(Na(PO_3))_3$
- $MgCl_2, 6H_2O$
- $MnCl_2$
- $FeCl_3, 6H_2O$
- H_3BO_3
- $CoCl_2, 6H_2O$
- $ZnSO_4, 7H_2O$
- $Na_2MoO_4, 2H_2O$
- $CuSO_4, 5H_2O$
- $NiCl_2, 6H_2O$

Le pilote d'essai de biodétérioration est constitué des organes suivants :

- Cuve thermostatée ($4^\circ C$) 100 L (minimum) avec système de mélange ((1) dans la figure 2 et (2) pour le système thermostaté). La composition de la solution d'alimentation ((3) dans la figure 2) est décrite dans le chapitre 5.2.3.2.

- Pompes péristaltiques (débits 20 ± 5 ml/h) ((4) sur la figure 1) avec tubes (PTFE naturel 0.50-1.00 mm) et tubes de connexion.
- Plaque en plastique avec gel adhésif double face pour supporter les échantillons de matériau testé ((5) sur la figure 2).
- Support en inox ou en plastique pour la plaque en plastique et conçu pour incliner les échantillons de matériau testé ($5^\circ \pm 2^\circ$) (position de l'échantillon décrite dans la figure 2 (b) et (c)).

Bac de récupération des solutions lessivées avec système d'évacuation des liquides par gravité ((4) dans la figure 2).

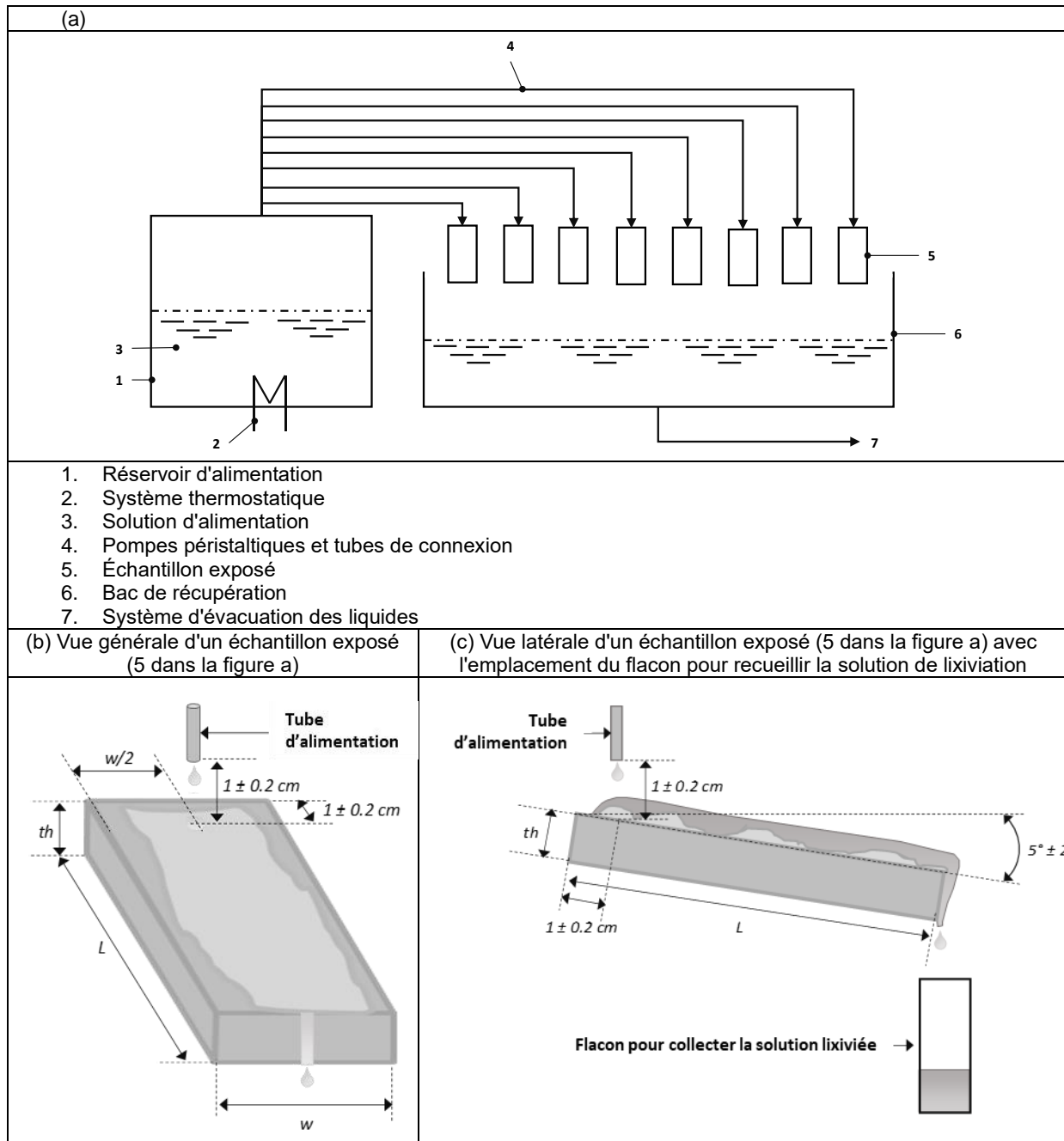


Figure 1: schéma du pilote de biodétérioration (BACTest) (a), et d'un échantillon exposé avec l'emplacement des tubes d'alimentation et du flacon pour l'échantillonnage de la solution de lixiviation (b) vue en perspective ; (c) vue de côté.

5.2.3 Procédure

5.2.3.1 Préparation des échantillons et des mesures avant l'essai (d0)

a) Pour les échantillons de mortier / béton

Peser chaque échantillon $\rightarrow m_0$ (en gramme)

Mesurez les dimensions des échantillons (longueur (L), largeur (w), épaisseur (th)). Utiliser un pied à coulisse $\pm 0,1$ mm.

Pour exposer une surface définie, conserver la face moulée de 4×8 cm² libre et étaler la résine (résine époxy résistante à l'environnement acide) sur les 5 autres surfaces comme décrit dans la figure 3.

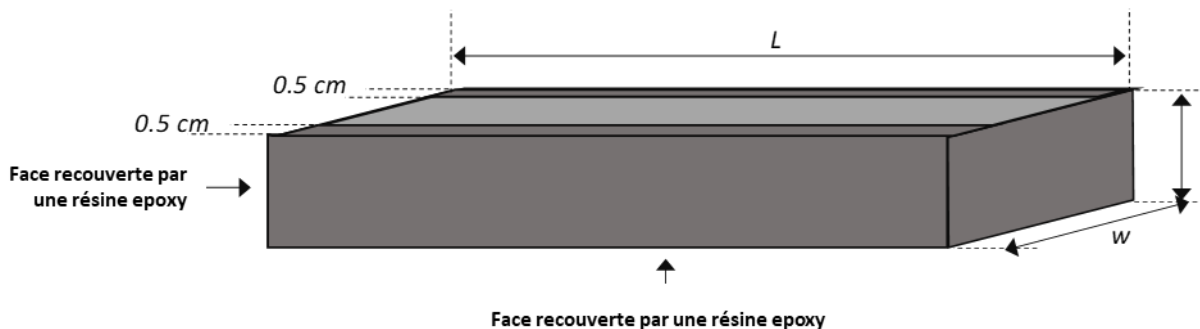


Figure 3: schéma de l'échantillon de mortier scié dont les faces sont recouvertes de résine époxy

Après avoir recouvert les surfaces non exposées avec la résine époxy :

Peser chaque échantillon $\rightarrow m_1$ (en gramme)

Prendre une photo de chaque échantillon.

b) Pour l'analyse de la solution de lixiviation

- préparer un flacon de 50 ml par échantillon de mortier et l'étiqueter en conséquence

- peser chaque flacon fermé $\rightarrow mv_0$ (en gramme)

5.2.3.2 Préparation des échantillons et des mesures avant l'essai (d0)

Remplir le réservoir d'alimentation avec de l'eau déminéralisée.

Ajouter les sels nutritifs à l'eau déminéralisée. La solution d'alimentation est constituée d'eau déminéralisée et de divers sels dissous, préparés au préalable et stockés dans des bouteilles en verre séparées, conservées à 4°C pour éviter toute croissance microbienne. Le tableau 3 donne la composition de la solution d'alimentation.

Tableau 3: composition de la solution d'alimentation

Composé	Concentration	Unité	Sel
$S_4O_6^{2-}$	158,86	mgS- $S_4O_6^{2-}$ /l	$K_2S_4O_6$
N- NH_4^+	3,93	mgN- NH_4^+ /l	NH_4Cl
P	1,71	mgP/l	$(Na(PO_3))_3$
Mg^{2+}	0,18	mg Mg^{2+} /l	$MgCl_2, 6H_2O$
Mn^{2+}	0,03	mg Mn^{2+} /l	$MnCl_2$
Fe^{3+}	0,02	mg Fe^{3+} /l	$FeCl_3, 6H_2O$

Cette solution est complétée par une solution d'oligo-éléments (5 ml pour 200 L de solution d'alimentation). Le tableau 4 donne la composition de cette solution de micronutriments.

Tableau 4 : composition de la solution d'éléments trace

Composé	mg/L
H_3BO_3	0.3
$CoCl_2, 6H_2O$	0.2
$ZnSO_4, 7H_2O$	0.1
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0.03
$CuSO_4, 5H_2O$	0.01

NiCl ₂ , 6H ₂ O	0.02
---------------------------------------	------

5.2.3.3 Inoculation de la surface de l'échantillon avec la boue activée

L'objectif est de pré-ensemencer la surface du matériau avec un consortium microbien provenant du système d'assainissement. Ce type de consortium microbien est connu pour être diversifié en termes de populations microbiennes présentes. Le contrôle de l'environnement (solution d'alimentation, surface exposée des matériaux) permet de sélectionner l'activité microbienne correspondant à celle présente sur les parois de matériaux cimentaires en réseaux d'assainissement.

Préalablement à l'essai, l'activité sulfo-oxydante du consortium doit être vérifiée selon le protocole détaillé dans la partie 6 de ce document.

Centrifuger 500 mL de boues activées à 4000 rpm.

Retirer le surnageant de tous les flacons.

Récupérer la pâte brun-noir (phase solide correspondant à la matière organique en suspension des boues activées contenant des micro-organismes).

Recouvrir la surface des matériaux à exposer avec la pâte brun-noir à l'aide d'un pinceau.

Laisser sécher pendant une heure afin que la boue adhère à la surface du matériau.

5.2.3.4 Début de l'essai

Placez l'échantillon de mortier ou de béton sur le support de façon à ce que le tube d'alimentation soit positionné à 1 cm au-dessus de l'échantillon et que la goutte tombe sur la surface exposée comme présenté dans la figure 1 (b et c).

Démarrer les pompes péristaltiques.

Contrôler que la goutte tombe bien au sommet de la surface exposée du matériau.

Attendre que la première goutte tombe du matériau après ruissellement. Si le film liquide ne couvre pas toute la surface du matériau, étaler doucement le film liquide sur la surface avec un pinceau (le biofilm n'est pas encore formé, donc aucun risque de le perturber).

Attendre une heure et prélever un échantillon de la solution lessivée pour chaque matériau exposé.

5.2.3.5 Mesures au cours de l'essai

Au jour n (d_n), arrêter les pompes péristaltiques (jours d'échantillonnage : 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91).

Placer un flacon vide de 50 mL (préalablement pesé) en aval de chaque échantillon (voir figure 3).

Démarrer les pompes péristaltiques et mesurer le temps d'échantillonnage.

Après 1 heure +/- 5 minutes, arrêter les pompes péristaltiques. Notez le temps exact d'échantillonnage t_n (en heures).

Calculer le débit exact d'eau ruisselant sur les surfaces exposées (Q_{tn} exprimé par exemple le débit en ml/h au jour d_n). Peser chaque flacon avec la solution lessivée récupérée m_{vn} (en gramme).

L'équation 1 présente pour un échantillon le calcul de Q_{dn}

$$Q_{dn} = (m_{vn} - m_{v0}) / t_n \quad (1)$$

Mesurer le pH (± 0,1) de la solution lessivée pour chaque échantillon. Noter les valeurs pH_n (± 0,1) pour chaque échantillon.

Filtrer la solution à 0,45 µm pour éliminer tous les micro-organismes et particules. Stocker l'échantillon liquide à 4°C pour limiter les activités microbiennes.

Analyser la concentration en sulfate et en calcium.

NB : la concentration en sulfate est mesurée par chromatographie ionique (anionique DIONEX-Thermofisher : IC25, IonPacTM AS19, à 30 C avec générateur de cartouche d'éluant EGC III KOH), les concentrations de calcium et de magnésium sont mesurées par chromatographie ionique (DIONEX-Thermofisher : ICS 2000, IonPac CS12, à 30 C avec générateur d'éluant cartouche EGC III MSA pour acide méthanesulfonique DX320-Dionex Thermofisher).

5.2.3.6 Maintenance au cours de l'essai

Pour éviter la colonisation de la solution d'alimentation et des tubes par les microorganismes, et donc la production d'acide qui ne se ferait pas en contact avec le matériel exposé, il est nécessaire de procéder aux opérations de maintenance suivantes toutes les 2 semaines.

a) Renouvellement de la solution d'alimentation et nettoyage de la cuve d'alimentation

Recueillir 5 litres de la solution d'alimentation dans un récipient.

Placer les tubes d'alimentation dans le récipient nouvellement rempli pour continuer à alimenter le ruissellement sur la surface exposée pendant le nettoyage de la cuve d'alimentation.

Vider le réservoir d'alimentation

Nettoyer l'intérieur de la cuve avec une éponge et de l'eau de Javel.

Remplacer la solution d'alimentation.

b) Changement des tubes

Arrêter les pompes péristaltiques.

Changer tous les tubes entre le réservoir d'alimentation et la surface des échantillons exposés.

Redémarrer les pompes péristaltiques.

5.3. Expression des résultats

L'objectif est de calculer l'accumulation de calcium lessivé par rapport à la teneur initiale en calcium de l'échantillon exposé par mètre carré de surface exposée et de représenter ce paramètre en fonction de l'accumulation de sulfate (indicateur de la production d'acide biogène) comme indiqué à la figure 1 du chapitre 5.2.2. Ce format permet de faire un lien quantitatif direct entre la production d'acide et la détérioration du matériau. On dispose ainsi d'un critère de performance informatif et identifiable.

5.3.1 Teneur initiale en calcium des matériaux

Les données fournies par les fournisseurs de matériaux sont exprimées en $\text{Tot}(\text{Ca})_{\text{ini}}$ (mol) pour le calcium.

5.3.2 Sulfate produit cumulé

L'analyse hebdomadaire de la solution lixiviée fournit une mesure de la concentration en sulfate. Pour chaque échantillonnage au jour d_n , un flux ponctuel de sulfate produit est calculé. A titre d'exemple, l'équation 2 montre le calcul du flux de sulfate produit au jour d'échantillonnage d_n .

$$F(\text{SO}_4^{2-})_{d_n} = Q_{d_n} \times [\text{SO}_4^{2-}]_{d_n} \quad (2)$$

Où $F(\text{SO}_4^{2-})_{d_n}$ est le flux de sulfate produit à la date d_n (mol/j), Q_{d_n} le débit de la solution de ruissellement mesuré le jour de l'échantillonnage d_n (en L/j), et $[\text{SO}_4^{2-}]_{d_n}$ est la concentration de sulfate produit mesurée dans la solution lixiviée au jour de l'échantillonnage d_n (mol/L).

Le même calcul est effectué le jour de l'échantillonnage d_{n+1} et permet d'obtenir $F(\text{SO}_4^{2-})_{d_{n+1}}$. La quantité de sulfate produite entre le jour d'échantillonnage d_n et le jour d'échantillonnage d_{n+1} est calculée par l'équation 3.

$$\text{Tot}(\text{SO}_4^{2-})_{d_{n+1} - d_n} = ((F(\text{SO}_4^{2-})_{d_{n+1}} + F(\text{SO}_4^{2-})_{d_n})/2) \times (d_{n+1} - d_n) \quad (3)$$

Où $\text{Tot}(\text{SO}_4^{2-})_{d_{n+1} - d_n}$ est le sulfate cumulé produit entre le jour d'échantillonnage d_{n+1} et le jour de l'échantillonnage d_n (mol) et $(d_{n+1} - d_n)$ le temps entre les jours d'échantillonnage d_{n+1} (jours) and d_n (jours).

Pour chaque jour d'échantillonnage d_n calculer $\text{Tot}(\text{SO}_4^{2-})_{d_n - d_{n-1}}$ et les ajouter à ceux du temps d_n , pour obtenir $\text{Tot}(\text{SO}_4^{2-})_{d_n}$.

5.3.3 Calcium lixivié cumulé

L'analyse hebdomadaire de la solution lixiviée fournit une mesure de la concentration en calcium. Un flux de calcium lessivé pour chaque date d'échantillonnage doit être calculé. A titre d'exemple, l'équation 4 montre le calcul du flux de calcium lessivé au jour d_n (jours).

$$F\text{Lixi}(\text{Ca}^{2+})_{d_n} = Q_{d_n} \times [\text{Ca}^{2+}]_{d_n} \quad (4)$$

Où $F\text{Lixi}(\text{Ca}^{2+})_{d_n}$ est le flux du calcium lessivé au jour d_n (mol/j), Q_{d_n} le débit de la solution de ruissellement mesuré à la journée d_n (L/j), et $[\text{Ca}^{2+}]_{d_n}$ est la concentration de calcium lessivé mesurée dans la solution lessivée au jour t_n (mol/L).

Le même calcul est effectué au jour d_{n+1} pour obtenir $F(\text{Ca}^{2+})_{d_{n+1}}$. La quantité de calcium lixivié entre le jour d_n et le jour d_{n+1} est calculée par l'équation 5.

$$\text{Lixi}(\text{Ca}^{2+})_{d_{n+1} - d_n} = ((F\text{Lixi}(\text{Ca}^{2+})_{d_{n+1}} + F\text{Lixi}(\text{Ca}^{2+})_{d_n})/2) \times (d_{n+1} - d_n) \quad (5)$$

Où $Lixi(Ca^{2+})_{d_{n+1} - d_n}$ est le cumul de calcium lixivié entre le jour d_{n+1} et le jour d_n (mol), ($d_{n+1} - d_n$) le temps entre le jour d_{n+1} et le jour d_n (jours).

Pour chaque date d_n calculer $Lixi(Ca^{2+})_{d_{n+1} - d_n}$ et les ajouter pour obtenir la valeur au jour d_n : $Lixi(Ca^{2+})_{d_n}$ qui est l'indice de lixiviation du calcium du matériau exposé.

5.3.4 Cumul de calcium lixivié par rapport à la teneur en calcium initiale du matériau exposé

Les résultats de quantité cumulée de calcium lixivié sont normalisés par la teneur initiale en calcium du matériau exposé (CaTot).

Calculer pour chaque jour d_n le critère $(LixiCa/CaTot)_{d_n}$ (en mol/mol) par l'équation 6.

$$(LixiCa/CaTot)_{d_n} = Lixi(Ca^{2+})_{d_n} / CaTot \quad (6)$$

L'indice de lixiviation du calcium pour le matériau exposé est calculé par l'équation (7) :

$$I_{LixiCa} = (LixiCa/CaTot)_{d_n} / Tot(SO_4^{2-})_{d_n} \quad (7)$$

5.4. Présentation des résultats

5.4.1 Avant l'essai

Le tableau 5 présente les données collectées avant le début de l'essai pour deux matériaux à titre d'exemple (matériaux notés Mat1 et Mat2, respectivement) avec le matériau témoin (noté Tem). Tous les matériaux sont testés en triplicat, donc 9 échantillons sont exposés. Par exemple, pour le premier matériau (Mat1), les triplicats sont étiquetés Mat1_a, Mat1_b et Mat1_c, respectivement.

Tableau 5: données à collecter pour chaque échantillon de matériau avant l'essai.

Echantillons de matériau	L (m)	w (m)	th (m)	CaTot (mol)
Tem_a				
Tem_b				
Tem_c				
Mat1_a				
Mat1_b				
Mat1_c				
Mat2_a				
Mat2_b				
Mat2_c				

L'activité de consortium sulfo-oxydant a été vérifiée suivant le protocole de la partie 6 du présent document .

5.4.2 Rapport au cours de l'essai

Le tableau 6 présente les données et les résultats collectés pour un matériau exposé pour chaque jour d'échantillonnage d_n .

Tableau 6 : données à collecter pendant l'essai à chaque jour d'échantillonnage d_n .

Jour	pH _{dn}	Q _{dn} (in ml/h)	[SO ₄ ⁽²⁻⁾] _{dn}	[Ca ⁽²⁺⁾] _{dn}	Tot(SO ₄ ⁽²⁻⁾) _{dn}	Lixi(Ca ⁽²⁺⁾) _{dn}	(LixiCa/CaTot) _{dn}	IndLixiCa (uniquement pour dn)
d ₁								
d ₂								
...								
d _{n-1}								
d _n								

5.4.2 Rapport de fin d'essai

Tracer le pH de la solution de lixiviation pour chaque échantillon exposé en fonction du temps. Pour valider l'essai, le pH de la solution de lixiviation doit être inférieur à 4 durant les semaines 5 à 12.

Présenter des photos à différents moments (jour 0, jour 28, jour 63 et jour 98) pour tous les échantillons exposés comme présenté dans la figure 4 (deux matériaux Mat1 et Mat2 donnés en exemple). L'observation du développement d'un biofilm sur la surface exposée et l'observation de la production d'un précipité blanc/jaune sur la surface exposée valident les conditions agressives de l'essai.

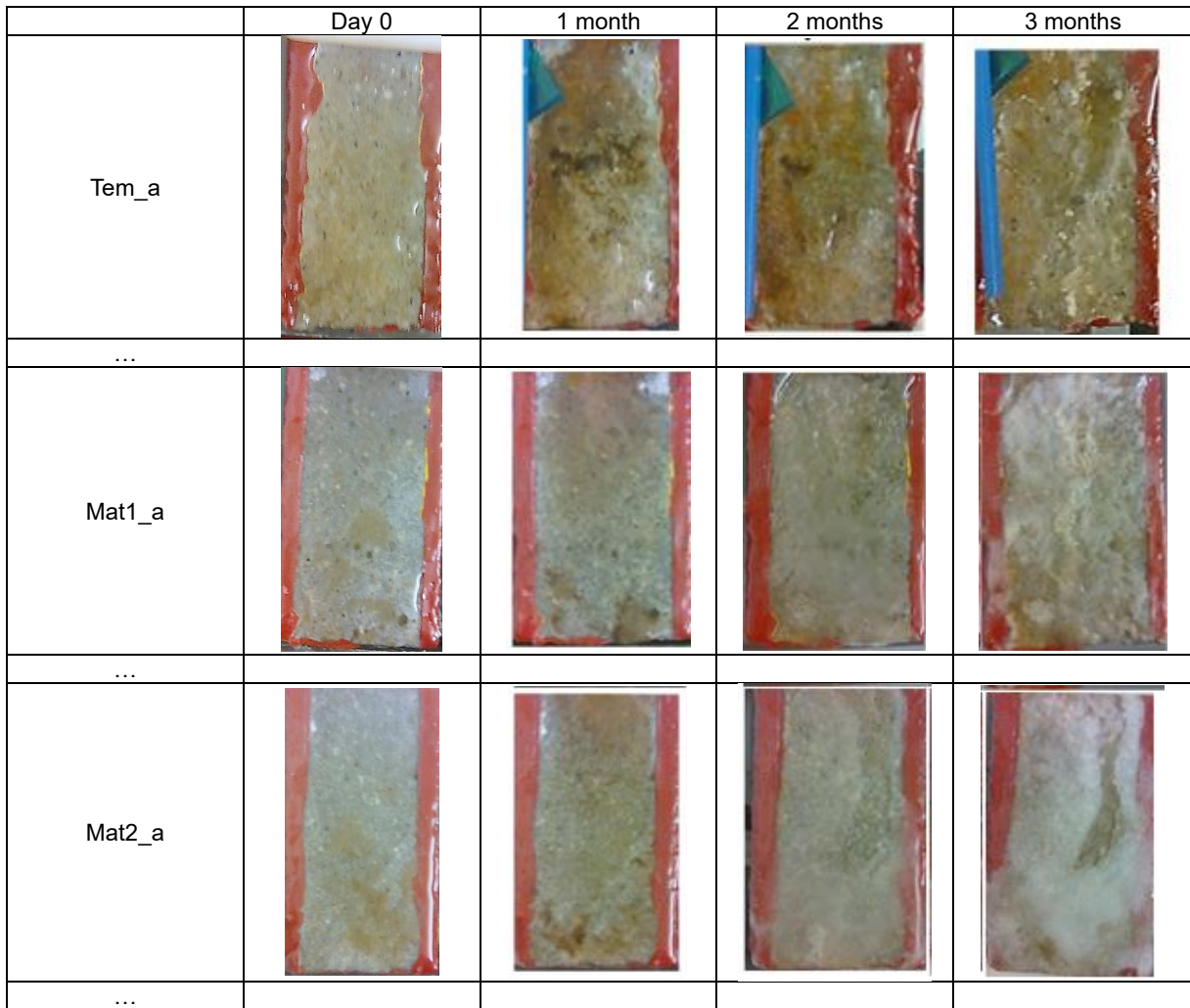


Figure 3: Photos des échantillons exposés à différents moments du test.

Tracer $(LixiCa/CaTot)_{dn}$ en fonction de $Tot(SO_4^{2-})_{dn}$ pour tous les échantillons exposés, comme présenté dans la figure 4 pour un matériau (Mat1) et le témoin à titre d'exemple.

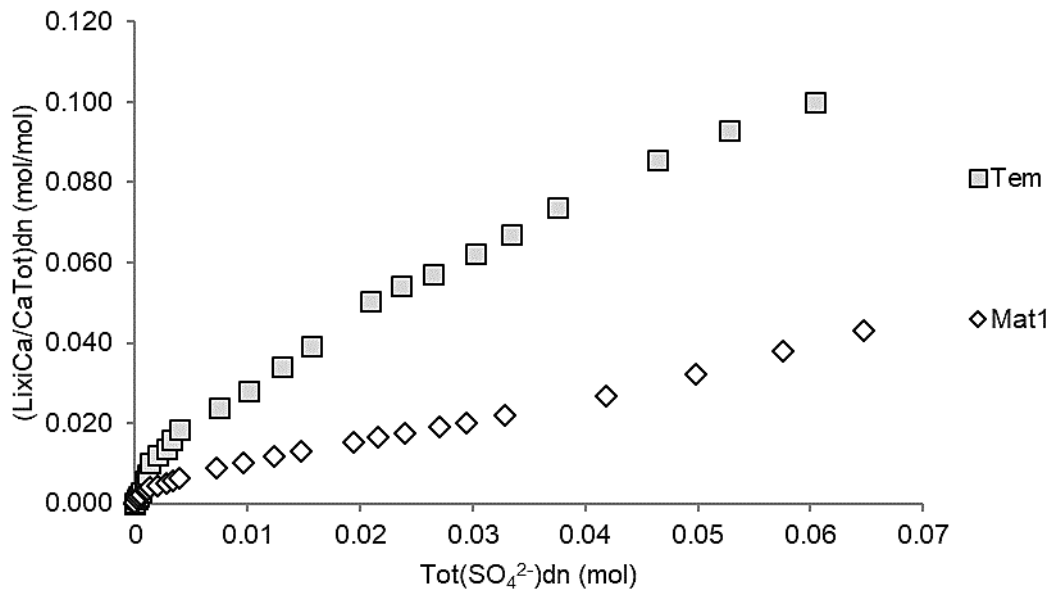


Figure 4: $(LixiCa/CaTot)_{dn}$ en fonction de $Tot(SO_4^{2-})_{dn}$

Calculer l'indice de dégradation normalisé $I_{bio/tem} = \text{Indice de lixiviation du Calcium de l'échantillon} / \text{Indice de lixiviation du Calcium du témoin}$

Tableau 6: Récapitulation des indices de lixiviation des matériaux exposés pour le témoin (Tem) et deux matériaux exposés (Mat1 et Mat2)

Echantillons de matériau	I_{LixiCa}	$I_{bio/tem}$
Tem	1.65 ± 0.01	100 %
Mat1	0.65 ± 0.04	39.3 %
Mat2	1.28 ± 0.08	77.6%

6. Procédure pour valider le potentiel sulfo-oxydant d'un consortium microbien environnemental

Les méthodes de test biologique pour évaluer la résistance des mortiers ou des bétons pour des environnements de réseau d'assainissement sont basées sur la production d'acide sulfurique par des micro-organismes se développant à la surface des matériaux exposés. Cette production d'acide sulfurique est due à la succession dans le temps de plusieurs activités biologiques, principalement une activité microbienne sulfurique neutrophile dans les premières étapes de la biodétérioration (impliquant différentes espèces de microorganismes) et une activité microbienne sulfurique acidophile dans les dernières étapes de la biodétérioration (impliquant également différentes espèces de microorganismes). Pour assurer ces activités biologiques, des consortiums environnementaux peuvent être utilisés (des boues-activées par exemple). Cependant, si cette approche semble convaincante et justifiable, il n'en demeure pas moins que toutes les boues-activées varient (en termes de diversité et de population microbienne sélectionnées) d'une station à l'autre en fonction des eaux usées traitées, des procédés mis en œuvre, mais aussi peuvent différer dans le temps (en fonction des saisons, des épisodes pluvieux, etc.). Ainsi, pour exploiter les méthodes de tests biologiques, il est nécessaire de valider le potentiel sulfo-oxydant du consortium environnemental choisi, de valider la présence de micro-organismes sulfo-oxydants neutrophiles et acidophiles actifs.

L'objectif est, par des impulsions successives d'un substrat soufré (thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) ou tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$)), d'évaluer la production d'acide sulfurique biogénique et ainsi de valider la présence de micro-organismes sulfo-oxydants. Pour cela, seule la mesure du pH est nécessaire en raison du fort potentiel d'acidification des micro-organismes oxydant le soufre. Cette acidification prouve que l'oxydation biologique a bien eu lieu et donc que le consortium microbien utilisé possède le potentiel oxydant du soufre nécessaire pour conduire la biodétérioration des matériaux cimentaires pour les environnements d'eaux usées.

6.1 Méthode d'essai

6.1.1 Description

L'objectif est de valider la présence d'une activité sulfo-oxydante neutrophile et d'une activité sulfo-oxydante acidophile dans un consortium environnemental.

L'objectif est de quantifier la production d'acide sulfurique biogénique lors d'impulsions successives de substrat soufré (thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) ou tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$)) et de valider la présence de microorganismes sulfo-oxydants dans le consortium. Le fort potentiel d'acidification des micro-organismes oxydant le soufre permet de ne considérer que le pH en tant qu'indicateur.

Le consortium testé est introduit dans un réacteur liquide aéré (besoin d'oxygène pour assurer l'oxydation des composés soufrés) et agité. Une injection d'un composé soufré réduit tel que le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) ou le tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$) est réalisée. Le pH de la solution est contrôlé en continu ou quotidiennement. Si des micro-organismes neutrophiles oxydant le soufre sont actifs, l'activité biologique produit de l'acide sulfurique, ce qui entraîne une diminution du pH. Par la suite, un temps de latence est observé, et une seconde phase d'abaissement du pH peut être observée, liée à une légère respiration et une légère augmentation de la concentration en sulfates totaux dans le milieu de culture. Lorsque le pH du milieu se rapproche de 2,5, l'ajout de substrat soufré conduit à une augmentation rapide du taux de consommation d'oxygène, indiquant la croissance de micro-organismes aérobies. Cette augmentation est concomitante avec une baisse du pH et une forte évolution de la concentration en sulfates indiquant à bas pH la mise en place d'une activité sulfo-oxydante acidophile.

6.1.2 Réactifs chimiques

Sauf indication contraire, les produits chimiques utilisés sont des produits chimiques dont la pureté permet l'analyse. On utilise de l'eau distillée, de l'eau déminéralisée, de l'eau déionisée ou de l'eau de pureté équivalente (5-pH-7,5) dont la conductivité est inférieure à 0,1 (ou 0,5) mS.m⁻¹ conformément à la qualité 2 (ou 3) spécifiée dans la norme EN ISO 3696.

Réactifs

- $K_2S_4O_6$ ou $Na_2S_2O_3$

6.1.3 Equipement

- Réacteur thermostaté (volume du réacteur non fixé, en verre ou en plastique) à 20°C avec un système d'agitation
- Diffuseur d'air

- Electrode de mesure de pH (en ligne, ou pour des mesures ponctuelles) (gamme de fiabilité pH 2 – pH 10)

6.1.4 Procédure

6.1.4.1 Préparation

Il est nécessaire de travailler avec des boues activées diluées dont la concentration maximale en matières en suspension est de 2 g/L (NF EN 872).

- Mesurer le total des solides en suspension dans le consortium (NF EN 872)
- Dissoudre le sel de soufre choisi (thiosulfate ou tétrathionate) dans un flacon de 20 ml pour obtenir une solution à 0,4 molS/L (étiquetée solution 1).

6.1.4.2 Evaluation du potentiel sulfo-oxydant d'un consortium microbien

Démarrer l'agitation et l'apport d'air par bullage pour assurer l'apport d'oxygène (la mesure de l'oxygène dissous par une sonde peut être un plus pour assurer une oxygénation suffisante). Une concentration continue d'oxygène dissous supérieure à 2 mg/L est suffisante pour éviter la limitation en oxygène.

- Dans le cas d'un réacteur de 1L, ajouter 10 mL de la solution 1 pour une concentration initiale de 4.10^{-3} molS/L dans le réacteur.
- Surveiller l'évolution du pH. Si le pH diminue, la présence de micro-organismes neutrophiles oxydant le soufre est confirmée (plusieurs exemples sur différentes boues provenant de différents sites sont présentés à la fin de ce document).
- Après stabilisation du pH à des valeurs inférieures à 3, effectuer une seconde injection de la solution 1 (5 mL de la solution 1).
- Suivre l'évolution du pH

La durée maximale du test est de 14 jours.

6.1.5 Validation du potentiel sulfo-oxydant d'un consortium microbien

Tracez les données de pH en fonction du temps. Pour une solution 1 préparée avec un sel de thiosulfate, une légère diminution du pH à des valeurs autour de 2,3 devrait être observée. Pour une solution 1 préparée avec un sel de tétrathionate, une diminution du pH à des valeurs autour de 2,1 devrait être observée. Cette diminution du pH peut prendre quelques heures à quelques jours. Elle permettra de valider la présence de micro-organismes sulfo-oxydants acidophiles dans le consortium initial.

A titre d'exemple, la figure 5 illustre les mesures de pH obtenues pour trois consortia environnementaux différents (boues-activées provenant de différents sites en France). Pour les trois tests (nommés test 1, test 2 et test 3), la première diminution du pH de 8,3 (valeur maximale) à 3 correspond à l'activité neutrophile oxydant le soufre. Après cette valeur, la diminution du pH correspond (pour les trois tests) à l'activité sulfo-oxydante acidophile.

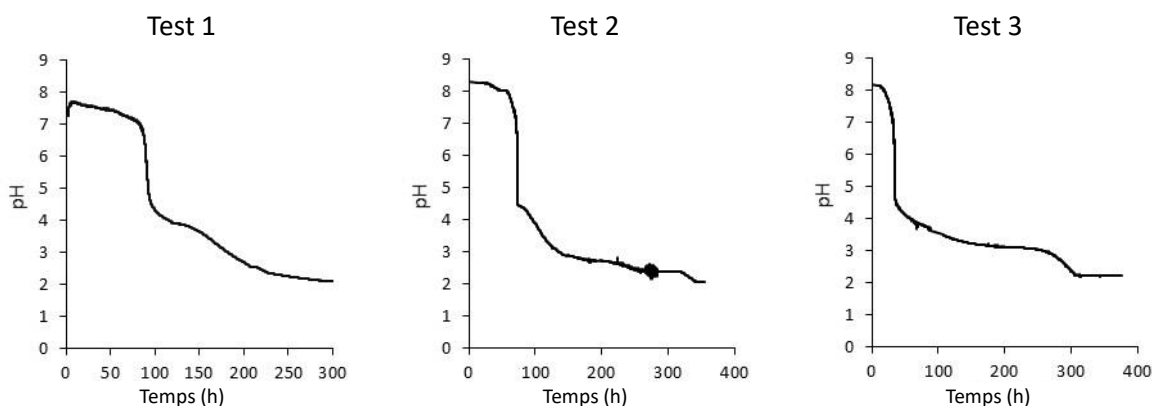


Figure 5 : suivi du pH durant 3 tests d'évaluation de la présence d'une activité sulfo-oxydante avec 3 différents inocula issus de 3 sites différents.

Bibliographie

- [1] W. Holger *et al.*, "Accelerated testing of materials under the influence of biogenic sulphuric acid corrosion (BSA)," in *Proceedings of RILEM 253-MCI Final Conference*, Toulouse, Jun. 2018, vol. PRO 123, 1, pp. 23–32.
- [2] J. Herisson, E. D. van Hullebusch, M. Moletta-Denat, P. Taquet, and T. Chaussadent, "Toward an accelerated biodeterioration test to understand the behavior of Portland and calcium aluminate cementitious materials in sewer networks," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 84, pp. 236–243, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2012.03.007.
- [3] A. Grandclerc, M. Guéguen-Minerbe, and T. Chaussadent, "Accelerated biodeterioration test of cementitious materials in sewer networks," in *Proceedings of RILEM 253-MCI Final Conference*, Toulouse, Jun. 2018, vol. PRO 123, 1, pp. 119–126.

- [4] M. Peyre Lavigne *et al.*, "An innovative approach to reproduce the biodeterioration of industrial cementitious products in a sewer environment. Part I: Test design," *Cem. Concr. Res.*, vol. 73, pp. 246–256, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.cemconres.2014.10.025.
- [5] M. Peyre Lavigne *et al.*, "Innovative approach to simulating the biodeterioration of industrial cementitious products in sewer environment. Part II: Validation on CAC and BFSC linings," *Cem. Concr. Res.*, vol. 79, pp. 409–418, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cemconres.2015.10.002.
- [6] M. Peyre Lavigne, A. Bertron, C. Patapy, X. Lefebvre, and E. Paul, "Accelerated test design for biodeterioration of cementitious materials and products in sewer environments," *Matér. Tech.*, vol. 103, no. 2, p. 204, 2015, doi: 10.1051/mattech/2015018.
- [7] A. Aboulela *et al.*, "Laboratory Test to Evaluate the Resistance of Cementitious Materials to Biodeterioration in Sewer Network Conditions," *Materials*, vol. 14, no. 3, p. 686, Jan. 2021, doi: 10.3390/ma14030686.
- [8] Bock, E., Sand W., Pohl, A., Bedeutung der Mikroorganismen bei der Korrosion von Abwasserkanälen, TIS Tiefbau – Ingenieurbau– Straßenwesen, Sonderdruck zum 4. Statusseminar »Bauforschung und -technik«, 1983, 47-49).