

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant
Filière : Sciences biologiques, Spécialité : Bioindustrie, Analyse et
Contrôle(BAC)

Thème

Présenté par :Benchabi Amel

**Recherche de *Bacillus* carbonatogènes des sites rocheux
et leurs applications dans la bio-cicatrisation de
matériaux cimentaires**

Jury d'évaluation :

Président de jury: Mr. KACEM CHAOUCHE N.
Rapporteur : Mme. KARA ALI M.
Examinatrice :Mme. CHERFIA R.

Pr. UFM. Constantine 1.
Dr. UFM. Constantine 1.
Dr. UFM. Constantine 1.

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020-2021

Remerciements

Car on ne réussit jamais seul...

Ce modeste travail a été réalisé dans le laboratoire de Mycologie de biotechnologie et de l'activité microbienne de la Faculté des Sciences de la vie. Des personnes que j'ai croisées que je tiens ici à remercier toutes ces personnes qui ont participé, d'une manière ou d'une autre, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je voudrais exprimer tout mon estime et ma reconnaissance la plus sincère à ma directrice de mémoire Madame Dr KARA ALI Monira. Merci de m'avoir soutenue dans les périodes tempétueuses pour moi, merci de m'avoir enseigné la pratique des sciences et la rigueur de la démarche expérimentale, de m'avoir transmis votre enthousiasme et votre force, merci de m'avoir offert cette grande liberté de travail et de m'avoir accordé votre confiance. Votre part active à la réalisation de ce travail m'a été précieuse. Vos conseils et votre savoir faire, toujours donnés avec une extrême amabilité, m'ont permis d'élaborer ce mémoire. J'ai énormément appris de vous sur le plan pédagogique scientifique et surtout humain. Veuillez être assuré de mon admiration et de tout mon respectueux dévouement.

Je suis particulièrement reconnaissante aux membres de jury en particulier madame CHERFIA Radia pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur KACEM CHAOUECHE Noredine pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir accepté de présider ce jury aujourd'hui je suis là grâce à vos soutiens, votre compréhension et votre entière adoption de mes objectifs.

Je tiens à remercier vivement Monsieur MANSOUR Mehdi pour sa contribution à ce travail, son énorme gentillesse et sa chaleur humaine. Ainsi que pour avoir accepté de se déplacer et me donner sa précieuse collaboration.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à monsieur le directeur de E.N.G BENCHAOUI Toufik et monsieur BOUBAKOUR Azzeddine, pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à mes collègues du laboratoire de la MGMC pour leur soutien moral, merci infiniment.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail,

A celui qui a toujours été mon meilleur exemple dans la vie : mon très cher père, pour son soutien et tous les sacrifices qu'il a consentis pour mon éducation et mon avenir et son

entière disponibilité

A ma chère mère, pour l'amour, la douceur, la patience et la tendresse qu'elle m'a

toujours donnés

A mon très cher frère ABDEREZAK, à qui je souhaite tous le bonheur du monde

A ma sœur NAOUEL merci mille fois pour avoir toujours été là prête à me donner tout le

soutien, sois toujours merveilleuse

A celui qui m'a donné le courage et la volonté pour continuer ce travail, à mon cher époux,

MOHCENE

A mes trois petits poussins MEY, ANIA et BELKIS merci d'être toujours à mes côtés dans

mes douleurs et mes joies. Chaque moment avec vous est un moment de bonheur et surtout

d'inspiration

A tous mes amis, qui mon toujours soutenu et aidé : HAMZA, WAFA,

MYADA.FATIMA.ZAKI.

A ma famille, merci ... Je vous dois tout... Je vous dédie ce mémoire.

Table des matières

1-Introduction	1
2-Revue bibliographique	3
2.1-Généralités sur les matériaux cimentaires.....	3
2.1.1- Les granulats.....	3
2.1.2- Matrice cimentaire	4
2.2- Aperçu sur la carbonatation	5
2.2.1- Carbonate de calcium	5
2.2.2- Carbonatation naturelle	5
2.2.3- Carbonatation biologique.....	6
2.3- Massifs rocheux	8
2.3.1- Généralités sur les massifs rocheux.....	8
2.3.2- Classification des massifs rocheux.....	8
2.3.3- Étude de la structure d'un massif rocheux.....	8
2.3.3.1- masse volumique.....	9
2.3.3.2-Porosité n.....	9
2.3.3.3-Discontinuités.....	9
2.4- Microorganismes isolés à partir des massifs rocheux.....	9
2.3.4.1- Propriétés des micro-organismes des roches.....	10
2.5- Les <i>Bacillus</i>	10
2.5.1-Caractères morphologiques.....	10
2.5.2- Classification de <i>Bacillus</i> dans le monde microbien.....	11
2.5.3-Croissance.....	12
2.5.4- Habitat.....	12
2.5.5- Ecologie.....	12
2.5.6- Caractères cultureux	13
2.5.7- Caractères biochimiques.....	13
2.5.8- <i>Bacillus</i> carbonatogènes.....	14
2.6-Voies métaboliques de la carbonatation	15
2.7-Facteurs affectant l'efficacité de la bio-carbonation.....	16
2.7.1-Type de bactéries	16
2.7.2- Concentration de cellules bactériennes	16
2.7.3-Variation du pH	16
2.7.4-Variation de la température	17
2.7.5-Concentrations d'urée et de calcium	17
2.7.6-Sources de nutriments	17
2.8- Utilisation de bactéries alcalino-résistantes comme agents de bio-cicatrisation.....	17
2.9- Avantages et limites de la bio-carbonatation.....	18
2.10- Application de la bio-carbonatation.....	18

3- Matériel et méthodes.....	20
3.1- Echantillonnage.....	20
3.2- Isolement des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	21
3.2.1- Dilutions	21
3.2.2-Traitement thermique.....	21
3.2.3- Ensemencement.....	21
3.2.4- Purification des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	21
3.3- Identification présomptive des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	21
3.3.1- Observation macroscopique.....	22
3.3.2- Observation microscopique.....	22
3.3.2.1- Observation à l'état frais.....	22
3.3.2.2- Coloration de Gram.....	22
3.3.2.3- Coloration des endospores.....	23
3.3.3- Caractères biochimiques.....	23
3.3.3.1- Test catalase.....	23
3.3.3.2- Type respiratoire.....	24
3.3.3.3- Fermentations de quelques substrats carbonés en utilisant la galerie <i>API 20^E</i>	24
3.4-Sélection des isolats du genre <i>Bacillus</i> alcalophiles carbonatogènes.....	25
3.4.1- Culture sur milieu sélectif solide.....	25
3.4.2-Culture sur milieu sélectif liquide.....	26
3.4.3- Test chimique de vérification de la calcite précipitée sur milieu solide.....	27
3.4.4- Test chimique de vérification de la calcite précipitée sur milieu liquide.....	27
3.4.5- Effet de l'urée sur la calcification.....	28
3.4.6- Etude de la croissance des souches sélectionnées.....	28
3.5- Utilisation des bactéries carbonatogènes sélectionnées comme agents de bio-cicatrisation	28
3.5.1-Préparation des solutions bactériennes	28
3.5.2-Préparation de la pâte du ciment.....	28
3.5.3-Création des fissures.....	29
3.5.4- Traitement des échantillons.....	29
4- Résultats.....	30
4.1-Isolement et identification des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	30
4.2- Etude macroscopique.....	30
4.3- Etude microscopique.....	32
4.3.1- Observation à l'état frais.....	32
4.3.2- Coloration de Gram.....	34
4.3.3- Coloration des endospores.....	36
4.4- Caractères biochimiques.....	36
4.4.1- Test catalase.....	36
4.4.2- Type respiratoire	37
4.4.4-Fermentations de quelques substrats carbonés en utilisant galerie <i>API20</i>	38
4.6-Sélection des isolats du genre <i>Bacillus</i> alcalophiles carbonatogènes.....	42
4.6.1- Sélection sur milieu solide.....	42

4.6.2- Sélection sur milieu liquide.....	43
4.6.2- Effet de l'urée sur la calcification	44
4.6.3- Etude de la croissance des souches sélectionnées.....	45
4.6.3.1- Suivi de la croissance par spectrophotomètre	45
4.6.4- Utilisation des bactéries carbonatogènes sélectionnées comme agents de bio-cicatrisation	46
5- Discussion	49
6-Conclusion et perspectives	53
7- Références bibliographiques	55

ملخص

Abstract

Annexe

Liste des figures

Figure 1 Représentation schématique des matériaux cimentaires.....	3
Figure 2 Composition du béton.....	5
Figure 3 Carbonatation dans la nature	6
Figure 4 Carbonatation induite biologiquement par les bactéries	7
Figure 5 schéma des membranes externes des bactéries à coloration Gram positif et des bactéries à coloration Gram négatif.....	15
Figure 6 Réparation des fissures induite par la bio-carbonatation.....	18
Figure 7 Sites d'échantillonnage.....	20
Figure 8 Fioles incubées dans un incubateur agité.....	26
Figure 9 Schéma démonstratif de la culture sélectif sur milieu MPC.....	27
Figure 10 Traitement des fissures du ciment.....	29
Figure 11 Aspect macroscopique des 09 isolats bactériens.....	31
Figure 12 Observation microscopique à l'état frais des isolats bactériens.....	33
Figure 13 Coloration de Gram des 09 isolats.....	35
Figure 14 Test des endospores.....	36
Figure 15 Test catalase.....	37
Figure 16 Test de type respiratoire.....	38
Figure 17 Tests API 20 ^E	39
Figure 18 Test de présence de la poudre blanche autour des colonies de la bactérie <i>Bacillus megaterium</i> et <i>Bacillus subtilis</i> après 5 jours d'incubation.....	42
Figure 19 Test d'absence de la poudre blanche autour des colonies (Témoin).....	43
Figure 20 Test de formation d'un précipité blanc au fond des tubes.....	44
Figure 21 Effet de l'urée sur la production de calcite par les deux souches bactériennes sélectionnées.....	45
Figure 22 Évolution de la croissance par <i>Bacillus megaterium</i> et <i>Bacillus subtilis</i>	46

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification des <i>Bacillus</i> selon catalogue of life 2021	12
Tableau 2 Substrats spécifiques de la galerie API 20 ^E	25
Tableau 3 Préparation de la pâte du ciment	28
Tableau 4 Isolats bactériens obtenus à partir de différents sites	30
Tableau 5 Caractères macroscopiques des isolats obtenus	32
Tableau 6 Aspect microscopique des isolats bactériens	34
Tableau 7 Utilisation des différents substrats par les 9 isolats obtenus	40
Tableau 8 Tableau récapitulatif des différents résultats d'identification d'isolats obtenus...	41
Tableau 9 Traitement du ciment par les deux souches sélectionnées	47

Liste des abréviations

ONPG: Ortho-nitro-phenyl-galactoside

ADH : Argininedé hydrolase

LDC : Lysine décarboxylase

ODC: Ornithine décarboxylase

CIT : Citrate de Simmons

H₂S : Sulfure d'hydrogene

TDA : Tryptophane-désaminase

VP :Voges-Proskauer

GEL : gélatine

MPa : Méga pascal

1-Introduction

Le ciment est l'un des matériaux les plus produits dans le monde. Chaque année, près de 3700 millions de tonnes de ciment sont fabriquées et l'industrie cimentaire note une amélioration de 21% depuis 2008(Olivier, 2016). Le béton fabriqué à partir de ce matériau présente de nombreux avantages dans le domaine de la construction, il est rapide à mettre en place, il s'adapte aux géométries et possède une bonne durabilité. Cependant, celui-ci est soumis à l'action atmosphérique de plusieurs agents physiques, chimiques et biologique (Saiz-Jimenez, 1997 ; LeMétayer-Levrel *et al.*, 1999 ; Warscheid et Braams, 2000). En effet, les pierres carbonatées sont particulièrement sensibles aux intempéries. De plus, la dissolution progressive de la matrice minérale entraîne l'augmentation de la porosité, la fissuration et par conséquent, la diminution des caractéristiques mécaniques (Tiano *et al.*, 1999).

Pour diminuer la susceptibilité à la pourriture, de nombreux traitements de conservation ont été appliqués dans le but de modifier certaines caractéristiques de la pierre et qui visent principalement à protéger la pierre contre la pénétration d'eau et d'autres agents d'altération (Delgado Rodrigue, 2001 ; Moropoulou *et al.*, 2003).

Les traitements organiques par les solvants entraînent généralement la formation d'incompatibilités. De plus, les grandes quantités de solvants organiques utilisés contribuent à la pollution. En revanche, les traitements inorganiques peuvent être préférables car les matériaux en pierre et les matériaux de consolidation partagent une certaine affinité physico-chimique (Camaiti *et al.*, 1988; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2003).

Le maintien des pierres cimentaires nécessite un entretien récurrent car les fissures sont inévitables dans ces structures (Kantzas *et al.*, 1992; Jonkers, 2008; Adjoudj *et al.*, 2014 ; Shaheen et Khushnood, 2018). Le système de béton auto-cicatrisant est appliqué par insertion de microbes calcifiants, et est conçu pour l'auto-traitement du béton, pour éviter les réparations externes (Stocks-Fischer *et al.*, 1999 ; Ramakrishnan *et al.*, 2001 ; Chaurasia *et al.*, 2014). En outre, l'utilisation de microbes, notamment, les bactéries du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et quelques autres bactéries alcalines du sol améliorent la résistance mécanique de la matrice du béton contre la corrosion en laissant la structure du système intact (Arias et Fernández, 2008 ; Daskalakis *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2015 ; Khushnood *et al.*, 2018).

C'est sur cette logique que l'objectif du présent travail s'articule et vise, par conséquent, la recherche des bactéries du genre *Bacillus* carbonatogènes des sites rocheux et leurs applications dans la bio-cicatrisation de matériaux cimentaires.

Pour ce faire, une synthèse des principaux événements scientifiques en relation avec les matériaux cimentaires, le béton, la carbonatation, et le traitement de fissures formées sur la matrice cimentaire ,a été développée (revue bibliographique). L'étude expérimentale et la partie résultats sont scindées en deux grandes parties ; la première est consacrée à l'échantillonnage, l'isolement des bactéries du genre *Bacillus* ; la deuxième partie a concerné la sélection et la caractérisation des *Bacillus sp.* carbonatogènes des sites rocheux, dans le but de les utilisées comme des agents bio-cicatrisants de matériaux cimentaires. Dans cette partie un protocole expérimental a été développé et adapté afin de réaliser l'objectif souhaité. Les résultats ont fait l'objet d'une discussion approfondie pour comparer nos résultats à ceux, déjà, développés par des travaux antérieurs. Le mémoire se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

2- Revue bibliographique

2.1- Généralités sur les matériaux cimentaires

Les matériaux à base cimentaires sont des géo-suspensions à forte concentration volumique de particules solides (grains). Ils peuvent être aussi considérés comme étant des matériaux multiphasiques constitués de trois phases (solide, liquide et gazeuse). Ces trois phases sont présentées par les grains, l'eau et l'air qui constituent ce matériau. Dans le domaine de la construction, les matériaux composites rigides à base cimentaire sont les plus utilisés pour la confection d'éléments structuraux (fondations et ossatures) et non structuraux (cloisons). L'utilisation accrue de ces matériaux est motivée par leur excellent comportement mécanique en compression et leur durabilité. Ces matériaux sont présents dans l'ensemble des infrastructures sous différentes appellations. Ces appellations sont fonction des classes granulaires des grains présents dans le matériau (figure 1), cependant quel que soit la dénomination, la composante de base est une matrice composée d'eau et de grain de ciment éventuellement associée à des éléments minéraux de même classe granulaire (fumée de silice, cendres volantes...). On retrouve généralement trois différentes dénominations de matériaux à base cimentaire : la pâte de ciment (matrice), le mortier qui est une association de pâte de ciment et du sable ($D_{\max} < 6 \text{ mm}$). Les bétons qui sont une association du mortier et de graviers ($D_{\max} > 6 \text{ mm}$) (Boutebba *et al.*, 2020).

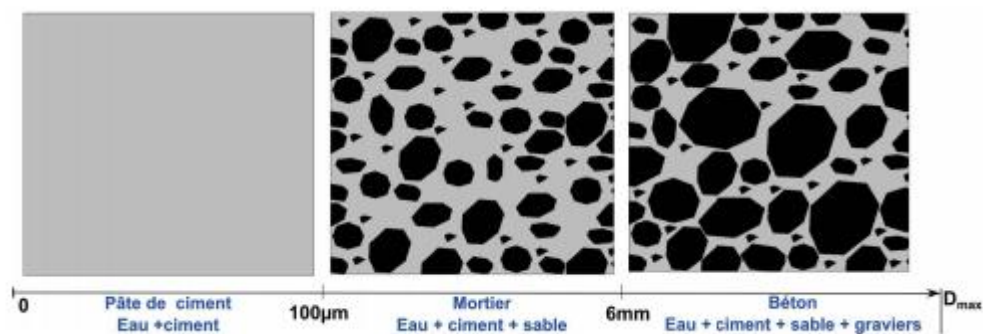


Figure 1 Représentation schématique des matériaux cimentaires, dénomination en fonction de l'échelle des constituants (Engon, 2015).

2.1.1- Les granulats

Le comportement à l'état fluide et durci des géo-suspension à forte concentration volumique de particules solides est influencé par leurs constituants. Dans le cas des matériaux cimentaires, les propriétés des granulats (origine, forme et taille) jouent un rôle majeur dans leurs comportements tant à l'état fluide (comportement rhéologique et tribologique) qu'à l'état durci (comportement thermomécanique). Ils sont la principale source de la résistance

mécanique des matériaux à base cimentaire (Dreux and Fiesta, 2002). Ces granulats présentent une neutralité chimique vis-à-vis de la matrice (sauf cas d'alcali-granulats). Leurs origines varient. Ils peuvent être d'origine naturelle ou artificielle. Les granulats d'origine naturelle proviennent essentiellement de roches sédimentaires (calcaire, siliceuse), de roches magmatiques ou de roches métamorphiques.

Les granulats d'origine artificielles couramment utilisés pour la confection de matériaux à base cimentaire peuvent être d'origine minérale (les granulats de laitier, le schiste expansé...) ou issus du recyclage des matériaux cimentaires (bétons concassés...). Actuellement d'autres types de granulats d'origine végétale (lin, sous-produit bois, sisal...) ou issus du recyclage des déchets de différentes industries (granulats de verre, polyéthylène...) rentrent dans la composition des matériaux cimentaires. Leur utilisation reste limitée à cause des inconvénients (coût, baisse de résistances mécaniques et de durabilité) qu'ils engendrent. Cependant l'utilisation de ces granulats améliore les propriétés thermo-physiques des matériaux cimentaires. Cette amélioration oriente leur utilisation vers les matériaux cimentaires destinés au second œuvre (cloisonnement, panneaux isolants...) (Engon, 2015).

2.1.2- Matrice cimentaire

Une matrice est définie comme étant un liant permettant d'assembler les différents composants d'un matériau composite tel que le béton. Ce dernier est un assemblage de matrice cimentaire de nature généralement minérale. Il est fabriqué à partir de granulats (sable, gravillons) agglomérés par un liant, qui réunit des particules solides sous forme de poudre (Souchu, 2009). Le béton utilisé dans le bâtiment et les travaux publics comprend plusieurs catégories, il est classé selon sa masse volumique ; en béton très lourd (dont $\rho > 2\,500\text{ kg/m}^3$), béton lourd (ρ entre $1\,800$ et $2\,500\text{ kg/m}^3$), béton léger ($\rho = 500$ à $1\,800\text{ kg/m}^3$) et béton très léger ($\rho < 500\text{ kg/m}^3$) et selon la nature des liants en béton de ciment.

Le béton peut varier en fonction de la nature des granulats, des adjuvants, des colorants, des traitements de surface et peut ainsi s'adapter aux exigences de chaque réalisation, par ses performances et par son aspect (Gagné, 1993). Les bétons sont essentiellement composés de ciment, de granulats, d'eau et d'adjuvants. La nature et les propriétés chimiques de ces composants sont étroitement liées à la sensibilité des bétons vis-à-vis des interactions chimiques, physiques et biologiques. De plus, la composition, la formulation, la préparation et la mise en œuvre des matériaux cimentaires à l'état frais sont aussi des paramètres qui influencent les propriétés du matériau durci et sa durabilité (Tagnit-Hamou, 2019). La figure (2) illustre le processus de production des bétons.

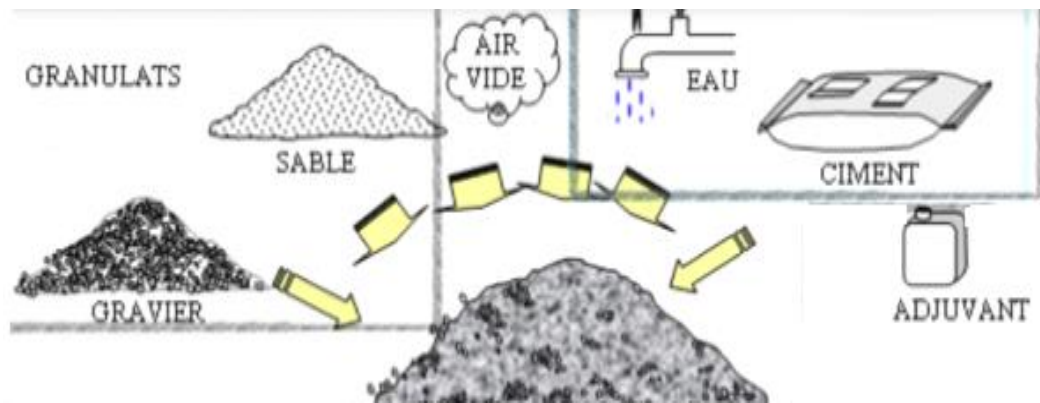
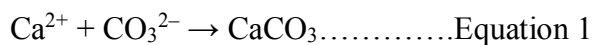


Figure 2 Composition du béton (Anonyme 1)

2.2- Aperçu sur la carbonatation

2.2.1- Carbonate de calcium

Le carbonate de calcium est l'un des minéraux les plus communs sur terre, constitue 4 % de la croûte terrestre (Castanier *et al.*, 1999). Le carbonate de calcium est le composé majeur des calcaires comme la craie, le marbre, les coquilles d'animaux marins, le corail et les escargots. Le carbonate de calcium (CaCO_3) est composé d'ions carbonate (CO_3^{2-}) et d'ions calcium (Ca^{2+}), selon l'équation (1), sa masse molaire est de l'ordre de 100,1 g/mol.

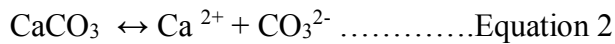


La précipitation du carbonate de calcium se produit naturellement dans les eaux marines et douces, ainsi que, dans les sols (Chu *et al.*, 2017). Ce processus est dû principalement en raison d'une augmentation de la concentration du carbonate du calcium et /ou d'une diminution de sa solubilité en solution, des changements de température ou de pression provoquant une évaporation, et une bio-minéralisation (Castanier *et al.*, 1999).

2.2.2- Carbonatation naturelle

La carbonatation consiste en l'action du CO_2 de l'atmosphère qui diffuse sous forme gazeuse dans les pores du béton en formant un acide au contact de la solution interstitielle de la pâte de ciment (figure 3). Ce phénomène modifie progressivement la composition chimique et la microstructure interne du béton en agissant sur les produits résultants de l'hydratation du ciment. Au cours du processus de carbonatation, l'élément principal de transformation est le carbonate de calcium (CaCO_3), qui correspond à la forme du calcaire qui a servi à obtenir le *clinker* lors de la cuisson du cru dans le four de la cimenterie.

Deux processus sont impliqués à la cimentation de calcite in-situ dans la nature ; la calcite peut se former lors de l'évaporation de l'eau saturée en ions calcium dans les milieux marins, ce phénomène est couramment observé dans les zones subtropicales (Whiffin, 2004 ; Van Paassen, 2009). Tandis que, le deuxième type, se produit en raison d'une réaction chimique à la surface des grains de sol près de la limite eau-fond marin (De Jong *et al.*, 2006). L'équilibre de solubilité du carbonate de calcium est présenté par l'équation (2) :



La réaction d'équilibre globale de la précipitation de calcite est présentée dans l'équation(3)

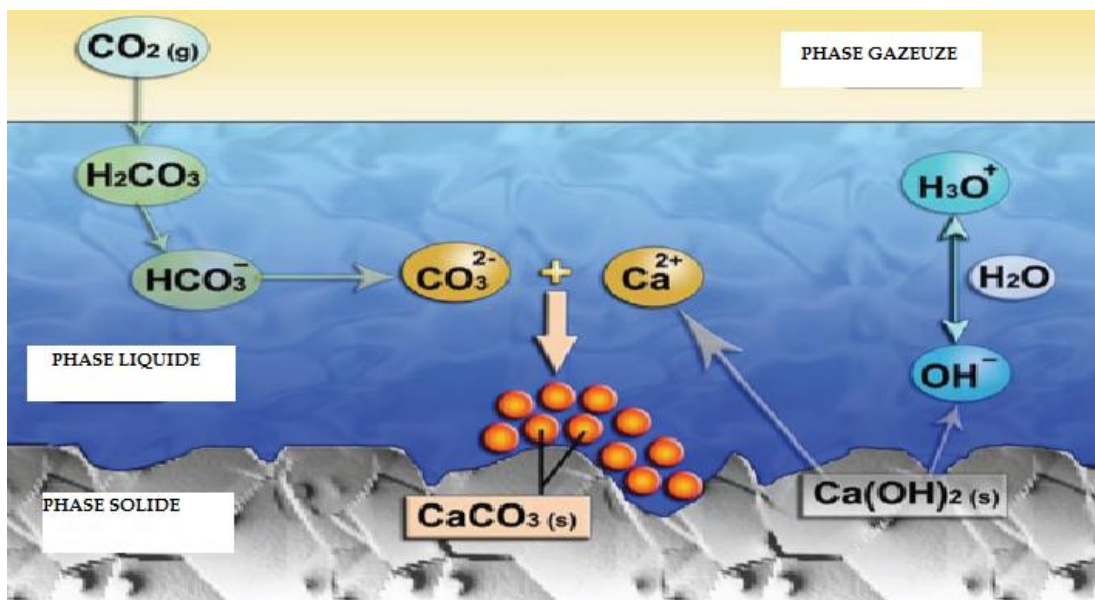
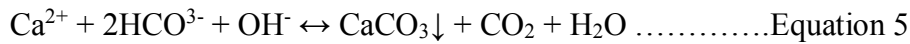
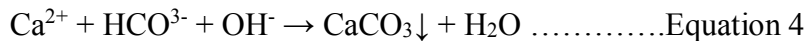


Figure 3 Carbonatation dans la nature (Anonyme 2)

2.2.3- Carbonatation biologique

Les microorganismes auto-cicatrisants sont capables de récupérer des fissures à l'intérieur et l'extérieur du béton avec une série de bio-minéralisation. Ce phénomène est généralement connu sous le nom de précipitation inorganique de micro-organismes, en l'occurrence, la perle formée par les huîtres comme mécanisme de défense, la production d'or à partir de certains types de bactéries et la précipitation du carbonate de calcium dans le béton auto-cicatrisant (Bastrzyk *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

La précipitation de calcite induite microbiologiquement selon les réactions ci-dessous. (Ramakrishnan *et al.*, 2001).



Les équations (4) et (5) sont déclenchées simultanément par les changements du pH dont l'alcalinité est induite par l'activité métabolique bactérienne et la décomposition de l'urée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) (équation 6)



Le CO_2 constitue, l'un des sous-produits principaux du processus de la carbonatation biologique est qui est naturellement séquestré dans le sol sans effets secondaires.

En plus, de la précipitation de la calcite due au mécanisme ci-dessus, les ions calcium empruntés du chlorure de calcium nutritif se déposeront à la surface des micro-organismes avec une charge nette de surface cellulaire qui est négative. Généralement, des précipités de carbonate se développent sur la surface externe des cellules bactériennes qui sont attachées aux particules de sable (Pentecost et Bauld, 1988).

Après les dépôts successifs de carbonate, les bactéries seraient incrustées dans les cristaux de carbonate en croissance (Rivadeneira *et al.*, 1998 ; Castanier *et al.*, 1999) (figure 4).

Les équations pour la précipitation de la calcite à la surface de la cellule sont les suivantes :

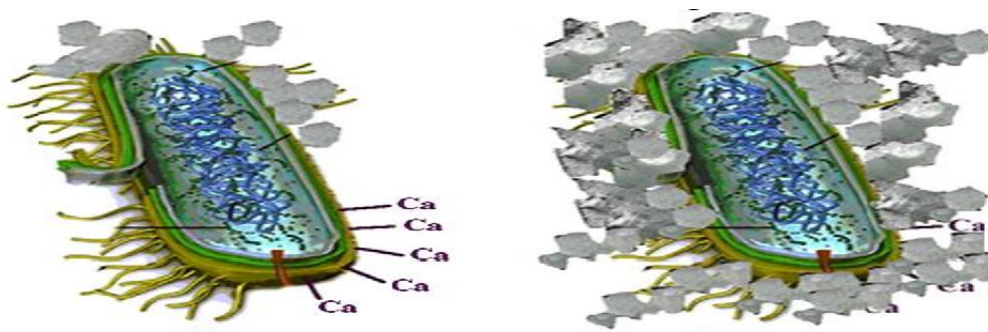
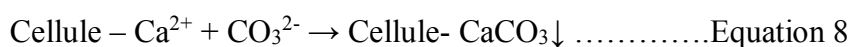
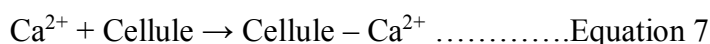


Figure 4 Carbonatation induite biologiquement par les bactéries (De Muynck *et al.*, 2010).

2.3- Massif rocheux

2.3.1- Généralités

Un massif rocheux tel que l'on rencontre dans la nature aujourd'hui résulte d'une longue histoire géologique, souvent complexe. Il comprend une phase de formation du matériau par dépôt successif et consolidation donnant ainsi naissance à une roche sédimentaire, ou encore un processus de cristallisation dans le cas d'une roche magmatique.

Ensuite des modifications vont s'installer soit par des déformations tectoniques par la formation de plis et de failles, ou bien de transformations métamorphiques comme la foliation et la recristallisation, ou encore une période d'altération météorique pour les parties proches de la surface.

2.3.2- Classification des massifs rocheux

Un massif rocheux est une accumulation de plusieurs minéraux, les analyses des roches reposent sur la présence de défauts dans l'assemblage des minéraux, pores ou fissures, qui influent fortement sur les propriétés du matériau (Kosev, 1985).

Les géologues distinguent trois grandes catégories de roches en fonction de leur origine

La première classe est celle des roches magmatiques (ou éruptives) résultent du refroidissement de magmas en fusion .

La deuxième renferme les roches sédimentaires qui sont déposées dans les mers ou les lacs et sont formées par accumulation de particules détritiques résultant de la désagrégation des roches par l'érosion ou biogènes formées biologiquement grâce à l'activité de microorganismes.

Et enfin les roches métamorphiques qui sont le produit de la transformation à l'état solide d'une roche préexistante, avec modifications structurales et en général apparition de nouveaux minéraux, sous l'influence de la pression et de la température.

2.3.3- Étude de la structure d'un massif rocheux

La représentation d'un massif rocheux consiste à déterminer les paramètres physico-chimiques en l'occurrence, la masse volumique, la porosité et l'étude des discontinuités (Deschamps, 1973).

2.3.3.1-Masse volumique réelle

C'est la masse volumique de la roche sèche, calculée à partir de la masse de l'échantillon par son volume. Elle s'exprime en kg / m³ ou en t / m³. Il ne faut pas la confondre avec la masse volumique absolue, qui est la masse volumique de la matière minérale.

2.3.3.2-Porosité n

C'est le rapport du volume de l'espace poreux, c'est-à-dire des vides formés dans la roche, au volume de l'échantillon.

2.3.3.3- Discontinuités

Les discontinuités sont le résultat de plusieurs travaux géologiques : joints sédimentaires, foliations, diaclases, failles, schistosité. Les premiers sont liés à des interruptions de sédimentation (minces lits argileux entre deux bancs, par exemple ; la foliation est due à la disposition en lits de minéraux micacés dans les roches métamorphiques ; les autres discontinuités correspondent à des ruptures mécaniques. La description de la discontinuité comporte également des indications sur le remplissage (continu, argileux, humide, par exemple) et sur les épontes (c'est-à-dire les parois) avec leur degré d'altération, la hauteur et la longueur d'onde des aspérités, leur degré d'imbrication, etc. Toutes ces caractéristiques ont une grande influence sur les propriétés mécaniques et hydrauliques de la discontinuité.

2.3.4- Microorganismes isolés à partir des massifs rocheux

Beaucoup de chercheurs sont intéressés par la géo-microbiologie qui renferme plusieurs processus entre autre la bio-lithogénèse par les microorganismes qui sont capables d'induire la cristallisation et la précipitation de calcium, magnésium et de silice, etc.

En plus des micro-organismes connus à proximité de la surface, il existe d'autres à profondeurs différentes dans plusieurs types de roches (Sinclair et Ghiorse, 1989). D'autres études ont montré que des bactéries sont colonisées les argiles à plus de 400 m de profondeur (White *et al.*, 1983 ; Weirich et Schweisfurth, 1985). Plusieurs populations bactériennes sont également identifiées en roche granitique, notamment en Suède et au Canada (Pedersen, 1992; Brown *et al.*, 1994).

2.3.4.1- Propriétés des micro-organismes des roches

L'influence directe ou indirecte des micro-organismes sur les roches et en particulier des bactéries est due à plusieurs propriétés qui peuvent être résumées comme suit (Ehrlich, 1998) :

-Oxydation et réduction

les micro-organismes produisent des polymères extracellulaires (attachés à la cellule) de nature polysaccharidique ou protéique. Ces polymères ont généralement une nature anionique (groupes COO-, hydroxyles, phosphates, etc.), sont hydratés et sont capables de complexer différents métaux (Fe, Ca, etc.). (Beveridge, 1989). Le pouvoir oxydant ou réducteur des bactéries a été mis en évidence pour un certain nombre d'éléments chimiques. Les formes réduites des éléments minéraux tels que l'hydrogène, le carbone, et le phosphore peuvent être oxydées et réduites par la plupart des bactéries de genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Silverman, 1964; Ehrlich, 1996).

-Formation d'acides organiques et inorganiques

Dans certains cas, leur action d'altération doit être due à la formation de produits de leur métabolisme, spécialement quand les micro-organismes vivent en tapis sur la surface d'une roche ou d'un minéral.

Certains micro-organismes produisent des acides inorganiques comme HNO₃ et H₂SO₄ ce qui fait varier le pH du milieu (Brock *et al.*, 1994).

-Formation des différents minéraux

La formation des différents minéraux est réalisée par cristallisation ou précipitation en effet, les roches sédimentaires ou ignées (Bennett *et al.*, 1988). La bio-minéralogie microbienne joue un rôle majeur dans le cycle géochimique des éléments minéraux. Les silicates de magnésium produites par des algues et les diatomées, la production de carbonate de calcium par les *Bacillus*.

2.5- Les *Bacillus*

2.5.1-Caractères morphologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des grandes bacilles rectilignes, à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5x1,2 µm jusqu'à 2,5x10 µm), sporulées à GRAM positif ou à GRAM variable (fréquemment, la coloration de GRAM n'est positive que dans les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais il y a des espèces immobiles comme *Bacillus mycoides*.

Les *Bacillus* sont aérobies stricts ou facultatifs, sporulés (donne des spores ou endospores libres) parfois capsulés (présence de capsules polypeptidiques chez *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*) (Camille, 2007).

2.5.2- Classification de *Bacillus* dans le monde microbien

Selon Gordon *et al.* (2000), les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes définis suivant la morphologie, la position et la déformation de la spore .

- **Le groupe I**

La clé de détermination des espèces du groupe I prend en compte la forme et la position de la spore qui est centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes (Gordon *et al.*, 2000).

- Le groupe IA

Il est constitué des bacilles dont le diamètre est supérieur à 1µm et contenant des inclusions de poly-béta-hydroxybutyrate (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*) (Gordon *et al.*, 2000).

- Le groupe IB

Rassemblant des Bacilles d'un diamètre inférieur à 1µm et dépourvus d'inclusions de poly-béta-hydroxybutyrate (*Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*) (Gordon *et al.*, 2000).

- **Le groupe II**

Ce groupe est constitué des espèces à GRAM variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale déformante (*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*) (Gordon *et al.*, 2000).

- **Le groupe III**

Ce groupe est caractérisé par des bacilles à GRAM variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*Bacillus fusiformis*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus sphaericus*) (Gordon *et al.*, 2000).

Selon la classification de catalogue of life 2021, le genre *Bacillus* est classé comme suit (tableau 1):

Tableau 1 Classification des *Bacillus* selon catalogue of life 2021

Regne	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	<i>Bacillus</i>
Espèces	<i>B.subtilis, B.cereus , B.coagulensetc.</i>

2.5.3- Croissance

Les bactéries du genre *Bacillus*, sont des mésophiles avec une température optimale entre 30 et 45 C°, mais le genre contient également un certains nombres d'espèces thermophiles avec température optimale plus de 65 C°. Au laboratoire, dans des conditions optimales de croissance, les espèces du genre *Bacillus* montrent des temps de génération d'environ 25 minutes (Todar, 2003).

2.5.4- Habitat

L'habitat principal des *Bacillus* est le sol où ils jouent un rôle dans les cycles de carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologiques des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler à partir du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires (Tortora *et al.*, 2003).

Les *Bacillus spp.* sont également présentes dans l'air où ils viennent parfois contaminer les cultures en biotes de Pétri, en travaux pratiques de microbiologie, lorsque les consignes d'ensemencement ne sont pas parfaitement respectées (Camille, 2007).

2.5.5- Ecologie

Selon le microbiologiste Russe Winogradsky, les *Bacillus* appartiennent à la flore naturelle du sol. Ils deviennent métaboliquement actifs quand les substrats appropriés pour leur croissance

sont disponibles. Ils forment des spores quand les éléments nutritifs sont épuisés. La formation des spores est associée avec la production d'antibiotiques (Todar, 2003).

2.5.6- Caractères cultureux

Tous les *Bacillus* se développent sur tous milieux usuels non sélectifs. En bouillon, on observe un trouble floconneux avec un voile en surface ou des flocons qui sédimentent laissant le bouillon liquide dans le cas de *Bacillus anthracis*.

En gélose : les colonies présentent une morphologie et une taille variable selon l'espèce, on obtient généralement des colonies assez volumineuses ayant tendance à s'étaler, plates, opaques à surface chagrinée, à bords un peu dentelés dans le cas de *Bacillus subtilis* (Jerome *et al.*, 2004).

2.5.7- Caractères biochimiques

Les *Bacillus* présentent des types métaboliques variés et leur identification est complexe, cette dernière est basée sur les caractères biochimiques (Latour et Lemanceau, 1997):

- Catalase +
- Oxydase –
- Aérobie stricts ou anaérobie facultatif suivant l'espèce
- Ils fermentent sans dégagement gazeux le glucose, le saccharose, l'arabinose, le xylose et le mannitol. Ils utilisent les citrates, produisent des antibiotiques tels que les subtiline, les subténoline, les bacillomycine, les bacitracine, etc.) (Camille, 2007).

Plusieurs tests sont réalisés au laboratoire pour identifier le profil biochimiques des *Bacillus sp.*, comme :

- Réaction de Vogesproskawer (production d'acetyl-methylcarbinol)
- Fermentation des sucres en milieu sans peptone sont particulièrement intéressantes celles de glucose, xylose, arbinose
- Test de recherche de la catalase
- Test de réduction des nitrates en nitrite (recherche de nitrate réductase)
- Test de recherche de l'uréase
- Test d'hydrolyse de l'amidon (recherche de l'amylase)
- Test d'hydrolyse de la gélatine

- Test d'hydrolyse de lécithine (recherche de lécithinase)
- Test d'hydrolyse de la caséine (recherche de la caséinase)

2.5.8- *Bacillus* carbonatogènes

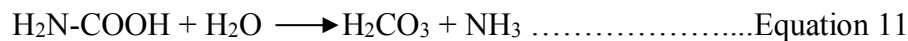
Les espèces de *Bacillus* utilisent certains biomécanismes pour produire du carbonate de calcium, et ce, en fonction de leurs environnements. Il est à noter que la voie uréo-lithiques est la plus impliquée (Vijay *et al.*, 2017; Sidiq *et al.*, 2019).

➤ Biomécanisme uréo-lityque

Après pénétration de la molécule de l'urée ($\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$), dans la cellule bactérienne par diffusion, son hydrolyse suit la réaction présentée dans l'Équation 9 (Krajewska, 2009):



Cette réaction, catalysée par l'uréase, produit du carbamate ($\text{H}_2\text{N-COOH}$) et de l'ammoniac (NH_3). Une fois dans le milieu extérieur, ces deux produits vont réagir avec l'eau présente dans l'environnement et produire des ions hydroxyles (HO^-) pour l'ammoniac (Équation 10) et de l'acide carbonique (H_2CO_3) pour le carbamate (Équation 11).



Les ions hydroxyles (Équation 10) vont basifier le milieu et favoriser la réaction entre les carbonates produits (Équation 11) et les ions calcium présents sur les sites de nucléation membranaires (Équation 12).



La réaction de carbonatation crée ainsi une gaine autour de la cellule, qui continuera à s'épaissir jusqu'à ce que les carbonates soient accumulés (Li *et al.*, 2013).

L'interaction des ions Ca^{2+} avec la membrane cellulaire chargée négativement permet la nucléation des carbonates de calcium pour les deux voies métaboliques décrites. Les sites d'interactions possibles avec les ions Ca^{2+} présents dans l'environnement de la cellule, vont être différents et plus ou moins accessibles en fonction du type de la membrane cellulaire (Gram positif et Gram négatif (figure 5)). En effet, chez les bactéries à Gram positif, les cations peuvent interagir avec les acides téichoïques et lipotéichoïques, nombreux et facilement accessibles. Et chez les bactéries à coloration Gram négatif, les cations peuvent interagir avec les lipopolysaccharides, également nombreux, mais sur une zone moins accessible, car proche de la membrane externe.

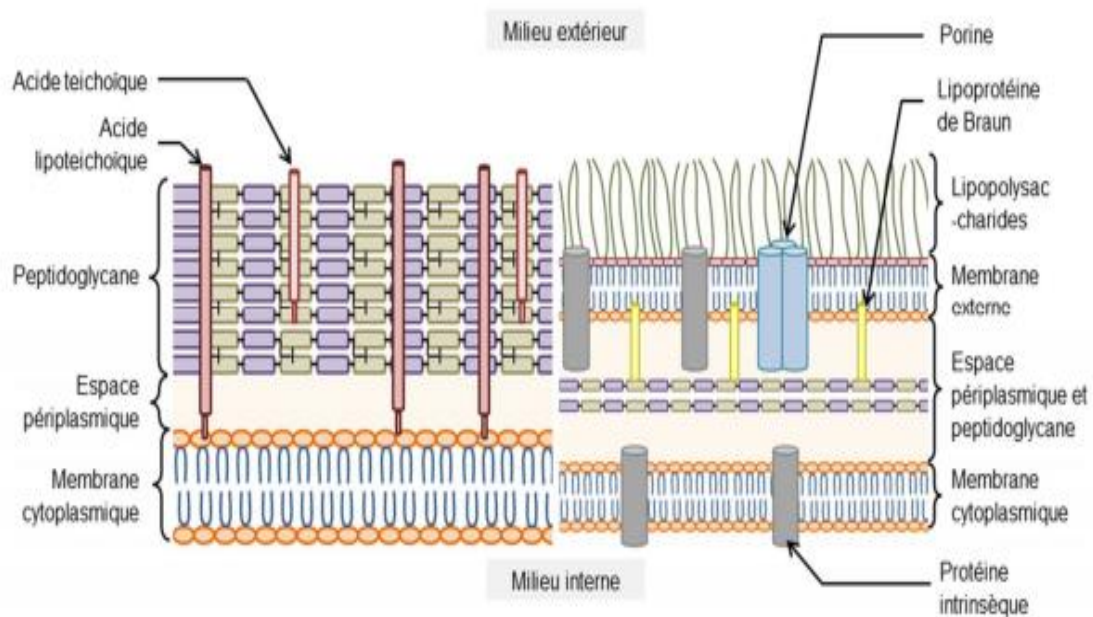


Figure 5 Schéma des membranes externes des bactéries à coloration Gram positif (gauche) et des bactéries à coloration Gram négatif (droite) (Meksem, 2010).

2.6-Voies métaboliques de la carbonatation

De nombreuses espèces de bactéries participent à la précipitation de carbonates de calcium selon différentes voies métaboliques distinctes en l'occurrence, l'autotrophie, qui est effectuée par les bactéries dont la source de carbone est uniquement ou principalement issue du CO_2 ; et l'hétérotrophie, qui est réalisée par les bactéries dont la source de carbone provient de constituants organiques. Trois groupes bactériens autotrophes peuvent produire des carbonates de calcium :-les méthanogènes non-méthyllogènes, qui utilisent le dihydrogène (H_2) et le dioxyde de carbone (CO_2) de leur environnement pour produire du méthane (CH_4) ; - les oxygéniques photosynthétiques, qui utilisent l'énergie lumineuse grâce à la chlorophylle et réalisent une photosynthèse avec production d'oxygène; et - les photosynthétiques dites « anoxiques », qui réalisent une photosynthèse sans production d'oxygène via des pigments photosynthétiques appelés bactériochlorophylles, en réduisant des éléments soufrés, l'hydrogène ou des composés organiques.

Ces trois mécanismes favorisent la précipitation de carbonate de calcium grâce à leur consommation en carbone provenant du CO_2 . En effet, la diminution du CO_2 induit une chute de la pression partielle et oriente l'équilibre des ions carbonate vers la précipitation des carbonates de calcium suivant la réaction suivante.

Les microorganismes hétérotrophes peuvent précipiter les carbonates de calcium de façon active ou passive. La précipitation active par les microorganismes est liée à des phénomènes d'échanges membranaires et notamment au fonctionnement des pompes Ca^{2+} . La précipitation passive résulte de la production d'ions carbonate et hydrogencarbonate, liée au métabolisme, qui vont s'accumuler dans le milieu. En même temps, les déchets du métabolisme vont alcaliniser le milieu. Ces deux facteurs vont favoriser la précipitation de carbonates de calcium. Ces microorganismes hétérotrophes interviennent dans les cycles du soufre ou de l'azote (Castanier *et al.*, 1999). Parmi toutes les voies de production employées par ces organismes hétérotrophes (Dhami, 2013). Une autre voie métabolique peut se compléter ou se combiner à la précédente : l'inter-conversion du dioxyde de carbone CO_2 et du bicarbonate H_2CO_3 catalysée par l'anhydrase carbonique (Supuran et Scozzafava, 2007; Achal et Pan, 2011).

2.7-Facteurs affectant l'efficacité de la bio-carbonation

Plusieurs bactéries peuvent favoriser le processus de la bio-carbonatation, cependant, les bactéries du genre *Bacillus* productrices d'uréase sont les plus utilisées; comme la bactérie *B. pasteurii*, qui a été utilisée pour l'assainissement (Burne, 2013 ; Phillips *et al.*, 2013), alors que *B. megaterium* a été utilisé pour améliorer la rigidité du béton et les matériaux de construction (Dhami *et al.*, 2014)

Les facteurs qui peuvent influencer l'activité de l'uréase et la quantité de CaCO_3 précipitée sont présentés dans les sections suivantes :

2.7.1-Type de bactéries

Le choix de bactéries est motivé par plusieurs critères, par exemple, l'isolement des souches bactériennes d'un site de calcification biocatalytique et la sélection des souches bactériennes possédant une importante activité de l'uréase, favorisant l'expression de l'uréase et la réponse calcique (Hammes *et al.*, 2003 ; Al-Thawadi, 2008).

2.7.2- Concentration de cellules bactériennes

Il s'agit de déceler le temps des phases exponentielles ou il se produit une quantité optimale des enzymes de la souche d'intérêt, afin d'optimiser l'hydrolyse de l'urée et par conséquent les conditions de fabrication du carbonate de calcium. Aussi, l'hydrolyse de l'urée est directement liée à la biomasse bactérienne (Okwadha et Li, 2010).

2.7.3-Variation du pH

Le pH influence le mécanisme de l'activité enzymatique des microorganismes (Ferris *et al.*, 2004 ; Stocks Dupraz *et al.*, 2009). La précipitation de la calcite s'effectue à un pH compris entre 7,0 et 9,5. En revanche, si le pH est très bas, le carbonate va se dissoudre et il n'est pas

précipité (Gorospe *et al.*, 2013). De plus, Stocks-Fischer *et al.* (1999), ont montré que les propriétés biochimiques des précipitations du carbonate de calcium induites par *S. pasteurii*, sont significativement élevées à pH supérieur à 7,7, où la précipitation de la calcite a été parfaite.

2.7.4-Variation de la température

L'hydrolyse enzymatique de l'urée est influencée par la variation de la température (Mitchell et Ferris, 2005). A des températures mésophiles (entre 20 et 37°C), l'activité de l'uréase augmente de 10 fois en la comparant à celle obtenue dans des températures basses (comprise entre 15 et 20°C) (Al-Thawadi, 2008). De plus, Williams *et al.* (2016), ont trouvé que l'activité uréase est complètement affectée à des températures atteignant les 55°C et dans des pH 13,6.

2.7.5-Concentrations d'urée et de calcium

Les concentrations et les sources du calcium sont des facteurs majeurs pour les processus de bio-précipitation. En effet, plusieurs auteurs ont confirmé que lorsque les concentrations d'urée et de calcium sont élevées, l'efficacité de la précipitation de la calcite est réduite et vice versa (De Muynck *et al.*, 2010).

2.7.6-Sources de nutriments

La source de nutriments est l'un des facteurs majeurs qui peuvent influencer la bio-carbonatation. De plus, les bactéries calcifiantes ont besoin d'une source de carbone organique et d'une source de calcium. Selon Abo-ElEnein *et al.* (2012), l'enrichissement du milieu de culture par quelques nutriments comme l'extrait de levure, le chlorure d'ammonium, le sulfate de potassium et l'urée, provoque l'augmentation du pH, ce qui induit une activité uréasique élevée.

2.8- Utilisation de bactéries alcalino-résistantes comme agents de bio-cicatrisation

Les fissures du béton parviennent naturellement à cause des chocs mécaniques ou bien le non-respect des règles de la construction, parmi les causes on peut citer : l'excès d'eau dans le mélange, le séchage trop rapide du béton, l'absence de joints de dilatation, les conditions climatiques, et la vibration. Cependant, dans le but de traiter les fissures formées sur la matrice cimentaire plusieurs recherches ont été effectuées, récemment, et qui se sont concentrées sur le développement d'un système de réparation pour les matériaux cimentaires. Ce système de bio-réparation présente de meilleurs résultats par rapport aux produits

actuellement disponibles sur le marché, en termes de durabilité à long terme et du respect de l'environnement (Wiktor, 2011).

La figure 6 présente le résultat de l'évaluation des performances du traitement de ciments lorsque les microorganismes sont utilisés comme agents de réparations (Jonkers, 2011).

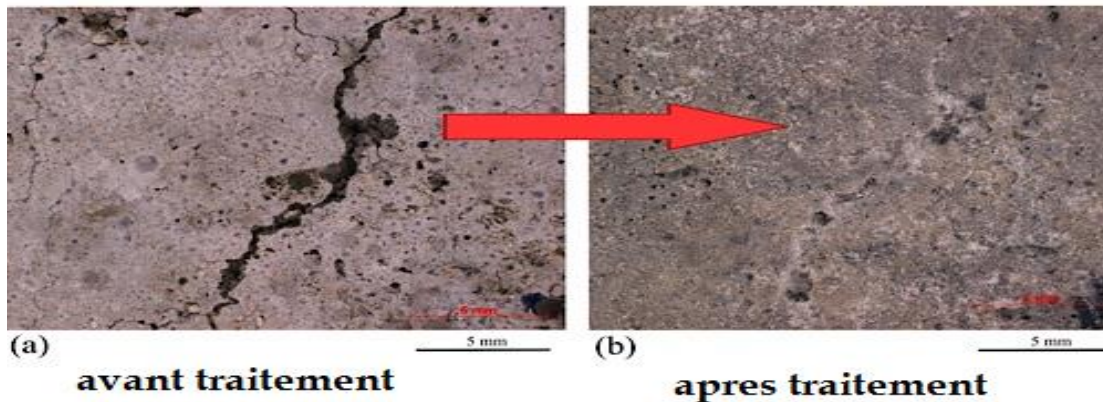


Figure 6 Réparation des fissures induite par la bio-carbonatation (Jonkers, 2011)

2.9- Avantages et limites de la bio-carbonatation

La carbonatation est considéré l'un des phénomènes les plus bénéfiques des matrices cimentaires à base de ciment. Elle permet l'augmentation de la résistance mécanique des bétons (compression, chocs, usure, etc.) et de rendre le matériau plus stable chimiquement vis-à-vis des réactions de gonflement (réaction sulfatique interne ou externe, réaction alcali-granulats, etc.). De plus, la carbonatation induit un gain de masse correspondant à la fixation du CO_2 dans les hydrates. Le fait que le volume molaire du carbonate de calcium formé soit supérieur à celui des hydrates qui conduit, à un colmatage de la microstructure et une densification de la zone carbonatée, ceci rend le béton moins perméable aux agents agressifs (en l'occurrence les ions sulfates, les chlorures, et plus généralement, eaux séléniteuses ou magnésiennes, etc.) (Wiffin, 2004 ; Al-Thawadi, 2008).

2.10- Application de la bio-carbonatation

L'utilisation des bactéries capables de produire des carbonates de calcium a été étudiée dans de nombreux domaines, on cite entre autres : la bio-remédiation des contaminants inorganiques, suivant des mécanismes physico-chimiques et biologiques complexes, permettant une immobilisation et une bio-remédiation de ces éléments (Gadd, 2010), le piégeage du calcium dans les eaux usées permettant de limiter la précipitation des carbonates de calcium durant leur traitement dans un bioréacteur anaérobie, menant ainsi à une

diminution de l'efficacité du retraitement des eaux (Van Langerak *et al.*, 1998; Hammes *et al.*, 2003), la séquestration du CO₂ atmosphérique, étudiée pour comprendre les mécanismes de formation des sédiments (Castanier *et al.*, 1999) et afin de diminuer le taux de ce gaz dans notre atmosphère (Ramanan *et al.*, 2009). La consolidation des roches calcaires des monuments historiques par diminution de la perméabilité des pierres ou comblement des fissures (Le Métayer-Levrel *et al.*, 1999), La consolidation des matériaux de construction (De Muynck *et al.*, 2010; Dhami *et al.*, 2013) et la modification des propriétés du sol, comme par l'augmentation de sa cohésion et sa solidité afin de permettre le développement de constructions (Van Paassen et Harkes, 2007; Ivanov et Chu, 2008).

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur la recherche de *Bacillus carbonatogènes* des sites rocheux en vue de leurs applications dans la bio-cicatrisation de matériaux cimentaires. Le développement de cette étude a eu lieu au sein des deux laboratoires ; à savoir, le laboratoire du centre médical de la mutuelle générale des matériaux de construction (CMS-M.G.M.C) ainsi que, le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).

3.1- Echantillonnage

Les échantillons utilisés dans le présent travail ont été prélevés à partir des sites rocheux, de la région d'ELKHROUB commune -OULED RAHMOUNE- située au sein de l'Entreprise Nationale des Granulats (ENG). Cette région est connue par la production de carbonate de calcium depuis l'année 1986. Les échantillons du sol analysés dans ce travail ont été prélevés à partir des trois endroits du site rocheux; en l'occurrence ; 795 L1 (site d'une roche calcaire), 795 L2 (site du sol ordinaire) et la 812 (site argileux) (figure 7). Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, une quantité de ce dernier est prélevée à partir de différentes profondeurs (20 et 35cm) et ce, à l'aide d'une spatule stérile et introduite dans des flacons stériles afin de les transporter jusqu'au laboratoire.



Figure7 Sites d'échantillonnage

3.2- Isolement des bactéries du genre *Bacillus*

3.2.1- Dilutions

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à préparer la solution mère du sol en ajoutant 1 g du sol à 9 mL d'eau physiologique stérile (9g d'NaCl dans 1 litre d'eau distillée), suivie d'une agitation pendant 3 min au vortex. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1 mL de la solution précédente à 9 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-11} (Jerome *et al.*, 2004).

3.2.2-Traitement thermique

Les endospores sont détectées indirectement en chauffant les tubes contenant les dilutions préparées précédemment à 80°C pendant 10 minutes puis les tremper dans de l'eau glacée, traitement auquel les endospores résistent habituellement, mais qui tue la plupart des cellules végétatives. L'étalement de cet échantillon traité sur milieu LB gélosé (Annexe 1) permet d'isoler des espèces du genre *Bacillus* (Singleton, 2005).

3.2.3- Ensemencement

0.1 mL de chacune des dilutions a été déposé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu nutritif gélosé LB (Luria-Bertani), puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Grâce à cette méthode, toutes les colonies se développent sur la surface. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24 heures (Tortora *et al.*, 2003).

3.2.4- Purification des bactéries du genre *Bacillus*

Après développement des colonies, les bactéries isolées sont repiquées dans le même milieu de culture (LB). La purification est effectuée par la méthode des stries qui consiste à tracer des stries croisées avec l'anse contenant la bactérie, sur la surface d'une gélose neuve dans des boîtes de Pétri. La colonie parfaitement isolée, est ensuite prélevée et transférée toujours au moyen d'une anse de repiquage sur le même milieu mais dans de nouvelles boîtes de Pétri. L'incubation de toutes les boîtes est effectuée à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes (John et Michael, 2007).

3.3- Identification présomptive des bactéries du genre *Bacillus*

L'identification des *Bacillus* est effectuée par l'observation macroscopique basée sur la détermination de l'aspect et la couleur des colonies, en plus de l'observation microscopique qui met en évidence la taille, la forme, l'arrangement des cellules, et leur mobilité. L'identification est basée aussi sur l'étude des caractères biochimiques.

3.3.1- Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nue de la taille (petite, moyenne, grande), la forme de la colonie (ronde, irrégulière...), transparence, élévation de la colonie, type de colonie et le relief (Camille, 2007).

3.3.2- Observation microscopique

3.3.2.1- Observation à l'état frais

Cette technique permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie. Il est souvent possible de visualiser si, les cellules sont mobiles ou non. La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame en verre propre. Puis à l'aide d'une anse de platine stérile, un prélèvement bactérien de la colonie à identifier est apporté et dissocié dans la goutte d'eau physiologique. Ensuite la lame est recouverte par une lamelle, tout en évitant la formation de bulles d'air. Enfin, l'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) puis à immersion (X100) (Singleton, 2005).

3.3.2.2- Coloration de Gram

La coloration de Gram a été mise au point en 1884 par le bactériologiste Danois *Hans Christian Gram*. Cette technique est l'une des méthodes de coloration la plus utile, elle permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Tortora *et al.*, 2003).

Cet examen a été effectué selon la méthode classique suivante : les frottis utilisés sont étalés à l'aide d'une anse sur des lames en verre propre. Les lames sont ensuite séchées à l'air à proximité d'un bec bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois dans la flamme. Les frottis préparés sont colorés pendant 1 minute au cristal violet, qui est un colorant basique, ils sont ensuite, rincés rapidement par une solution de *lugol* (solution

aqueuse d'iode et d'iodure de potassium), qui agit comme un mordant, qui augmente les interactions entre le colorant et la cellule pour que cette dernière soit contrastée. Sans rincer et en inclinant les lames à 45°C, les frottis sont ensuite décolorés par un lavage avec un mélange d'éthanol et d'acétone (1 à 3 secondes). Juste après, la décoloration est arrêtée rapidement par un lavage à l'eau du robinet.

Dans la dernière étape, les frottis sont soumis à une contre-coloration de 30 secondes à la fuchsine basique diluée. Après un bref rinçage, les frottis sont séchés par le papier buvard et examinés par microscope jusqu'à l'objectif à immersion (grossissement X100) (Camille, 2007).

La couleur violette due au cristal violet est l'aspect caractéristique des bactéries à coloration Gram positive, les bactéries Gram négative se colorent en rose par la fuchsine (Tortora *et al.*, 2003).

3.3.2.3- Coloration des endospores

Une endospore est une structure dormante intracellulaire particulière qui protège la bactérie contre des conditions environnementales défavorables. Bien que, en général, les bactéries ne produisent pas d'endospores, il existe néanmoins, quelques genres de bactéries à Gram positif qui sporulent. Les endospores ne peuvent être colorées par les méthodes habituelles car les colorants pénètrent difficilement à travers la paroi. Par exemple, traitées à la coloration de Gram, les bactéries sporulées se colorent mais l'endospore demeure transparente. Dans le contexte d'un diagnostic microbiologique où il importe de vérifier leur présence pour identifier l'agent pathogène, il faut colorer spécifiquement les endospores.

La technique de coloration la plus courante pour les endospores est la coloration de *Schaeffer-fulton*. D'abord, le frottis fixé à la chaleur est recouvert par le vert de Malachite, colorant primaire, puis chauffé jusqu'à évaporation pendant environ 5 minutes, la chaleur favorise la pénétration du colorant à travers la paroi de l'endospore. La préparation est ensuite lavée à l'eau pendant environ 30 secondes. Pour colorer les constituants bactériens qui ne sont pas des endospores, le frotti est traité par la safranine qui est un contre colorant. Si le frottis est correctement préparé, les endospores apparaîtront en vert à l'intérieur des cellules bactériennes colorées en rouge ou rose (Tortora *et al.*, 2003).

3.3.3- Caractères biochimiques

3.3.3.1- Test catalase

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée. Il consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène, la présence de catalase se manifeste par la formation de bulles (oxygène). Dans la version traditionnelle du test. Un prélèvement bactérien est transféré au moyen d'une boucle dans une goutte de peroxyde d'hydrogène déposée sur une lame. Avec cette technique, si le test est positif, les bulles en éclatant donnent naissance à un aérosol. Pour éviter la contamination de l'environnement par des aérosols, une autre méthode est utilisée : en plaçant une petite quantité de culture bactérienne dans une lame, vide et propre, ensuite, deux gouttes de peroxyde d'hydrogène sont déposées à proximité de l'échantillon bactérien. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles (Singleton, 2005).

3.3.3.2- Type respiratoire

Le milieu utilisé est la gélose Viande-foie (VF)(Annexe 1). Ce milieu contient du glucose (source du métabolisme énergétique) et ne contient pas de nitrates (accepteurs d'électrons). Avant d'êtreensemencés, les milieux VF doivent être régénérés par séjour d'une demi-heure au bain-marie bouillant puis refroidis à 45°C.

L'effilure d'une pipette Pasteur boutonnée stérilisée par flamage est plongée dans une suspension de la bactérie à étudier. L'inoculum est transporté dans le fond du tube, ensuite la pipette est remontée en décrivant des tours de spires très serrés en prenant soin de ne pas aérer le milieu. L'incubation est effectuée à 37 °C durant 18 à 24 heures.

Après incubation, quatre types respiratoires peuvent être observés:

- Bactérie aérobie strict: croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose;
- Bactérie anaérobie strict : croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose;
- Bactérie aéro-anaérobie facultatif : croissance sur toute la hauteur de la gélose;
- Bactérie micro-aérophile : croissance dans un cylindre de gélose d'environ 0,5 Cm de hauteur et situé à environ 1 à 2 cm de la surface (Camille, 2007).

3.3.3.3- Fermentations de quelques substrats carbonés en utilisant la galerie API 20E

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries et la détermination de certaines espèces par la compréhension de certaines caractéristiques du métabolisme des isolats (Goszczyńska *et al.*, 2000). A cet effet, la galerie API 20 E, a été utilisée pour tester la fermentation des 20 substrats carbonés semi-solides. Les bactéries à tester sont mises en suspension dans de l'eau physiologique puis inoculées dans chaque puits de la galerie.

Le tableau 2 explique la signification de la majorité des tests fondamentaux que renferme la galerie API 20 E.

Tableau 2 Substrats spécifiques de la galerie API 20E

Substrats	Significations	Caractère
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	B-galactosidase
ADH/LDC/ODC	Arginine, lysine, ornithine	Arginine-déhydrogenase Lysine-décarboxylase Ornithine-décarboxylase
CIT	Citrate de simons	Utilisation des citrates
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S
TDA	Tryptophane	Tryptophane-désaminase
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétonine
GEL	Gélatine	Gélatinase
Sucre	Substrats carbonés	Utilisation des glucides

Pendant l'incubation, le métabolisme des glucides par exemple produit des acides organiques qui font virer les indicateurs du pH. La lecture de galerie a été faite après 24 h d'incubation à 30°C, en notant les virages du négatif au positif de chaque puits.

3.4-Sélection des isolats du genre *Bacillus* carbonatogènes

3.4.1- Culture sur milieu sélectif solide

Les souches purifiées ont été utilisées pour la production de calcite en utilisant le milieu précipité au calcium (MPC). (Annexe1)(Cacchio *et al.*, 2003). Des fioles de 100 ml de pré-culture contenant 25 ml du milieu liquide (LB) préparés et stérilisés, ont été inoculés par deux colonies de chaque souche bactérienne et incubées dans un incubateur agité (37 °C et 150 rpm) (figure 8) pendant 24 heures.

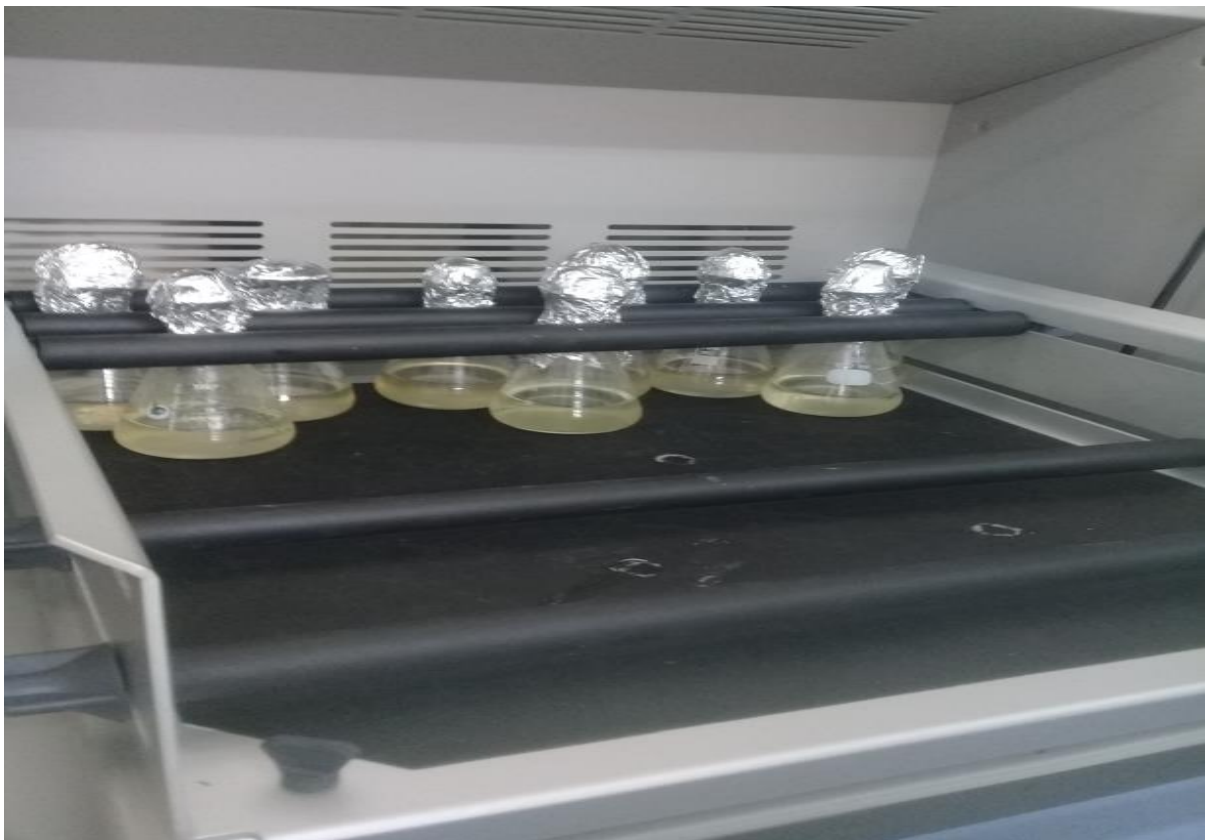


Figure 8 Fioles incubées en agitation

Après la période d'incubation 40 μ l de chaque culture bactérienne ont été inoculés à la surface des boîtes de pétri contenant le milieu solide MPC, puis incubées à 37°C pendant 7 jours. Le test est considéré positif, s'il y a la production d'une poudre blanche autour de la zone inoculée.

3.4.2-Culture sur milieu sélectif liquide

Des tubes Falcons stériles de 50 ml ont été inoculés avec 11 ml de cultures bactériennes jeune précédemment cultivées sur milieu LB liquide, et additionnés avec 4 ml de milieu MPC liquide (Bhaduri *et al.*, 2016). Les falcons ont été incubés à 37°C, pendant 21 jours, jusqu'à l'obtention d'un précipité blanc dans le fond des tubes falcons, ce qui confirme la production de la calcite.

La figure 9 illustre le schéma simplifié de cette technique.



Figure 9 Schéma démonstratif de la culture sélectif sur milieu

3.4.3- Test chimique de vérification de la calcite précipitée sur milieu solide

Dans le but de vérifier la production de la calcite (poudre blanche), qui a été précipitée autour des colonies, une spatule stérile a été utilisée pour récupérer la poudre obtenue et la déposée dans des lames en verre, puis une goutte de l'acide chlorhydrique (HCl) (Bassow *et al.*, 1971), a été ajoutée afin de tester la solubilité de cette poudre. Le témoin négatif (colonie sans poudre) a été utilisé pour comparer les résultats obtenus en utilisant le même acide (HCl).

3.4.4- Test chimique de vérification de la calcite précipitée sur milieu liquide

Afin de vérifier la production de la calcite sur milieu liquide, les cultures obtenues dans les falcons ont été filtrés à travers du papier Wattman n°1, puis séchés. Des gouttes de HCl ont été versées pour vérifier la production de la calcite. Le résultat est considéré positif si il y a une effervescence qui se traduit par la disparition de la poudre blanche (Shahine *et al.*, 2021).

3.4.5- Effet de l'urée sur la calcification

La production de carbonate de calcium via la voie de la dégradation de l'urée est la plus étudiée selon la littérature (Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2015). L'urée est utilisée comme source d'azote, son hydrolyse aboutit à la formation de CO_3 qui est impliqué dans la production de la calcite.

Afin de réaliser ce test, le milieu MPC liquide a été utilisé (Stocks-Fischer *et al.*, 1999), ce milieu a été additionné de 20 mg /l de l'urée et inoculé par deux souches bactériennes qui ont montré un résultat positif vis-à-vis le test de production de la calcite (voir section 3.4.2). Le milieu MPC sans urée a été inoculé par les mêmes souches et sert comme témoin.

3.4.6- Etude de la croissance des souches sélectionnées

Afin de mettre en évidence la comparaison de la croissance des deux souches sélectionnées et leurs aptitudes de production de calcite, un suivi de la croissance a été effectué en utilisant la densité optique. Pour ce faire, 15 erlen-meyers contenant le milieu LB liquide ont été préparés et autoclavés, ensuite inoculés par les souches sélectionnées séparément. L'incubation a été réalisée à 30° C et 150 rpm pendant 24 heures.

➤ Mesure de la densité optique

La croissance cellulaire est suivie par mesure de la densité cellulaire par spectrophotométrie à 600 nm (spectrophotomètre SHIMADZU UV-1280) dans une cuve en verre de 1cm de trajet optique. La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,05 et 0,8 unité d'absorbance, ce qui place la valeur dans la zone de linéarité de la méthode.

3.5- Utilisation des bactéries carbonatogènes sélectionnées comme agents de bio-cicatrisation

Dans le but de confirmer la bio-cicatrisation des fissures du ciment par les deux souches bactériennes sélectionnées, la méthode de Luo *et al.* (2015) a été utilisée avec quelques modifications :

3.5.1-Préparation des solutions bactériennes

Les deux souches bactériennes sélectionnées ont été utilisées pour la préparation de pré-cultures de 24h cultivées sur milieu LB (pH 9) préalablement autoclavées, inoculées puis incubées à 37°C et 150rpm.

3.5.2-Préparation de la pâte du ciment

Les constituants utilisés pour la préparation de la pâte du ciment sont présentés dans le tableau 3

Tableau3 Préparation de la pâte du ciment

Ciment(g)	Solution bactérienne (ml)	Substrat (Cacl ₂) (g)	Eau (ml)
1502	45 (d'une concentration de 6.10^6 (celles/ml)	30	30

Pour ce faire, trois lots ont été utilisés ; le premier et le deuxième ont été mélangés avec de la solution bactérienne de chaque souche, séparément, tandis que le troisième a été additionné uniquement avec de l'eau et qui sert par conséquent comme témoin. Ensuite la pâte a été coulée dans 03 moules en plastiques dont la hauteur est de 2cm et démoulée après 24h.

3.5.3- Création des fissures

Des chocs mécaniques ont été appliqués sur les échantillons du ciment afin de créer des petites fissures. Notons que les chocs mécaniques sont habituellement formés en utilisant un compresseur, dont la pression se situe entre 0.5 et 0.8 MPa. En revanche, dans le présent travail, la formation des fissures a été effectuée manuellement en utilisant un marteau. Les fissures ont été traitées par les deux souches carbonatogènes sélectionnées.

3.5.4- Traitement des échantillons

Les échantillons des ciments ont été trempés dans de l'eau pendant 12h puis, laissés à l'air libre pour autres 12h. Après cette période, les deux premiers lots ont été pulvérisés par la solution bactérienne, alors que le témoin a été pulvérisé par de l'eau uniquement. La lecture a été effectuée à partir du 5^{ème} jour, en observant la bio-cicatrisation des fissures.

La figure 10 illustre un schéma simplifié de la méthode utilisée.

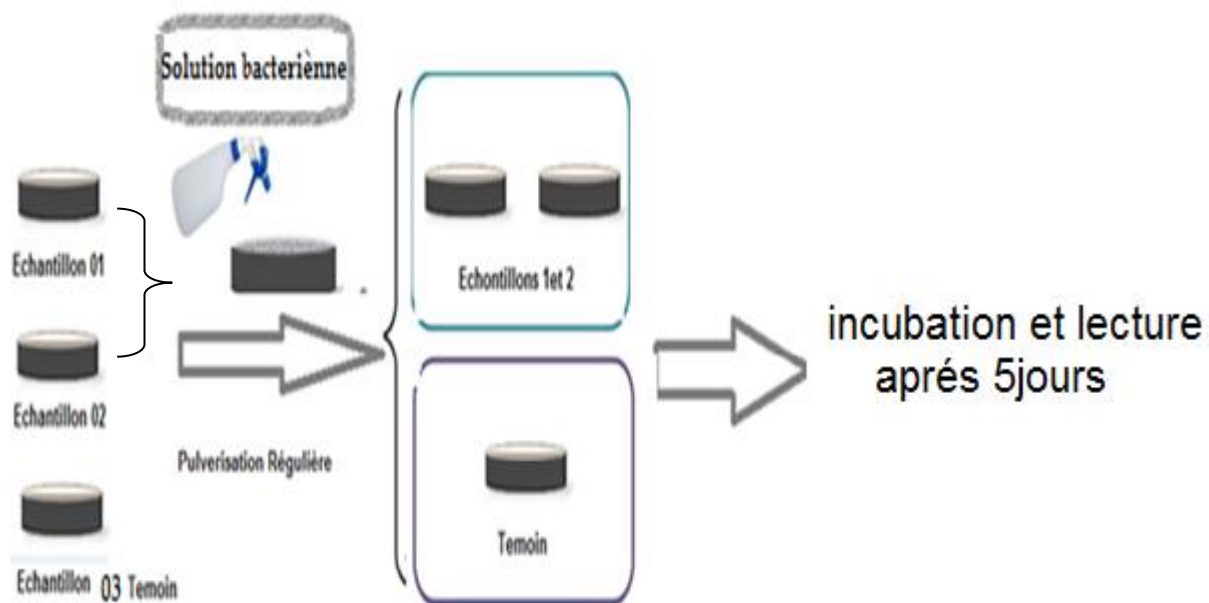


Figure 10 Traitement des fissures du ciment

4- Résultats

Le présent travail porte sur la caractérisation de bactéries carbonatogènes du genre *Bacillus* isolées à partir des sites rocheux et leurs applications dans la bio-cicatrisation de matériaux cimentaires. Aussi, cette étude a pour but de développer un protocole expérimental adapté afin de mettre en évidence la bio-cicatrisation des fissures engendrées manuellement.

4.1- Isolement et identification des bactéries du genre *Bacillus*

26 isolats bactériens ont été obtenus à partir des trois sites d'échantillonnage. L'analyse des résultats obtenus a montré que 3 isolats bactériens ont été obtenus à partir du site 795 L1 (35 cm de profondeur). Alors que, 17 bactéries ont été isolées à partir du site 795 L2 (20 cm de profondeur), et enfin 6 isolats bactériens ont été obtenus à partir du site 812(35 cm de profondeur) (tableau 4). L'analyse des résultats obtenus a révélé que la profondeur de 20 cm (sol ordinaire) est la plus peuplée de bactéries en comparaison aux autres profondeurs.

Tableau4 Isolats bactériens obtenus à partir de différents sites

Sites	Dilutions	Nombre d'isolats	Profondeurs
795L1(Roche calcaire)	10^{-1}	03	35 cm
795 L2 (Sol ordinaire)	10^{-1}	10	20 cm
	10^{-2}	04	
	10^{-3}	03	
812 (site argileux)	10^{-1}	06	35cm

Après purification, seulement 9 isolats bactériens ont fait l'objectif du complément d'étude. L'identification préliminaire de ces isolats ainsi que leur capacité de produire le carbonate de calcium est mise en évidence dans les sections qui suivent.

4.2- Etude macroscopique

L'observation macroscopique (Figure11) a permis de mettre en évidence l'aspect macroscopique des isolats bactériens purifiés.

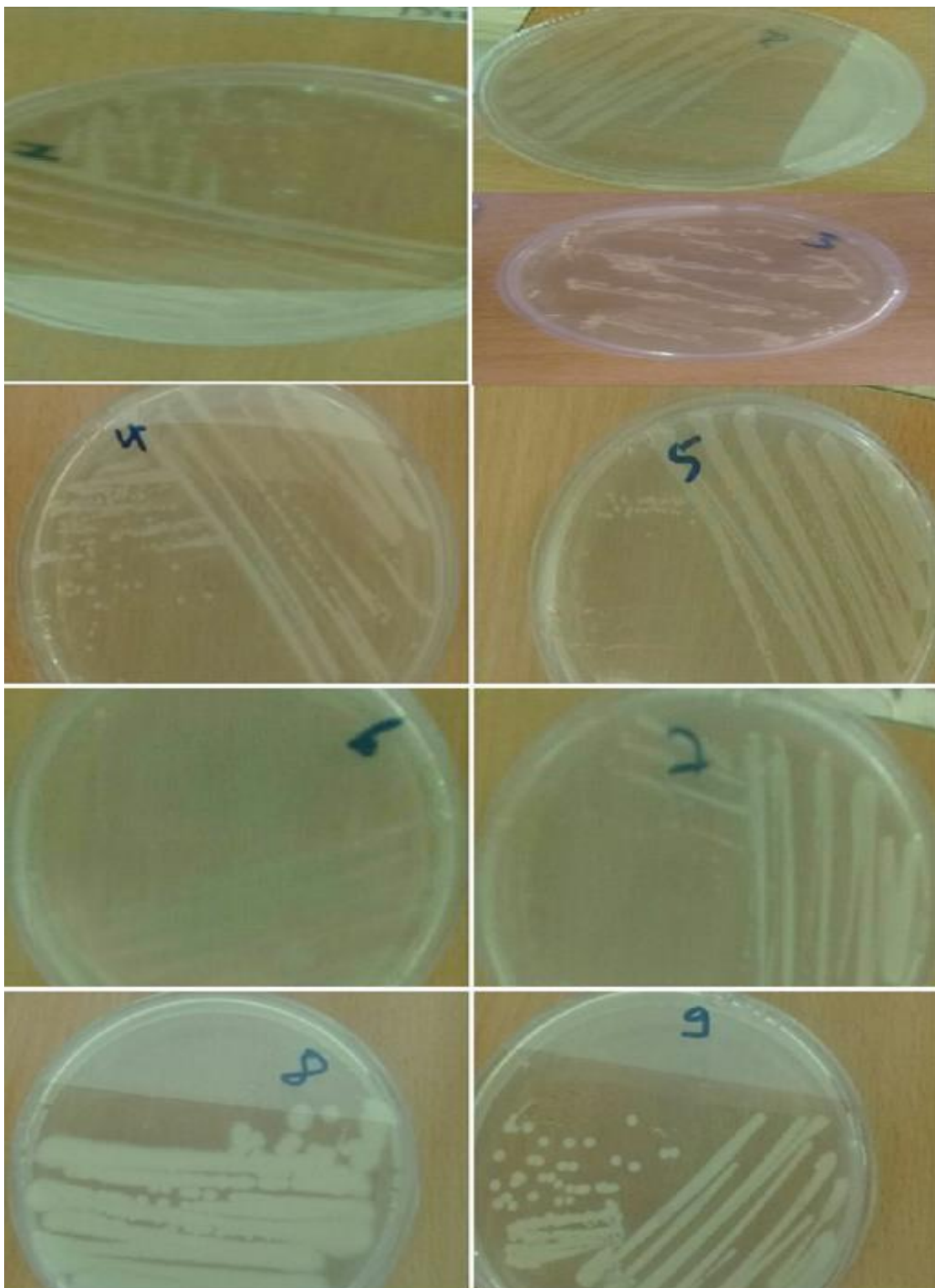


Figure 11 Aspect macroscopique des 09 isolats bactériens.

Ces observations ont montré une grande diversité des caractères morphologiques des isolats obtenus, au niveau de la taille, de la forme, du relief et de la couleur. Le tableau 5 résume les différents caractères macroscopiques.

Tableau 5 Caractères macroscopique des isolats obtenus

N° d'isolats bactériens	Temps d'incubation (Heures)	Taille	Forme	Relief	Couleur
1	24	Moyenne	Ronde	Plane	Crème
2		Petite	Ronde	Plane	Crème
3		Moyenne	Ronde	Plane	Crème
4		Moyenne	Ronde	Plane	Crème
5		Petite	Ronde	Plane	Crème
6		Petite	Ronde	Plane	Crème
7		Moyenne	Ronde	Plane	Crème
8		Grande	Irrégulière	Elevée	Crème
9		Moyenne	Ronde	Plane	Crème

En effet, les colonies d'isolats bactériens obtenus présentent une morphologie et une taille variable (petite, moyenne et grande). Selon l'espèce étudiée, l'observation macroscopique a montré des colonies plus ou moins volumineuses ayant tendance à s'étaler sous différentes façons, en l'occurrence : plates ; à surface chagrinée ; et à bords un peu dentelés.

4.3- Etude microscopique

4.3.1- Observation à l'état frais

La réalisation de l'état frais nous a permis d'observer la morphologie des bactéries et de voir si elles sont de type mobile ou immobile (Camille, 2007). Les résultats obtenus ont montré que certains isolats sont mobiles, d'autres sont immobiles. L'aspect microscopique à l'état frais des isolats obtenus sont illustrés dans la figure 12.

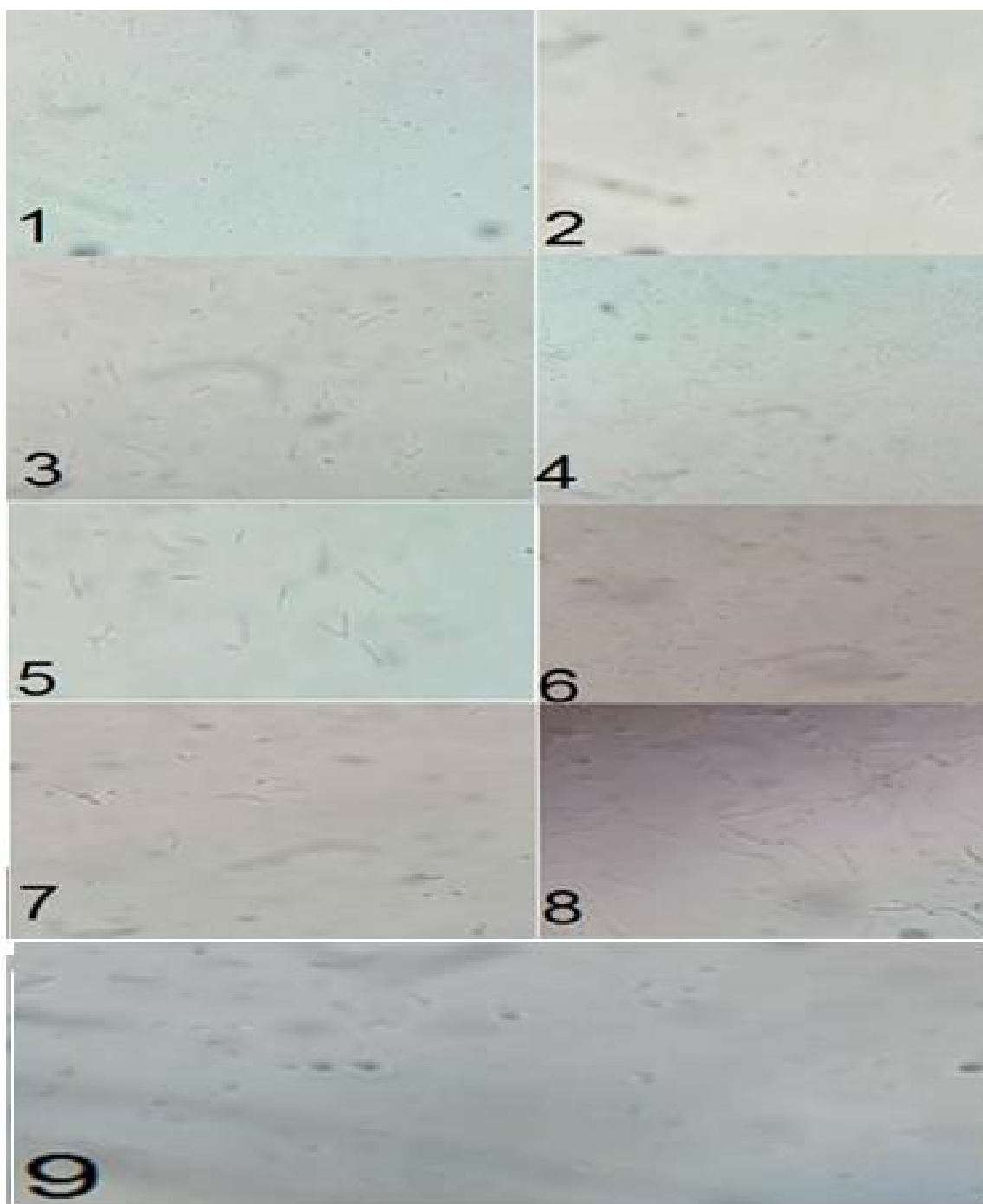


Figure 12 Observation microscopique à l'état frais des isolats bactériens (Grossissement X 40).

En effet, les bactéries du genre *Bacillus* sont généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais il y a des espèces immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches.

Le tableau ci-dessous (tableau 6) récapitule l'aspect microscopique des isolats obtenus.

Tableau 6 Aspect microscopique des isolats bactériens

N°d'isolats bactériens	Forme	Taille	Mobilité
1	Bacilles	Moyenne	Mobiles
2	Bacilles	Petite	Mobiles
3	Bacilles	Moyenne	Mobiles
4	Bacilles	Moyenne	Mobiles
5	Bacilles	Petite	Immobilés
6	Bacilles	Petite	Mobiles
7	Bacilles	Moyenne	Mobiles
8	Bacilles	Grande	Immobilés
9	Bacilles	Moyenne	Mobiles

4.3.2- Coloration de Gram

Après avoir effectué une coloration de Gram, les 09 isolats bactériens obtenus ont présenté une coloration violette, signifiant qu'ils sont Gram (+) (Figure 13).

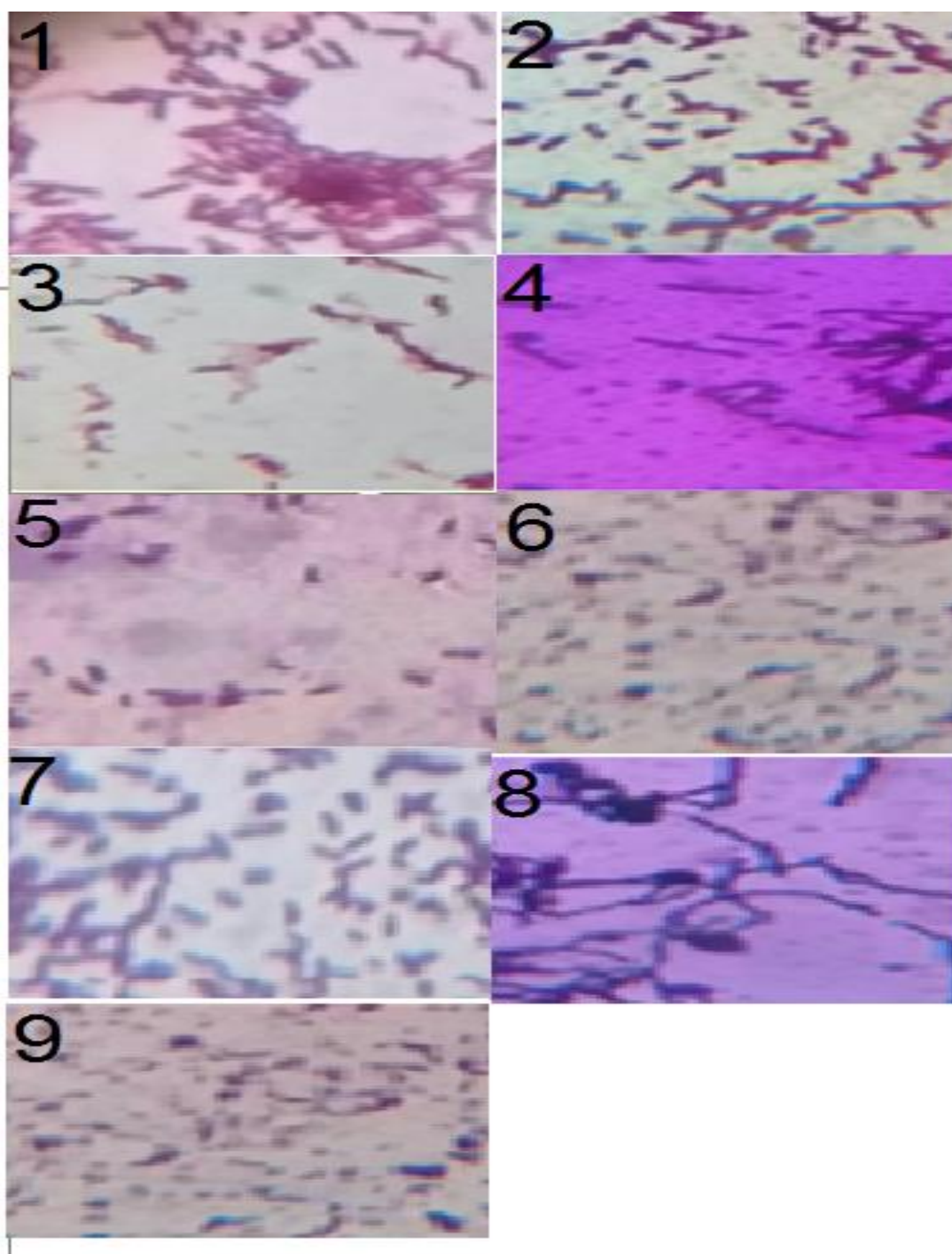


Figure 13 Coloration de Gram des 09 isolats

La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles à GRAM positif rarement à GRAM négatif, car la coloration de GRAM n'est positive que dans les très jeunes cultures) (Camille, 2007).

4.3.3- Coloration des endospores

La coloration de spores suivant la technique de SCHEAFFER FULTON, est appliquée aux bacilles qui ont développé une coloration positive de GRAM. Le résultat obtenu a montré que les spores apparaissent en couleur verte et que tous les isolats sont de caractère sporulant.

La figure 14 montre un exemple de l'apparition d'un isolat coloré avec du vert de malachite et qui confirme par conséquent la présence des endospores.



Figure 14 Test des endospores (Grossissement X 40).

En se basant sur les caractéristiques morphologiques, en l'occurrence, macroscopiques et microscopiques, les 9 isolats bactériens obtenus appartenant au genre *Bacillus*

4.4- Caractères biochimiques

4.4.1- Test catalase

Ce test a montré que les 9 isolats bactériens présentent des bulles après le dépôt de l'eau oxygénée H_2O_2 , signifiant qu'elles sont catalase positif. Cette enzyme contient du fer qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 15).



Figure 15 Test catalase

4.4.2- Type respiratoire

La culture des 9 souches obtenues sur milieu viande fois (VF), a montré que toutes les souches testées présentent une croissance sur toute la hauteur de la gélose; indiquant que les bactéries en question sont aéro-anaérobie facultatif (figure 16).

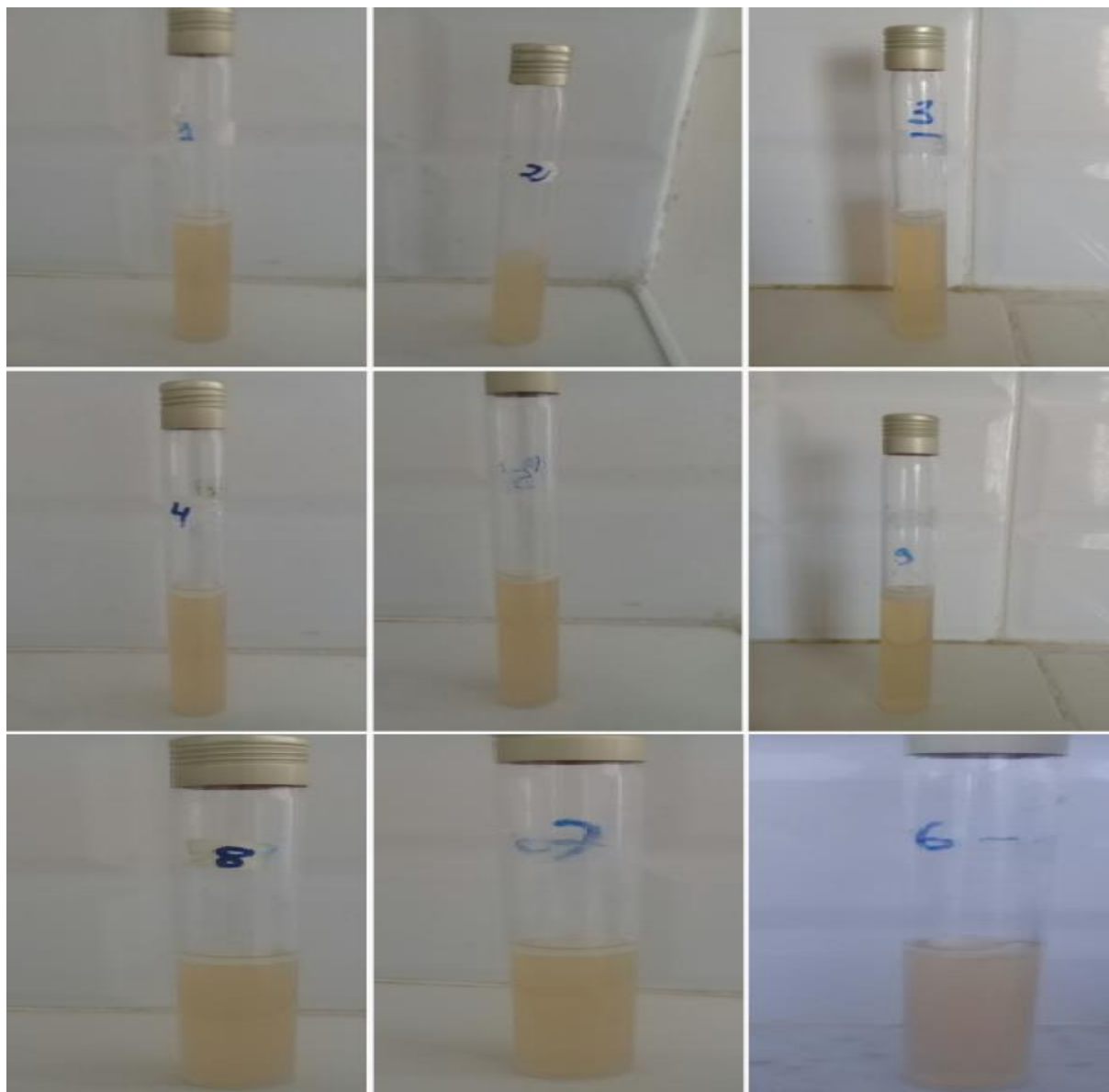


Figure16 Test de type respiratoire

4.4.4-Fermentations de quelques substrats carbonés en utilisant la galerie API 20E

La galerie API 20E, constitue, un ensemble de cupules prêtes à l'emploi et qui permettent l'identification préliminaire des microorganismes d'une façon rapide en effectuant des tests biochimiques miniaturisés. Le résultat de l'identification biochimique des 9 isolats bactériens en utilisant la galerie API 20 E est présenté dans la figure ci-dessous (figure 17).

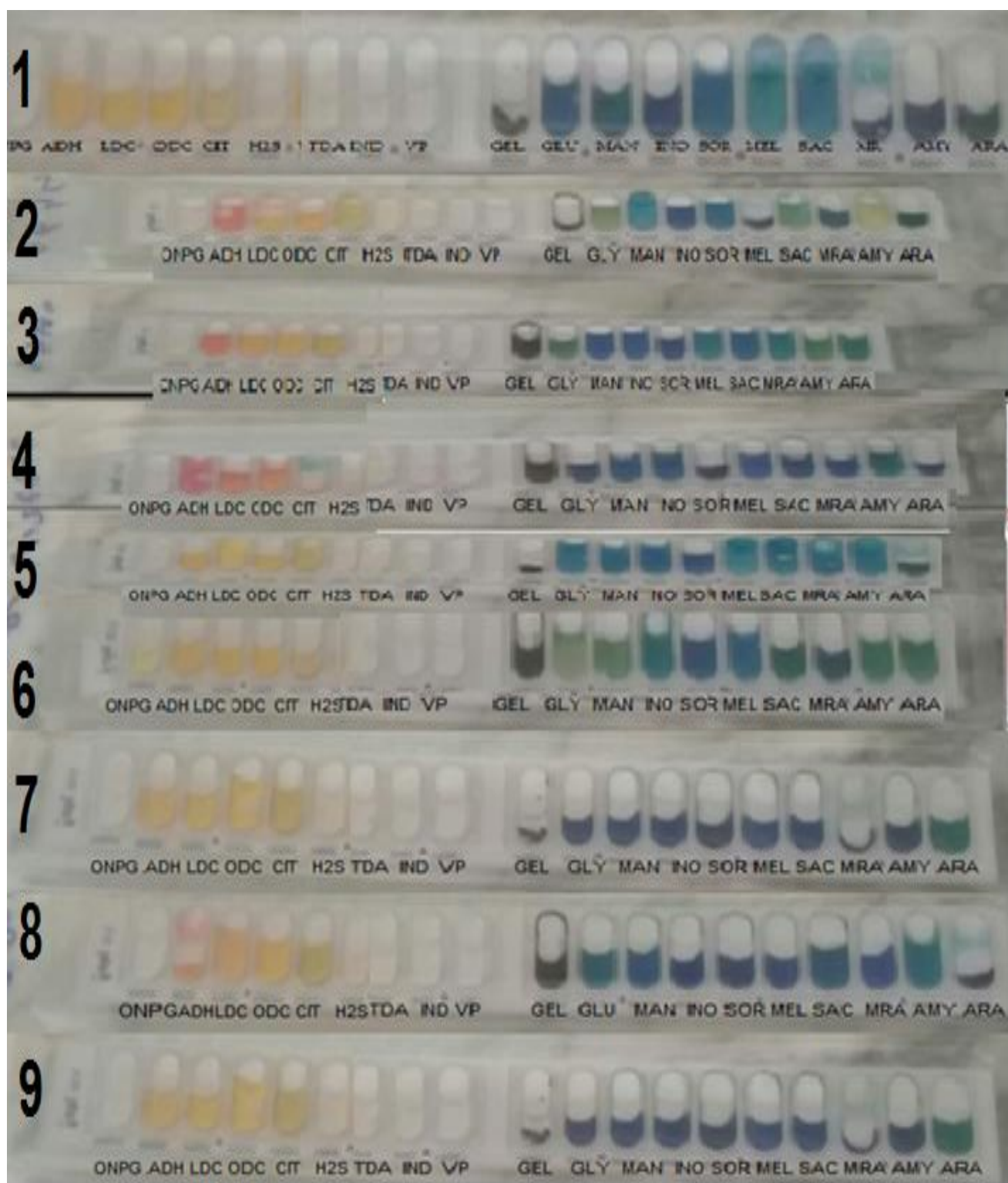


Figure 17 Tests API 20E

Sur la base des résultats obtenus, l'utilisation des différents substrats par les 9 isolats obtenus a été variable selon l'espèce utilisée (tableau7).

Tableau 7 Utilisation des différents substrats par les 9 isolats obtenus.

Substrats	Souches bactériennes								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ONPG	-*	+**	-	-	-	+	-	-	-
ADH	+	+	+	+	-	-	-	+	-
LDC	+	-	-	+	-	-	-	+	-
ODC	+	-	-	+	-	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	+	-	+	+	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Mannitol	-	+	-	-	+	+	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Sorbitol	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Saccharose	+	+	-	-	+	+	-	+	+

** Test positif ; * Test négatif

L'étude des caractères réalisés à l'aide des préparations microscopiques, macroscopiques et les résultats des tests biochimiques en utilisant la galerie API 20 E sont résumés dans le tableau 8

Tableau 8 Tableau récapitulatif des différents résultats d'identification des isolats obtenus

souches bactériennes	Etat frais	Coloration de Gram	Coloration d'endospore	Catalase	Utilisation Du citrate de simons	Utilisation du glucose	Utilisation du saccharose	Type respiratoire	Espèces présumées Et site d'isolement
1	Bacilles Moyens Mobiles	G+	+	+	+	+	+	Aéro-anaérobie facultatif	/
2	Bacilles Petits Mobiles	G+	+	+	+	+	+	Aéro-anaérobie facultatif	<i>Bacillus cereus</i>
3	Bacilles Moyens Mobiles	G+	+	+	+	+	-	Aéro-anaérobie facultatif	/
4	Bacilles Moyens Mobiles	G+	+	+	+	+	-	Aéro-anaérobie facultatif	<i>Bacillus subtilis</i>
5	Bacilles Petits Immobiles	G+	+	+	+	+	+	Aéro-anaérobie facultatif	/
6	Bacilles Moyens Mobiles	G+	+	+	-	+	+	Aéro-anaérobie facultatif	/
7	Bacilles Moyens Mobiles	G+	+	+	+	-	-	Aéro-anaérobie facultatif	/
8	Bacilles Grands Immobiles	G+	+	+	+	-	+	Aéro-anaérobie facultatif	<i>Bacillus megaterium</i>
9	Bacilles Moyens Mobiles	G+	+	+	-	-	+	Aéro-anaérobie facultatif	/

La détermination du genre est effectuée selon la clef, dichotomique simplifiée, proposée par Muthuvel. (2013); Ashiuchi. (2001) et Oyeleke. (2011). L'analyse de ces résultats montre que les isolats 2,4 et 8 correspondent, probablement, aux espèces ***Bacillus cereus***, ***Bacillus subtilis*** et ***Bacillus megaterium*** respectivement. En revanche l'identification préliminaire des autres isolats a été indéterminée. Aussi, la confirmation de l'ensemble des résultats obtenus nécessite

une identification par voie moléculaire pour mettre en évidence l'identité de l'espèce en question.

4.6- Sélection des isolats du genre *Bacillus* alcalophiles carbonatogènes

4.6.1- Sélection sur milieu solide

Le test de la sélection des souches bactériennes carbonatogène du genre *Bacillus* a été effectué dans le but de sélectionner les isolats qui montrent leur capacité à produire du carbonate de calcium. Les résultats obtenus de la culture sur milieu sélectif solide ont montré que seulement les souches codés 4 (*Bacillus subtilis*) et 8 (*Bacillus megaterium*) présentent une poudre blanche autour de la zone inoculée et ce, après 5 jours d'incubation (figure 18).

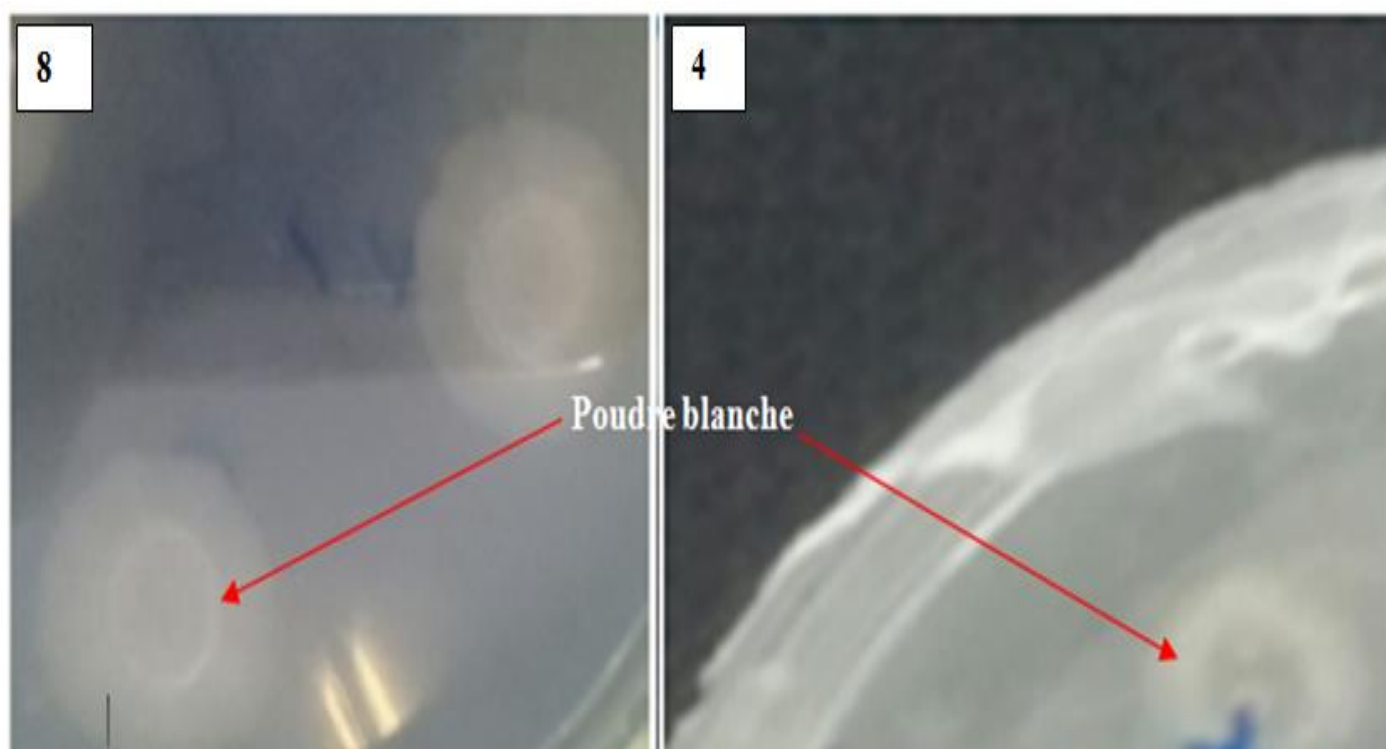


Figure 18 Test de présence de la poudre blanche autour des colonies de la bactérie *Bacillus megaterium* (8) et *Bacillus subtilis* (4) après 5 jours d'incubation.

L'absence de cette poudre a été observée chez le témoin (figure 19)

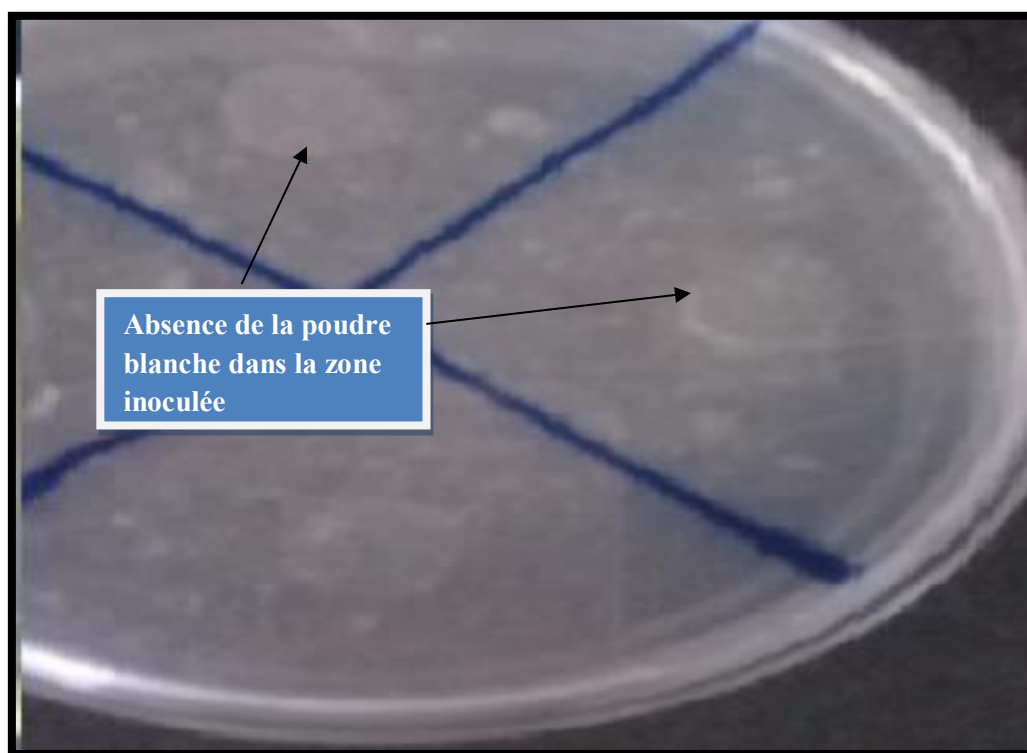


Figure 19 Test d'absence de la poudre blanche autour des colonies (Témoin)

Après le grattage de cette dernière et la mise en contact avec de l'acide chlorhydrique une effervescence s'est produite, ceci, reflètent ainsi la production du dioxyde de carbone (CO_2) accompagnée d'une disparition de la poudre blanche car l' HCl entraîne une dissolution de la calcite suivant la réaction suivante :



4.6.2- Sélection sur milieu liquide

Le milieu liquide à base de calcium a été lancé afin de favoriser la précipitation du carbonate de calcium. Le résultat obtenu, Après 5 jours d'incubation, a confirmé le résultat du milieu solide. En effet, les souches *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* (codées 8 et 4 respectivement), présentent un résultat positif ce qui confirment la formation d'un précipité blanc au fond des tubes (figure 20). En revanche le témoin ne présente aucun halo au fond de tube.

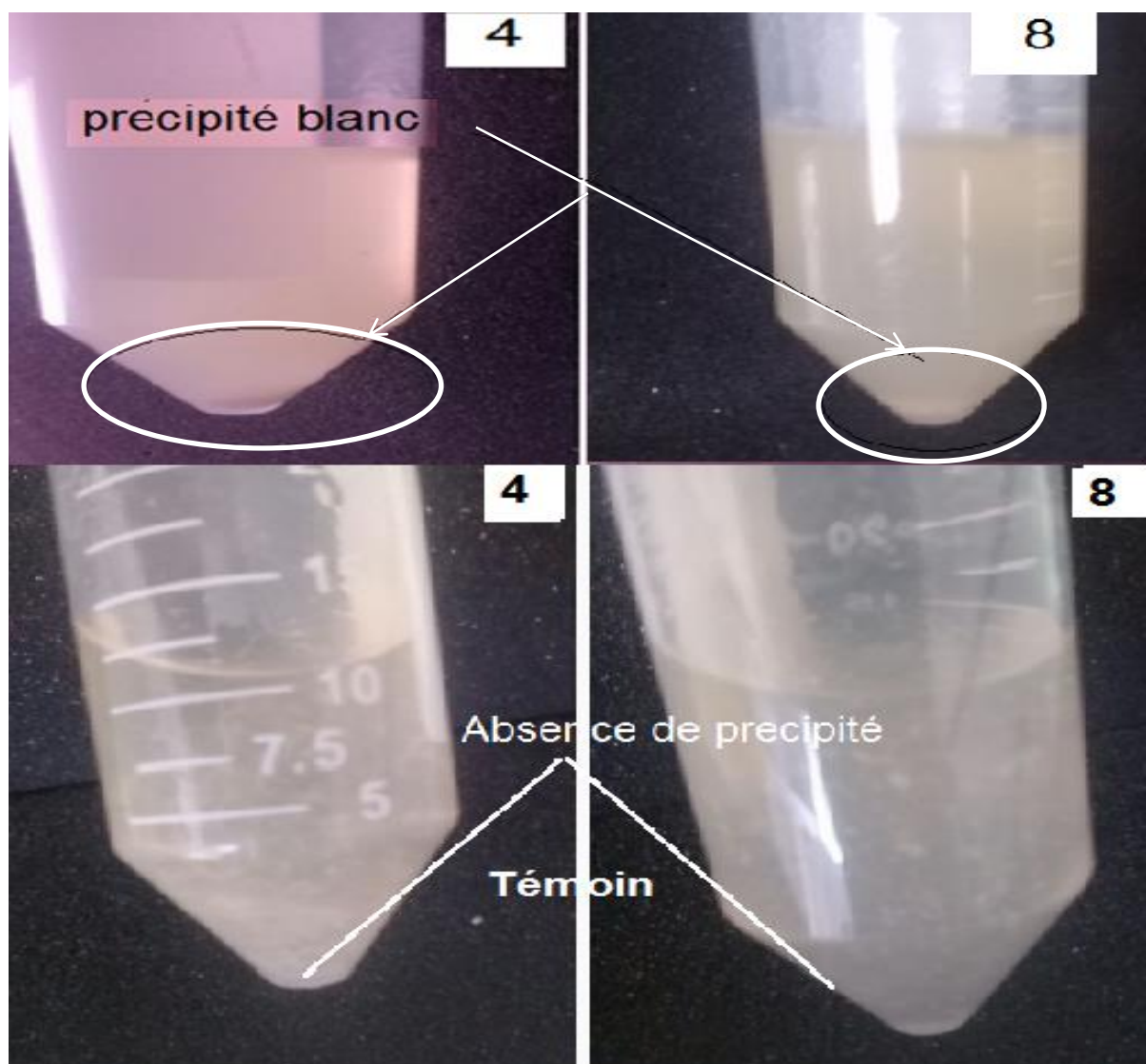


Figure 20 Test de formation d'un précipité blanc au fond des tubes

Sur la lumière des résultats obtenus des deux tests, seulement les souches *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* ont montré un résultat positif, ce qui confirme, que les souches en questions sont calcifiantes. Ces deux souches ont été, par conséquent, utilisées pour le reste du travail.

4.6.2- Effet de l'urée sur la calcification

Rappelons que l'urée est utilisée comme source d'azote par les souches bactériennes, son hydrolyse aboutit à la formation de CO_3 qui est impliqué dans la production de la calcite. Le test de l'effet de l'urée sur la calcification nous a permis de mettre en évidence l'influence de l'urée sur la production de calcite par les deux souches sélectionnées, effectuée sur milieu

liquide contenant l'urée. L'analyse des résultats obtenus a montré que le précipité blanc est apparu clairement dès le 3^{ème} jour (figure21).

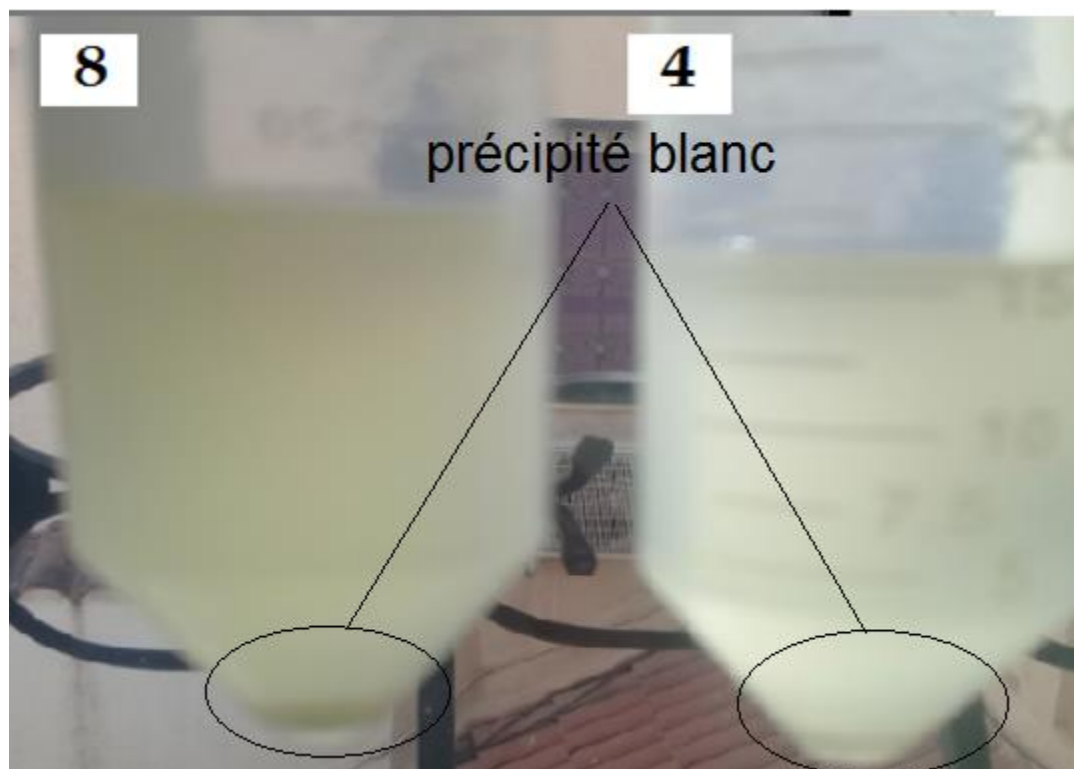


Figure 21 Effet de l'urée sur la production de calcite par les deux souches bactériennes sélectionnées

L'apparition de la calcification à partir du 3^{ème} jour a confirmé que l'urée accélère le phénomène de production de calcite en tenant compte de la souche étudiée.

4.6.3- Etude de la croissance des souches sélectionnées

4.6.3.1- Suivi de la croissance par spectrophotomètre

D'après la littérature, lorsque la phase de croissance exponentielle est allongée, le mécanisme de production de calcite est accéléré (Castanier *et al.*, 1999 ; LeMétayerLevrel *et al.*, 1999).

Après avoir effectué les manipulations précédentes, le dépôt de la calcite dans le milieu CPM a été débuté dès le troisième jour; donc il a été indispensable de mettre en évidence la comparaison de la croissance des deux souches étudiées et ceci dans le but de conclure la corrélation entre la croissance et la production de calcite par les deux souches sélectionnées.

Les résultats de la DO sont présentés dans la figure ci-dessous

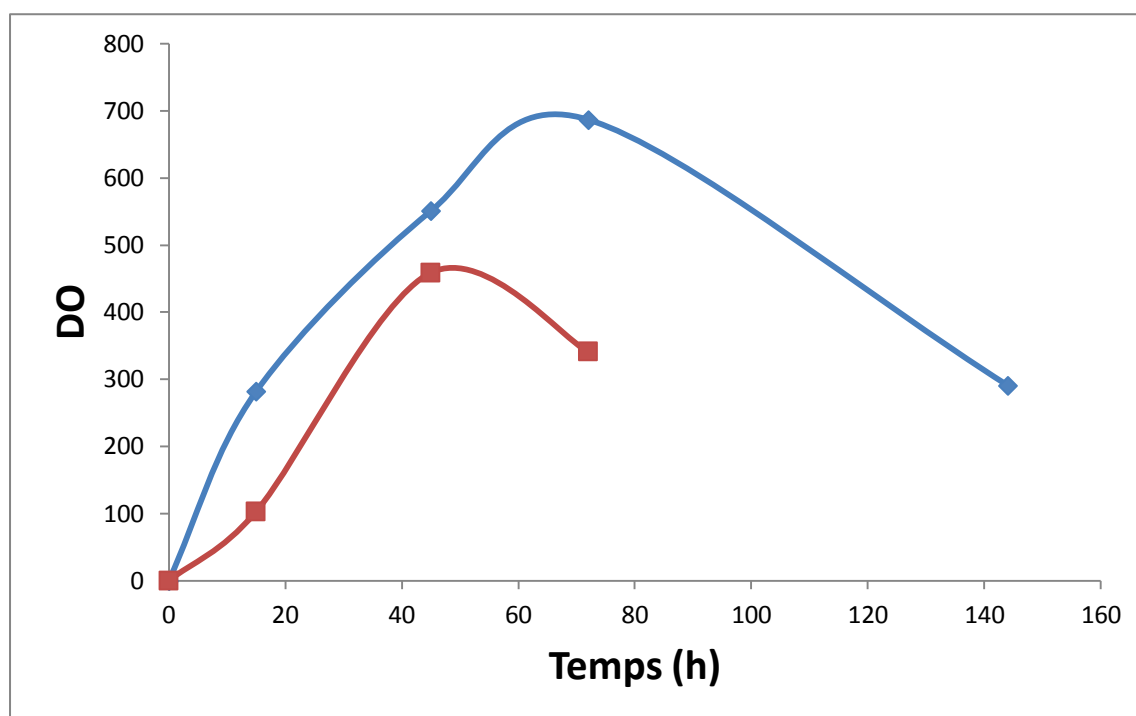








Figure 22 Évolution de la croissance par *Bacillus megaterium* — et *Bacillus subtilis* —

Au début de la fermentation, la croissance de la biomasse bactérienne présentée par la DO a augmenté progressivement avec le temps, atteignant la valeur 687 à 72 h de fermentation. La diminution de la croissance est observée à partir du quatrième jour (fin de la fermentation) et ce, dans le cas de *Bacillus megaterium*. Alors que, le même profil a été obtenu dans le cas de *Bacillus subtilis*. En effet, la DO a augmenté progressivement avec le temps, atteignant 448 après 48 heures de fermentation, puis une diminution de la croissance a été enregistrée à partir du troisième jour. L'analyse des deux profils de croissance montre que *Bacillus megaterium* présente une phase exponentielle allongée en comparaison avec *Bacillus subtilis*.

4.6.4- Utilisation des bactéries carbonatogènes sélectionnées comme agents de bio-cicatrisation

Selon la littérature, la capacité de bio-cicatrisation de matériaux cimentaires est très variable, selon le type des souches impliquées et le procédé considéré (Luo, 2015; Park *et al.*, 2012). Afin de tester la capacité des deux souches sélectionnées à cicatrifier les fissures du ciment un test qualitatif préparé manuellement a été lancé. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 9.

Tableau9 Traitement du ciment par les deux souches sélectionnées

Temps (jours) Echantillon	0	11
Témoin		
<i>Bacillus megaterium</i>		 <p>Légère Réparation</p>
<i>Bacillus subtilis</i>		

L'analyse des résultats obtenus ont montré que, seulement *Bacillus megaterium* présente un résultat positif, en effet, un début d'une réparation légère des fissures à partir du 11^{ème} jour a été observée en comparaison par *Bacillus subtilis* et le témoin.

Sur la lumière des résultats obtenus, le test de bio-cicatrisation, est considéré préliminaire, prometteur et ouvre la voie sur l'exploitation ultérieure de *Bacillus megaterium* comme agent de bio-cicatrisation.

5- Discussion

Les fissures de matériaux cimentaires sont les causes principales de la diminution de la durée de vie de ces structures, de ce fait, il est plus judicieux et plus économique de limiter le développement des petites fissures du jeune âge au moment où elles apparaissent que de les réparer après qu'elles soient développées en grandes fissures (Wang *et al.*, 2012). Un moyen prometteur consiste à pré-ajouter des agents cicatrisants au béton pour remédier les fissures lorsqu'elles apparaissent. La bio-précipitation du carbonate de calcium induite par les microorganismes est considérée l'une des approches qui a pris beaucoup d'intérêt à travers le monde entier (Adolphe *et al.*, 1990 ;Castanier *et al.*, 1995, Levrel *et al.*, 1999, Medveille, 2019).

Les bactéries du genre *Bacillus* utilisent certains biomécanismes pour produire du carbonate de calcium (Vijay *et al.*, 2017 ;Sidiq *et al.*, 2019). Il est à noter que plusieurs facteurs peuvent affecter le bon déroulement du phénomène de la bio carbonatation, à savoir ; le type des bactéries, leurs concentrations cellulaires, le pH, la température, la concentration de l'urée et la concentration du calcium (Chaparro-Acuña *et al.*, 2017 ;Shahine *et al.*, 2021).

C'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif de notre travail qui est amorcé par les points de recherche suivants :

- Isolement des bactéries du genre *Bacillus* carbonatogènes à partir des sites rocheux ;
- Sélection et identification préliminaire de ces bactéries;
- Utilisation de *Bacillus* carbonatogènes comme agents de bio-cicatrisation de matériaux cimentaires.

Les échantillons du sol utilisés dans cette étude ont été prélevés à partir des sites rocheux. Trois endroits ont été ciblés; l'endroit (795 L1), qui est une roche de calcaire, l'endroit (795 L2), qui est un sol ordinaire et l'endroit (812), qui est un sol argileux. Le choix de ces endroits pour isoler des bactéries carbonatogènes est motivé par plusieurs critères y compris, le pH alcalin (environ de 8,5), qui facilite le processus de carbonatation .Selon Krumbein. (1979) ; Morita, (1980); Cacchio *et al.* (2003), les bactéries isolées à partir des sols alcalins des mines et des caves sont capables de produire et précipiter une quantité appréciable du carbonate de calcium.

Dans cette étude 26 isolats ont été obtenus à des profondeurs différentes. En effet, 3isolats bactériens ont été obtenus à partir du site 795L1 (35 cm de profondeur), 17 isolats bactériens ont été obtenus à partir du site 795 L2 (20 cm de profondeur) et enfin 6 isolats bactériens ont été obtenus à partir du site 812 (35 cm de profondeur).

Ces résultats montrent, en outre, que les souches bactériennes isolées sont considérées autochtones du site selon Phaff et Starmer. (1987) et Calvet. (2003).

De plus, l'ensemble des isolats bactériens ont été obtenus après un traitement thermique des solutions du sol préparé. Ce traitement provoque l'élimination de la plupart des cellules végétatives et conserve seulement les endospores qui résistent habituellement à des températures élevées. L'étalement des dilutions traitées sur milieu solide sélectif (LB) permet la sélection des espèces du genre *Bacillus* selon Singleton. (2005).

Après purification, seulement 9 isolats bactériens ont été sélectionnés pour la suite du travail. L'identification présumée de ces 9 isolats bactériens du genre *Bacillus* qui reposait sur l'observation macroscopique, microscopique et sur les tests biochimiques *in vitro* a montré que l'isolat N°2 (isolé du site 795L1) correspond selon les notifications de Muthuvel. (2013) à l'espèce *Bacillus cereus* car, il est mobile, positif à la coloration de Gram, possède des endospores, catalase positif, capable d'hydrolyser le glucose, doté d'un métabolisme aéro-anérobies facultatif.

L'isolat N°4 (isolé du site 812), correspond probablement à l'espèce *Bacillus subtilis* car, d'après Ashiuchi. (2001), selon toujours les mêmes références, il est mobile, Gram positif, possède une endospore, doté d'une enzyme catalase, caractérisé par un métabolisme aéro-anérobie facultatif, Enfin, la souche N°8(isolé du site 795 L2), quant à elle, correspond, d'après Oyeleke. (2011), à l'espèce *Bacillus megaterium* étant donné qu'elle est immobile, positive à la coloration de Gram, possède une endospore, catalase positif, et utilise le glucose. En revanche l'identification préliminaire des autres isolats a été indéterminée. Il est à signaler que, la confirmation de l'ensemble des résultats obtenus nécessite une identification par voie moléculaire pour mettre en évidence l'identité de l'espèce en question.

Dans la présente étude, les résultats obtenus du test de la sélection de *Bacillus carbonatogène* sur milieu sélectif solide ont montré que seulement les souches *Bacillus subtilis* et *Bacillus mégathérium* présentent une poudre blanche autour de la zone inoculée sur milieu solide et en comparaison avec le témoin. Après le grattage de cette dernière et la mise en contact avec de l'acide chlorhydrique, une effervescence s'est produite, ceci, reflètent ainsi la production du dioxyde de carbone(CO₂) accompagnée d'une disparition de la poudre blanche car l'HCl entraîne une dissolution de la calcite.

L'évaluation de la capacité de souches bactérienne de genre *Bacillus* à produire le carbonate de calcium sur milieu solide à base de calcium a été étudiée par plusieurs auteurs, en effet, des résultats semblables à ceux trouvés dans le présent travail ont été montrés par Cacchio *et al.* (2003) et Bhaduri *et al.* (2016).

De plus, la sélection des bactéries du genre *Bacillus* carbonatogène sur milieu liquide à base de calcite a été lancée seulement sur les bactéries *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium*, qui ont montré un résultat positif sur le milieu solide. Ce test a été réalisé dans le but de confirmer les résultats de la sélection sur milieu solide d'une part, et de favoriser la précipitation du carbonate de calcium d'une autre part. Les résultats obtenus en culture liquide ont confirmé le résultat du milieu solide. En effet, les souches *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium* présentent un résultat positif via la formation d'un précipité blanc au fond des tubes à partir du 5^{ème} jour d'incubation. Des résultats approximatifs ont été obtenus par Cacchio *et al.* (2003).

Dans cette étude, le test de l'effet de l'urée sur la calcification a été lancé. L'urée est utilisée comme source d'azote par les souches bactériennes, son hydrolyse aboutit à la formation de CO₂ qui est impliqué dans la production de la calcite. Le test de l'effet de l'urée sur la calcification nous a permis de mettre en évidence l'influence de l'urée sur la production de calcite par les deux souches sélectionnées. L'analyse des résultats obtenus a montré que le précipité blanc est apparu clairement dès le 3^{ème} jour. Daskalakis *et al.* (2015) ont trouvé une excellente précipitation de carbonate de calcium après 6 jours avec la souche *Bacillus pumilus* sur milieu à base de l'urée.

Dans le présent travail, la croissance des deux souches étudiées ainsi que leur capacité à produire du carbonate de calcium sur milieu LB, a été mise en évidence.

Les résultats du suivi de la croissance par spectrophotomètre ont montré que la croissance de la bactérie *Bacillus megaterium* augmente progressivement pour atteindre 687 à 72 h de fermentation. Après cette période une diminution de la croissance a été observée, et est estimée à 241 après 6 jours de fermentation. Alors que dans le cas de *Bacillus subtilis*, la croissance augmente pour atteindre une valeur de 459 à 45 heures, après cette période, une diminution de la croissance a été enregistrée (351) à 72 h.

La comparaison entre le profil de croissance des deux souches a montré que la souche *Bacillus megaterium* a présenté une phase de croissance longue (allant jusqu'à 72 h de fermentation) en comparaison avec la souche *Bacillus subtilis* qui était caractérisé par une phase de croissance courte (48h). Selon Castanier *et al.* (1999), plus la phase exponentielle est longue avec un temps de génération court, plus la production des cristaux de carbonate de calcium est importante.

Les résultats obtenus dans la présente étude confirme que la souche *Bacillus megaterium* semble être la souche la plus performante *vis-à-vis* la production de la carbonate de calcium

Dans le présent travail, un test qualitatif préparé manuellement a été lancé dans le but d'évaluer la capacité des deux souches bactériennes à cicatrifier les fissures. Les résultats obtenus ont montré un début d'une réparation légère des fissures à partir du 11^{ème} jour, par la souche *Bacillus megaterium*. En revanche, la bactérie *Bacillus subtilis* et le témoin n'ont présenté aucune cicatrisation des fissures.

L'équipe de Park *et al.* (2012), ont trouvé des épaisseurs 10 fois plus importantes de bio-précipitation avec une fermeture de fissures de 300µm de largeur sur des coulis de ciment Portland, après 5 jours de traitement par la bactérie *Bacillus subtilis*.

En revanche, selon Zhang *et al.* (2020), la réparation de fissures du béton a été induite par des bactéries carbonatogènes, les résultats ont montré que la fermeture complète des fissures à partir de 60^{ème} jours de traitement. Selon Luo *et al.* (2015), la période de fermeture des fissures est influencée par plusieurs facteurs comme ; le genre de la bactérie impliquée, son état physiologique, la méthode du traitement ainsi que la taille des fissures, qui est par conséquent, un facteur déterminant de la vitesse de la cicatrisation.

6-Conclusion et perspectives

Dans cette étude, une caractérisation préliminaire des souches de bactéries isolées à partir des sites rocheux de la région d'ELKHROUB commune -OULED RAHMOUNE- Constantine a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches ayant la capacité de produire le carbonate de calcium et par conséquent, de les utiliser comme agents de bio-cicatrisation de matériaux cimentaires.

26 isolats bactériens ont été obtenus, Après purification, seulement 09 isolats ont fait l'objet du complément de cette étude. L'identification éventuelle des 9 isolats obtenus, basée sur l'étude microscopique (état frais, coloration de Gram, coloration des endospores) et l'étude biochimique en utilisant la galerie API 20E, le test catalase et le type respiratoire, a montré leur appartenance au genre *Bacillus*. Les trois souches codées 2, 4 et 8 ont été identifiées comme étant, *B.cerues*, *B.subtilis* et *B.megaterium* respectivement.

Le test de sélection des 9 bactéries carbonatogènes a été effectué sur milieu liquide et solide à base de calcium, et qui sert à déterminer la capacité des isolats à précipiter le carbonate de calcium. Il a été conclu de cette partie, que les deux souches bactériennes, *B.subtilis* et *B.megaterium* sont capables de produire le carbonate de calcium.

Les résultats du test d'effet de l'urée sur la calcification ont révélé que la souche *B.megaterium* est capable de produire le carbonate de calcium après le 3^{eme} jour d'incubation, ce qui confirme l'accélération de production de l'urée par les deux souches sélectionnées. Il a été conclu de cette partie que l'urée affecte la production de carbonate de calcium, en effet, il est utilisé comme source d'azote, et son hydrolyse aboutit à la formation de CO₃ qui est impliqué dans la production de la calcite.

Le suivi de la croissance par dosage spectrophotométrique de *B. subtilis* et *B. megaterium* sur milieu LB ont montré que la bactérie *B. megaterium* a présenté une phase de croissance longue (allant jusqu'à 72 h de fermentation) en comparaison avec la souche *Bacillus subtilis* qui a une phase de croissance courte (48h). Il a été conclu de cette partie que la souche *B. megaterium* qui présente une longue phase exponentielle semble être la souche la plus performante pour la production du carbonate de calcium.

Dans le but de tester la capacité de *B. subtilis* et *B. megaterium* à cicatriser les fissures du ciment, un test préliminaire induit manuellement a été réalisé, les résultats obtenus ont montré

un début d'une légère réparation des fissures par la souche *B. megaterium* contre la souche *B. subtilis* et le témoin qui n'ont présenté aucune cicatrisation. Il ressort de cette partie, que le résultat de ce test est très encourageant, et ouvre, par conséquent, la voie sur l'exploitation de la bactérie *B. megaterium* comme agent de bio-cicatrisation de matériaux cimentaires.

Enfin, l'ensemble des tests réalisés dans la présente étude et dont l'objectif est l'emploi de *Bacillus* carbonatogènes pour améliorer les propriétés physiques et mécaniques de matériaux cimentaires montre que ce sujet est très intéressant, et prometteur. Par ailleurs, plusieurs étapes s'avèrent nécessaires pour compléter cette étude ;

- Confirmation de l'identité de la bactérie *B. megaterium* par les analyses moléculaire ;
- Optimisation du milieu de culture à savoir ; la concentration d'urée, le pH, la température et ce, afin d'augmenter le rendement calcique;
- Quantification du carbonate de calcium produit par les bactéries calcifiantes en utilisant les techniques de mesure comme la calcimétrie;
- Etude approfondie concernant les différentes conditions nécessaires pour optimiser le phénomène de bio-cicatrisation en l'occurrence ; la structure de matériaux, la taille, et l'âge des fissures...etc.;
- Développement de différentes techniques d'application et d'introduction de *B. megaterium* dans le matériau cimentaire afin de maîtriser l'action des bactéries employées.

7- Références bibliographiques

Abo-El-Enein, S. A., Ali, A. H., Talkhan, F. N., & Abdel-Gawwad, H. A. (2012). Utilization of microbial induced calcite precipitation for sand consolidation and mortar crack remediation. *Housing and Building National Research Center journal*, 8(3), 185-192.

Adjoudj, M., Ezziane, K., Kadri, H., Soualhi, H. (2018) HidedetailsStudy of the rheological behavior of mortar with silica fume and superplasticizer admixtures according to the water film thickness . *Journal of Civil Engineering*, Volume 22, Issue 7, 1 January

Achal, V., Pan, X., & Özyurt, N. (2011). Improved strength and durability of fly ash-amended concrete by microbial calcite precipitation. *Ecological Engineering*, 37(4), 554-559.

Al-Thawadi, S. M. (2011). Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. *J. Adv. Sci. Eng. Res*, 1(1), 98-114.

Anonyme 1.(2015). <http://coursexosup.blogspot.com/2015/06/mortiers-beton.html>

Anonyme 2.(2012). <https://www.infociments.fr/sites/default/files/article/fichier/SB-OA-2012-4.pdf>

Bastrzyk, A., Fiedot-Toboła, M., Polowczyk, I., Legawiec, K., & Płaza, G. (2019). Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 145-152.

Bennett, V., Jackson, V. A., Rivers, T., Relf, C., Horan, P., & Tubrett, M. (2005). Geology and U Pb geochronology of the Neoproterozoic Snare River terrane: tracking evolving tectonic regimes and crustal growth mechanisms. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 42(6), 895-934.

Beveridge, T. J. (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual review of microbiology*, 43(1), 147-171.

Bhaduri, S., Debnath, N., Mitra, S., Liu, Y., & Kumar, A. (2016). Microbiologically induced calcite precipitation mediated by *Sporosarcina pasteurii*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (110), e53253.

Boquet, E., Boronat, A., & Ramos-Cormenzana, A. (1973). Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, 246(5434), 527-529.

Boutebba, W., Attil, S., & Idir, L. (2020). *Etude de la durabilité des bétons de sable de fonderie* (Doctoral dissertation, université Abderrahmane Mira-Bejaia).

Brock, C. P., & Dunitz, J. D. (1994). Towards a grammar of crystal packing. *Chemistry of materials*, 6(8), 1118-1127.

Brown, K. M., Douglas, M. S., & Smol, J. P. (1994). Siliceous microfossils in a Holocene, High Arctic peat deposit (Nordvestø, northwestern Greenland). *Canadian journal of botany*, 72(2), 208-216.

- Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G., & Lepidi, A. (2003). Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 85-98.
- Camaiti, M., Borselli, G., & Matteoli, U. (1988). Prodotti consolidanti impiegati nelle operazioni di restauro. *Edilizia*, 10, 125-134.
- Camille D. (2007) Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures www.edition.lavoisier.fr .
- Castanier S., Le Métayer-Levrel G., Perthuisot, J. (1998). La carbonatogenèse bactérienne. *Colloques et séminaires - Institut français de recherche scientifique pour le Développement en coopération*, p. Paris, France.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., & Perthuisot, J. P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sedimentary geology*, 126(1-4), 9-23.
- Chaparro-Acuña, S. P., Becerra-Jiménez, M. L., Martínez-Zambrano, J. J., & Rojas-Sarmiento, H. A. (2017). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*, 67(2), 277-288.
- Daskalakis, M. I., Magoulas, A., Kotoulas, G., Catsikis, I., Bakolas, A., Karageorgis, A. P., ...& Rigas, F. (2013). *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Cupriavidus* isolates induce calcium carbonate precipitation for bioremediation of ornamental stone. *Journal of applied microbiology*, 115(2), 409-423.
- De Belie, N. (2016). Application of bacteria in concrete: a critical evaluation of the current status. *RILEM Technical Letters*, (1), 56-61.
- DeJong, J. T., Fritzges, M. B., & Nüsslein, K. (2006). Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering*, 132(11), 1381-1392.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., & Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and concrete Research*, 38(7), 1005-1014.
- De Muynck, W., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological engineering*, 36(2), 118-136.
- De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecological Engineering*, 36(2), 99-111.
- Deschamps, M. (1973). *Etude géologique du sidérolithique du Nord-Est, du centre du Massif central français et des terrains qui lui sont associés* (Doctoral dissertation, Sc. nat.: Paris VI: 1973.).

- Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2013). Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(5), 707-714.
- Dreux, G., & Festa, J. (1998). New Guide of concrete and its constituents. Eyrolle Edition. (8th edn), Paris, France p, 409.
- Ehrlich, H. L. (1998). Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews*, 45(1-2), 45-60.
- Engon, T. C., Abane, M. A. A., Zame, P. Z. O., Ekomane, E., Bekoa, E., Mvogo, K., & Bitom, D. (2015). Morphological, physico-chemical and geochemical characterization of two weathering profiles developed on limestone from the Mintom Formation in the tropical humid zone of Cameroon. *Journal of African Earth Sciences*, 131, 198-212.
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(3), 609-643.
- Gagné, F. (1993). Constructs and models pertaining to exceptional human abilities. Gordon R. H. (2000) *Current Microbiology* vol 41 .
- Guiraud, J. P. (1998). La microbiologie alimentaire.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., & Siciliano, S. D. (2003). Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4901-4909.
- Ivanov, V., & Chu, J. (2008). Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 139-153.
- John, M., Su, X. C., & Otting, G. (2007). NMR structure determination of protein–ligand complexes by lanthanide labeling. *Accounts of chemical research*, 40(3), 206-212.
- Jonkers, H. M., & Schlangen, E. (2008). A two component bacteria-based self-healing concrete. In *Concrete repair, rehabilitation and retrofitting II* (pp. 137-138). CRC Press.
- Kantzas, A., Stehmeier, L., Marentette, D. F., Ferris, F. G., Jha, K. N., & Maurits, F. M. (1992, June). A novel method of sand consolidation through bacteriogenic mineral plugging. In *Annual Technical Meeting*. OnePetro.
- Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1-3), 9-21.
- Kosev, N., Stefanov, G., & Muler, B. (1985). classification des roches et des massifs rocheux. *annuaire de l'institut d'architecture et de genie civil, sofia-fascicule iv: mecanique des sols, travaux de fondations, geologie appliquee-1983-1984*, 31.
- Latour, X., & Lemanceau, P. (1997). Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 9(17), 427-443.

- Li, R., Palm, B. B., Borbon, A., Graus, M., Warneke, C., Ortega, A. M., ... & De Gouw, J. A. (2013). Laboratory studies on secondary organic aerosol formation from crude oil vapors. *Environmental science & technology*, 47(21), 12566-12574.
- Luo, M., Qian, C. X., & Li, R. Y. (2015). Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete. *Construction and building materials*, 87, 1-7.
- Meksem, A. (2010). *Études structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- Mitchell, A. C., & Ferris, F. G. (2005). The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: temperature and kinetic dependence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(17), 4199-4210.
- Moropoulou, A., Polikreti, K., Bakolas, A., & Michailidis, P. (2003). Correlation of physicochemical and mechanical properties of historical mortars and classification by multivariate statistics. *Cement and concrete research*, 33(6), 891-898.
- Ollivier, J. P., Carles-Gibergues, A., & Hanna, B. (1988). Activite pouzzolanique et action de remplissage d'une fumee de silice dans les matrices de beton de haute resistance. *Cement and Concrete Research*, 18(3), 438-448.
- Olivier, K. (2016). *Étude expérimentale et modélisation de l'auto-cicatrisation des matériaux cimentaires avec additions minérales* (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay; Université de Sherbrooke. Département de physique).
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental technology*, 31(8-9), 825-834.
- Pedersen, T. F., Calvert, S. E., Bustin, R. M., (1992). Lack of evidence for enhanced preservation of sedimentary organic matter in the oxygen minimum of the Gulf of California. *Geology*, 20(8), 757-760.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in mycology*, 76, 51-167.
- Putranto, L. S. (2016). Kasus "Cacat" Infrastruktur Perkotaan dalam Investigasi Kecelakaan Lalu-Lintas Angkutan Jalan KNKT.
- Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V., & Bang, S. S. (2001). Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Materials Journal-American Concrete Institute*, 98(1), 3-9.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K., & Gonzalez-Munoz, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2182-2193.

Sáiz-Jiménez, C. (1997). Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(2-4), 225-232.

Shaheen, N., & Khushnood, R. A. (2018). Bioimmobilized limestone powder for autonomous healing of cementitious systems: a feasibility study. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2018.

Sinclair, J. L., & Ghiorse, W. C. (1989). Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae, and fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiology Journal*, 7(1-2), 15-31.

Silverman, M. P., & Ehrlich, H. L. (1964). Microbial formation and degradation of minerals. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 6, pp. 153-206). Academic Press.

Souchu, P. (2009). La chaux-Définitions et histoire.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., & Bang, S. S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563-1571.

Supuran, C. T., & Scozzafava, A. (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(13), 4336-4350.

Tiano, P., Biagiotti, L., & Mastromei, G. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of microbiological methods*, 36(1-2), 139-145.

Tiano, P., Cantisani, E., Sutherland, I., & Paget, J. M. (2006). Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. *Journal of Cultural Heritage*, 7(1), 49-55.

Todar, K. (2003) The Genus Bacillus, Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison.

Tortora, G., Caputo, R., Damiano, V., Melisi, D., Bianco, R., Fontanini, G., & Ciardiello, F. (2003). Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 and protein kinase A antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. *Clinical cancer research*, 9(4), 1566-1572.

Van Langerak, E. P. A., Gonzalez-Gil, G., Van Aelst, A., Van Lier, J. B., Hamelers, H. V. M., & Lettinga, G. (1998). Effects of high calcium concentrations on the development of methanogenic sludge in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactors. *Water Research*, 32(4), 1255-1263.

Van Paassen, L. A. (2009). Biogrout, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation.

Warscheid, T., & Braams, J. (2000). Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(4), 343-368.

Weirich, G., & Schweisfurth, R. (1985). Extraction and culture of microorganisms from rock. *Geomicrobiology Journal*, 4(1), 1-20.

Whiffin, V.S. (2004). *Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement* (Doctoral dissertation, Murdoch University).

White, W. J. Watt, W. D., Scott, C. D., (1983). Evidence of acidification of some Nova Scotian Rivers and its impact on Atlantic Salmon, *Salmo solar*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(4), 462-473.

Wiktor V. ,Jonkers H.M. (2011) Quantification of crack-healing in novel bacteria-based selfhealing Concrete. *Cement and Concrete Composites*, 33, 763–770.

Zhang, X., & Qian, C. (2020). WITHDRAWN: Engineering Application of Microbial Self-healing Concrete in Lock Channel Wall.

ملخص

تمت دراسة عينات مختلفة من تربة المنطقة الحجرية ولاد رحمون بالخروب الكائنة بالمؤسسة الوطنية للحصى، النتائج المحصل عليها أسفرت عن 26 عزلة وبعد العزل الانتقائي تم الحصول على 9 عزلات بكتيرية نقية حيث سمح الكشف المجهرى و البيوكيميائى بتحديد 3 ا نواع عزلات منها تحمل الترقيم 2, 4, 8 والتي تبين انها تنتمي إلى *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* على التوالي .
 مدعم بالكالسيوم بعد خمسة ايام من الحضان.

من جهة أخرى و بهدف تحسين انتاجية العزلتين المختارتين لكاربونات الكالسيوم تم تدعيم وسط النمو باليوربا مما أدى إلى تسريع الإنتاجية بالمقارنة مع الوسط من دون اليوربا و هذا في ظرف ثلاثة ايام من الحضان.
 في وسط LB أظهرت دراسة منحنى النمو لكنا العزلتين ان *Bacillus megaterium* تميزت بمرحلة نمولوجارتمية طويلة تصل الى 72 ساعة مقارنة مع *Bacillus subtilis* و التي تميزت بمرحلة نمو لوغارتمية قصيرة تصل الى 48 ساعة مما يؤكد ان *Bacillus megaterium* قد تكون اكثر فعالية لإنتاج كاربونات الكالسيوم.

بهدف كشف قدرة البكتيريتين على ترميم الأسطح الاسمنتية المتصدعة تم انجاز اختبار يدوي النتائج المحصل عليها أظهرت بداية ترميم طفيف لهذه التشققات و هذا في ظرف 11 يوم بالنسبة للبكتيرية *Bacillus megaterium* بعكس *Bacillus subtilis* و الشاهد حيث لم نسجل أي ترميم وبالتالي يعتبر هذا الاختبار محفز و يفتح المجال لاستعمال سلالة *Bacillus megaterium* كعامل بيولوجي لاجل ترميم الأسطح الاسمنتية

الكلمات المفتاحية، *Bacillus*: الكربنة، المناطق الحجرية، المواد الاسمنتية. المعالجة البيولوجية

Abstract

Different samples were studied from the soil of the stony area of Oulad Rahmoun in El-Khroub, located at the E.N.G. 26 isolates were obtained. After purification, only 9 pure bacterial isolates were obtained. Microscopic and biochemical detection allowed the identification of 3 types of isolates, including the 2, 4,8 which identified as *Bacillus cerues*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*, respectively.

Bacillus subtilis and *Bacillus megaterium* were selected for their ability to produce calcium carbonate in calcium-fortified medium after five days of incubation.

On the other hand, and in order to improve the productivity of calcium carbonate, by the two selected isolates the growth medium was reinforced with urea, which led to an acceleration of productivity compared to the medium without urea, within three days of incubation.

The study of the growth curve of both isolates in LB medium showed that *Bacillus megaterium* was characterized by a long exponential growth phase (up to 72 hours) compared with *Bacillus subtilis*, which was characterized by a short exponential growth phase (up to 48 hours), which confirms that *Bacillus megaterium* may be more effective for the production of calcium carbonate.

In order to reveal the ability of the two bacteria to repair cracked cement surfaces, a manual test was realized. The results obtained showed the beginning of a small restoration of these cracks, and this is within 11 days for *Bacillus megaterium*, comparing with *Bacillus subtilis* and the blank, where we did not record any restoration. Therefore this test opens the way for the use of *Bacillus megaterium* strain as a biological agent for the restoration of cement surfaces.

keywords: *Bacillus*, carbonation, stone areas. Cementious materials .Bio-cicatrisation.

Annexe 1 : Milieux de cultures

Milieu LB

Le milieu LB est un milieu recommandé pour la culture des *Bacillus sp.* (Guiraud, 1998). La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone	10
Extrait de lavure	5
NaCl	10
Agar	17

Le pH est ajusté à 9.0

Milieu viande foie (VF)

Le milieu VF est utilisé pour la détermination du type respiratoire des bactéries. Ce milieu semi-solide, gélosé à 6%, la composition chimique en g/L d'eau distillée est la suivante (Camille, 2007).:

Base viande foie	30
Glucose	2
Agar	6

pH final entre 7,6 et 7,8 à 25°C.

Milieu MPC (Milieu Précipité au Calcium)

Milieu qui favorise la précipitation du carbonate de calcium (pH 9), dont la composition chimique en g/L d'eau purifiée est :

Chlorure de calcium 80

Extrait de levure 4

Agar 15

Annexe 2 : Réactif

➤ Coloration de Gram

Fuchsine	1g
Alcool éthylique à 90°	10 mL
Phénol	5g
Eau distillée	
1000 mL	

➤ Vert de Malachite

Le vert de Malachite est utilisé pour la coloration des endospores (Guiraud, 1998), sa composition est la suivante :

Vert de Malachite	0.25g
Eau distillée	1L

Nom et Prénom : BENCHABI Amel

Date de soutenance : 12 septembre 2021

Thème : Recherche de *Bacillus* carbonatogènes des sites rocheux et leurs applications dans la bio-cicatrisation de matériaux cimentaires

Résumé :

L'exploration des échantillons de différents endroits prélevés des sites rocheux en l'occurrence ; roche de calcaire, sol argileux et sol ordinaire, de la région d'Ouled Rahmoune située dans le Sud Est de la wilaya de Constantine, a permis d'obtenir 26 isolats bactériens. Les échantillons ont été prélevés à partir des profondeurs de 20 cm et 35 cm. L'identification présumée des 9 isolats, basée sur l'étude macroscopique, microscopique et biochimique (galerie API 20E), a révélé leur appartenance au genre *Bacillus*. Les trois souches codées 2, 4 et 8 ont été identifiées comme étant, *Bacillus cerues*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium* respectivement. Les deux souches bactériennes *B. subtilis* et *B. megaterium* ont été sélectionnées pour leurs capacité à produire du carbonate de calcium sur milieu solide et liquide à base de chlorure de calcium comme unique source de calcium et ce, après 5 jours d'incubation. Les résultats du test d'effet de l'urée sur la calcification ont révélé que *B. subtilis* et *B. megaterium* sont capables de produire le carbonate de calcium après le 3^{ème} jour d'incubation, ce qui confirme l'accélération de production de l'urée par ces souches. Le suivi de la croissance par dosage spectrophotométrique de *B. subtilis* et *B. megaterium* sur milieu LB a montré que la bactérie *B. megaterium* a présenté une phase de croissance exponentielle longue (allant jusqu'à 72 h de fermentation) en comparaison avec la souche *Bacillus subtilis* qui a une phase de croissance exponentielle courte (48h), ce qui confirme que la souche *Bacillus megaterium* semble être la souche la plus performante pour la production du carbonate de calcium. Dans le but de tester la capacité de *B. subtilis* et *B. megaterium* à cicatrifier les fissures du ciment, un test préliminaire induit manuellement a été réalisé, les résultats obtenus ont montré un début d'une légère réparation des fissures à partir du 11^{ème} jour par la souche *B. megaterium* contre la souche *B. subtilis* et le témoin qui n'ont présenté aucune cicatrisation. De ce fait, ce test est considéré prometteur et ouvre, désormais, la voie sur l'exploitation de la bactérie *B. megaterium* comme agent de bio-cicatrisation de matériaux cimentaires.

Mot clés : *Bacillus*, Carbonatation, sites rocheux, matériaux cimentaires, bio-cicatrisation.

Laboratoires :

Laboratoire du centre médical de la mutuelle générale des matériaux de construction (CMS-M.G.M.C)
Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM)

Président de jury: Mr. KACEM CHAOUCHE N. Pr. UFM. Constantine 1.

Rapporteur : Mme. KARA ALI M.

Dr. UFM. Constantine 1.

Examinatrice : Mme. CHERFIA R.

Dr. UFM. Constantine 1.