

Evaluation de traitements alternatifs sur la durabilité fongique des fibres de chanvre

Lily Deborde¹, Christophe Lanos¹, Yves Andrès², Valentin Colson³,

¹ UNIR, Université de Rennes, Laboratoire de Génie Civil et Génie Mécanique – 3 rue du Clos Courtel, 35704 Rennes

² IMT Atlantique, GEPEA - UMR CNRS 6144 La Chantrerie 4 rue Alfred Kastler, 44307 Nantes

³ CAVAC Biomatériaux, Fief Chapitre, 85400 Sainte-Gemme-la-Plaine

RESUME L'utilisation de ressources végétales dans la formulation des matériaux permet de réduire l'impact environnemental du secteur de la construction. Cette étude vise à développer un traitement fongicide adapté aux isolants thermiques à base de fibres de chanvre. Le but est de limiter les impacts sanitaires et environnementaux du traitement, tout en optimisant les performances techniques des produits traités. L'efficacité des traitements est évaluée grâce à un protocole de laboratoire mis en place dans ce projet. Ce protocole d'essai intègre une étape de traitement qui repose sur l'enduction des fibres par pulvérisation, suivie d'un séchage. Les fibres traitées sont ensuite inoculées, via une suspension concentrée contenant trois souches fongiques différentes. L'étape d'incubation s'étend sur 28 jours en conditions isothermes et à quasi-saturation en humidité. Des témoins positifs (fibres non traitées) et négatifs sont intégrés dans chaque campagne d'essais afin de valider les conditions de développement fongique à partir des résultats obtenus. La méthode d'analyse des échantillons contaminés est discutée. Différents traitements innovants à base de composés minéraux, d'huiles essentielles et autres additifs alternatifs aux solutions existantes ont été étudiés. Certaines formulations commerciales de référence sont également testées. Les résultats obtenus permettent de valider le protocole expérimental proposé et de constater que le développement fongique s'est déclaré sur plusieurs traitements testés. L'analyse de ces résultats permet d'identifier les composés à privilégier dans la formulation d'un traitement fongicide alternatif.

Mots-clefs résistance fongique, durabilité, fibres biosourcées, chanvre, huiles essentielles.

I. INTRODUCTION

Le chanvre est une ressource végétale locale (Vendée) et renouvelable annuellement. Ces fibres sont utilisées pour produire de bons isolants thermiques, présentant également des propriétés hygroscopiques et acoustiques élevées (Amziane and Collet, 2017; Cérézo, 2005; Collet, 2004). Ces matériaux biosourcés organiques présentent cependant une sensibilité fongique potentiellement défavorable en cas d'exposition à des humidités relatives élevées (Delannoy et al., 2020).

L'étude présentée dans cet article s'inscrit dans le projet ADEME « INNOFIB ». L'objectif de ce projet est de développer un procédé industriel innovant de fonctionnalisation de la fibre de chanvre par voie sèche, en opposition à certaines techniques d'affinage et de traitements qui utilisent des procédés par immersion plein bain des fibres. Les 2 défis de ce projet sont :

- l'affinage de la fibre de chanvre, par voie sèche, pour obtenir les meilleures performances (homogénéisation des propriétés, diminution de la masse volumique et de la conductivité thermique)
- le traitement des fibres par pulvérisation, pour améliorer leur réaction au feu et la résistance fongique.

Les additifs de traitement fongicides relèvent d'un domaine d'étude encore peu abordé par les laboratoires de sciences physiques. Les espèces de champignons sont nombreuses (100000 espèces) et trouver un traitement opérant est un problème complexe. La diversité des espèces et leur capacité d'adaptation à des milieux de vie très variés, associée à un mode de nutrition spécifique et une absence d'activité chlorophyllienne, complexifient leur éradication.

Ainsi, il y a un vrai défi dans ce projet à trouver comment sélectionner des traitements efficaces. Il faut d'une part mettre en place un protocole fiable assurant un développement fongique des témoins non traités (démarche qualitative) mais également susceptible de fournir un résultat quantitatif. A cette fin, une collaboration avec l'IMT Atlantique qui a développé des approches similaires (Tobon Monroy, 2020), a été initiée.

II. MATERIAUX ET METHODES

A. *Fibres testées, traitements fongicides et application*

L'étude est focalisée sur les fibres de chanvre. Celles-ci sont produites grâce à un procédé de défibrage par CAVAC Biomatériaux. Elles présentent une longueur moyenne de 10 mm et un diamètre moyen de 101 μm (+/- 100 μm).

Différents traitements, mono ou bi composants, formulés à partir de composés minéraux, d'huiles essentielles (HE) sont testés. Des traitements commerciaux servant de base de comparaison sont également intégrés à l'étude. Au total, 28 traitements fongicides ont été évalués.

L'application des traitements se fait par voie humide en pulvérisation. Une méthode a été créée pour traiter, à l'échelle du laboratoire, 100 g de fibres. Les fibres sont placées dans un malaxeur (conforme à la norme EN 196) équipé d'une pale. La solution de traitement est ajoutée lentement pendant que la pale tourne (118 rpm). Quand toute la solution est ajoutée, le malaxeur est stoppé pour racler le fond du bol. Le mélange est relancé pendant 2 minutes à 118 rpm. Les fibres sont ensuite placées à l'étuve (40 °C ou 130 °C). Ce protocole a été validé en analysant la dispersion d'une solution de pigments. Le traitement est parfaitement homogène dès 100 g de solution pour 100 g de fibres et pour un temps de mélange total de 3 minutes.

B. *Méthodes d'évaluation de la résistance fongique existantes*

- Annexe F de la norme EN 15101-11

Le protocole de référence pour les matériaux isolants du bâtiment est la norme EN 15101-11 Annexe F (AFNOR, 2013). Le protocole consiste, après un pré-conditionnement à 28 °C et 95 % HR, à réaliser une inoculation par voie humide de 5 souches choisies (*aspergillus niger*, *trichoderma viride*, *penicilium funiculosum*, *chaetomium globosum* et *paecilomyces variotii*), puis laisser incuber l'échantillon pendant 28 jours dans une enceinte climatique réglée à 28°C et 95 % HR. L'analyse des résultats se fait par observation visuelle à l'aide d'un microscope. Les échantillons sont classés selon une grille d'évaluation au regard des développements fongiques constatés.

Cette méthode est aujourd'hui remise en question. D'une part car l'inoculation est réalisée par voie humide. L'effet de l'activité de l'eau (aptitude de l'eau à être absorbée par le substrat pour s'équilibrer avec l'ambiance) de l'inoculum liquide peut être plus importante que l'effet du substrat sur le développement des souches ce qui peut engendrer une variabilité dans les résultats (Tobon Monroy, 2020). D'autre part le caractère subjectif de l'analyse visuelle pose question.

- Fascicule de documentation P75-471 (FCBA – CSTB)

Ce protocole est toujours en discussion. Le protocole proposé reprend celui de la norme EN 15101, en rajoutant une étape de stérilisation des échantillons par irradiation ionisante avant l'inoculation (AFNOR, 2021). L'inoculation se fait par voie humide (les 5 même souches que pour l'annexe F), l'incubation se fait à 28°C et 95 % HR (ou 85 %) pendant 28 jours. L'examen des éprouvettes après incubation est complété par un comptage biologique sur les échantillons n'ayant visuellement pas conduit au développement fongique. Le résultat du comptage est binaire. Si le nombre de colonies après l'incubation dépasse le nombre de colonies déposées à l'inoculation alors le matériau est classé comme non résistant au développement fongique. Si au contraire le nombre de colonies présentes après incubation est inférieur au nombre de colonies déposées alors le matériau est classé résistant.

- Méthode EAD 040138-01-1201

L'EAD (European Assessment Document) a publié une méthode (European assessment document, 2018) différente des deux protocoles précédents. Le protocole consiste à mettre l'échantillon dans une boîte étanche avec de l'eau au fond de la boîte, à température ambiante. Il n'y a pas de contact entre l'échantillon et l'eau liquide, un équilibre hydrique se crée entre l'échantillon et l'environnement dans la boîte (qui se veut à la saturation). Il n'y a pas d'inoculation. Après 4 semaines d'incubation, l'échantillon est sorti puis observé à l'œil ou au microscope afin d'évaluer la qualité du développement fongique.

C. Méthode d'évaluation qualitative développée

Parmi les différentes méthodes décrites précédemment, il est choisi de tester les formulations avec une adaptation de la méthode du FCBA - CSTB et en retenant une incubation en boîte étanche selon le principe de la méthode EAD. L'intérêt de ce protocole est d'éviter de mobiliser une enceinte climatique pour la période d'incubation.

Une inoculation de souches fongiques sur la fibre de chanvre est indispensable. En effet, d'un point de vue biologique il est compliqué de différencier, dans le cas où l'inoculation n'est pas réalisée, les cas où :

- il n'y a pas eu de développement fongique car le traitement est efficace,
- il n'y a pas eu de développement fongique car l'échantillon source ne contenait pas suffisamment de contamination fongique.

Le protocole retenu est donc le suivant :

Les fibres traitées sont déposées dans une boîte percée qui est elle-même placée en suspension dans une boîte plus grande. De l'eau stérile est placée au fond de la grande boîte (Fig.1). Un

couvercle vient rendre étanche le montage. Ce montage permet de maintenir l'échantillon dans un milieu fermé garantissant une saturation en vapeur d'eau.

Pour l'inoculation, les fibres sont, dans un premier temps, humidifiées avec un spray d'eau stérile et sont ensuite inoculées par voie humide avec des spores de trois souches différentes : deux souches de *Penicillium sp.* et une d'*Aspergillus niger*. Les souches de *penicillium* ont été isolées à partir de matériaux biosourcés mis en contact d'une forte humidité. La souche d'*Aspergillus niger* correspond à celle utilisée par Tobon et al (2020).

Le spray contenant les souches est formulé avec un mélange d'eau stérile avec 0.01 M/L de $MgSO_4$ et 0.25 % du tensioactif Twin 20. L'ajout du tensioactif est indispensable pour que les spores hydrophobes ne collent pas aux parois du matériel. Le sulfate de magnésium permet maintenir l'isotonie de la solution d'extraction. Ce mélange est utilisé pour récupérer les spores sur les boîtes de culture en milieu solide.



Figure 1. Photos du dispositif

Les boîtes fermées sont ensuite conditionnées pendant 28 jours à 25 °C dans une étuve pour la phase d'incubation. La présence d'eau dans le fond de la boîte pendant toute la durée de l'incubation est vérifiée. Au bout de 28 jours, les boîtes sont ouvertes et les fibres sont observées à l'œil et au microscope pour voir s'il y a eu ou non un développement fongique (Fig.2). Chaque boîte est également photographiée avant et après l'incubation.



Figure 2. Grille d'évaluation visuelle

Pour chaque formulation, trois échantillons d'environ 10 g de fibres sont réalisés. A chaque série d'essais, trois échantillons « témoins positifs » sont ajoutés. Ces témoins correspondent à des fibres de chanvre non traitées. Ils permettent de valider que les conditions étaient propices au développement des souches ajoutées. Ainsi, si au bout des 28 jours il n'y a pas eu de développement sur ces témoins il est nécessaire de recommencer l'essai.

La concentration en spore de la solution ainsi que la quantité de solution déposée via le spray sont mesurées.

D. Complément d'évaluation quantitative développée

Pour les échantillons ne présentant pas de développement fongique à l'issue de l'évaluation qualitative une étape supplémentaire de quantification peut être réalisée. Elle demande plus de temps et de matériel d'analyse biologique, c'est pourquoi elle n'est effectuée que sur une sélection réduite de formulations.

Le protocole repose sur la même préparation des échantillons (boîtes fermées assurant la saturation en eau de l'air au voisinage de l'échantillon). L'inoculation est cette fois réalisée par voie sèche en reprenant la méthode développée par Anna Maria Tobon Monroy (Tobon Monroy, 2020). De l'air sec est soufflé pendant 15 minutes au travers d'un flacon contenant une souche. Les 3 mêmes souches que précédemment sont inoculés à l'aide de 2 flacons par souche. Les spores sont transportées par l'air vers une enceinte (Fig.3) dans laquelle les boîtes ouvertes sont placées. Après 15 minutes d'inoculation par le flux d'air chargé de spores, un repos d'une heure permet aux spores de retomber sur les échantillons. Des boîtes de pétri vides sont placées dans l'enceinte afin de déterminer la quantité de spores déposée par cm^2 (Tobon Monroy, 2020). Les boîtes contenant les échantillons à tester sont ensuite fermées et placées en incubation dans une enceinte climatique pendant 4 semaine à 23 °C et 90 % HR. De même que pour le protocole précédent, à chaque série d'essais, trois échantillons « témoins positifs » sont ajoutés.

Les résultats sont observés au microscope et l'efficacité est quantifiée par un comptage du nombre de spores par unité de surface, conformément à la méthode proposée par Anna Maria Tobon Monroy (Tobon et al., 2020).

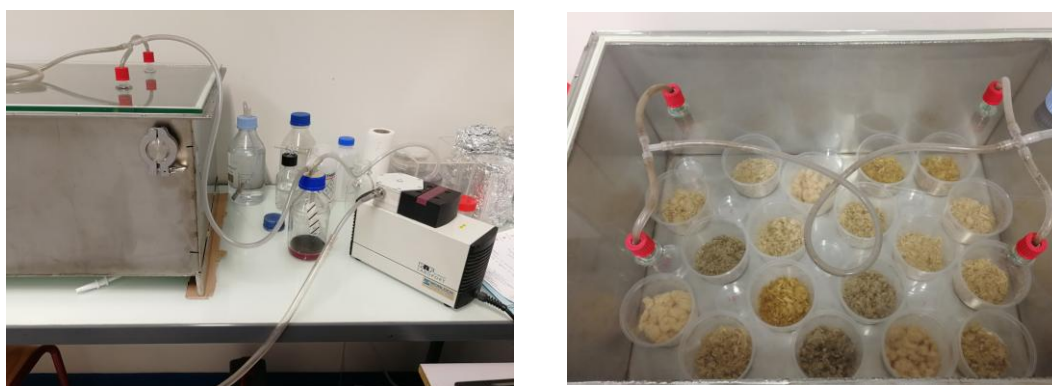


Figure 3. Montage pour l'inoculation par voie sèche

III. RESULTAT

A. Partie visuelle

La figure 4 présente les résultats qualitatifs, pour les 3 échantillons testés par traitement à l'échéance de 28 jour d'incubation. Les résultats en verts correspondent aux échantillons sur lesquels il n'y a pas de développement fongique visible, les résultats en orange pour un faible développement et les résultats rouge pour un développement important (Fig.2).

Pour les deux campagnes d'essais les témoins positifs et négatifs ont réagi comme attendu. Cela valide les conditions d'essai.

Traitement	DOSAGE	Ech 1 à 28j	Ech 2 à 28j	Ech 3 à 28j
Témoin chanvre non traité		Noir + blanc	Noir + blanc	Noir + blanc
Témoin 1: Acide borique	5%			
Témoin 2: OIT	1%			
Produit en développement Berkem 6	5%	Noir	Noir	Noir
Produit en développement Berkem 1 : AXIL 2000 FIBER	1%			
Sels minéraux	10%			Blanc
HE orange sanguine (<i>Citrus sinensis</i>)	1%	Blanc + noir	Blanc + noir	Blanc + noir
HE thym (<i>Thymus vulgaris sb thymol</i>)	1%	Noir + blanc	Blanc	
HE origan (<i>Origanum vulgare</i>)	1%			
HE eucalyptus (<i>Eucalyptus citriodora</i>)	1%	Noir	Blanc + noir	Blanc + noir
HE basilic (<i>Ocimum basilicum var. basilicum</i>)	1%	Noir + blanc	Blanc + noir	Blanc + noir
HE arbre à thé, (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	1%	Noir + blanc	Noir	Noir
HE coriandre (<i>Coriandrum sativum</i>)	1%	Noir	Noir	Noir
HE citronnelle (<i>Cymbopogon winterianus Jowitt</i>)	1%	Noir + blanc	Noir	Noir
HE litsée citronnée (<i>Litsea cubeba</i>)	1%	Noir	Noir	Noir
HE Thym (thymol et thym geraniol)	2%	Noir + blanc	Blanc	Noir + blanc
Sels minéraux + HE origan	10% + 1%			
HE lavandin (<i>Lavandula burnatii super</i>)	1%	Noir	Noir	Noir
HE menthe poivrée (<i>Mentha x piperita Franco-Mitcham</i>)	1%	Noir	Noir	Noir
HE clous de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>)	1%	Noir	Noir	Noir
HE thym sauvage, serpolet (<i>Thymus serpyllum</i>)	1%	Noir	Noir	Noir
HE eucalyptus smith (<i>Eucalyptus smithii</i>)	1%	Blanc + noir	Blanc + noir	Noir
HE Sarriette des montagnes (<i>Satureia montana</i>)	1%	Noir	Noir	Noir
HE origan (<i>Origanum vulgare</i>) bis, flux d'air	1%	Blanc gris	Blanc gris	Blanc gris
HE cannelle (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	1%			

Légende

	Aucun développement
	Développement faible
	Développement important
Couleur	Couleur de moisissure(s) visible(s)

The figure displays a grid of microscopic images arranged in three rows and six columns. Each image shows the surface of a plant sample, likely a leaf or stem, after treatment. The images are color-coded based on the legend: green for no development, yellow for weak development, and red for strong development. The first row shows control samples (Témoin) and various treatments at 5% and 10% concentrations. The second row shows treatments with essential oils (HE). The third row shows treatments with essential oils and minerals. The images illustrate the progression of mold growth over time, with some samples showing significant colonization (red) and others remaining clear (green).

Figure 4. Résultat avec la méthode d'évaluation développée dans cette étude

Les traitements traditionnels (acide borique et l'octylisothiazolinone, OIT) n'ont pas montré de développement fongique. Parmi les produits BERKEM en cours de développement l'un est efficace et l'autre non. Pour le traitement à base de sels minéraux les résultats sont satisfaisants.

Certaines huiles essentielles (cannelle, origan, basilique, les 3 thym, et la sarriette) donnent des résultats intéressants. Le suivi hebdomadaire des échantillons, réalisé pour quelques traitements, permet de juger de la dynamique de contamination. Le basilique, les thym, et la sarriette ralentissent la croissance, mais ne sont pas assez efficaces car à 28 jours le développement fongique est visuellement important. Mais la cannelle et l'origan présentent eux une efficacité suffisante selon notre protocole, il n'y a pas de développement fongique visible à l'œil nu à 28 jours.

Il est important de nuancer ces résultats sur les HE, en effet les échantillons ont séjourné 28 j dans une boîte étanche. Pour vérifier que l'effet des HE (composés d'éléments volatiles) n'est pas lié à la saturation de l'atmosphère par les HE autour de l'échantillon, le test a été également réalisé en

présence d'un volume d'air autour de l'échantillon beaucoup plus important. Les résultats sont moins bons dans le cas de l'HE d'origan.

Certains échantillons avec un développement fongique ont été observés au microscope numérique à large profondeur de champ (Keyence VHX). Ces images ont permis de valider la nature des espèces présentes qui correspondent bien aux espèces inoculées. Il n'y a donc pas de développement endogène, ce qui est logique au regard des quantités de spores inoculées.

B. Partie comptage biologique

Traitement	Ech	masse prélevée (g)	Unité formant colonie (UFC) /g
Témoin chanvre non traité	1		
	2		
	3		
Témoin 1: Acide borique	1	3,765	0E+0
	2	4,818	0E+0
	3	3,310	0E+0
Origan (<i>Origanum vulgare</i>)	1	2,523	4E+6
	2	2,184	8E+6
	3	2,523	7E+6
Sels minéraux	1	4,906	2E+4
	2	4,061	2E+5
	3	4,305	9E+4

Quantité de spore déposée à l'inoculation : 105 ± 92 UFC/g

Figure 5. Résultat des comptages biologiques

Le témoin non traité a permis de valider les conditions d'incubation mais n'a pas fait l'objet d'un comptage de spores en raison d'un développement fongique visuellement trop important, ne nécessitant pas de comptage pour confirmation. Seul l'échantillon traité avec de l'acide borique passe le test quantitatif, le nombre d'unité par colonie (UFC) par gramme compté est négligeable devant la quantité de spores inoculés.

Le traitement à l'HE d'origan conduit à un nombre d'UFC trop important, en comparaison du nombre d'UFC déposé lors de l'inoculation (105 UFC/g), pour être considéré résistant au développement fongique, selon ce protocole.

Dans le cas du traitement aux sels minéraux, le nombre d'UFC est moins important que pour le traitement avec l'origan, mais ce n'est pas suffisant pour que selon ce test il y ait « résistance au développement fongique ».

La différence entre les résultats de la méthode qualitative et quantitative est très importante : les échantillons traités avec l'origan et les sels minéraux ne présentent pas de développement fongique observable visuellement, mais il s'avère qu'après comptage biologique, un développement est bien présent. Bien que ces matériaux soient définis comme non résistants il pourrait être intéressant de classer leur sensibilité au développement fongique en définissant un seuil sur le nombre d'UFC pour traduire une résistance plus modérée (ce qui semble

techniquement difficilement réalisable) ou en révisant les conditions d'incubation. La résistance fongique doit être calibrée au regard de l'application et de l'occurrence d'une exposition aux fortes humidités dans l'esprit de ce qui est utilisé dans les Eurocode 0 et 1 de la construction (dans le cas des charges). Ceci permettrait de ne pas imposer le recours à des traitements fongicides trop puissants et/ou trop impactants.

Notons pour cette étude les UFC sont exprimées par gramme de fibres humides et que dans la norme il est fait référence à un nombre d'UFC par cm³. Définir un seuil sur le nombre d'UFC n'a de sens que si le protocole d'essai est réellement réalisé sur un échantillon à sa masse volumique d'usage, ce qui paraît illusoire.

IV. CONCLUSION

Le protocole qualitatif proposé est pertinent et adapté aux isolants biosourcés. L'inoculation par des souches contaminantes est indispensable. Cette méthode est discriminante et permet d'identifier des solutions alternatives de traitements : les sels minéraux et quelques HE. Face à la grande diversité d'HE existantes, il reste de nombreuses solutions à envisager et ces résultats ne peuvent être considérés comme exhaustifs.

Le protocole quantitatif s'avère extrêmement sévère et les traitements les plus puissants sont les seuls susceptibles de conduire à la classification « résistant au développement fongique ».

Une réflexion sur la mise en place d'un seuil de nombre d'UFC ou d'une révision des conditions d'incubation (température, durée, humidité) doit être engagée par la communauté afin d'identifier un protocole quantitatif cohérent avec l'exploitation des matériaux biosourcés dans la construction.

REMERCIEMENT

Ce programme de recherche est financé par l'ADEME dans le cadre du projet GRAINE 2019 « INNOFIB » n°2103D0018-A.

REFERENCES

- AFNOR, 2021. FD P75-471 Méthode d'essai d'évaluation de la résistance des produits isolants thermiques vis-à-vis des moisissures.
- AFNOR, 2013. EN15101-1 : 2013+A1 : 2019(F) Produits isolants thermiques destinés aux applications du bâtiment — Isolation thermique formée en place à base de cellulose (LFCI) — Partie 1 : Spécification des produits en vrac avant la mise en œuvre.
- Amziane, S., Collet, F., 2017. Bio-aggregates Based Building Materials: State-of-the-Art Report of the RILEM Technical Committee 236-BBM. Springer.
- Cérézo, V., 2005. Propriétés mécaniques, thermiques et acoustiques d'un matériau à base de particules végétales: approche expérimentale et modélisation théorique. Inst. Natl. Sci. Appliquées Lyon.
- Collet, F., 2004. Caractérisation hydrique et thermique de matériaux de Génie Civil à faibles impacts environnementaux (phdthesis). Institut National des Sciences Appliquées de Rennes.
- Delannoy, G., Marceau, S., Glé, P., Gourlay, E., Guéguen-Minerbe, M., Amziane, S., Farcas, F., 2020. Durability of hemp concretes exposed to accelerated environmental aging. Constr. Build. Mater. 252, 119043. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119043>
- European assessment document, 2018. EAD 040138-01-1201, Determination of resistance to mould fungus.
- Tobon, A.M., Andres, Y., Locoge, N., 2020. Impacts of test methods on the assessment of insulation materials' resistance against moulds. Build. Environ. 179, 106963. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2020.106963>

Tobon Monroy, A.M., 2020. Etude de la potentialité du développement de micro-organismes sur des matériaux d'isolation bio-sourcés et conventionnels utilisés dans la rénovation de bâtiments : impacts sur la qualité de l'air intérieur 216.