



**HAL**  
open science

# Biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons : Mise au point d'un test accéléré de laboratoire

Virginie Wiktor

► **To cite this version:**

Virginie Wiktor. Biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons : Mise au point d'un test accéléré de laboratoire. Sciences de l'ingénieur [physics]. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2008. Français. NNT: . tel-00300262

**HAL Id: tel-00300262**

**<https://theses.hal.science/tel-00300262v1>**

Submitted on 17 Jul 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 477GP

**THESE**  
présentée par

*Virginie WIKTOR*

Pour obtenir le grade de Docteur  
de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

Spécialité : Génie des Procédés

***Biodétérioration d'une matrice cimentaire par des  
champignons :  
Mise au point d'un test accéléré de laboratoire***

Soutenue à Saint-Etienne le 24 Avril 2008

Membres du jury

**Président :**

René Guyonnet

Directeur de Recherches, Ecole des Mines de Saint-Etienne

**Rapporteurs :**

Clara Urzi

Professeur, Université des sciences de Messine

Michèle Queneudec T'Kint

Professeur, Laboratoire des Technologies innovantes, Amiens

**Examineur :**

Françoise Feugeas

Maître de Conférence, INSA de Strasbourg

**Directeurs de thèse :**

Philippe Grosseau

Maître de Recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne

Eric Garcia-Diaz

Professeur des Ecoles des Mines, Ecole des Mines de Douai

**■ Spécialités doctorales :**

SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX  
 MECANIQUE ET INGENIERIE  
 GENIE DES PROCEDES  
 SCIENCES DE LA TERRE  
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT  
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES  
 INFORMATIQUE  
 IMAGE, VISION, SIGNAL  
 GENIE INDUSTRIEL  
 MICROELECTRONIQUE

**Responsables :**

**J. DRIVER** Directeur de recherche – Centre SMS  
**A. VAUTRIN** Professeur – Centre SMS  
**G. THOMAS** Professeur – Centre SPIN  
**B. GUY** Maître de recherche – Centre SPIN  
**J. BOURGOIS** Professeur – Centre SITE  
**E. TOUBOUL** Ingénieur – Centre G2I  
**O. BOISSIER** Professeur – Centre G2I  
**JC. PINOLI** Professeur – Centre CIS  
**P. BURLAT** Professeur – Centre G2I  
**Ph. COLLOT** Professeur – Centre CMP

**■ Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'Etat ou d'une HDR)**

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BENABEN	Patrick	PR 2	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
BERNACHE-ASSOLANT	Didier	PR 1	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR 2	Informatique	G2I
BOUCHER	Xavier	MA	Génie Industriel	G2I
BOUDAREL	Marie-Reine	MA	Sciences de l'inform. & com.	DF
BOURGOIS	Jacques	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BRODHAG	Christian	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BURLAT	Patrick	PR 2	Génie industriel	G2I
CARRARO	Laurent	PR 1	Mathématiques Appliquées	G2I
COLLOT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DARRIEULAT	Michel	ICM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DECHOMETS	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
DESRAYAUD	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DELAFOSSÉ	David	PR 2	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	G2I
DRAPIER	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	CIS
DRIVER	Julian	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FOREST	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
FORTUNIER	Roland	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
FRACZKIEWICZ	Anna	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	CR	Génie des Procédés	SPIN
GIRARDOT	Jean-Jacques	MR	Informatique	G2I
GOEURIOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GOEURIOT	Patrice	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
GROSSEAU	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GUILHOT	Bernard	DR	Génie des Procédés	CIS
GUY	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
KLÖCKER	Helmut	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
LI	Jean-Michel	EC (CCI MP)	Microélectronique	CMP
LONDICHE	Henry	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
MOLIMARD	Jérôme	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
MONTHEILLET	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean-Charles	PR 1	Image, Vision, Signal	CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	CR	Sciences de la Terre	SITE
THOMAS	Gérard	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
VALDIVIESO	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VAUTRIN	Alain	PR 1	Mécanique & Ingénierie	SMS
VIRICELLE	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS

**Glossaire :**

PR 1 Professeur 1<sup>ère</sup> catégorie  
 PR 2 Professeur 2<sup>ème</sup> catégorie  
 MA(MDC)Maître assistant  
 DR (DR1) Directeur de recherche  
 Ing. Ingénieur  
 MR(DR2) Maître de recherche  
 CR Chargé de recherche  
 EC Enseignant-chercheur  
 ICM Ingénieur en chef des mines

**Centres :**

SMS Sciences des Matériaux et des Structures  
 SPIN Sciences des Processus Industriels et Naturels  
 SITE Sciences Information et Technologies pour l'Environnement  
 G2I Génie Industriel et Informatique  
 CMP Centre de Microélectronique de Provence  
 CIS Centre Ingénierie et Santé

## *Remerciements*

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à celles et ceux, qui, de près ou de loin, ont contribué à son élaboration, par leurs encouragements et leur soutien amical.

Je remercie René Guyonnet, responsable du département Physico-Chimie des Matériaux Multi-Composants (PCMM) - devenu au cours de ce travail le département Poudres et Matériaux Multi-Composants (PMMC) -, Philippe Grosseau, responsable du département PMMC de l'École des Mines de Saint-Etienne, et Denis Damidot responsable du département Génie Civil et Environnemental de l'École des Mines de Douai, pour m'avoir accueillie dans leurs départements respectifs.

J'adresse mes remerciements à mes directeurs de thèse, Philippe Grosseau et Eric García-Díaz d'avoir dirigé ce travail et pour la confiance qu'ils m'ont accordée au cours de ces trois années, j'ai beaucoup appris à leur côté.

Je suis également très reconnaissante à Clara Urzi et Michèle Queneudec T'Kint, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, mais aussi pour l'attention et les remarques constructive portées à ce travail.

Je tiens également à remercier Françoise Feugeas et René Guyonnet d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Je remercie chaleureusement le Professeur Antonio Mastino - responsable du département de Microbiologie et Sciences Génétique et Moléculaire de l'Université de Messine - de m'avoir accueillie dans son département lors de mon séjour en Sicile. Je souhaite remercier tout particulièrement Clara Urzi et Filomena De Leo de m'avoir donné l'opportunité de travailler à leur côté, pour le temps qu'elles m'ont accordé, leur aide précieuse dans les manip, leur rigueur scientifique, leurs qualités humaines, leur gentillesse et leur bonne humeur : « Mille grazie ! ». Je garderai d'excellents souvenirs de mon passage à

Messine, tant sur le plan humain que professionnel. Je n'oublie pas Essaïd Bilal, sans qui je n'aurais certainement pas rencontré Clara Urzi.

J'adresse mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide dans les manips et sans qui ce travail n'aurait pas été possible : Anne-Marie Danna, Marie-Claude Bartholin, Henri Besset, Alexandre Govin, Olivier Valfort, Marc Rouvière, Paul Jouffrey à l'École des Mines de Saint-Étienne, et Guillaume Potier, Christophe Cappelaere, Mickael D'Helft, Patrick Degrugilliers, David Bulteel, à l'École des Mines de Douai.

Je souhaite également dire un grand merci à nos formidables secrétaires Carole (Douai), Carole (Saint-Étienne), et bien sûr Françoise et Stéphanie pour leur gentillesse, leur bonne humeur, et leur disponibilité.

Je remercie également Christine Lors pour ses conseils et les corrections du manuscrit, et Christopher Yukna pour son aide et ses corrections de l'anglais.

J'ai eu la chance au cours de ces trois années de rencontrer des personnes vraiment formidables (trop nombreuses pour pouvoir toutes les citer !), tant sur le plan professionnel qu'amical. Une chose est sûre, je n'aurais pas pris autant de plaisir à faire cette thèse sans leur soutien, leur gentillesse et leur bonne humeur. Entre les sessions hockey, resto, laser game, les pauses kfé, les collections de kinders, et les « œuvres collectives », on a vraiment passé de bons moments. Je pense tout particulièrement à Vincent et Steph (mes coburos qui ont réussi à me supporter tout ce temps !), Najih l'expert en biologie, JC et ses p'tites cuillères, Laetitia (merci de m'avoir entraînée au footing !), Marthe, mon prof au billard Ahmed, les barbus râleurs (Jérôme et Christophe !), Alex, Yamina, Sorina et Geoffroy, Wilfried le pro du laser-game, sans oublier les douaisiens : Yann, Guillaume, Frédéric, Nadine et Julien, Christophe, Georges, Carole, et le soutien grenoblois de Céc, Delph, Elsa, Nico.

Enfin je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude à mes parents et mes sœurs, d'avoir su respecter mes choix même si je sais que cela n'a pas toujours été facile, mais aussi pour m'avoir toujours encouragée, et soutenue (et surtout supportée ces derniers mois !), je les en remercie infiniment.

A mes parents,  
A Pee-Wee et P'tit Francis !

« Si le problème a une solution, il ne sert à rien de s'inquiéter. Mais s'il n'en a pas, alors s'inquiéter ne sert à rien. »

Proverbe tibétain

---



---

## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : La biodétérioration des matériaux : Etat des lieux	4
<b>1. Biodétérioration ou biodégradation ?</b>	<b>4</b>
<b>2. Les facteurs influençant la biodétérioration</b>	<b>5</b>
2.1. Bioréceptivité	6
2.1.1. Influence de la composition de la matrice	6
2.1.2. La porosité	6
2.1.3. La rugosité	7
2.2. Les conditions environnementales	7
<b>3. Les mécanismes de la biodétérioration</b>	<b>8</b>
3.1. La biodétérioration esthétique	8
3.2. La biodétérioration chimique	8
3.3. La biodétérioration physique	9
<b>4. Les organismes impliqués dans la biodétérioration</b>	<b>9</b>
4.1. Les macro-organismes	10
4.2. Les micro-organismes	10
4.2.1. La succession biologique	10
4.2.2. Le biofilm	11
4.2.3. Les bactéries	12
4.2.4. Les champignons	12
4.2.5. Les algues et les cyanobactéries	13
<b>5. Les techniques d'analyse et de caractérisation</b>	<b>16</b>
5.1. Les techniques biologiques	16
5.1.1. Echantillonnage	16
5.1.2. Méthodes de cultures	17
5.1.3. Méthodes moléculaires	18
5.1.4. Détection de biomolécules	19
5.1.5. Coloration des cellules	19
5.2. Analyses physiques et chimiques	20
5.2.1. Analyse chimique élémentaire par voies physiques	20
5.2.2. Analyse minéralogique d'un matériau	20
5.2.3. Exemples d'application	21
<b>6. Les outils actuels de lutte contre la biodétérioration</b>	<b>22</b>



6.1.	Nettoyage _____	22
6.2.	Méthodes chimiques _____	22
6.3.	Méthodes physiques _____	23
<b>7.</b>	<b>La biodétérioration étudiée à l'échelle du laboratoire _____</b>	<b>23</b>
7.1.	Etude de M. A. Shirakawa sur le développement d'une méthode pour évaluer la bioréceptivité d'un enduit de plâtre intérieur à la croissance fongique (Shirakawa et al., 2003) _____	24
7.2.	Etude d'Arnaud Dubosc sur la mise au point d'essais accélérés de vieillissement pour l'étude du développement de salissures biologique sur les parements en béton (Dubosc, 2000 ; Escadeillas et al., 2007) _____	24
7.3.	Etude de de Moraes Pinheiro, sur l'altération de la microstructure du béton par les mécanismes de la biodétérioration (de Moraes Pinheiro et al., 2003) _____	25
7.4.	Etude de Akira Ohshima sur le développement de champignons et d'algues sur un mortier (Ohshima et al., 1999) _____	25
7.5.	Etude d'Hélène Barberousse sur la recherche des facteurs favorisant l'implantation des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France (Barberousse, 2006) _____	26
7.6.	Etude de Clara Urzì et Filomena De Leo sur l'évaluation de l'efficacité de biocide et de composés hydrofuges contre la colonisation microbienne de mortiers (Urzì et al., 2007) _____	27
7.7.	Etude K. F. Nielsen sur l'influence de l'humidité et de la température sur le développement fongique ainsi que des métabolites secondaires agissant sur des matériaux de construction (Nielsen et al., 2004) _____	27
<b>8.</b>	<b>Conclusion _____</b>	<b>28</b>
 <b>CHAPITRE II : Les micromycètes _____</b>		<b>32</b>
<b>1.</b>	<b>Généralités _____</b>	<b>31</b>
1.1.	Introduction à la taxinomie _____	31
1.2.	Le règne des Champignons _____	32
1.3.	La diversité des ascomycètes _____	34
1.3.1.	Mode de développement _____	34
1.3.2.	La reproduction _____	34
1.3.3.	Cas particuliers _____	35
<b>2.</b>	<b>Les mécanismes de biodétérioration par les champignons _____</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>Les champignons impliqués dans la biodétérioration _____</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>Les micromycètes de l'étude _____</b>	<b>40</b>
4.1.	<i>Alternaria alternata</i> _____	41
4.2.	<i>Aspergillus niger</i> _____	42
4.3.	<i>Exophiala</i> sp. _____	42
4.4.	<i>Coniosporium uncinatum</i> _____	43

<b>5. Quantification de la biomasse</b>	<b>43</b>
5.1. Dosage de l'ergostérol	44
5.2. Le dosage des protéines	46
<b>6. Conclusion</b>	<b>46</b>
<b>CHAPITRE III : La matrice cimentaire</b>	<b>49</b>
<b>1. Généralités</b>	<b>48</b>
1.1. Fabrication du ciment	48
1.2. La chimie du ciment	49
1.3. La porosité des matrices cimentaires	51
<b>2. Vieillessement naturel et accéléré des matrices cimentaires</b>	<b>52</b>
2.1. La carbonatation des matériaux cimentaires	52
2.1.1. La carbonatation de la portlandite $\text{Ca}(\text{OH})_2$	53
2.1.2. La carbonatation des silicates de calcium hydratés C-S-H	53
2.1.3. La carbonatation des autres constituants des matériaux cimentaires	54
2.1.4. Aspect morphologique, cristallographiques et chimiques des carbonates de calcium formés	54
2.1.5. Effet de la carbonatation sur la microstructure	54
2.1.6. Essais de carbonatation accéléré	55
2.2. La lixiviation des matrices cimentaires	58
2.2.1. Influence de la lixiviation sur la porosité	58
2.2.2. Dissolution de la portlandite	59
2.2.3. Décalcification des C-S-H	59
2.2.4. Profil de dégradation des matrices cimentaires lixiviées	60
2.3. Lixiviation de matrices cimentaires carbonatées	60
<b>3. Conclusion</b>	<b>61</b>
<b>DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE IV : Matériels et méthodes</b>	<b>66</b>
<b>1. La matrice cimentaire</b>	<b>65</b>
1.1. Confection et conservation des éprouvettes	65
1.1.1. Détermination du rapport Eau/Ciment (E/C)	65
1.1.2. Confection des éprouvettes	65
1.1.3. Conservation des éprouvettes	66
1.2. Vieillessement accéléré	66
1.2.1. La carbonatation	66

1.2.2.	La lixiviation	67
1.3.	Techniques analytiques	68
1.3.1.	Diffractométrie des rayons X (DRX)	68
1.3.2.	Spectrométrie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF)	69
1.3.3.	Fluorescence X	69
1.3.4.	Pycnométrie à hélium	71
1.3.5.	Porosimétrie par intrusion de mercure	71
1.3.6.	Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	72
1.3.7.	Microscopie optique, et stéréoscopique	73
1.4.	La stérilisation des éprouvettes	73
1.4.1.	Stérilisation par rayonnements ionisants	74
1.4.2.	Stérilisation aux UV	75
<b>2.</b>	<b>Techniques microbiologiques</b>	<b>75</b>
2.1.	Cultures fongiques	75
2.1.1.	Souches fongique utilisées	75
2.1.2.	Conditions de culture des souches fongiques	76
2.2.	Préparation d'une suspension de spores	77
2.3.	Préparation d'une suspension de cellules fongiques	77
2.4.	Dosages biochimiques	78
2.4.1.	Dosage de l'ergostérol	79
2.4.2.	Dosage des protéines	79
2.5.	Coloration au réactif de Schiff (PAS)	81
<b>3.</b>	<b>Test de biodétérioration</b>	<b>82</b>
 <b>CHAPTER V: Accelerated weathering of the matrix</b>		<b>85</b>
<b>1.</b>	<b>Characterization of hydrated cement paste</b>	<b>84</b>
1.1.	X-ray diffraction (XRD) analysis	84
1.2.	Fourier Transformed infrared (FT-IR) analysis	85
1.3.	Mercury Intrusion Porosimetry (MIP)	87
1.4.	Helium pycnometry	88
<b>2.</b>	<b>Accelerated weathering of the matrix</b>	<b>89</b>
2.1.	Accelerated carbonation	89
2.2.	Leaching operation	91
<b>3.</b>	<b>Influence of accelerated weathering on the matrix microstructure</b>	<b>92</b>
3.1.	X-ray diffraction analysis	92
3.2.	Fourier Transformed Infrared analysis	94
3.3.	Mercury Intrusion Porosity and helium pycnometry	96

3.4.	Direct observations _____	97
3.5.	Scanning Electron Microscope (SEM) observations _____	98
3.6.	SEM/EDX analysis _____	101
3.7.	Discussion _____	102
<b>4.</b>	<b>Conclusion _____</b>	<b>103</b>
CHAPTER VI: Fungal development _____		<b>106</b>
<b>1.</b>	<b>Cultural methods _____</b>	<b>105</b>
1.1.	Culture of <i>Alternaria alternata</i> _____	105
1.1.1.	Influence of culture media _____	105
1.1.2.	Influence of light on sporulation _____	108
1.2.	Culture of <i>Aspergillus niger</i> _____	109
1.3.	Cultures of <i>Exophiala</i> sp. and <i>Coniosporium uncinatum</i> _____	111
<b>2.</b>	<b>Development of assay for biomass quantification _____</b>	<b>111</b>
2.1.	Proteins assay _____	111
2.1.1.	Bradford assay _____	111
2.1.2.	Extraction of proteins _____	112
2.2.	Ergosterol assay _____	114
2.2.1.	HPLC determination _____	115
2.2.2.	Extraction of ergosterol _____	117
2.2.3.	Discussion _____	118
<b>3.</b>	<b>Conclusion _____</b>	<b>119</b>
CHAPTER VII: Accelerated laboratory test of biodétérioration _____		<b>121</b>
<b>1.</b>	<b>Test A _____</b>	<b>120</b>
1.1.	Set up of the experimental device _____	120
1.1.1.	Experimental device _____	120
1.1.2.	Nutrients brought _____	120
1.1.3.	Specimen weathering _____	121
1.1.4.	Inoculation _____	121
1.2.	Observations _____	121
<b>2.</b>	<b>Test B _____</b>	<b>122</b>
2.1.	Optimization of the experimental device _____	122
2.2.	Observations _____	123
<b>3.</b>	<b>Test C _____</b>	<b>124</b>
3.1.	Optimization of the experimental device _____	124

3.2.	Observations _____	125
<b>4.</b>	<b>Test D</b> _____	<b>127</b>
4.1.	Optimization of the experimental device _____	127
4.2.	Observations _____	127
<b>5.</b>	<b>Test E</b> _____	<b>132</b>
5.1.	Improvement of the experimental device _____	132
5.1.1.	Conditioning of boxes _____	132
5.1.2.	Inoculation _____	132
5.1.3.	Results _____	133
5.1.4.	Discussion _____	154
<b>6.</b>	<b>Discussion</b> _____	<b>156</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusion</b> _____	<b>160</b>
CONCLUSION GÉNÉRALE _____		<b>162</b>
PERSPECTIVES _____		<b>166</b>
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____		<b>167</b>
ANNEXES _____		<b>184</b>
GLOSSAIRE _____		<b>212</b>

## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Evolution théorique des propriétés biologiques et physiques du béton en fonction du temps d'exposition – NSOM: Neutrophilic sulfur-oxidizing micro-organisms ; ASOM: Acidophilic sulfur-oxidizing micro-organisms (Selon Roberts et al., 2002)</i>	11
<i>Figure 2 : Méthodologie schématique pour l'étude microbiologique de la biodétérioration selon les techniques d'échantillonnage (Urzi, 2005)</i>	18
<i>Figure 3 : Arbre phylogénétique selon la classification proposée par Woese et al. (1990)</i>	32
<i>Figure 4 : Les classes du règne des Champignons</i>	33
<i>Figure 5 : Cycle de développement des Hyphomycètes (d'après Kubeldis, 2003)</i>	35
<i>Figure 6 : Bourgeonnement d'une blastospore (d'après Barron, 1999)</i>	35
<i>Figure 7 : Formation d'hyphes chez les champignons lévuriformes (d'après Barron, 1999)</i>	36
<i>Figure 8 : Croissance méristématique (d'après Wollenzien, 1995)</i>	36
<i>Figure 9 : Formule chimique développée de l'ergostérol</i>	45
<i>Figure 10 : composition des ciments courants (d'après Bollotte, Italcementi Group)</i>	49
<i>Figure 11 : Notation cimentière des principaux constituants du ciment</i>	50
<i>Figure 12 : Représentation schématique du système considéré pour l'étude de la biodétérioration</i>	62
<i>Figure 13 : Dispositif expérimental pour l'essai de carbonatation accéléré</i>	66
<i>Figure 14 : Dispositif expérimental pour l'essai de lixiviation</i>	68
<i>Figure 15 : Schéma simplifié du pycnomètre</i>	71
<i>Figure 16 : Mesure de la dose absorbée au cœur de l'éprouvette</i>	75
<i>Figure 17 : Observation au microscope optique des suspensions de cellules fongiques, grossissement x40 – (a) Alternaria alternata, (b) Exophiala sp., (c) Aspergillus niger, (d) Coniosporium uncinatum</i>	78
<i>Figure 18 : échantillonnage des éprouvettes pour la coloration PAS</i>	81
<i>Figure 19: X-ray diffractogram of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH</i>	85
<i>Figure 20: Diffuse reflectance FT-IR spectrum of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH</i>	86
<i>Figure 21: ATR FT-IR spectrum of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH</i>	86
<i>Figure 22: Pore size distribution of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH</i>	88
<i>Figure 23: Identification of faces for carbonation operation (section through vertically cast cube)</i>	89
<i>Figure 24: Carbonation depth for hydrated cement pastes after 48h of accelerated carbonation – Example of: (a) non pre-dried specimen, (b) and (c) pre-dried specimen</i>	90
<i>Figure 25: Evolution of pH in function of the leaching period (average of duplicates) - green curve: surface pH of the matrix, red curve: leachate pH</i>	91
<i>Figure 26: Soluble Calcium derived from calcite and portlandite for CaCO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O system – calcium carbonate in water with a fixed partial pressure of carbon dioxide (Bureau and Zasoski, 2002)</i>	92
<i>Figure 27: X-ray diffractogram of specimen before (a) and after (b), (c) accelerated weathering of the matrix – E=ettringite, G=gypsum, P=portlandite, C=calcite, A=aragonite, V=vaterite</i>	93
<i>Figure 28: Details of FT-IR spectra (ATR) of the cementitious matrix before and after accelerated weathering</i>	94
<i>Figure 29: Change over time for the pore size distribution with accelerated weathering</i>	96

Figure 30: Direct observations of specimen before and after accelerated weathering – (a) non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen _____	97
Figure 31: SEM images of fracture surfaces – (a) non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen _____	98
Figure 32: SEM images of thin sections – (a) non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated and leached specimen _____	99
Figure 33: Global SEM images of thin sections of a carbonated and leached specimen _____	100
Figure 34: Measured thickness in close ups of earlier images _____	100
Figure 35: Localization of EDX analyzed areas _____	101
Figure 36: SEM / EDX analysis of thin sections for carbonated and leached specimen _____	102
Figure 37 : <i>Alternaria alternata</i> grown on different media at $24\pm 1^\circ\text{C}$ - $90\pm 5\%$ RH – (a) 9 days in $V_s$ , (b) 9 days in $mV_s$ , (c) 9 days in mCD, (d) 14 days in mCD, (e) observation of spore chains from (d) with stereomicroscope x50, (f) observation of (e) with optic microscope (scale bare = $20\ \mu\text{m}$ ) _____	107
Figure 38: Influence of light exposition on sporulation for culture grown 14 days in mCD medium – (a) Not exposed to light, (b) exposed to light _____	108
Figure 39: Observations of fungal cultures – (a) Culture in plate of <i>Aspergillus niger</i> grown 9 days in PDA, (b) observation of <i>A.niger</i> with stereomicroscope, (c) observation <i>A.niger</i> with optic microscope, (d) culture in plate of <i>Exophiala sp.</i> grown 15 days in PDA, (e) observation of <i>Exophiala sp.</i> with stereomicroscope, (f) culture in plate of <i>Coniosporium uncinatum</i> grown 1 month in PDA, (g) observation of <i>C.uncinatum</i> with stereomicroscope, (h) observation of <i>C.uncinatum</i> with optic microscope _____	110
Figure 40: Standard curve produced from standard assay performed in PBS _____	113
Figure 41: Influence of sonication on proteins extraction _____	114
Figure 42: HPLC chromatogram of solution of commercial ergosterol eluted with acetonitrile-methanol (80:20 v/v) with a flow rate of 1 mL/min _____	115
Figure 43: UV spectrum corresponding to the eluted peak at 15.895 min _____	116
Figure 44: Standard curve of ergosterol solution _____	116
Figure 45: Experimental device developed for the 1 <sup>st</sup> test _____	121
Figure 46: Experimental device for test B _____	122
Figure 47: Observations of boxes after 5 days of incubation at $24\pm 1^\circ\text{C}$ and $90\pm 5\%$ RH – (a) Non weathered specimen, (b) carbonated specimen _____	123
Figure 48: Experimental device for test C _____	125
Figure 49: Observations of specimens inoculated with <i>Aspergillus niger</i> after 10 days of incubation at $24\pm 1^\circ\text{C}$ and $75\pm 5\%$ RH – (a) Non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen _____	126
Figure 50: Experimental device for test D _____	127
Figure 51: Observations of specimens inoculated with <i>Aspergillus niger</i> after 10 days of incubation at $24\pm 1^\circ\text{C}$ and $75\pm 5\%$ RH – (a) Non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen _____	128
Figure 52: Observations of carbonated and leached specimens inoculated with <i>Alternaria alternata</i> after 10 days of incubation at $24\pm 1^\circ\text{C}$ and $90\pm 5\%$ RH _____	128

<i>Figure 53: Observations with stereomicroscope of the specimen surface after 3 months of incubation – (a), (d) non weathered, (b), (e) carbonated, and (c), (f) carbonated then leached specimen</i>	129
<i>Figure 54: SEM pictures of specimen surface after 6 months of incubation for carbonated then leached specimen inoculated with (a) <i>Alternaria alternata</i>, and (b) <i>Aspergillus niger</i></i>	130
<i>Figure 55: Experimental set-up for test E</i>	132
<i>Figure 56: Direct observations of the non weathered specimens after 4 weeks of incubation</i>	134
<i>Figure 57: Direct observations of the carbonated specimens</i>	136
<i>Figure 58: Direct observations of the carbonated then leached specimens – (T0) after inoculation, (T4) after four weeks of incubation</i>	138
<i>Figure 59: Observation with stereomicroscope of the non weathered specimens – T0: just after inoculation; T4: after 4 weeks of incubation</i>	140
<i>Figure 60: Observations performed with stereomicroscope of the carbonated specimens – (T0) just after inoculation, (T1) after one week of incubation, (T4) after four weeks of incubation</i>	142
<i>Figure 61: Stereomicroscopic observation performed on the carbonated then leached specimens – black arrows point out the assumed bacterial contamination; pink arrows the fungal one</i>	144
<i>Figure 62: Observations with stereomicroscope of samples before (left pictures) and after (right picture)</i>	145
<i>Figure 63: location on the specimen of the different side observed</i>	146
<i>Figure 64: Observations with stereomicroscope of cross-sections details of carbonated then leached specimen after the PAS staining – (a) inoculated with <i>Aspergillus niger</i>, (b) control, (c) inoculated with <i>Coniosporium uncinatum</i></i>	147
<i>Figure 65: SEM observations of the carbonated then leached control without medium – (a) and (b) surface observations</i>	148
<i>Figure 66: SEM observations of the carbonated then leached controls – (a) surface observation; (b), (c) and (d) observation of the cross-section</i>	149
<i>Figure 67: SEM observations of the carbonated then leached specimens inoculated with <i>Aspergillus niger</i> - (a), (b), (c) and (d) surface observation</i>	150
<i>Figure 68: SEM observations of specimens inoculated with <i>Alternaria alternata</i> – (a), (b) surface observation of the carbonated specimen; (c) observation of the cross section of the carbonated then leached specimen, (d) observation of the cross-section of the carbonated specimen</i>	151
<i>Figure 69: SEM observations of the carbonated then leached specimens inoculated with <i>Exophiala sp.</i> – (a), (b), (d) surface observation; (d) observation of the cross-section</i>	152
<i>Figure 70: SEM observations of the carbonated then leached specimens inoculated with <i>Coniosporium uncinatum</i> – (a), (b) surface observation; (c) and (d) observation of the cross-section</i>	153
<i>Figure 71 : Radiolyse de l'eau</i>	185
<i>Figure 72 : montage essai 1</i>	200
<i>Figure 73 : montage essai 2</i>	200
<i>Figure 74 : Montage ATR horizontal</i>	207
<i>Figure 75 : Dispositif ATR utilisé à l'EMSE</i>	208



---



---

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Synthèse des protocoles utilisés pour les essais de laboratoire sur la biodétérioration des matériaux</i>	29
<i>Tableau 2 : Propriétés des minéraux impliqués dans la carbonatation (Arandigoyen et al., 2006)</i>	55
<i>Tableau 3 : Composition chimique en équivalent d'oxydes du ciment anhydre utilisé pour l'étude</i>	70
<i>Tableau 4 : Formule de Bogue et teneur des phases du ciment anhydre utilisé pour l'étude</i>	70
<i>Tableau 5 : Comparaison des dispositifs expérimentaux des différents tests réalisés</i>	83
<i>Table 1: XRD Data for hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% HR</i>	84
<i>Table 2: FT-IR characterization of hydrated cement paste</i>	85
<i>Table 3: FT-IR characterization of specimens before and after accelerated weathering</i>	95
<i>Table 4: Characterization of the matrix microstructure</i>	97
<i>Table 5: Characteristics of proteins assay performed in different solvents</i>	113
<i>Table 6: HPLC data for ergosterol assay</i>	117
<i>Table 7: Observations and evolution of microbial growth on specimen surfaces during 4 weeks of accelerated biodeterioration test</i>	154
<i>Table 8: Overview of the results obtained for the development of the biodeterioration test</i>	158
<i>Table 9: Overview of the results obtained for the carbonated then leached specimens inoculated in the Test E, from a fungal growth point of view</i>	159

---

# INTRODUCTION

Les bâtiments, les monuments, les ouvrages d'art... ont pour vocation de durer dans le temps. Au fil des années, ils sont exposés au vieillissement naturel dû à la pollution environnementale, au gel, au vent, à la pluie...mais ils sont également soumis aux attaques biologiques. Les micro-organismes ont la capacité de se développer sur la surface des matériaux de construction, organiques ou inorganiques. L'impact microbien sur ces matériaux a une influence non négligeable sur leur durabilité et leurs propriétés, allant de l'altération de l'aspect esthétique jusqu'à la diminution de leur durée de vie : on parle alors de « biodétérioration ».

Selon la définition donnée par Eggins et Oxley (2001) le mot détérioration implique la perte de la valeur économique, et présente donc un caractère plutôt négatif. Le coût de la biodétérioration des matériaux de construction est difficile à estimer (RILEM, 2003). Cela inclut aussi bien le coût économique des opérations de nettoyage, de peinture et de réfection que du coût culturel causé par la détérioration du patrimoine historique. Dans certains cas, on trouve aussi le terme « biodégradation ». Biologiquement, c'est exactement le même processus que la biodétérioration, mais la biodégradation présente un caractère plutôt positif dans le sens où le résultat est souhaité.

La biodétérioration chimique est causée soit par les micro-organismes eux-mêmes avec l'utilisation directe du matériau comme source de nutriments, soit de manière indirecte via la production de métabolites acides par ces mêmes micro-organismes. La biodétérioration physique est due à la pression exercée sur le matériau pendant la croissance des micro-organismes. Enfin, la biodétérioration esthétique résulte du développement des micro-organismes qui est visible à l'œil nu. Parmi les micro-organismes concernés, on trouve les algues, cyanobactéries, champignons, et bien sûr les bactéries.

Actuellement, des solutions existent pour lutter contre la biodétérioration, elles mettent en œuvre des méthodes chimiques (dont l'utilisation de biocides), physique, mécanique ou encore biologique. Ces mesures, préventives ou curatives, coûtent des millions d'euros par an.

Ces coûts ne prennent pas en compte les recherches et le développement de programmes entrepris à travers le monde, qui visent à développer des matériaux résistants et des biocides moins agressifs vis-à-vis de l'environnement (RILEM, 2003). Parmi ces nouveaux matériaux nous pouvons citer le ciment photocatalytique, à base de  $\text{TiO}_2$ .

Les mécanismes intervenant dans la biodétérioration ne sont pas encore totalement élucidés, pour lutter efficacement contre la biodétérioration et prévenir le développement des micro-organismes, il est nécessaire d'avoir une meilleure compréhension de ces mécanismes. Pour cela, nous devons avoir à notre disposition un essai qui nous permette de reproduire à l'échelle du laboratoire (quelques mois) des effets proches de ceux que l'on observe en environnement naturel après plusieurs années. D'autre part, l'étude de la biodétérioration nécessite une approche pluridisciplinaire, mettant en jeu des compétences complémentaires dans le domaine du Génie Civil, de la biologie et de la microbiologie, et de la physico-chimie des matériaux. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude sur la biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons.

Les écoles des Mines se sont regroupées pour former un réseau : le GEM (Groupement des Ecoles des mines). Le GEM permet d'unir des connaissances et des moyens techniques, et ainsi de rassembler les équipes de recherche au profit de l'étude de thématiques pluridisciplinaires. Au total, ce sont 43 laboratoires de recherche qui sont concernés.

Ce travail a été réalisé au sein du GEM « Matériaux de construction », dans le cadre du projet sur la « Biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons ». Ce projet comporte un axe Physico-chimie, qui fait l'objet d'une collaboration entre le département Génie Civil de l'Ecole des Mines Douai, et le centre Sciences des Processus Industriels et Naturels (SPIN) – département Poudres et Matériaux Multi-Composants (PMMC) de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. L'étude qui suit s'inscrit dans ce premier axe. Le projet est également composé d'un axe Matériaux-Mécanique, qui est suivi par les Ecoles des Mines de Paris et Alès.

Le but de notre étude est la mise au point d'un essai accéléré de laboratoire, afin d'étudier la biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons. A travers cette mise au point nous visons à optimiser le vieillissement accéléré de la matrice et le développement fongique. L'objectif final est d'obtenir avec cet essai une meilleure compréhension des mécanismes qui interviennent dans la biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons, afin de

mieux lutter contre les dommages engendrés et à terme prévenir le développement de micro-organismes.

La première partie de ce mémoire est dédiée à l'étude bibliographique à travers 3 chapitres, respectivement sur la biodétérioration, les micro-organismes de l'étude, et la présentation de la matrice cimentaire.

La deuxième partie traite de l'aspect expérimental de l'étude. Le chapitre IV présente le matériel utilisé et les méthodes employées. Nous y présentons la mise en culture des souches, la préparation et le vieillissement accéléré de la matrice cimentaire, les techniques d'analyses et de caractérisation, et la description du test de biodétérioration. Dans les chapitres V, VI, VII, nous exposons et discutons les résultats expérimentaux.

Enfin, nous concluons ce mémoire dans une dernière partie ; Les principaux résultats sont rappelés ainsi que les suites et les perspectives à donner à ce travail sont abordées.

# CHAPITRE I :

## LA BIODETERIORATION DES MATÉRIAUX :

### ÉTAT DES LIEUX

Nous nous proposons dans cette première partie de dresser un état des lieux sur la biodétérioration des matériaux de construction en général, et plus particulièrement des matériaux cimentaires. Nous nous intéresserons ensuite aux micro-organismes de l'étude, à travers la présentation des champignons microscopiques, des souches sélectionnées, et des différentes méthodes de quantification de la biomasse\* fongique. Enfin, nous aborderons un aspect plus physico-chimique en décrivant les caractéristiques des matrices cimentaires.

De nombreux matériaux de construction sont sujets à la colonisation par les micro-organismes. Cette colonisation est responsable de changements dans la couleur, et les propriétés chimiques ou physiques du matériau. Depuis la fin des années 60, ces changements ont été regroupés sous les termes de « biodégradation » et « biodétérioration » (Guillitte, 1995) selon les auteurs. Afin d'éviter les confusions, et par soucis de clarté pour la suite, nous entamons ce chapitre par quelques définitions.

### **1. Biodétérioration ou biodégradation ?**

H. J. Hueck définit dès 1965 la biodétérioration comme étant « *tout changement indésirable dans les propriétés d'un matériau causé par l'activité vitale d'organismes* ». La biodégradation est généralement associée à « *l'exploitation, par l'homme, des capacités de décomposition d'organismes pour rendre un déchet plus utile ou plus acceptable* » (Hueck, 1965 ; Allsopp et al, 2003). Eggins et Oxley (1980) tentent d'approfondir ces définitions. Selon les auteurs, la biodétérioration est vue comme un processus qui diminue la valeur et la biodégradation comme un qui l'accroît, mais les deux sont identiques en principe, la distinction étant basée uniquement sur les besoins humains. Conventionnellement, la

---

\* Biomasse : masse totale (quantité de matière) de toutes les espèces vivantes présentes en un milieu donné.

biodétérioration se réfère aux dommages causés aux matériaux, constructions, et processus de valeur relativement élevée tandis que la biodégradation se réfère seulement aux matériaux et se distingue par le traitement biologique principalement parce qu'elle s'applique aux matériaux de valeur basse ou même négative.

Urzì (2006) définit la biodégradation comme une transformation irréversible causée par des organismes de tout type de matériaux (organique ou inorganique) en environnement naturel. La biodétérioration est qualifiée de transformation irréversible causée par des organismes de tout type de matériaux (organique et inorganique) qui présentent une valeur économique, historique ou artistique.

Selon la norme ISO 846 : 1997, sur l'évaluation de l'action des micro-organismes sur les plastiques, la biodétérioration est définie comme étant la « *variation des propriétés chimiques ou physiques d'un matériau provoquée par l'action d'un micro-organisme* ». Cette définition semble néanmoins un peu restrictive dans le sens où les changements relatifs à l'aspect esthétique ne sont pas abordés. En ce qui concerne la biodégradation, le terme fait l'objet de discussions au sein du comité technique.

Il apparaît à travers ces définitions que les termes « biodétérioration » et « biodégradation » ne peuvent être employés pour décrire le même phénomène. Ce travail fait l'objet d'une étude sur la biodétérioration, et nous retenons la définition suivante : « changement indésirable engendré par l'activité d'organismes vivants, des propriétés (esthétique, chimique, physique) d'un matériau (organique ou inorganique) présentant une valeur économique, historique ou artistique.

## **2. Les facteurs influençant la biodétérioration**

La composition du matériau utilisé et son état de conservation, les conditions environnementales et climatiques favorables (température, humidité, pluie, exposition au soleil, polluants organiques et inorganiques) peuvent créer de bonnes conditions, parfois même optimales, pour le développement des organismes sur la surface (détérioration esthétique), et/ou jusqu'à des couches plus profondes (détérioration physique/mécanique et chimique) (Urzì et al., 2000). L'estimation de la contribution biologique dans la détérioration des pierres commence par la description du type de pierre/bâtiment, y compris la présence d'eau (par exemple, humidité qui monte du sol, défauts d'écoulement de l'eau, humidité de

condensation), et des nutriments (par exemple, composés organiques ou inorganiques issus de sources naturelles ou anthropogéniques<sup>\*</sup>) (Warscheid et Braams, 2000).

## **2.1. Bioréceptivité**

En 1995, Guillitte définit le concept de la bioréceptivité comme « *l'aptitude d'un matériau à être colonisé par un ou plusieurs groupes d'organismes vivants sans nécessairement induire une biodétérioration* ». La bioréceptivité peut aussi être définie comme l'ensemble des propriétés du matériau qui contribuent à l'installation, l'accrochage, et le développement de la faune et/ou de la flore. La bioréceptivité dépend donc des propriétés intrinsèques de la matrice, telles que sa composition, la porosité, la perméabilité, ou encore la rugosité.

### **2.1.1. Influence de la composition de la matrice**

La surface de la matrice est utilisée comme support pour la croissance, mais aussi comme source de nutriments par les micro-organismes. Sa composition minérale ou organique, de même que son pH, ont une influence sur le type de micro-organismes et les espèces sélectionnées (Dubosc, 2000).

### **2.1.2. La porosité**

La porosité du support influence l'absorption et la rétention par le matériau d'eau après les intempéries ou une humidification quelconque (Dubosc, 2000). Des valeurs de porosité élevées (environ 14% vol) permettent une pénétration en profondeur de l'humidité à l'intérieur du matériau, préparant la voie pour une contamination microbienne<sup>\*</sup> jusqu'à 3-5 cm. Les matériaux possédant de larges pores favorisent une contamination microbienne temporaire, à cause de leur faible rétention d'eau. Les matériaux à petits pores, avec des temps de rétention d'eau plus longs, offrent des conditions plus favorables pour la colonisation par les micro-organismes (Warscheid et al., 1989a, 1993). La plupart des micro-organismes peuvent se développer à des humidités relatives (HR) comprises entre 60 et 98%.

---

<sup>\*</sup> Anthropogénique : lié aux activités humaines.

<sup>\*</sup> Microbe : vient du grec *mikros*=petit, et *bios*=vie. Ce mot désigne tous les micro-organismes visibles au microscope comme les bactéries, les champignons, ou plus petit encore comme les virus. Dans le langage familier, se dit de tout micro-organisme pathogène.

### **2.1.3. La rugosité**

Elle influence l'accrochage des cellules apportées par le vent, surtout celles qui sont véhiculées par un écoulement sur un mur. D'autre part, le bullage de surface peut créer des zones de rétention d'eau favorables aux algues (Dubosc, 2000).

## **2.2. Les conditions environnementales**

Les conditions environnementales, telles que le vent, la pluie, la neige, l'exposition au soleil, la pollution, ... jouent un double rôle dans la biodétérioration. D'une part, elles contribuent au vieillissement naturel du matériau (Warscheid et Braams, 2000), et modifient donc sa bioréceptivité. D'autre part, elles ont une influence directe sur le développement des micro-organismes créant selon les cas un environnement propice ou néfaste à la colonisation microbienne. Ces dernières années, les activités urbaines et industrielles ont modifié la composition de l'atmosphère, créant un environnement plus agressif, qui accélère la détérioration des matériaux. Le dioxyde de soufre est l'un des composés gazeux majeurs des atmosphères polluées en environnement urbain. Comme l'oxydation du dioxyde de soufre conduit à la formation d'acide sulfurique, il y a une forte corrélation entre la sulfatation des roches calcaires et les concentrations en  $\text{SO}_2$ . L'attaque des roches calcaires par l'acide sulfurique conduit à la formation de gypse. Pendant la cristallisation du gypse, les particules organiques des polluants, les particules carbonées, la poussière, le pollen, etc. s'accumulent à la surface des bâtiments et sont piégés dans la matrice minérale. Cela aboutit à la formation d'une croûte dure, de couleur grise à noire (Saiz-Jimenez, 1993). Manifestement, cette croûte enrichit le substrat et les composés anthropogéniques peuvent influencer, de façon importante, la colonisation et le modèle de croissance des micro-organismes sur les pierres situées dans un environnement pollué en comparaison à la croissance des micro-organismes sur un matériau similaire en environnement rural (Saiz-Jimenez, 1997).

Par opposition, une faible exposition à la lumière défavorise le développement d'organismes photosynthétiques, c'est-à-dire qui ont besoin de lumière pour produire leur énergie.



### **3. Les mécanismes de la biodétérioration**

Dans l'environnement naturel, il est difficile, si ce n'est impossible de séparer l'influence biologique de l'impact physique et/ou chimique. Mais en se basant sur les connaissances actuelles sur la biodétérioration des pierres, nous pouvons éliminer l'approche purement abiotique\* dans l'analyse et l'évaluation de la détérioration des pierres (Warscheid et Braams, 2000). Les effets néfastes du développement des micro-organismes sur les matériaux de construction s'échelonnent de l'altération de l'aspect esthétique aux changements des caractéristiques physiques et/ou chimiques (Planche 1). Les dommages principaux dérivés de l'activité métabolique des organismes sont associés aux mécanismes physiques, chimiques et esthétiques, tandis que l'intensité des dommages est directement corrélée aux types et dimensions de l'organisme impliqué, au type de matériau et à son état de conservation, aux conditions environnementales, à l'exposition, au type et niveau de la pollution atmosphérique (Tiano, 2001).

#### **3.1. La biodétérioration esthétique**

Le développement de micro-organismes à la surface des matériaux est responsable de changements dans l'aspect esthétique, diminuant généralement sa valeur économique (Planche 1). Néanmoins, dans certains cas ce développement est souhaité et encouragé. Cela peut donner du charme à certaines bâtisses en milieu rural ou harmoniser un mur colonisé en d'autres endroits (Dubosc, 2000). On peut appliquer, pour favoriser les développements biologiques, un lavage avec du fumier de vache et de l'eau. Des traitements plus élaborés sont également mis au point. Ils sont à base de nutriments et de cellules congelées et séchées (Jones, 1987).

#### **3.2. La biodétérioration chimique**

L'action chimique est imputable à la production de divers métabolites, qui agissent par assimilation ou dissimilation. Lors des processus d'assimilation, les constituants du matériau sont utilisés comme nutriments après avoir été réduits par diverses enzymes extracellulaires

---

\* Abiotique : qualifie un milieu où la vie n'existe pas, ou dans lequel la vie est impossible.

qui facilitent la pénétration des hyphes\* dans le matériau (Boissier, 2003). Les processus de dissimilation sont liés à la production d'acides organiques et de pigments. Les acides organiques sont capables de réagir avec le substrat par dissolution des cations ou par chélation des ions métalliques. Le dioxyde de carbone produit par tous les organismes aérobies, notamment les moisissures lors de la respiration, joue également un rôle dans la dégradation des supports. En effet, à partir d'un certain taux d'humidité, ce gaz peut se transformer en acide carbonique, capable de dissoudre le calcium et le magnésium pour former des bicarbonates de calcium et de magnésium hydrosolubles (Boissier, 2003 ; Warscheid et Braams, 2000 ; Sand, 1997). Outre l'action directe de ces acides, leur production favorise la croissance d'espèces fongiques acidophiles qui pourront poursuivre la dégradation du support (Sand, 1997 ; Garg et al., 1995 ; Singh, 1994).

### **3.3. La biodétérioration physique**

Il s'agit de la pression exercée par les micro-organismes sur le matériau pendant sa croissance. Ce sera le cas des hyphes pour les champignons, ou des racines pour des systèmes plus complexes comme les mousses et les lichens (Warscheid et Braams, 2000 ; Sand, 1997). Les champignons peuvent être responsables de l'écaillage et de l'exfoliation de la surface, ils peuvent engendrer également des lésions comme de petits cratères (Urzi et al., 2000b).

## **4. Les organismes impliqués dans la biodétérioration**

L'étude de la communauté microbienne est généralement réalisée en utilisant les méthodes de culture traditionnelles, ce qui favorise l'identification des souches à croissance rapide, mais tend à sous-estimer la part de souches à croissance plus lente. Actuellement moins de 10% des micro-organismes ont été découverts dans des écosystèmes individuels, et ces méthodes de culture sont partiellement inadéquates pour l'étude de la composition de la communauté microbienne naturelle. Il est reconnu que probablement plus de 90% des micro-organismes présents dans les biens culturels ne sont pas découverts. Ceci a une importance majeure, étant donné que la plupart des travaux de restauration utilisent les biocides conventionnels qui ne conviennent probablement pas aux communautés microbiennes complexes et inconnues qui se

---

\* Hyphes : vient du grec *hyphe* = tissu, filaments longs, fins et ramifiés à structure cellulaire qui constituent les mycètes.

développent sur et sous les surfaces (Saiz-Jimenez, 2000). D'autre part, il faut également souligner que la présence d'un organisme sur un matériau détérioré n'implique pas nécessairement qu'il en est la cause (Saiz-Jimenez, 1997 ; De Leo et Urzì, 2006).

#### **4.1. Les macro-organismes**

Les oiseaux, en particulier les pigeons, causent de remarquables dégâts sur le plan esthétique et de la détérioration chimique par l'intermédiaire du guano\*. Il y a également une multitude d'autres organismes vivants qui vivent sur et à l'intérieur de la texture minérale, tels que les araignées, moustiques.... (Urzì et al., 2000). Nous pouvons également citer les plantes, les mousses et lichens responsables entre autres d'une détérioration esthétique, mais aussi d'une importante détérioration chimique et physique. Les lichens provoquent aussi bien une détérioration physique que chimique ; les métabolites acides solubilisent et désintègrent le substrat (Nimis et al., 1992).

#### **4.2. Les micro-organismes**

Généralement, tous les types de micro-organismes – bactéries, cyanobactéries, algues, champignons – sont capables d'attaquer et de dégrader les matériaux (Sand, 1997). Plusieurs groupes microbiens coexistent en même temps, sur un même matériau. Toute biodétérioration qui se produit est probablement le résultat d'interactions microbiennes complexes (Warscheid et Braams, 2000).

##### **4.2.1. La succession biologique**

Les micro-organismes sont sélectionnés naturellement selon le pH et les nutriments disponibles. Le développement des premiers colonisateurs modifie les paramètres physico-chimiques de la surface, rendant possible la colonisation par de nouvelles espèces, les seconds colonisateurs, et ainsi de suite, on parle alors de succession biologique. La colonisation du béton est un excellent exemple de succession microbienne, comme l'illustre Roberts et al. (2002) dans leurs travaux sur la biodétérioration des tuyaux d'égouts : dès que le pH de surface est réduit à ~9, et avec suffisamment de nutriments, d'humidité et d'oxygène, certaines espèces de bactéries comme *Acidithiobacillus sp.* peuvent s'accrocher à la surface

---

\* Guano : nom donné aux excréments des oiseaux et des chauves-souris.

du béton et se reproduire. Ils identifièrent 5 espèces de *Acidithiobacillus* se développant pour une gamme de pH allant de 10 à 0,5. Donc, selon les caractéristiques physico-chimiques, une ou deux espèces se développent au détriment des autres. On parle alors de succession biologique (Figure 1). Les bactéries sont généralement les premiers colonisateurs, car elles peuvent se développer sur tout type de support et sur des gammes de pH étendues (Dubosc, 2000).

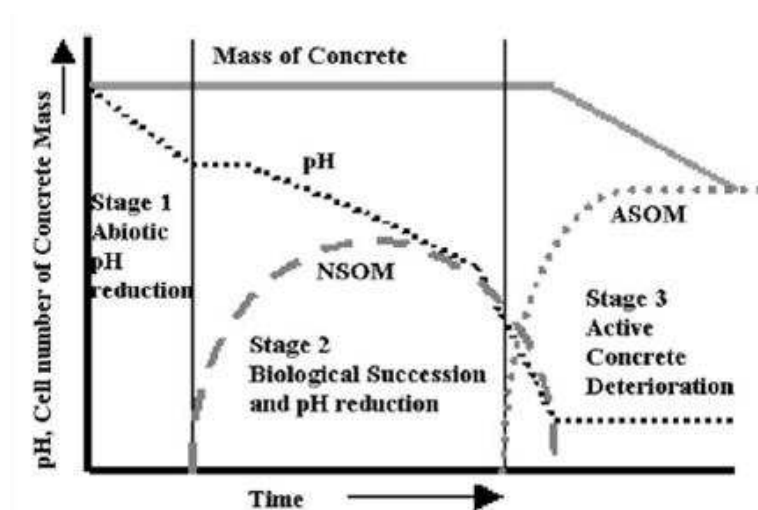


Figure 1 : Evolution théorique des propriétés biologiques et physiques du béton en fonction du temps d'exposition – NSOM: Neutrophilic sulfur-oxidizing micro-organisms ; ASOM: Acidophilic sulfur-oxidizing micro-organisms (Selon Roberts et al., 2002)

#### 4.2.2. Le biofilm

Les micro-organismes vivant sur des substrats inorganiques forment des communautés plus ou moins complexes structurées en biofilm, ou en tapis microbien. Les biofilms microbiens sont des assemblages de cellules microbiennes encastrées dans une matrice complexe de substances polymériques complexes (EPS). En fait, les EPS représentent le ciment qui permet le développement microbien et assure son adhésion au substrat, protègent les cellules de la déshydratation, et représentent un accumulateur de carbone organique. Elles jouent un rôle important dans la formation du biofilm. Les biofilms microbiens se développent pratiquement sur tous les substrats inorganiques, altérant la couleur originale et l'aspect par le développement d'une population avec des pigments variés, en piégeant la poussière, la suie et la matière particulaire dans les EPS. Généralement, la pollution environnementale représente une source de nutriments, augmentant considérablement la croissance du biofilm microbien et ainsi le processus de détérioration (Tomaselli, 2002).

### 4.2.3. Les bactéries

Ce sont des organismes unicellulaires procaryotes (cellules sans noyau véritable). Elles peuvent être autotrophes ou hétérotrophes. Un organisme autotrophe est capable de synthétiser lui-même les matières organiques qui le composent à partir de l'oxydation de composés minéraux. En revanche, un organisme hétérotrophe utilise des molécules organiques préformées, réduites, comme sources de carbone. Il existe une telle variété d'espèces que l'on considère que tout support est obligatoirement colonisé par des bactéries (Dubosc, 2000). Elles sont capables (i) de se lier aux particules cristallines et d'être ainsi plus persistantes à la surface de la roche et dans le réseau poreux, (ii) de solubiliser  $\text{CaCO}_3$  via la production de métabolites acides et/ou à travers la respiration et le rejet de  $\text{CO}_2$ , (iii) de précipiter les carbonates, oxalates ou autres minéraux et de contribuer ainsi à la formation de croûtes (Urzì *et al.*, 2000).

Les bactéries sont largement impliquées dans la formation du biofilm sur les pierres et sont responsables de changements considérables dans les propriétés physico-chimiques de la structure minérale (Warscheid *et al.*, 1991 ; 1996). Elles utilisent une large variété de nutriments, et sont, de ce fait, capables de servir toute la microflore par la cassure de composés faiblement dégradables, comme les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et contribuent à la stabilisation de la microflore sur les pierres (Warscheid *et al.*, 1991 ; Ortega-Calvo et Saiz-Jimenez, 1996 ; Zanardini *et al.* 2000).

La colonisation des matériaux par les bactéries sulfo-oxydantes, ou nitrifiantes dépend de la présence de composés réduits soufrés et azotés ( $\text{H}_2\text{S}$ , S,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ ). La biodétérioration par les bactéries sulfo-oxydantes *Acidithiobacillus* sp. a été décrite en premier en France et au Cambodge (Pochon *et al.*, 1960 ; Pochon et Jaton, 1967, 1968 ; Jaton, 1973). Dans une série d'étude, Parker et son équipe établirent que la présence de Thiobacilli acidophiles est corrélée à la dégradation du béton en isolant *Acidithiobacillus concretivorus* (renommée *Acidithiobacillus thiooxidans*), et *Acidithiobacillus* sp., de tuyaux d'égouts corrodés (Gu, 1998). Des études montrent que la biodétérioration des pierres par les bactéries nitrifiantes en chambre de simulation se produit à des taux 8 fois supérieurs comparé à un processus d'altération purement chimique (Warscheid et Bramms, 2000).

### 4.2.4. Les champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes (cellules à noyau). Ils sont dépourvus de chlorophylle et donc incapables de photosynthèse : ils sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone,

c'est-à-dire qu'ils ont besoin d'une source extérieure de carbone (Dubosc, 2000 ; Kumar et Kumar, 1999). Les déchets issus d'algues et de bactéries (ou les cellules mortes de ces micro-organismes), les feuilles mortes, et les fientes d'oiseaux constituent une source de carbone (Kumar et Kumar, 1999). Les champignons peuvent être considérés comme les organismes associés à la biodétérioration des matériaux organiques et inorganiques les mieux armés (De Leo et Urzi, 2006). Ils sont omniprésents et attaquent une grande variété de substrats, tels que le textile, le cuir, le papier, les pierres, le bois, le plastique, la peinture, les matériaux de construction etc. (Khandelwal, 2001). Ils sont capables de pénétrer à l'intérieur du matériau par la croissance des hyphes et par une activité corrosive, due à l'excrétion d'acides organiques ou à l'oxydation de composés de la matrice. Leur activité de détérioration inclut la décoloration de la surface des matériaux, par l'excrétion de mélanine par les champignons *Dematiaceous* (Warscheid et Braams, 2000). La biodétérioration par les champignons est détaillée dans le chapitre suivant.

#### 4.2.5. Les algues et les cyanobactéries

Les algues sont des organismes eucaryotes (cellules à noyau) autotrophes\*. Les cyanobactéries, également appelées algues bleues ou cyanophycées, sont des organismes procaryotes, autotrophes. Elles possèdent de la chlorophylle *a* et d'autres pigments, d'où leur couleur qui peut varier beaucoup, mais qui est en principe bleu, ce qui explique leur nom. Elles utilisent également la photosynthèse comme source d'énergie (Prescott et al., 2003). Les principales conditions pour le développement algal sont : l'humidité, la chaleur, la lumière et des nutriments inorganiques (Kumar et Kumar, 1999).

On pensait que les micro-organismes phototrophes\* n'avaient pas d'effets directs sur la détérioration des pierres, excepté d'un point de vue esthétique due à leurs pigments (Pietrini et al., 1985 ; Urzi et al., 1992). Certains auteurs parlent même de film protecteur à la surface de la pierre, sous certaines conditions climatiques (e.g. environnement tropical), qui régule l'humidité et la température (Wendler et Prasartset, 1999 ; Warscheid et Braams, 2000). Néanmoins, d'autres études ont souligné l'importance des organismes phototrophes dans la détérioration physique et chimique des pierres, spécialement lorsqu'ils sont alimentés par la

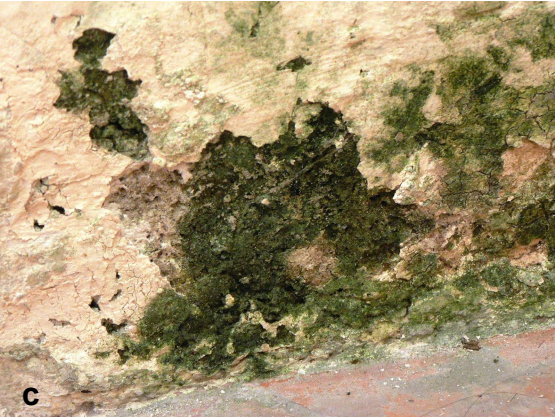
---

\* Autotrophe : désigne un organisme capable de synthétiser par lui-même les matières organiques qui le composent à partir d'éléments minéraux.

\* Phototrophe : désigne un organisme qui utilise la lumière comme source d'énergie.

pollution anthropogénique sous climats modérés. Ces processus de biodétérioration sont caractérisés entre autres par (i) l'excrétion d'acides organiques corrosifs particulièrement sur le marbre et les roches calcaires (Arino et al., 1997), (ii) l'assimilation et l'accumulation de soufre et de calcium dans leurs cellules (Ortega-Calvo et al., 1994). L'accumulation de biomasse photosynthétique constitue une base excellente de nutriments organique pour la microflore hétérotrophe suivante et leur activité de biodétérioration (Caneva et salvadori, 1989). Cependant leur présence sur la surface des pierres n'implique pas forcément une action destructive. Le développement de la flore algale observé sur la surface de monuments situés en Asie, en Europe et en Amérique n'est en générale pas influencé par la composition chimique du substrat. La colonisation et la croissance sont plutôt influencées par le climat et les conditions environnementales. Les espèces les plus communes appartiennent aux genres des (i) cyanobactéries filamenteuses : *Phormidium*, *Microcoleus* et (ii) des algues : *Klebsormidium*, *Tentepohlia*. Des formes unicellulaires, par exemple les cyanobactéries *Gloeocapsa* et *Chroococcus*, et les algues *Chlorella* et *Chlorococcum*, sont également observées (Ortega-Calvo et al., 1995, Gaylarde et Gaylarde, 2005).

**Planche 1 (ci-après) : Exemples de biodétérioration de matériaux en environnement naturel. (a) Détail de la statue de l'Ange présente au musée de Messine avec une pigmentation noire due à la colonisation fongique (De Leo, 2005), (b) Tuyau d'égout détérioré suite à l'activité bactérienne, (c) et (d) détail d'une corniche présente au musée de Ravello, le développement d'algues est responsable de la coloration verte, (e) crypte de la Villa Ruffolo (Ravello) avec un développement microbien important, (f) et (g) détail d'une corniche de la cathédrale d'Amiens, avec le développement de mousses, lichens et plantes.**





## **5. Les techniques d'analyse et de caractérisation**

Comment étudier les micro-organismes responsables de la biodétérioration ? On va distinguer le travail sur site et en laboratoire. Sur site, il faut tout d'abord procéder à une estimation des caractéristiques de l'altération, puis en faire une description, dresser une cartographie et compléter la documentation par des photographies. Après avoir déterminé la meilleure procédure (destructive ou non) à utiliser, vient l'étape d'échantillonnage avec le prélèvement. Puis en laboratoire, nous pouvons utiliser les méthodes microscopiques pour l'observation, les analyses culturales avec l'identification des isolats, et les analyses moléculaires des populations colonisatrices (Figure 2) (Urzi, 2005).

Différentes techniques optique, chimique, et physique peuvent être utilisées pour l'étude de l'impact microbien sur les matériaux de construction. Les techniques optiques les plus utilisées sont l'observation directe, la microscopie optique, la pétrographie de section mince, la microscopie électronique à balayage (environnementale), la microscopie laser confocale, et la microscopie à force atomique. Les techniques physiques les plus communes sont l'assimilation d'eau, la porosimétrie, la thermogravimétrie, les analyses thermiques différentielles, les mesures de perte de masse. Parmi les techniques chimiques importantes, nous pouvons citer la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, l'analyse de la dispersion d'énergie des rayons X, la diffraction des rayons X, chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie liquide haute performance, spectroscopie d'émission atomique (Welton et al., 2005).

### **5.1. Les techniques biologiques**

#### **5.1.1. Echantillonnage**

L'échantillonnage et le suivi de la croissance biologique sur les matériaux de construction doivent être réalisés en utilisant des techniques qui sont non seulement non contaminantes, et si possible non destructives. Plusieurs méthodes non destructives ont été proposées pour la mise en évidence directe ou indirecte de la colonisation microbienne. Procédures avec aiguilles et seringue, empreinte sur agar, mesure de l'activité microbienne, détection des bactéries par fluorescence des anticorps, techniques de bioluminescences, et dosage de l'ATP ont été décrites par plusieurs auteurs (Eckhardt, 1978 ; May et Lewis, 1988 ; Hirsh et al., 1995 ; Wollenzien et al., 1995 ; Ranalli et al., 2000). Cependant, malgré leur indéniable utilité, ces techniques ne donnent aucune information sur les relations entre les micro-

organismes et la surface même (Urzi et De Leo, 2001). L'utilisation de bandes adhésives, technique empruntée à la mycologie clinique, a été utilisée pour la première fois par Gargani en 1968 dans le domaine du patrimoine culturel pour mettre en évidence la croissance de champignons sur des fresques après les inondations de 1966 à Florence (Gargani, 1968 ; Urzi et De Leo, 2001 ; Welton et al., 2005). Les bandes adhésives sont appliquées délicatement sur la surface de la pierre et sont placées immédiatement sur une lame de microscope stérile et sont conservées dans une boîte jusqu'au laboratoire. Les bandes sont ensuite coupées en petits morceaux pour l'observation au microscope et l'analyse culturale. L'utilisation de bandes adhésives est une technique simple qui offre plusieurs avantages : (i) elle est non destructive et peut être utilisée pour suivre la colonisation microbienne sur une période donnée, (ii) c'est une méthode peu chère qui ne requiert aucun instrument excepté un microscope, (iii) elle montre les relations existantes entre la surface et les micro-organismes colonisateurs (étape de croissance), diffusion des micro-organismes à l'intérieur de la matrice, (iv) cette méthode met en évidence les relations qui existent entre les communautés microbienne (par exemple micro-organismes dominants), (v) cette technique permet l'identification de micro-organismes isolés. Parmi les méthodes destructives, nous pouvons citer l'utilisation du scalpel pour gratter et prélever un échantillon de la surface du matériau colonisé (Urzi et De Leo, 2001).

### **5.1.2. Méthodes de cultures**

Les méthodes de culture ont pour but de quantifier, d'isoler et de réaliser une caractérisation taxonomique, biochimique, et physiologique des micro-organismes présents. L'identification est basée sur la macro-morphologie des colonies qui se sont développées sur différents milieux de culture, et sur la micro-morphologie des structures reproductives. Dans certains cas, des méthodes moléculaires telles que le séquençage complet des gènes de l'ADNr, offrent la possibilité d'identifier et de caractériser des espèces qu'il est impossible de reconnaître par les procédures morphologiques, biochimiques, et physiologiques traditionnelles. Ces méthodes donnent également des informations sur la phylogénie des souches (De Leo et Urzi, 2005).

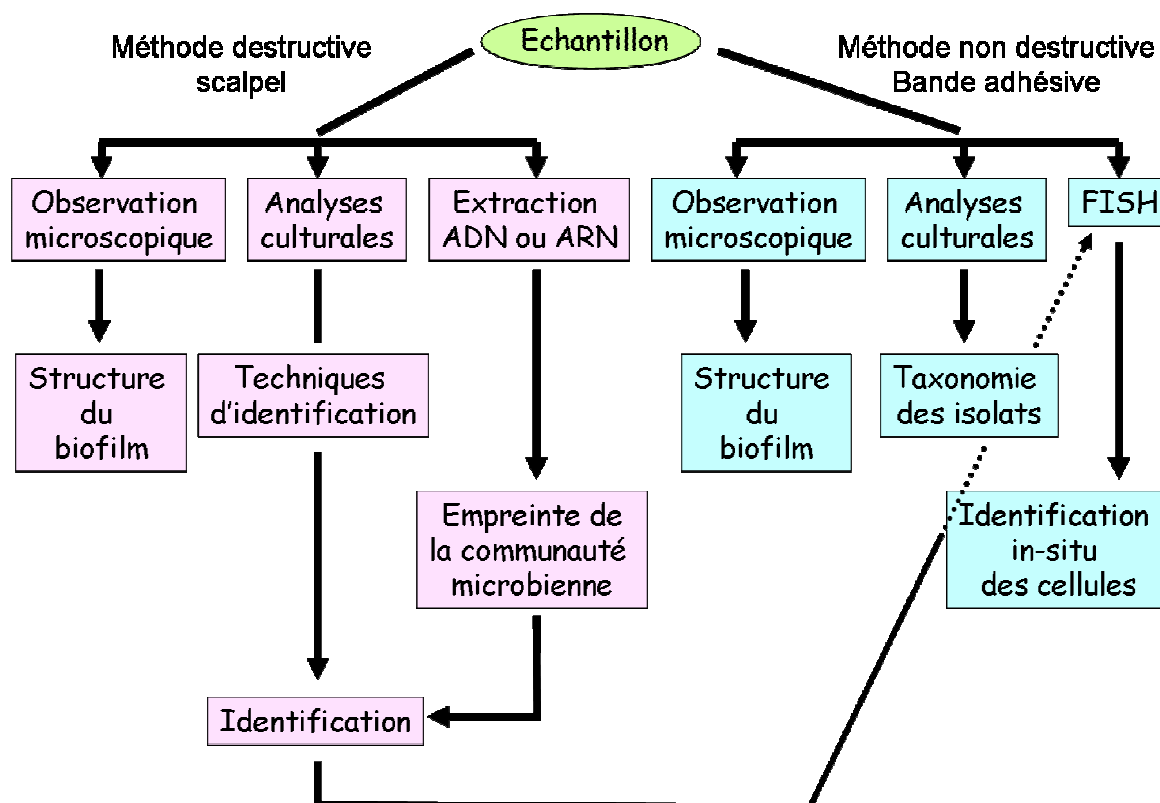


Figure 2 : Méthodologie schématisée pour l'étude microbiologique de la biodétérioration selon les techniques d'échantillonnage (Urzi, 2005)

### 5.1.3. Méthodes moléculaires

Actuellement, une approche pour étudier la communauté microbienne est l'utilisation de techniques moléculaires comme la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) (Rolleke et al., 1998 ; Pinar et al. 2001 ; Urzi et al., 2003c). Le but de ces techniques est de caractériser la communauté microbienne totale (micro-organismes cultivables et non cultivables) par extraction de l'ADN total et amplification à l'aide d'amorces universelles de l'ADNr 16S. L'électrophorèse des fragments amplifiés est réalisée sur gel de polyacrylamide dans un gradient dénaturant en urée et formamide (DGGE), ou après digestion d'un des deux filaments d'ADN (SSCP). Dans les deux cas, les bandes obtenues correspondent à une seule espèce microbienne. Ces techniques sont largement utilisées pour la caractérisation de la communauté bactérienne sur des échantillons de pierre prélevés sur différents monuments (Rolleke et al., 1998 ; Pinar et al., 2001). Vaestrade et al. (2001) ont utilisé des méthodes moléculaires pour déterminer les communautés microbiennes présentes sur les parois en béton de tuyaux d'égouts (Vincke et

al., 2001). L’empreinte génétique est obtenue par DGGE de fragments de gènes d’ARNr 16s. Ils observèrent des changements au niveau des bandes dominantes en comparant les profils DGGE des communautés bactériennes présentes sur la surface du béton sain et du béton corrodé. Avec l’utilisation d’outils statistiques, il a été possible de distinguer deux groupes différents, correspondants à la communauté microbienne de tuyaux sains et corrodés respectivement. La caractérisation des communautés microbiennes a montré que les séquences de bandes les plus représentatives présentent le plus haut niveau de correspondance avec les séquences des souches bactériennes *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus* sp., *Mycobacterium* sp., et différents hétérotrophes appartenant aux  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Acidobacteria* et *Actinobacteria* (Welton et al., 2005).

#### 5.1.4. Détection de biomolécules

Les cellules peuvent être détectées et quantifiées par analyse de molécules biologiques spécifiques, telles que les protéines, les phospholipides, les acides nucléiques, la chlorophylle ou les enzymes. Les dosages d’enzymes peuvent être particulièrement utiles, étant donné qu’ils mesurent les cellules actives plutôt que simplement les cellules qui peuvent se reproduire pour donner des colonies sur milieu solide (Welton et al., 2005).

#### 5.1.5. Coloration des cellules

Différentes colorations peuvent être utilisées pour rendre les cellules microbiennes visibles au microscope. Certains colorants fluorescents, tels que l’acridine orange et DAPI (4’,6-diamino-2-phenyllindole) permettent de compter les cellules et de distinguer leur forme, sans les enlever du substrat. D’autres colorants fluorescents permettent de différencier les cellules vivantes ou actives de celles qui sont mortes ou non-actives (Welton et al., 2005).

L’utilisation de l’acide périodique et du réactif de Schiff permet la coloration en rouge de composés tels que les EPS, le glycogène, l’amidon, la cellulose, la chitine, les complexes protéines-carbohydrates, et les glycolipides. Cette technique a été proposée pour les matériaux de construction par Warscheid (1990) et a été ensuite appliquée avec succès pour estimer l’étendue de la colonisation microbienne sur/dans les matériaux (Urzi et Albertano, 2001).

## **5.2. Analyses physiques et chimiques**

### **5.2.1. Analyse chimique élémentaire par voies physiques**

Les méthodes physiques couramment utilisées sont la spectrométrie d'absorption atomique (SAA), la spectroscopie d'émission atomique par plasma (ICP), et la spectrométrie de fluorescence X (SFX). Les spectromètres utilisés comportent tous une source lumineuse (SAA) ou une source d'excitation (ICP et SFX), un monochromateur, un système de comptage et très souvent un micro-ordinateur pour l'acquisition et le traitement des données. Ces méthodes physiques sont des méthodes comparatives qui nécessitent des étalonnages réalisés soit à partir de matériaux étalons de composition connue avec précision, soit à partir de mélanges synthétiques préparés avec des produits de pureté analytique ou bien encore en utilisant des solutions prêtes à l'emploi. Ces étalons servent à l'établissement de courbes d'étalonnage qui permettent de déterminer la concentration de l'élément dans le produit à analyser. Pour les méthodes SAA et ICP, les analyses sont réalisées après mise en solution des matériaux. Par contre, pour la SFX, les analyses sont effectuées directement sur le matériau en poudre (Witier et al., 1999).

### **5.2.2. Analyse minéralogique d'un matériau**

Elle a pour objet l'identification et le dosage des minéraux constitutifs du matériau. Son processus est très différent de celui de l'analyse chimique qui ne donne que la composition élémentaire des matériaux, exprimée en oxydes, à l'exception de quelques cas où les teneurs de certaines espèces minérales peuvent être calculées directement à partir de l'analyse élémentaire (chlorures alcalins, carbonates de calcium). L'analyse minéralogique utilise les résultats de plusieurs méthodes instrumentales qui sont utilisées pour caractériser un minéral par :

- sa structure cristalline (répartition des atomes dans des réseaux géométriques), qui est mise en évidence par la diffractométrie des rayons X.
- son réseau cristallin, qui peut être extrait du spectre de diffraction de rayons X obtenu sur l'échantillon (méthode de Debye et Scherrer) ;
- sa teneur dans un mélange, qui peut être déterminée, dans certains cas par la diffractométrie quantitative de rayons X, par les méthodes dites de l'étalon interne, de l'étalon externe et d'addition ; les choix des raies et des étalons peuvent parfois

- poser des problèmes dans le cas de composés comportant plusieurs minéraux, ce qui entraîne une erreur relative souvent élevée sur les résultats obtenus ;
- sa morphologie (taille et forme des particules), ainsi que ses défauts (dislocation, joints de grain, etc.) qui peuvent être observés ou évalués par microscopie optique et électronique ;
  - sa composition élémentaire approchée, qui peut être déterminée localement par l'analyse à la sonde électronique (dite sonde de Castaing) ou au microscope électronique à balayage équipé d'un spectromètre X soit à dispersion de longueur d'onde soit à dispersion d'énergie (EDS) ;
  - son comportement thermique (polymorphisme en fonction de la température, identification et dosage de certaines phases cristallines et surtout amorphes, état de l'eau dans les hydrates), qui peut être mis en évidence principalement par analyse thermogravimétrique (ATG), par analyse thermique différentielle (ATD), par analyse enthalpique différentielle (AED, DSC) et aussi par dilatométrie ;
  - les énergies de réaction, d'oxydation et de décomposition, exprimées en variation d'enthalpie, qui peuvent être mesurées par microcalorimétrie, par analyse enthalpique différentielle. Les énergies de liaison intramoléculaires et interatomiques qui peuvent être révélées dans certains cas par la spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge (Broll, 1996).

### 5.2.3. Exemples d'application

Nele De Belie et al. (2004) ont travaillé sur l'analyse de matériaux de construction soumis à la biodétérioration. Ils ont analysé du béton, des mortiers, et des pierres. Le but de leur étude était de déterminer la composition de composés cristallins formés suite à l'action de micro-organismes. L'observation au MEB a montré la présence de cristaux formés sur des échantillons de béton suite à l'interaction avec des acides organiques produits par des bactéries. Les analyses DRX ont révélé que ces cristaux contenaient de l'acétate de calcium, différents hydrates d'acétate de calcium, et des hydrates de lactate de calcium. Ces analyses ont également montré que les cristaux de carbonate de calcium formés par l'action microbiologique de *Bacillus sphaericus* étaient de la vatérite et de la calcite.

Moema Ribas Silva et al. (1995) ont étudié la biodétérioration du béton en combinant l'analyse de plusieurs techniques : ATD-TG, DRX, et MEB/EDS. Ces techniques ont donné des informations très utiles sur les caractéristiques du matériau concernant la biodétérioration.

Les analyses ATD et DRX ont permis d'identifier les composés amorphes et cristallisés, y compris les produits issus de la détérioration. Les analyses MEB/EDS ont permis d'observer, entre autres, la présence de ces composés, la texture du matériau et également de détecter la présence de micro-organismes et de caractériser leur morphologie.

## **6. Les outils actuels de lutte contre la biodétérioration**

Lorsque les processus de la biodétérioration sont considérés importants, le développement et la sélection de traitements résistants aux micro-organismes sont conseillés. D'un autre côté, les mesures peuvent être de très courte durée, et peuvent même conduire à une augmentation de la contamination microbienne et par conséquent de l'activité biodétérioratrice (Warscheid et Krumbein, 1996).

### **6.1. Nettoyage**

Le nettoyage à l'eau des surfaces aide à enlever les efflorescences et les sels solubles, mais à long terme cela conduit à une répartition microbienne plus importante due à l'augmentation de l'humidité (Warscheid et al., 1988a). Les nettoyages physiques et chimiques peuvent occasionner une décoloration et de sévères dommages aux ouvrages (Ashurst et Ashurst, 1990).

### **6.2. Méthodes chimiques**

Au Brésil, le coût pour repeindre les bâtiments sont estimés approximativement à 4% du coût total des bâtiments, et il est nécessaire de repeindre environ tous les 2 à 5 ans, selon les caractéristiques du bâtiment. Les biocides (en particulier les algicides et les fongicides) sont généralement incorporés dans les formulations des peintures dans le but d'allonger la période entre deux opérations de peinture. Les biocides commerciaux et les substances actives antimicrobiennes peuvent être classés en : alcools, aldéhydes, acides organiques, esters, phénols et leur dérivés, composés halogénés, métaux et substances organo-métalliques, oxydants, enzymes, surfaces actives, divers produits synthétiques organiques (Allsopp et Allsopp, 1983).

L'utilisation de biocides a un impact négatif sur l'environnement : ils peuvent être lessivés et se retrouver dans différents compartiments écologiques. L'objection la plus importante à

l'utilisation de biocides pour les ouvrages exposés à la fréquentation humaine est l'impact écotoxicologique des agents biocides. Les effets allergènes et synergiques des biocides sur la santé humaines ne sont pas totalement compris. Ces effets potentiels doivent être sérieusement considérés lors de la sélection d'un biocide et de sa méthode d'application (Warscheid et Braams, 2000). En ce qui concerne la recherche de traitements moins agressifs pour l'environnement, Leznicka (1992) a démontré l'efficacité à long terme de l'éthyl ester p-hydroxybenzoïque (PHB, Aseptine A) en combinaison avec des résines de silicones pour contrôler la biodétérioration causée par les champignons et les algues (Warscheid et Braams, 2000).

Plus récemment, le projet européen PICADA (Photocatalytic Innovative Covering Applications for De-pollution Assessment, 2006) a vu le jour. L'objectif est de développer une gamme de revêtements de façades autonettoyants et dépolluants à base de photocatalyseur, le  $\text{TiO}_2$ . Ce projet regroupe des centres de recherche, dont le CSTB, des industriels des matériaux, de la chimie et du bâtiment.

### **6.3. Méthodes physiques**

Les traitements par radiation ionisantes et l'irradiation sous UV ont prouvé leur efficacité contre la contamination microbienne des pierres. Cependant leur application est limitée aux objets mobiles et de petites tailles (Warscheid et Braams, 2000).

## **7. La biodétérioration étudiée à l'échelle du laboratoire**

De nombreuses études sur la biodétérioration portent sur des études cas. Les travaux dédiés à l'étude de la biodétérioration en laboratoire sont moins nombreux. De plus, la biodétérioration est un sujet tellement vaste de par la variété des matériaux touchés et la diversité microbienne concernée, que les tests ont besoin d'être adaptés et optimisés selon le contexte que l'on souhaite étudier. Nous présentons ici des essais de laboratoire sur l'étude de la biodétérioration de mortiers ou béton, sur lesquels nous nous sommes basés pour développer notre test accéléré. Le tableau 1 reprend les matériels et méthodes de chaque essai, afin d'avoir une vision générale des points communs et des différences entre ces essais.



### **7.1. Etude de M. A. Shirakawa sur le développement d'une méthode pour évaluer la bioréceptivité d'un enduit de plâtre intérieur à la croissance fongique (Shirakawa et al., 2003)**

Le but de cette étude était de développer et de standardiser un essai de laboratoire accéléré pour détecter la bioréceptivité d'un mortier intérieur au développement fongique. Pour déterminer les souches fongiques dominantes en conditions naturelles, un isolement à partir d'échantillons de mortier prélevés sur 41 bâtiments a été réalisé dans deux villes de l'état de São Paulo au sud-est du Brésil. Le genre le plus retrouvé est *Cladosporium*. Différents mortiers ont été étudiés. Plusieurs paramètres ont été testés pour déterminer les facteurs qui influencent la bioréceptivité fongique : le type de mortier, le degré de carbonatation et les valeurs de pH du mortier, l'humidité relative. Tous les mortiers sauf un ont montré un développement fongique significatif. Cependant la croissance a lieu à 100% HR. L'interaction entre *Cladosporium sphaerospermum* et le mortier a été étudiée par MEB/EDS.

### **7.2. Etude d'Arnaud Dubosc sur la mise au point d'essais accélérés de vieillissement pour l'étude du développement de salissures biologique sur les parements en béton (Dubosc, 2000 ; Escadeillas et al., 2007)**

L'objectif de cette étude était de mettre au point, en laboratoire, des bancs d'essais simulant des conditions propices aux développements biologiques sur des supports cimentaires. Dans le cadre de cette étude, seul l'aspect esthétique du problème était pris en compte. Des investigations dans la région toulousaine ont confirmé la présence majoritaire d'algues dans les recouvrements visibles de murs salis, et notamment des espèces ubiquistes des classes cyanophycées et chlorophycées. Pour la mise au point des essais de vieillissement, une méthodologie générale a été appliquée (choix et préparation des espèces, préparation des corps d'épreuve, techniques de quantification, etc..). Plusieurs conditions environnementales ont été testées, conduisant à développer quatre essais complémentaires variant par le mode d'humidification du support (remontée capillaire, écoulement, brumisation et maintien dans différentes hygrométries). Les essais de validation, effectués sur différentes formulations de mortier, ont montré que trois simulations donnent des résultats positifs en moins de deux mois et peuvent être retenus pour des études ultérieures. De plus, ces essais ont montré que si les algues chlorophycées se développent rapidement dans des conditions d'humidité favorables, les cyanophycées sont plus résistantes aux périodes sèches. Ils ont aussi mis en évidence que

la porosité et la rugosité du matériau sont des facteurs de premier ordre pour les développements biologiques sur support cimentaire.

Ces travaux ont été approfondis par Escadeillas et son équipe (2007). Cela a abouti au développement de deux tests de croissance algal sur des mortiers. Le premier recrée le développement de salissures observées à la base des murs et liées aux remontées capillaires. Le second simule les salissures observées sur la partie haute des murs ou pour des localisations particulières (rebords de fenêtre, pilier de ponts...) qui sont essentiellement dues au ruissellement.

### **7.3. Etude de de Moraes Pinheiro, sur l'altération de la microstructure du béton par les mécanismes de la biodétérioration (de Moraes Pinheiro et al., 2003)**

Les travaux de de Moraes Pinheiro et al. portent sur l'impact du développement du champignon *Cladosporium sphaerospermum* sur des échantillons en béton. L'étude s'inspire des travaux de Shirakawa (1999) et de Dubosc (2000). Elle consiste en l'analyse d'échantillon de béton soumis à une contamination fongique.

Pour évaluer l'impact sur la microstructure, les techniques suivantes ont été utilisées : MEB/EDS, DRX, ATD-TG, analyses chimiques, et calculs minéralogiques. Ces techniques ont permis d'observer des altérations dans la microstructure d'échantillons inoculés et non inoculés soumis à l'incubation, telles que la présence de gypse et un déficit en aluminium et en fer dans le matériau. La présence de gypse montre une attaque sulfatique. Ces altérations peuvent cependant être originaire d'une contamination bactérienne observée au MEB et peuvent être caractérisées morphologiquement. Une autre altération observée au MEB est la solubilisation de certains cristaux de carbonates de calcium, qui indique que *Cladosporium sphaerospermum* prend place dans le processus d'altération.

### **7.4. Etude de Akira Ohshima sur le développement de champignons et d'algues sur un mortier (Ohshima et al., 1999)**

Cette étude traite de la relation entre la croissance de champignons et d'algues et la structure poreuse du béton. Des échantillons de mortier ont été préparés avec différents rapports eau/ciment et différentes périodes de séchage. Les échantillons ont été inoculés par aspersion de suspension de spores de champignons et d'algues, puis ont été incubés en conditions

accélérées. Les mêmes échantillons ont été également exposés à l'extérieur. Le test fongique accéléré a consisté à déposer les échantillons avec un angle de 30° par rapport à la verticale. Chaque semaine une solution nutritive a été vaporisée avec la suspension de spores. Les conditions d'incubation ont été accélérées par l'ajout progressif de nutriments, ainsi que par l'augmentation de la température, et de l'humidité. Le test accéléré avec les algues est similaire, avec en plus une exposition à la lumière UV. Les échantillons ont été exposés à l'extérieur pendant 1,5 ans. Les auteurs ont conclu que dans les conditions accélérées, les croissances fongique et algale étaient modérées avec une source de nutrition inorganique, mais l'addition d'une source de nutriments organiques a provoqué une croissance rapide. L'apport de nutriments organiques a donc eu un effet accélérateur. D'autre part, la croissance des algues a été affectée par l'équilibre hydrique dans la structure poreuse. Lorsque l'humidité relative était la même, la teneur en eau variait selon le réseau poreux. Cet équilibre est corrélé avec la croissance des algues. La croissance des champignons est également affectée par l'équilibre hydrique, mais dans une moindre mesure. En revanche, la croissance fongique est hautement affectée par le mode de nutrition, car les champignons sont hétérotrophes. En ce qui concerne les échantillons exposés à l'extérieur, aucune croissance fongique n'est observée, mais une croissance algale est constatée (Ohshima et al., 1999).

### **7.5. Etude d'Hélène Barberousse sur la recherche des facteurs favorisant l'implantation des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France (Barberousse, 2006)**

Une partie de l'étude était dédiée à l'évaluation de la résistance à la colonisation par des micro-organismes d'éprouvettes de matériaux à l'aide d'un banc d'essai par ruissellement d'eau. Ce banc d'essai était inspiré de l'essai mis au point par Boulon et repris par Dubosc. Le système consistait en un caisson de verre, dans lequel étaient installés deux supports inclinés à 45°. Le principe était le suivant : le caisson était rempli d'une culture de micro-organismes qui était pompée et venait ruisseler sur le haut des éprouvettes. Le ruissellement de la culture à la surface des matériaux reproduisait le phénomène de colonisation d'un revêtement de façade : les micro-organismes, transportés par la solution avait la possibilité de s'accrocher et d'adhérer au revêtement en fonction des caractéristiques du matériau. Ces essais ont montré que des facteurs, tels que la porosité, la rugosité, et le pH de surface des matériaux, influent sur la colonisation par les micro-organismes.

### **7.6. Etude de Clara Urzì et Filomena De Leo sur l'évaluation de l'efficacité de biocide et de composés hydrofuges contre la colonisation microbienne de mortiers (Urzì et al., 2007)**

Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'un traitement sur un mortier contre la colonisation microbienne. Les expériences ont été menées en laboratoire et également en conditions naturelles par exposition des échantillons à l'extérieur sur une terrasse. Deux compositions de mortier, 3 composés hydrofuges et 2 biocides ont été testés. Les échantillons de mortiers ont été inoculés soit par une suspension de spores fongiques, soit par une suspension bactérienne ou par une suspension d'algues et cyanobactéries. Les résultats obtenus montrent que les mortiers non traités possèdent une importante bioréceptivité. Il a également été montré que l'application de composés hydrofuges seuls n'était pas suffisante pour prévenir le développement du biofilm sur la surface. Au contraire, il est apparu évident que la combinaison de composés hydrofuges et de biocides appliqués en même temps, pendant 15 mois en condition de laboratoire, créait des conditions défavorables au développement microbien. Des résultats similaires ont été obtenus pour une exposition à l'extérieur. En effet, les « black fungi » (champignons *Dematiaceous*) se sont révélés être les principaux colonisateurs des mortiers traités ou non avec l'hydrofuge seul. Ceci peut s'expliquer par le fait que les champignons peuvent se développer à des humidités moins élevées que les algues et les bactéries.

### **7.7. Etude K. F. Nielsen sur l'influence de l'humidité et de la température sur le développement fongique ainsi que des métabolites secondaires agissant sur des matériaux de construction (Nielsen et al., 2004)**

Ce travail porte sur l'influence de la température et de l'humidité relative sur la croissance et le métabolisme de 8 champignons microscopiques vis-à-vis de 21 types de matériaux de construction différents (matériaux à base de bois, ciment, gypse, laine de verre, ...). Les champignons ont été inoculés sous forme déshydratés sur les matériaux, et ont été incubés à 5°C, 10°C, 20°C ou 25°C pour 3 valeurs d'humidité relative dans une gamme allant de 69% à 90% HR, pendant 4 à 7 mois. Les résultats ont montré que la limite inférieure pour le développement fongique sur les matériaux en bois et en composites à base de bois était de 78% HR, à 20-25°C et augmentait à 90% à 5°C. Une humidité relative de 86% était nécessaire pour avoir un développement fongique sur des plaques de plâtre. Le développement a été détecté sur les matériaux en céramiques pour une humidité relative

supérieure à 90%, bien que 95% HR était nécessaire pour détecter chimiquement la biomasse. Seulement *Aspergillus*, *Penicillium* et *Eurotium* se sont développés sur les matériaux inoculés. La production de métabolites secondaires et de mycotoxines ont diminué avec les valeurs d'HR. De plus, les quantités de métabolites ont été non significatives par rapport à celles obtenues pour des humidités relatives élevées (>95% HR) sauf pour *Eurotium* (Nielsen et al., 2004).

## 8. Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre que les micro-organismes ont la capacité de se développer sur les matériaux de construction, et sont responsables de changements dans la coloration, et dans les propriétés chimiques et physiques. Nous rappelons ici les points essentiels :

- La biodétérioration est influencée par les conditions environnementales, telles que le vent, la pluie ou encore l'exposition à la lumière, mais également par la bioréceptivité : la composition de la matrice, le pH de surface, la porosité, et la rugosité.
- Les mécanismes impliqués dans la biodétérioration sont d'ordre esthétique (développement des micro-organismes), chimique (utilisation de la surface comme source de nutriments, production de métabolites acides), et physique (pression exercée sur le matériau pendant la croissance des micro-organismes).
- Les principaux micro-organismes impliqués dans la biodétérioration sont les bactéries, les champignons, les algues et les cyanobactéries.
- Les techniques d'analyses couramment utilisées pour l'étude de la biodétérioration sont empruntées à la microbiologie pour l'analyse de la communauté microbienne (méthodes classiques de microbiologie, méthodes moléculaires, ...), et au domaine des matériaux pour la caractérisation de la matrice (DRX, ATD-TG, porosimétrie ...). Les microscopies optique ou électronique apportent également de précieuses informations sur l'interaction entre les micro-organismes et la matrice.

**Tableau 1 : Synthèse des protocoles utilisés pour les essais de laboratoire sur la biodétérioration des matériaux**

Auteurs	nature	taille échantillon	matériau étudié		
			conservation	traitement	stérilisation
Shirakawa et al.	mortier	4 x 4 x 1 cm 1 x 1 x 0,3 cm	démoulage après 24h 48h à 22°C et 80% HR	carbonatation à 80% HR sous 5% CO <sub>2</sub> durée : 10 à 56 jours	Autoclavage 2h à 110°C puis séchage 72h à 80°C et acclimatation 6 jours à 25°C à 100% HR
de Moraes Pinheiro et al.	béton	5 x 5 x 1 cm	démoulage après 24h 15 jours cure humide puis 10 jours en laboratoire	carbonatation atmosphère saturée en CO <sub>2</sub> 65% < HR < 70% 25°C < T < 30°C durée : 120 jours	alcool ethylique puis séchage et acclimatation 6 jours à 25°C
Ohshima et al.	mortier	4 x 4 x 1 cm	démoulage après 24h ou après 28 jours  puis conservation à 20°C et 60%HR		oxyde d'éthylène gazeux
Dubosc Escadeillas et al.	mortier	5 x 5 x 1 cm	démoulage après 24h conservation 24h sous cellophane puis 15 jours à 20°C et 50% HR	carbonatation sous 50% CO <sub>2</sub> 60%<HR<70% durée : 1 à 3 mois	non
Barberousse	mortier	20 x 8 x 1 cm	conservation 48h sous film puis 26 jours à 23°C et 50% HR et démoulage	carbonatation 5 jours sous eau puis 5 jours à 23°C et 50% HR	non
Urzi et De Leo	mortier	1 x 1 x 0,5 cm		immersion 3 secondes dans une solution avec biocide seul ou hydrofuge seul ou hydrofuge + biocide puis séchage 72h sur papier filtre	non
Nielsen et al.	matériaux construction	25 x 15 x 5 cm	3 mois à 65% HR	non	ionisation rayonnement gamma

micro-organismes	inoculation	incubation			techniques analyses	références
		T°C	HR %	durée		
champignon <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	suspension de spores concentration 10 <sup>8</sup> spores/ml 25 µl	25 °C	75% 85% 100%	30 jours	microscope optique MEB MEBE/EDS	Shirakawa et al, int. Biodeter. & Biodeg. 2003, 51: 83-92
champignon <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	suspension de spores concentration 10 <sup>8</sup> spores/ml 250 µl	25°C	NC	60 jours	MEB/EDS DRX ATD-TG calcul minéralogique	de Moraes Pinheiro et al., proceeding of conference on microbial impact on building material, Lisbon, 2003
champignon <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	suspension de spores	26°C 29°C	NC NC	21 jours 42 jours	Index de croissance	Ohshima et al., transaction of the japan concrete institute vol 21, 1999
algue <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Oscillatoria laetevirens</i>	suspension de spores	26°C 29°C	NC NC	21 jours 42 jours	porosimétrie Hg	
algue <i>Chlorohormidium</i> <i>Chlorella</i>	culture liquide	21°C 25°C	80% 95%	60 jours	microscope optique MEBE analyse d'images colorimétrie	Dubosc, Thèse de doctorat INSA Toulouse, 2000 Escadeillas et al., Materials and Structures, 2007, 40: 1061-1071
cyanobactérie <i>Chroococidiopsis</i>		21°C 25°C	80% 95%	60 jours	dosage chla résistance mécanique microscope confocale	
algue <i>Klebsormidium flaccidum</i> <i>Stichococcus bacillaris</i> <i>Chlorella</i>	culture liquide	23°C	50%		MEB MET porosimétrie Hg rugosimétrie laser	Barberousse, Thèse de doctorat Muséum National d'Histoires Naturelles, 2006
champignon <i>Aletrnaria alternata</i> <i>Cladosporium</i> sp.	suspension spores concentration 10 <sup>8</sup> cfu/ml 0,1 ml	Tamb		15 mois	microscope optique	Urzi and De Leo, Int. Biodeter. & Biodeg. 2007
bactérie <i>Micrococcus</i> sp.	suspension cellulaire - 0,1 ml concentration 10 <sup>7</sup> cellules/ml	Tamb		15 mois	microscope à épifluorescence	
biofilm prélevé sur site <i>Nostoc</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Humicola</i> , <i>Ulocladium</i> , <i>Phoma</i> <i>Micrococcus</i>	suspension 0,1 ml	Tamb		15 mois	cultures cellulaires	
16 souches fongiques <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Trichoderma</i> <i>Cladosporium</i> , <i>Stachybotrys</i>	coton tige roulé à la surface de la boîte de pétri puis inoculation en 20 locations sur les échantillons	5°C à 25°C	69% à 90%	4 mois à 7 mois	microscope optique GC-MS/MS HPLC-DAD	Nielsen et al., int. Biodeter. & Biodeg. 2004, 54: 325-336

---

## CHAPITRE II :

# LES MICROMYCÈTES

Ce chapitre est consacré aux champignons microscopiques, les micromycètes, impliqués dans la biodétérioration. Nous commencerons par quelques généralités, puis nous nous intéresserons plus particulièrement aux souches sélectionnées dans cette étude.

## 1. Généralités

### 1.1. Introduction à la taxinomie

Il existe aujourd'hui un nombre considérable d'organismes et la tâche de les nommer et de les classer s'avère être complexe. La taxinomie, ou science de la classification des êtres vivants, fut établie par Carl Von Linne au XVIII<sup>e</sup> siècle. Il proposait alors un système de classification basé sur les ressemblances et les différences des organismes dans leur morphologie, leur fonctionnement, leur habitat et leur reproduction. La classification est en continuel changement. Le classement traditionnel des espèces est surtout basé sur la présence (ou l'absence) d'un caractère morphologique. Le classement repose sur une hiérarchie fixe de catégories. Au niveau le plus bas de ce système, on trouve l'*espèce* à laquelle correspond un type particulier d'organisme vivant ; plusieurs espèces différentes peuvent constituer un *genre*, plusieurs genres une *famille*, plusieurs famille un *ordre* ; puis vient la *classe* suivie de l'*embranchement* et enfin le *règne*. La classification phylogénétique\* est un nouveau système de classification systématique des êtres vivants (Figure 3). Elle pourrait, à plus ou moins long terme, remplacer la classification traditionnelle basée sur des traits phénotypiques et des préférences nutritionnelles. Initiée par Carl Woese en 1990 à partir de données génétiques, elle montre notamment que les procaryotes pouvaient être divisés en deux groupes trop différents pour pouvoir être identifiés comme un seul.

---

\* Phylogénétique : relatif à l'étude de la formation et de l'évolution des organismes vivants en vue d'établir leur parenté.



La première hiérarchie est donc composée de trois domaines :

- Archéobactéries
- Eubactéries
- Eucaryotes

Le domaine des Eucaryotes est subdivisé en quatre règnes :

- les protistes (eucaryote unicellulaire)
- les champignons (eucaryote multicellulaire)
- les végétaux (eucaryote multicellulaire)
- les animaux (eucaryote multicellulaire)

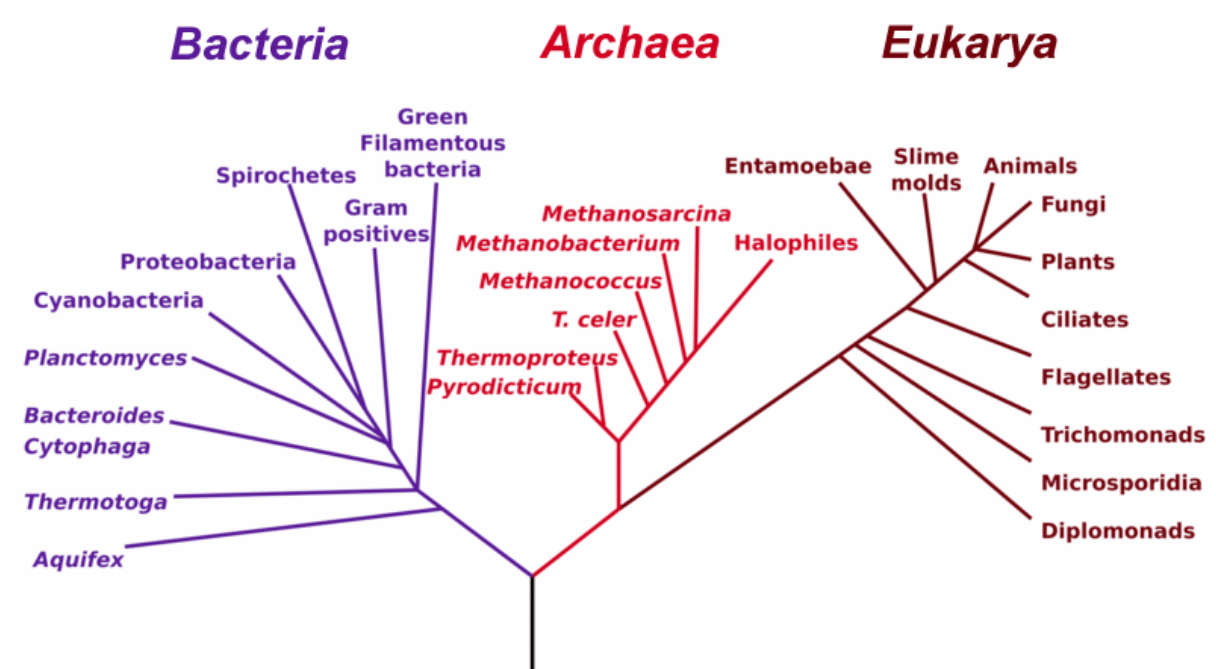


Figure 3 : Arbre phylogénétique selon la classification proposée par Woese et al. (1990)

On désigne scientifiquement un individu par le genre et l'espèce auxquels il appartient ; c'est la nomenclature binomiale. Des deux termes latins utilisés, seul le nom du genre prend une majuscule, mais les deux s'écrivent en italique (Bourbonnais, 2005).

## 1.2. Le règne des Champignons

Le règne des Champignons est divisé en 4 classes (Figure 4) : Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. Les champignons sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils sont

incapables d'utiliser l'énergie solaire, et utilisent donc de nombreuses molécules carbonées fabriquées par d'autres êtres vivants.

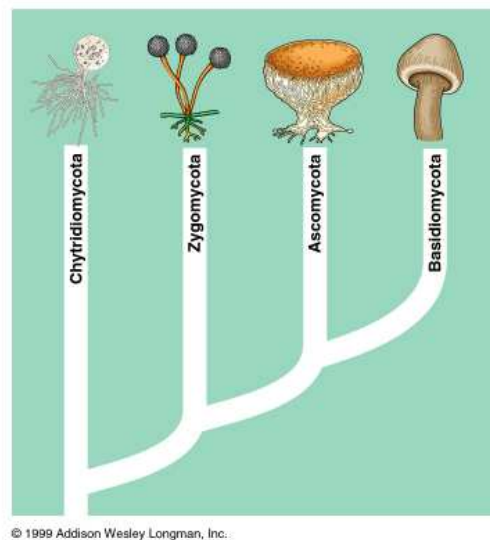
Les chytridiomycètes sont des champignons souvent unicellulaires et sont probablement proches des algues.

La plupart des zygomycètes vivent sur des matières végétales et animales en décomposition dans le sol. Quelques uns sont parasites de plantes, d'insectes, d'animaux et de l'homme.

De nombreuses espèces d'ascomycètes sont familières et économiquement importantes ; par exemple les moisissures rouges, brunes et bleu-vert qui détériorent la nourriture sont des ascomycètes. Le nom d'ascomycète provient de leur structure reproductrice caractéristique, l'asque (du grec *askos*, sac) en forme de massue ou de sac.

Les basidiomycètes sont communément connus sous le nom de « champignons à chapeau ».

Les deutéromycètes (ou champignons imparfaits) ne constituent pas un groupe naturel, mais un ensemble artificiel regroupant environ 15 000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus) ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme sexuée. Ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium. On place ces formes asexuées dans les classes auxquelles appartiennent leur phase sexuée (soit Ascomycota soit Basidiomycota). Ils sont responsables d'un grand nombre de maladies des végétaux et humaines (Boiron, 2002).



© 1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Figure 4 : Les classes du règne des Champignons

### **1.3. La diversité des ascomycètes**

Nous travaillons dans cette étude avec des espèces appartenant à la classe Ascomycota. C'est pourquoi nous présentons les similitudes et les différences de développement rencontrés pour cette classe uniquement.

#### **1.3.1. Mode de développement**

L'appareil végétatif, qui permet la croissance et le développement, est composé de filaments appelés hyphes dont l'ensemble constitue un réseau : le mycélium. Il va à la recherche de ses aliments, dégrade le support par émission d'enzymes et d'acides, en transforme les composants à l'intérieur de la cellule et rejette les déchets à l'extérieur, ou les stocke. La dégradation du substrat peut être infime ou considérable, selon l'adaptation spécifique du champignon, la durée et les conditions de son développement. Cette activité de dégradation est la cause de la détérioration des supports. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. L'accroissement de celles-ci s'effectue par le sommet, ou apex, où s'effectue l'essentiel des réactions de synthèse et dégradation du métabolisme dit « primaire », indispensable à la construction de la cellule du champignon. Les produits du métabolisme « secondaire » non indispensables au fonctionnement de la cellule, sont plutôt stockés en région subapicale. Les métabolites secondaires les plus connus sont les pigments, les antibiotiques, les mycotoxines... (Roquebert, 1997).

#### **1.3.2. La reproduction**

La plupart des micromycètes se multiplient par des spores, d'origine sexuée et/ou asexuée. Ce sont des cellules au métabolisme réduit, entourées de parois protectrices épaisses qui les isolent du milieu ambiant. Elles sont produites en très grand nombre et peuvent survivre plusieurs mois à plusieurs années. C'est sous cette forme que les micromycètes sont dispersés puis se déposent sur de nouveaux supports. Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, elles germent comme des graines, et redonne du mycélium qui reformera, à son tour des spores (Figure 5) (Roquebert, 1997).

Les spores se forment à partir du mycélium selon des processus plus ou moins différenciés, mais en tout cas très variés. Elles peuvent être solitaires groupées en chaînes ou en têtes, portées à la surface du mycélium, ou contenues dans des enveloppes cellulaires. Le développement normal d'une moisissure comprend une phase végétative de croissance, et

presque simultanément, une phase reproductive au cours de laquelle se forment les spores assurant la dispersion. La germination des spores est à l'origine de la phase végétative (Boissier, 2003). L'identification des moisissures repose principalement sur leur mode de formation et de groupement du mycélium.

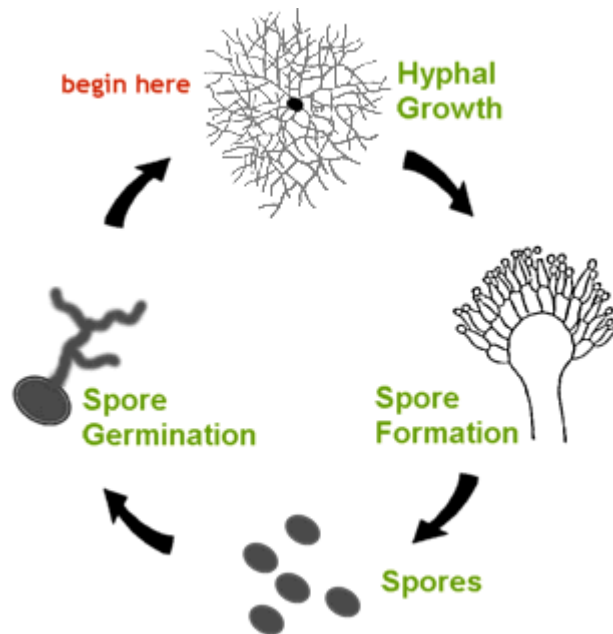


Figure 5 : Cycle de développement des Hyphomycètes (d'après Kubeldis, 2003)

### 1.3.3. Cas particuliers

#### 1.3.3.1. Les champignons lévuriformes

Les champignons lévuriformes ont la capacité de se développer selon un mode de croissance type levure (Figure 6) ou selon la forme mycélienne (Figure 7). Les blastospores représentent la forme unicellulaire du champignon et se caractérisent par des cellules ovoïdes de type lévuriforme. Ce sont des cellules bourgeonnantes ; le bourgeonnement étant un processus de division cellulaire permettant de générer ultimement deux blastospores à partir d'une cellule parentale.

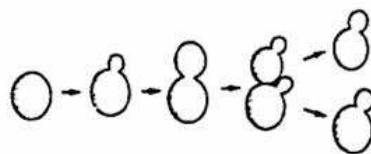
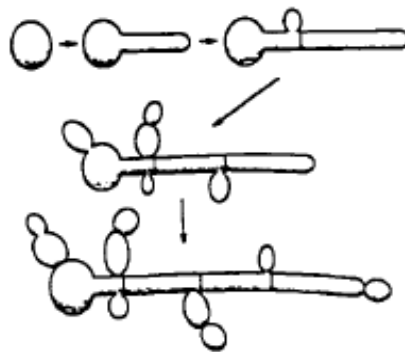


Figure 6 : Bourgeonnement d'une blastospore (d'après Barron, 1999)

Une blastospore produit une nouvelle cellule à partir d'un site déterminé situé à proximité de l'un de ses pôles (Figure 6).

La forme hyphe (mycélienne) est caractérisée par la formation d'un tube microscopique à partir d'un site indéterminé situé sur le blastospore. Le terme « tube germinatif » est utilisé pour décrire cette structure. Au fur et à mesure que l'hyphe s'allonge, des septa sont formés et séparent les unités cellulaires distinctes.



**Figure 7 : Formation d'hyphes chez les champignons lévuriformes (d'après Barron, 1999))**

De plus, une hyphe peut permettre la formation de blastospores et/ou d'hyphes secondaires situées latéralement au tube germinatif principal et à proximité des septa. Ainsi, une hyphe peut émerger à partir d'une blastospore ou d'une hyphe préexistante (Figure 7).

### ***1.3.3.2. Les champignons méristématiques***

Le développement méristématique est rare chez les champignons, mais est fréquemment rencontré chez les lichens (association d'une algue et d'un champignon), qui sont sujets aux conditions de sécheresse. Une cellule méristématique est une cellule non différenciée qui est apte à se diviser.



**Figure 8 : Croissance méristématique (d'après Wollenzien, 1995)**

La croissance méristématique se fait par gonflement de la cellule initiale qui donne naissance à deux nouvelles cellules, qui peuvent à leur tour se diviser (Figure 8). Le développement ne se fait pas forcément de façon apicale (en bout de chaîne). Les champignons méristématiques ont la capacité de se réorganiser de façon interne, en remplaçant les cellules mourantes ou mortes par de nouvelles (Gorbushina et al., 2003). Ils sont particulièrement adaptés aux conditions environnementales hostiles car leur croissance ne dépend pas de la quantité d'eau disponible.

## 2. Les mécanismes de biodétérioration par les champignons

Le processus de biodétérioration commence dès que le champignon s'installe et colonise la surface du matériau. Les principaux mécanismes peuvent se résumer ainsi :

- Production d'acides. Les acides organiques (tels que l'acide oxalique, citrique, propionique, etc.) conduisent à la dissolution des carbonates et à la décohésion des grains. Ce mode de biodétérioration est documenté pour les espèces des hyphomycètes comme *Penicillium* et *Aspergillus* mais jamais démontré pour les « black fungi » (Wollenzien et al., 1995 ; De Leo et Urzì, 2003).
- Dommages esthétiques dues aux pigments fongiques (particulièrement la mélanine et les caroténoïdes) (Sterflinger, 1999 ; Urzì et al., 2000a).
- Croissance intercrystalline. Dans ce cas le champignon se développe le long des défauts de la matrice.
- Biopitting. Ce mode de biodétérioration a été décrit pour les « black fungi », et plus spécialement pour les champignons méristématiques. Il a été suggéré que la formation de petits cratères serait due à la décohésion des grains déterminée par la pénétration des hyphes à l'intérieur des pierres (Sterflinger et Krumbein, 1997).

## 3. Les champignons impliqués dans la biodétérioration

Parmi les micro-organismes impliqués dans la biodétérioration des matériaux de construction, les champignons jouent un rôle important : ils se distinguent des bactéries car ils sont responsables d'une détérioration esthétique des matériaux de construction (croûtes noires, marron), et des algues et cyanobactéries car leur pouvoir de détérioration est nettement plus important, dans la mesure où ils provoquent une détérioration chimique (métabolites acides), voire physique (ancrage des hyphes dans la matrice). May *et al.* (1993) mentionnent les

champignons parmi les agents majeurs de la détérioration microbienne des matériaux de construction. Lezinicka *et al.* (1988) soulignent l'importance particulière des champignons *dematiceous* (de couleur foncée) dans la coloration et la détérioration du patrimoine culturel. La plupart de ces champignons appartiennent à la classe des ascomycètes. En général, deux groupes de champignons sont isolés de la surface des pierres :

- le premier groupe inclus les espèces des genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phoma* parmi ceux qui ne produisent pas de mélanine. On trouve également ceux qui présentent une pigmentation sombre tels qu'*Alternaria*, *Ulocladium*, *Cladosporium*, producteurs de mélanine. Sont aussi présents les champignons levuriformes comme *Exophiala*. La plupart de ces champignons sont ubiquistes\* et largement répartis (Domsch *et al.*, 1980). Ils sont caractérisés par une croissance rapide en milieu de culture classique, avec une humidité relative élevée et des conditions nutritives eutrophiques\*\* (Braams 1992 ; De Leo *et al.*, 1996 ; Sterflinger, 2000). La présence de ces champignons sur les monuments à différentes étapes de la détérioration, pour des expositions en environnement extérieur et pour différentes zones climatiques est bien documentée (Hirsch *et al.*, 1995 ; Urzì *et al.*, 1995 ; Urzì *et Realini*, 1998 ; De Leo *et Urzì*, 2003).
- le second groupe inclus les champignons appelés méristématiques ou MCF (Micro Colonial Fungi). D'un point de vue taxonomique, ils représentent un vaste groupe hétérogène de champignons à la pigmentation sombre. Ils partagent comme caractéristique commune, la présence de mélanine à l'intérieur de leurs cellules (cellules qui gonflent, hyphes et/ou spores). La production de mélanine et le développement méristématique leur permettent de survivre en conditions de stress tel qu'une humidité relative basse, ou une importante exposition au soleil (De Hoog, 1993). On utilise également le terme « rock-inhabiting fungi » pour ce groupe de champignons, ce qui souligne bien que la plupart ont été isolés à partir de la surface des pierres. Récemment, de nombreuses souches de ce groupe ont été décrites comme des espèces nouvelles (Sterflinger *et al.*, 1997 ; Wollenzien *et al.*, 1997 ; De Leo *et al.*, 2003a), et les recherches écologiques et taxonomiques sont actuellement en cours (De Leo *et al.*, 2003a). Ils ont la capacité de se réorganiser de façon interne, en remplaçant les cellules mourantes ou mortes par de nouvelles

---

\* Ubiquiste : se dit des espèces susceptibles d'être observées dans de très nombreux habitats.

\*\* Eutrophique : se dit d'un milieu qui se retrouve enrichie en éléments nutritifs.

(Gorbushina et al., 2003). Il est possible de former des hyphes qui pénètrent en profondeur à l'intérieur du matériau, se protégeant ainsi des conditions environnementales non favorables. En ce sens, la partie visible des MCF est comme la partie émergée des icebergs, car les hyphes peuvent pénétrer rapidement de plusieurs millimètres jusqu'au centimètre à l'intérieur des roches dures à la recherche d'un environnement plus protecteur (Gorbushina, 2007).

Le premier groupe est dominant lorsque les conditions sont favorables tandis que le second prévaut en environnement rude et hostile (Gorbushina, 2007). Il est très probable que les champignons méristématiques en particulier possèdent leur niche écologique naturelle sur la surface des pierres (Wollenzien et al., 1995) et donc de la plupart des matériaux de construction.

Une étude menée par Urzi *et al.* (2001), porte sur l'examen de 49 échantillons de pierres prélevés sur sites dans divers pays européens (brique, mortier, marbre). Quarante-deux échantillons présentaient une colonisation par des champignons *dematiaceous*. Parmi les souches les plus fréquemment isolées, ils trouvèrent les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Ulocladium*. Dans certains cas, des souches ubiquistes non-*dematiaceous* du genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* ont été isolées. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium*, sont des champignons acidogéniques produisant différents acides organiques comme : acide oxalique, gluconique, malique, citrique etc, pour des concentrations basses et normales en glucose (de la Torre *et al.*, 1991). Ces acides forment des sels de calcium ou agissent comme agent de chélation de cations minéraux favorisant la biodétérioration (Berthelin, 1983). Cependant, l'attaque des champignons n'est pas exclusivement chimique par la production d'acides organiques. Le développement des « black fungi » sur les pierres n'est pas seulement inesthétique, salissant les monuments, en raison du changement de couleur et de l'apparition de points noirs, mais il est également la cause de lésions en forme de cratère et exfoliation de la surface de la pierre combinée avec une perte du matériau (Urzi *et al.*, 2001). L'attaque physique de ces champignons est un facteur important de la biodétérioration des pierres (Diakumaku *et al.*, 1995). Leur pigmentation sombre (mélanine et mycosporines) les protège des irradiations, des températures extrêmes et d'une possible dessiccation (Zdanova *et al.*, 1973). Ces pigments contribuent considérablement à la survie de ces champignons aux conditions extrêmes. Une étude sur la microflore présente sur des sculptures et des bâtiments de St-Petersbourg a montré qu'ils étaient sujets à une biodétérioration active par des micromycètes possédant une pigmentation sombre. Les hyphes



étaient présents à l'intérieur des pores des pierres et causent lentement leur destruction (Gorbushina et al., 2002). Pour montrer la capacité des micromycètes à se développer sur les pierres, Gorbushina et al. (2002) ont inoculé des échantillons prélevés sur des monuments, après stérilisation, par des micromycètes : *Exophiala moniliae* et *Phialophora melinii*. Après 5 jours d'incubation seulement, le développement des deux souches est observé sur les échantillons, et ce sans aucun ajout d'éléments nutritifs. La matière organique déjà présente dans la matrice a permis le développement fongique. Les substrats minéraux fraîchement exposés à l'air extérieur présentent une lacune en nutriments organiques, ce qui les rend réfractaires à la croissance végétative des champignons. Pour palier à ce problème, certains groupes de champignons ont abandonné leur système de développement par élongation des hyphes (qui est plus appropriée pour la pénétration et l'utilisation du substrat) et ont adopté une croissance comme les levures (par bourgeonnement) (Gorbushina, 2007).

En résumé, certaines souches, comme *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, sont responsables de la biodétérioration du matériau par voie chimique (production d'acides organiques) alors que d'autres, comme *Alternaria*, *Phoma*, *Conosporium* attaquent le matériau par voie physique (pénétration en profondeur dans la matrice). Notons aussi que les micromycètes possédant une pigmentation sombre, *Alternaria*, *Exophiala* sont responsables d'une biodétérioration esthétique indéniable. Il faut souligner également l'importance des champignons méristématiques dans la biodétérioration. En effet, contrairement aux micromycètes couramment identifiés qui sont ubiquistes, les champignons méristématiques sont quasiment tous isolés à partir de la surface de pierres. De plus, la nature de la flore fongique varie selon la teneur en eau du support. Une humidité croissante du substrat entraîne l'apparition successive de genres fongiques, dits de première (*Aspergillus*, *Penicillium*), deuxième (*Cladosporium*, *Ulocladium*), et de troisième colonisation (*Stachybotrys*) (Grant et al., 1989 ; Boissier, 2003).

#### 4. Les micromycètes de l'étude

Nous venons de voir que les micromycètes colonisateurs des matériaux de constructions peuvent se regrouper en quatre grandes catégories, et pour étudier la biodétérioration d'une matrice cimentaire par les champignons nous avons sélectionné une souche représentative de chaque catégorie : (i) *Alternaria alternata* pour représenter un hyphomycète producteur de mélanine, (ii) *Aspergillus niger* pour un hyphomycète acidogénique, (iii) *Exophiala* sp. pour

un champignon lévuriforme, et (iv) *Conosporium uncinatum* pour les champignons méristématiques (Planche 2).

#### **4.1. *Alternaria alternata***

*Alternaria* est abondamment retrouvée lors de prélèvements sur sites d'échantillons de marbre (Wollenzien *et al.*, 1995). Plus récemment, Simonovicova *et al.* (2004) étudièrent les types de champignons retrouvés sur divers substrats minéraux dans un cimetière à Bratislava. Trente-six espèces de micro-champignons ont été isolées, dont les plus fréquemment retrouvées : *Acremonium* sp., *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., et *Trichoderma* sp. Les espèces d'*Alternaria* furent également retrouvées parmi les micro-champignons dominants sur substrat minéral. Diakumaku (1995) considère que les espèces du genre *Alternaria* sont les principales causes de coloration marron et noire sur le marbre, les roches calcaires, et le grès des monuments en Europe et en Afrique. Cette coloration est due à la synthèse de mélanine, un pigment de couleur sombre. Bien que ce genre comprenne les parasites de plantes, quelques espèces sont ubiquistes et fréquemment trouvées dans les sols. *A.alternata* est la plus commune de ces espèces. Elle est bien adaptée aux conditions de froid, avec une température minimum de croissance allant de  $-5^{\circ}\text{C}$  à  $0^{\circ}\text{C}$  (Simonovicova *et al.*, 2004). La croissance maximum apparaît pour un pH de 4-4,5, mais la croissance est possible pour une gamme de pH allant de 2,7 à 8,0 selon Domsch *et al.* (1980). Elle semble être sensible à la pollution atmosphérique : elle est largement retrouvée dans les biofilms formant des croûtes noires à Lexington, une zone peu polluée, et que très rarement à Cambridge, site pollué (Mitchell *et al.*, 2000). *Alternaria alternata* est capable de se développer en conditions d'anoxie (taux d'oxygène = 0,25%). Les spores contiennent environ 86% d'eau; sous des conditions très sèches, elles restent viables pendant plusieurs années. Les spores d'*Alternaria alternata* sont produites en chaîne, c'est-à-dire que la nouvelle spore est formée par extrusion à la suite de la précédente.

Le genre *Alternaria* Nees ex Fr. comprend plus de 40 espèces. C'est un genre très commun dans le sol ; les espèces dites phylloplan<sup>\*</sup>, *A.alternata* et *A.tenuissima*, sont retrouvées en très grand nombre dans l'air extérieur pendant l'été. La toxicologie des toxines d'*Alternaria* a été passée en revue par Woody et Chu. La toxicité aiguë (DL<sub>50</sub>) des alternariols chez les rongeurs

---

<sup>\*</sup> Phylloplan : microenvironnement d'une feuille. Certains auteurs définissent le phylloplan comme la surface d'une feuille.

semble être d'un ordre de grandeur de 400 mg/kg, ce qui est plutôt bas, même s'ils sont répertoriés comme tératogènes\*\* à des niveaux 10 fois moins élevés. L'acide tenuazonique (DL<sub>50</sub> 10-200 mg/kg chez les rongeurs) est plus toxique et les autres altertoxines sont environ 1000 fois plus toxiques (DL<sub>50</sub> 200µg/kg chez le rongeur). Ren *et al.* montrent que seulement certains alternariols sont produits sur divers matériaux de construction, alors que les altertoxines ne sont pas produites en quantités décelables. Cependant les espèces de ce genre pourraient être la cause de problèmes de santé dans les moisissures de bâtiments, et des métabolites très différents pourraient être produits sélectivement sur les matériaux de constructions (Nielsen, 2002).

#### **4.2. *Aspergillus niger***

C'est une espèce qui est souvent identifiée à partir de prélèvements sur sites de monuments ou bâtiments dégradés (Warscheid et Braams, 2000 ; Urzi *et al.*, 1998). C'est un champignon acidogénique (de la Torre, 1991), c'est-à-dire qu'il produit des acides organiques, tels que l'acide ascorbique, citrique, acétique, gluconique,....

*Aspergillus niger* est une espèce du genre *Aspergillus*. Il existe plus de 160 espèces d'*Aspergillus*. *Aspergillus niger* se développe aussi bien sous peu de lumière (à l'intérieur), que sous la forte lumière de l'extérieur. C'est une espèce toxique et pathogène : elle provoque des otomycoses (mycoses pulmonaires) chez l'homme et les oiseaux. Elle peut provoquer l'aspergillose du conduit auditif externe chez les sujets présentant une lésion préalable ou une malformation anatomique du conduit auditif. Cependant, elle possède des toxines à propriétés insecticides, actives sur les moustiques responsables de la fièvre jaune.

Le mycélium d'*Aspergillus niger* est cloisonné. Les phialides\* sont portées directement par les vésicules dans le cas de têtes unisériées, ou par l'intermédiaire de métules dans le cas de têtes bisériées. Les phialides portent les conidies (ou spores) (Guillaume, 2005).

#### **4.3. *Exophiala sp.***

Les espèces du genre *Exophiala* sont ubiquistes et ont été isolées à partir de nombreux substrats, tels que le bois en décomposition, monuments, eaux polluées (Wand et Zabel, 1990,

---

\*\* Tératogène : se dit des substances susceptibles de provoquer des malformations congénitales par une action sur l'embryon.

\* Phialide : article mycélien fertile en forme de bouteille formant successivement des spores.

Gorbushina et al., 2002). Les cultures en milieu solide sont marron à verdâtre. La texture des colonies peut éventuellement devenir duveteuse en raison du développement des hyphes. Les cellules se reproduisent par bourgeonnement.

#### **4.4. *Coniosporium uncinatum***

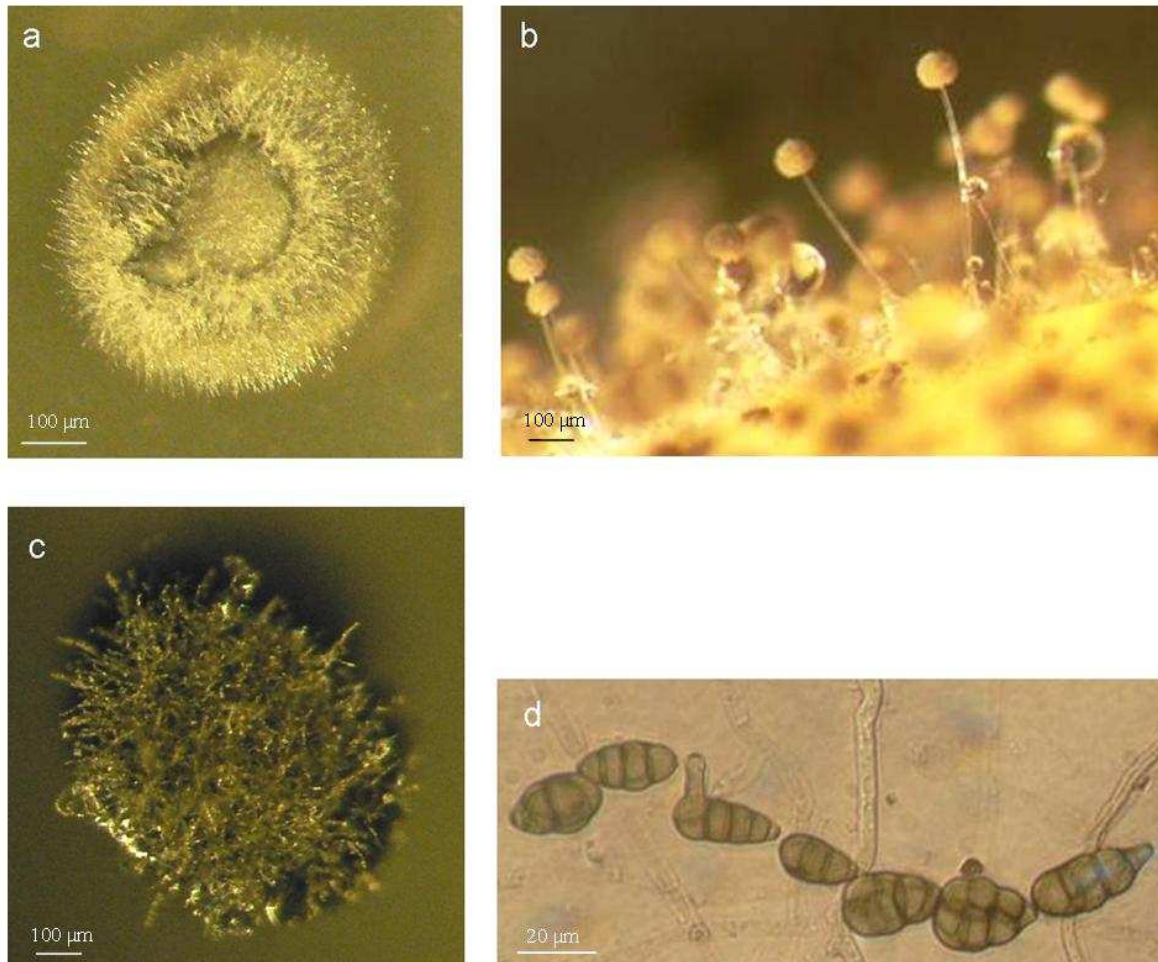
Les espèces de *Coniosporium* sont couramment isolées à partir de monuments localisés dans le bassin méditerranéen. Dans de nombreux cas ils constituent la microflore prédominante, voire même exclusive (Sterflinger, 1995 ; Garcia Valles et al., 1997 ; Urzì et al., 1998). Ceci peut être dû aux conditions extrêmes prévalant sur les matériaux pendant la saison sèche. Les colonies sont de couleur sombre, et atteignent 10 mm de diamètre en 4 semaines de culture sur Maltose Extract Agar. Le mycélium est composé d'hyphes particuliers marron, composés de parois cellulaires épaisses et lisses. Les cellules, presque sphériques, atteignent 6,5 -7,5 µm de longueur pour 5-6 µm de diamètre. On note également la présence d'hyphes terminal caractéristique courbé à l'extrémité des cellules pouvant atteindre 10 µm de longueur. *Coniosporium uncinatum* se développe pour une gamme de température allant de 10 à 30°C. La souche utilisée a été isolée à partir de prélèvements sur des statues en marbre situées dans le jardin du musée de Messine par Filomena De Leo (1999).

### **5. Quantification de la biomasse**

Pour estimer le degré et l'intensité de la biodétérioration d'un matériau, il faut quantifier les micro-organismes, c'est-à-dire quantifier la biomasse fongique. La biomasse peut se définir comme étant la masse totale des organismes vivants présents à un moment donné dans un environnement particulier. Plusieurs méthodes de quantification de la biomasse existent, certaines étant spécifiques à un type de micro-organismes.

Le problème majeur dans l'étude du développement fongique sur substrat solide est l'incapacité à déterminer la biomasse du mycélium directement par la mesure du poids sec ou humide. Ceci a conduit au développement de techniques indirectes pour l'estimation de la biomasse fongique. On trouve des méthodes basées sur l'observation microscopique (Jones et Mollison, 1948 ; Frankland et al., 1981 ; Söderstöm, 1977), où la biomasse est estimée à partir de la longueur des hyphes. Il y a également des méthodes biochimiques, basées sur le dosage chimique de composés cellulaires. Ces composés peuvent être spécifiques aux champignons comme la chitine, les acides gras phospholipides (18 :2ω6, 16 :1ω5), ou l'ergostérol (Seitz et

al., 1979 ; Zelles et al., 1992 ; Frostegard et Baath, 1996). Ils peuvent être également communs à tous les organismes comme les protéines ou l'adénosine triphosphate (ATP) (Gaunt et al., 1985 ; Barajas-Aceves et al., 2002). Parmi ces méthodes nous avons choisi de développer pour notre étude un dosage spécifique de la biomasse fongique : celui de l'ergostérol, et un plus global : le dosage des protéines qui permet l'estimation de la biomasse microbienne totale.



**Planche 2 : Observation de culture sur milieu solide (a) *Exophiala* sp., (b) *Aspergillus niger*, (c) *Coniosporium uncinatum*, (d) *Alternaria alternata***

### 5.1. Dosage de l'ergostérol

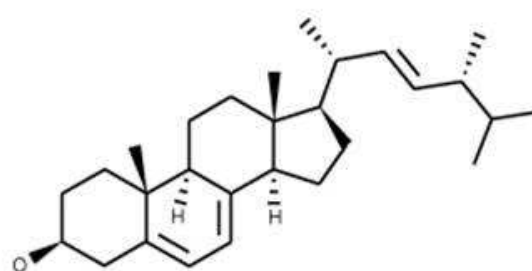
L'ergostérol est utilisé pour la mesure de la biomasse fongique car c'est un stérol endogène et prédominant trouvé seulement dans la membrane cellulaire des champignons (Weete, 1989),

et de certaines microalgues et protozoaires\* (Newell, 1992). Le dosage de l'ergostérol a été d'abord décrit pour le domaine de l'agriculture (Seitz et al., 1979). L'ergostérol joue un rôle important dans la croissance des champignons (Lees *et al.*, 1995). Il se trouve dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, principalement dans un état libre, et à un moindre degré estérifié en acide gras (Martin *et al.*, 1990). La biomasse fongique est déterminée en utilisant un facteur de conversion « Ergosterol-à-Biomasse fongique » à partir de cellules cultivées dans des cultures pures (Antibus *et al.*, 1993 ; Gessner *et al.*, 1993).

Saxena *et al.* (2001) ont démontré que la production d'ochratoxine A (OA) suivait la même tendance que la production d'ergostérol. Ainsi, le dosage d'ergostérol pourrait être utilisé comme indicateur de la production potentielle d'OA. L'OA est une mycotoxine produite par *Aspergillus ochraceus*, certaines souches d'*Aspergillus niger* et *Penicillium verrucosum* (Pitt *et al.*, 1997). Il est considéré que l'OA pourrait être une cause possible (jamais prouvée) d'une maladie humaine, connue sous le nom de néphropathie endémique des Balkans. Il a été également montré que l'OA est néphrotoxique (organe cible : le rein), génotoxique et cancérigène.

L'ergostérol est un excellent marqueur pour la quantification de la biomasse fongique sur les matériaux de construction et peut aussi être utilisé comme marqueur d'exposition dans l'air ou la poussière, employé spécialement par Larsson *et al.*, et Miller *et al.* (Nielsen, 2002).

Pour minimiser les erreurs de mesures, il peut être intéressant de comparer la quantité d'ergostérol à la concentration en ATP\*. Contrairement à l'ergostérol, le dosage de l'ATP n'est pas spécifique à la biomasse fongique, mais permet la mesure de biomasse microbienne totale (bactéries, champignons, protozoaire) (Ruzicka, 2000).



**Figure 9 : Formule chimique développée de l'ergostérol**

\* Protozoaire : organisme unicellulaire eucaryote.

\* ATP : Adénosine Tri-Phosphate. C'est une molécule dont la dégradation libère beaucoup d'énergie, récupérée pour le fonctionnement de nombreuses réactions chimiques.

Les techniques de dosages de l'ergostérol s'appuient sur une caractéristique de cette molécule : son absorbance à 282 nm, caractéristique que ne possèdent pas les autres stérols, ceci réduit donc la possibilité d'interférence pendant l'analyse chromatographique (Newell, 1992).

L'ergostérol est analysé par GC-MS (Larsson et Saraf, 1997), par HPLC (Gong, 2001), HPLC et GC-MS (Axelsson et al., 1995 ; Dales *et al.*, 1997) ou encore par GC-MS-MS (Nielsen *et al.*, 2000).

## 5.2. Le dosage des protéines

Les protéines sont des macromolécules, assemblages d'acides aminés, qui sont présentes chez tous les organismes vivants. On parle de protéine lorsque plus de 100 acides aminés sont liés au sein d'une chaîne d'acides aminés. Les propriétés des acides aminés (charge, hydrophobicité...) gouvernent la structure de la protéine, globulaire ou fibrillaire. Les protéines ont des fonctions très diverses : certaines pourront avoir une fonction structurale (elles participent à la cohésion structurale des cellules entre elles), enzymatique (elles catalysent les réactions chimiques de la matière vivante) ou encore une fonction de messenger (pour les protéines impliquées dans des processus de signalisation cellulaire).

Parmi les méthodes de dosage des protéines, la méthode de Bradford, est couramment utilisée car elle nécessite un appareillage simple (spectrophotométrie UV-vis), et c'est une méthode rapide. Le réactif de Bradford est utilisé pour déterminer la concentration en protéines en solution. Le dosage est basé sur la formation d'un complexe entre le colorant, bleu de Coomassie G250, et les protéines en solution. Le complexe protéines-colorant crée un changement du maximum d'absorbance du colorant entre 465 et 595 nm. L'absorption est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu.

Comme le dosage de l'ATP, le dosage des protéines, n'est pas spécifique à la biomasse fongique, mais permet de mesurer la biomasse microbienne totale.

## 6. Conclusion

Ce chapitre a permis de souligner la place importante qu'occupent les champignons dans la biodétérioration des matériaux de construction. Les points importants à retenir sont :

- 
- Les champignons sont responsables d'une biodétérioration esthétique (essentiellement due à la présence de pigment fongique), chimique (via la production d'acides organiques), et physique (pénétration en profondeur des hyphes dans la matrice).
  - Quatre grandes catégories de champignons sont impliquées dans la biodétérioration : (i) les hyphomycètes producteurs de mélanine comme *Alternaria alternata*, (ii) les hyphomycètes acidogéniques tel qu'*Aspergillus niger*, (iii) les « yeast like fungi » comme *Exophiala* sp. et (iv) les champignons méristématiques avec *Conosporium uncinatum*.
  - La quantification de la biomasse peut être réalisée par le dosage de l'ergostérol et le dosage des protéines.



## CHAPITRE III :

# LA MATRICE CIMENTAIRE

A travers ce troisième chapitre, nous présentons les propriétés et les caractéristiques de notre matériau support : la matrice cimentaire.

Le ciment est un liant hydraulique : il a la propriété de faire prise et de durcir au contact de l'eau. L'hydratation du ciment anhydre conduit à l'obtention d'un matériau durci, poreux, saturé avec une solution interstitielle qui évolue en fonction des réactions d'hydratation. Les pâtes de ciment hydraté sont donc composées de grains anhydres et d'hydrates en équilibre avec la solution interstitielle. La porosité, qui évolue au cours du temps, va influencer les propriétés diffusives intrinsèques du matériau (Moudilou, 2000).

## 1. Généralités

### 1.1. Fabrication du ciment

Le clinker de ciment Portland est obtenu par cuisson d'un mélange de roches calcaires et argileuses dans des proportions proches de 80 % - 20 %, avec d'éventuels ajouts correctifs de composition comme la bauxite, du sable siliceux de haute pureté, des cendres de pyrite. Avant de passer dans le four de cuisson ce mélange est appelé le « cru ». Il doit présenter des proportions précises en oxydes principaux ( $\text{CaO}$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  et  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) et en oxydes mineurs ( $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{MgO}$ ).

Différents modes de cuisson du cru existent, dont le mode par « voie sèche », qui est aujourd'hui le plus courant. Avec ce mode de fabrication, la farine du cru finement broyée est introduite dans une tour de précalcination. Au cours de son cheminement dans cette tour, la farine est portée à  $850^\circ\text{C}$ . Elle est ensuite introduite dans un four tubulaire rotatif où elle est portée de  $850$  à  $1450^\circ\text{C}$ . A la fin de ce procédé, le produit obtenu se présente sous forme boulets noirs de taille centimétrique.

Le clinker est le composant principal des ciments dits « Portland » et « Portland composés ». Le ciment Portland contient au moins 95% de clinker mélangé à du gypse (pour réguler la

prise) et d'autres ajouts éventuels. Les ciments Portland dits « composés » sont constitués d'un mélange de clinker, de gypse et d'autres constituants, selon les propriétés désirées, comme les laitiers de hauts fourneau, des fumées de silice, des cendres volantes, des pouzzolanes, des particules de calcaires broyés.... Les laitiers de haut-fourneau sont des scories fondues issues de la fusion du minerai de fer dans un haut-fourneau. Les cendres volantes sont des poussières fines produites par des centrales thermiques brûlant du charbon pulvérisé. Les fumées de silice sont des sous-produits de la fabrication du silicium métallique et de divers alliages ferro-silicieux. Les pouzzolanes sont des matériaux naturels issus de l'activité volcanique. Elles sont formées d'une partie bien cristallisée et d'une partie vitreuse qui est la phase réactive (Witier et al., 1999). Les ciments courants répondant à la norme NF EN 197-1 sont de 5 types, définis par leur composition (exprimée ci-après en % hors régulateur de prise) :

	clinker	laitier	pouzzolanes ou cendres	calcaire ou silice ou schiste	constituants secondaires (*)
<b>CEM I</b>	> 95				< 5
<b>CEM II</b>	> 65	6 à 35			< 5
<b>CEM III</b>	5 à 64	36 à 95			< 5
<b>CEM IV</b>	45 à 89		11 à 55		< 5
<b>CEM V</b>	20 à 64	18 à 50	18 à 50		< 5

(\*) peuvent être du filler ou des constituants principaux (si non déjà utilisés)

**Figure 10 : composition des ciments courants (d'après Bollotte, Italcementi Group)**

## 1.2. La chimie du ciment

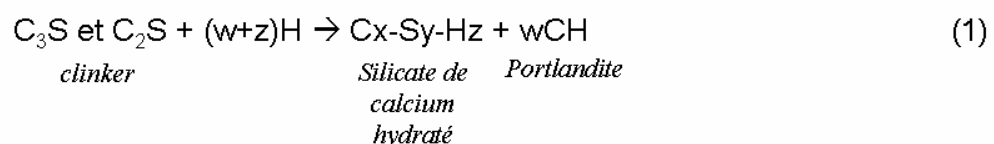
La chimie du ciment se construit essentiellement à partir de 4 oxydes majeurs : CaO, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, présents dans les matières premières et qui vont former les silicates et les aluminates de calcium du clinker. Pour simplifier les écritures des réactions, nous utiliserons la notation des cimentiers (Figure 11) :

Oxydes	Notation chimique	Notation cimentière
Oxyde de calcium	CaO	C
Oxyde de silicium	SiO <sub>2</sub>	S
Oxyde d'aluminium	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	A
Oxyde de fer	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	F
<b>Silicates</b>		
Silicates tricalcique	(CaO) <sub>3</sub> SiO <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> S
Silicate bicalcique	(CaO) <sub>2</sub> SiO <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> S
<b>Autres</b>		
Aluminate tricalcique	(CaO) <sub>3</sub> Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> A
Alumino-ferrite tetracalcique	(CaO) <sub>4</sub> (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )(Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	C <sub>4</sub> AF
Eau	H <sub>2</sub> O	H
Gypse	CaSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	C $\bar{S}$ H <sub>2</sub>

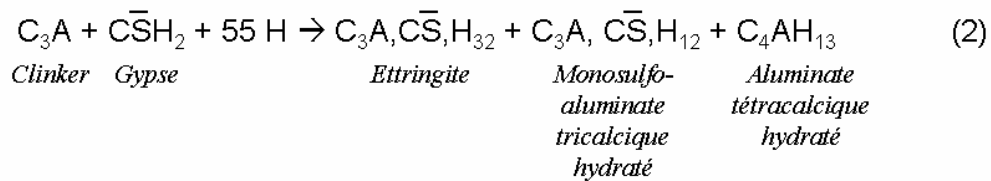
Figure 11 : Notation cimentière des principaux constituants du ciment

Les réactions chimiques simplifiées exprimées avec l'aide de la notation cimentière sont les suivantes (Farcas et Touze, 2001) :

- L'hydratation de deux phases silicates qui conduit à la formation de silicates de calcium hydratés (C-S-H) et de portlandite (Ca(OH)<sub>2</sub>) (équation 1), le durcissement de la pâte de ciment Portland est principalement dû à la formation de ces produits (Gervais, 2004);



- L'hydratation des deux phases aluminates qui réagissent avec le gypse (régulateur de prise) pour former de l'ettringite, du monosulfoaluminate tricalcique hydraté et de l'aluminate tétracalcique hydraté (équation 2);



Dans la phase solide, trois composants assurent la cohésion du matériau, ce sont dans l'ordre décroissant d'importance : les silicates de calcium hydratés (C-S-H), la portlandite (CH), et la série des aluminates. Les proportions dépendent de la nature et de la composition chimique du liant (Nguyen, 2005). Les ciments au laitier de haut fourneau contiennent moins de portlandite, plus de C-S-H, et plus d'aluminates que les ciments Portland pur (Gervais, 2004). La portlandite cristallise sous forme de fines plaquettes hexagonales. Les C-S-H ont une structure cristalline de composition variable. Le rapport CaO/SiO<sub>2</sub> (Ca/Si) et la concentration en Ca<sup>2+</sup> contrôlent le type de C-S-H. La stoechiométrie de la plupart des C-S-H est définie pour une gamme de rapport Ca/Si comprise entre 0,66 < Ca/Si < 2 (Flint et al., 1934 ; Glasser et al., 1987). Plusieurs structures ont été proposées pour les C-S-H, mais Taylor (1990) a donné une classification qui est la plus communément acceptée : C-S-H (I) et C-S-H (II), qui sont déduits de la structure de la tobermorite et de la jennite respectivement.

### 1.3. La porosité des matrices cimentaires

La porosité est un paramètre important pour la structure des pâtes de ciment car elle est déterminante pour certaines propriétés (résistance mécanique, transfert hydraulique,...). La porosité évolue au cours du temps car d'une part l'hydratation du ciment se produit sur une échelle de temps étendue, et d'autre part de nombreuses réactions de dissolution précipitation ont lieu dans le réseau poreux. La distribution porosimétrique est souvent décrite par trois classes de pores (Gervais, 2004) :

- La microporosité : 0,006 μm < Ø < 0,1 μm
- La mésoporosité : 0,1 μm < Ø < 0,6 μm
- La macroporosité : 0,6 μm < Ø

La porosité et la répartition porosimétrique sont des grandeurs évolutives, elles contrôlent la durabilité d'une pâte de ciment. Une pâte de ciment hydratée faiblement poreuse a une

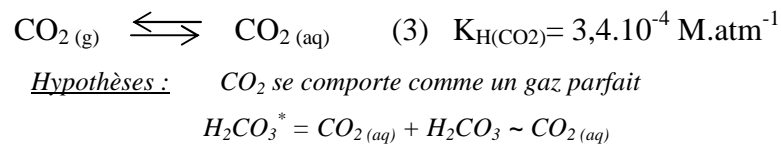
meilleure résistance mécanique et limite la pénétration des agents extérieurs agressifs comme l'eau et le dioxyde de carbone (Gervais, 2004).

## 2. Vieillessement naturel et accéléré des matrices cimentaires

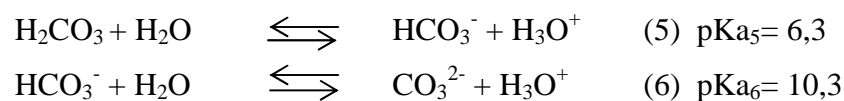
### 2.1. La carbonatation des matériaux cimentaires

La carbonatation des matériaux cimentaires correspond à un ensemble de mécanismes physiques et chimiques qui résultent de l'instabilité des phases  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  et C-S-H de la matrice cimentaire en présence de  $\text{CO}_2$ . L'action du  $\text{CO}_2$  se manifeste à de faibles concentrations telles celles que l'on trouve en milieu rural, où la fraction volumique en  $\text{CO}_2$  est d'environ 0,03%. Dans un local mal ventilé ce pourcentage peut atteindre 0,1% ; dans les grandes villes le pourcentage moyen est de 0,3% et peut atteindre 1% (Thiery, 2005). En condition atmosphérique, la vitesse de carbonatation peut atteindre une valeur approximative de 1cm /an de profondeur pour les bétons de structures (Gervais et al., 2004).

Lorsqu'une solution est soumise à une pression partielle de  $\text{CO}_2$ , le gaz se dissout et s'hydrate sous forme d'acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , ce passage en solution suit la loi de Henry :



Dans l'eau, l'acide carbonique se comporte comme un diacide faible:



A 20°C, pour un pH supérieur à 10,3 c'est l'ion  $\text{CO}_3^{2-}$  qui prédomine et pour un pH compris entre 6,3 et 10,3 c'est l'ion  $\text{HCO}_3^-$  qui prédomine. Au cours de la carbonatation, le pH de la solution interstitielle des matériaux cimentaires passe d'une valeur très basique, proche de 13, à une valeur proche de 9 (Thiery, 2005).

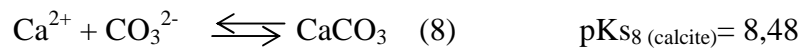
Le  $\text{CO}_2$  de l'air pénètre sous forme gazeuse dans le milieu poreux de la matrice cimentaire, se dissout dans la solution interstitielle des pores et réagit sur certains composés pour former des carbonates de calcium. Les mécanismes prépondérants sont ceux de la carbonatation de la portlandite  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  et des silicates de calcium hydratés C-S-H (Thiery, 2005).

### 2.1.1. La carbonatation de la portlandite $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Le passage en solution du  $\text{CO}_2$ , suivant les réactions (3) à (6) entraîne une baisse de concentration en ion  $\text{OH}^-$  dans la solution interstitielle des pores. Le pH du milieu est maintenu à une valeur élevée par la dissolution de la portlandite suivant la réaction :



Les ions calcium ainsi libérés précipitent avec les ions carbonates pour former du carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$  suivant la réaction :



Le pH de la solution interstitielle, qui correspond à l'équilibre du système  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-CO}_2\text{-CaCO}_3\text{-H}_2\text{O}$ , est de 12,4. La portlandite opère donc un effet tampon, en maintenant le pH autour de cette valeur. Alors que cet hydrate n'a que peu d'importance d'un point de vue de la résistance mécanique, cette caractéristique chimique lui confère un rôle fondamental dans le maintien de la durabilité des matériaux cimentaires (Thiery, 2005).

### 2.1.2. La carbonatation des silicates de calcium hydratés C-S-H

La carbonatation des C-S-H donne naissance à des carbonates de calcium, à un matériau siliceux hydraté (qualifié de gel de silice) et éventuellement à de l'eau libre. Cette réaction est considérée sous une forme topochimique (c'est-à-dire sans transport de matière ou phénomène de dissolution-précipitation) entre phases hétérogènes (Thiery, 2005) :



Les C-S-H, qui représentent la phase hydratée la plus importante dans la pâte de ciment, confèrent au matériau cimentaire l'essentiel de sa résistance mécanique. En revanche, ils ont un pouvoir tampon sur le pH de la solution interstitielle plus faible que la portlandite.

### **2.1.3. La carbonatation des autres constituants des matériaux cimentaires**

Les aluminates hydratés sont sensibles à la carbonatation. Des études (notamment Sauman et Lach, 1972) indiquent qu'ils se carbonatent en produisant des carbonates de calcium, des hydroxydes d'aluminium et de l'eau.

La carbonatation de l'ettringite et du monosulfoaluminate de calcium produit du gypse qui est très soluble dans l'eau et très réactif. Si les produits de la carbonatation se trouvent en présence de portlandite et d'eau, il peut se reformer de l'ettringite à partir des aluminates et du gypse libéré lors de la carbonatation.

### **2.1.4. Aspect morphologique, cristallographiques et chimiques des carbonates de calcium formés**

Différentes phases cristallines de carbonates de calcium sont identifiées dans les matériaux cimentaires carbonatés : la calcite, la vaterite et l'aragonite. Ces trois formes ont bien la même formule chimique  $\text{CaCO}_3$ , mais elles sont distinctes sur le plan cristallographique : la calcite est rhomboédrique, l'aragonite est orthorhombique, et la vaterite hexagonale. De plus, la morphologie des précipités est très différente : les précipités de calcite s'apparentent à des macrocristaux cubiques dont la taille est de l'ordre du micromètre tandis que les précipités de vaterite et aragonite sont de taille plus petite et de forme plutôt sphérique (Hostomsky et Jones, 1991 ; Tai et Chen, 1998 ; Thiery, 2005).

Thiery (2005) a montré dans ses travaux par analyse ATG – ATD d'échantillons de pâtes de ciment carbonatées que la formation de calcite proviendrait essentiellement de la carbonatation de gros cristaux de  $\text{Ca(OH)}_2$ , alors que la vaterite, l'aragonite et les carbonates amorphes seraient produits après carbonatation des C-S-H. La présence de  $\text{CaCO}_3$  métastable (vaterite et aragonite) dans la zone carbonatée semble être caractéristique des tests de carbonatation accélérée (Thiery et al., 2007).

### **2.1.5. Effet de la carbonatation sur la microstructure**

Les produits de carbonatation ont un volume molaire supérieur aux hydrates initiaux ( $\text{Ca(OH)}_2$  et C-S-H), on s'attend donc à une diminution de la porosité (Tableau 2).

Mineral	Density (g cm <sup>-3</sup> )	Molar volume (cm <sup>3</sup> )	Crystal shape	Variation of volume (%)
Portlandite	2.23	33.20	Laminar	-
Calcite	2.71	36.93	Prismatic	11.2
Aragonite	2.93	34.16	Fibrous	2.9
Vaterite	2.54	39.40	Spherical	18.7

**Tableau 2 : Propriétés des minéraux impliqués dans la carbonatation (Arandigoyen et al., 2006)**

Ngala et Page (1997) ont étudié les effets de la carbonatation sur la structure poreuse et les propriétés de diffusion de pâtes de ciment hydratées. La réduction du volume poreux total est observée, et peut être associée au dépôt de CaCO<sub>3</sub> formé pendant la carbonatation. Ils observèrent également une redistribution de la taille des pores pour les éprouvettes partiellement séchées avant carbonatation : augmentation de la proportion de larges pores ( $\varnothing > 30\text{nm}$ ) sans changement notable du volume poreux total.

Les travaux de Thiery et al. (2007) ont montré que la carbonatation de matériaux cimentaires à base de ciment Portland ordinaire conduisait à une réduction importante du volume poreux. En revanche, les matériaux à base de ciment Portland avec ajouts minéraux (fumées de silices, cendres volantes, laitier de haut-fourneau) ont un comportement différent : la carbonatation conduit à une augmentation de la porosité.

### 2.1.6. Essais de carbonatation accélérée

Pour l'étude et la modélisation de la carbonatation sur les matériaux cimentaires des essais accélérés de carbonatation ont été développés par plusieurs auteurs. Nous décrivons ici les principaux essais de carbonatation accélérée mis en œuvre.

#### 2.1.6.1. Paramètres influant sur la carbonatation

##### ➤ Influence du rapport E/C

Le rapport E/C a une influence considérable sur l'interconnexion du réseau poreux et par conséquent la perméabilité du béton et sur la diffusivité des espèces gazeuses ou ioniques en son sein (Chaussadent, 1997). Papadakis *et al.* (1992) montrent que la profondeur de carbonatation double lorsque le rapport passe de 0,5 à 0,8. La cinétique de carbonatation dépend de la résistance mécanique du béton. Un des paramètres influant sur cette résistance est bien entendu le rapport E/C et la porosité qui en dépend.



➤ Influence de l'humidité relative

On sait que la vitesse de carbonatation est maximale pour des humidités relatives comprises entre 50 et 65%. Il est en effet nécessaire d'avoir une certaine quantité d'eau pour dissoudre le gaz carbonique mais cette quantité doit être limitée pour que l'accès à la surface solide par diffusion (la diffusion en phase liquide est  $10^4$  fois inférieure à la diffusion en phase gazeuse), et par conséquent la carbonatation soient effectives (Chaussadent, 1997).

➤ Pré-conditionnement des échantillons

La migration du  $\text{CO}_2$  dans les bétons et les cinétiques des réactions chimiques entre les ions carbonates et les différents minéraux de la matrice cimentaire sont très dépendantes de la teneur en eau du béton, du taux de saturation des pores et de l'humidité relative du milieu extérieur. L'état hydrique du béton des corps d'épreuve au démarrage de l'essai de carbonatation, comme l'humidité relative du mélange gazeux pendant toute la durée de l'essai, sont donc des facteurs déterminants pour l'évolution des profondeurs de carbonatation en fonction du temps. Le pré-conditionnement intervient à l'issue de la phase de conservation des corps d'épreuve en salle humide et avant le démarrage de l'essai de carbonatation accélérée. Il doit permettre de désaturer, dans des conditions reproductibles, la surface des bétons, afin que la carbonatation puisse avoir lieu. Un type de pré-conditionnement, qui peut être mis en œuvre, fixe la durée de séchage quel que soit le type de béton. Au démarrage de l'essai de carbonatation accélérée, l'état hygroscopique des bétons peut donc varier en fonction de la microstructure du matériau. Néanmoins, la simplicité de ce pré-conditionnement est telle qu'elle permet d'assurer une bonne reproductibilité pour une durée d'utilisation faible (Rougeau, 1997).

***2.1.6.2. Protocole de carbonatation utilisé par Ngala et Page (1997)***

Avant carbonatation, les éprouvettes sont conservées pour séchage dans un dessiccateur où l'humidité relative est régulée à 65% par une solution saturée de nitrite de sodium. Elles sont ensuite placées dans un container étanche dans lequel l'humidité relative est régulée par une solution saturée de nitrite de sodium. Chaque jour, les éprouvettes sont soumises à un balayage d'un mélange gazeux : 5%  $\text{CO}_2$ , 95%  $\text{N}_2$  pendant 30 minutes. La profondeur de carbonatation est mesurée par pulvérisation d'une solution de phénolphthaléine sur des fractures fraîches d'éprouvettes.

***2.1.6.3. Essai de carbonatation accélérée développé par l'Association Française Pour la Construction et l'Association Française de Recherche et d'Essais sur les Matériaux et les constructions (AFPC – AFREM) – Rougeau (1997)***

Les corps d'épreuves de béton (70 x 70 x 280 mm) après démoulage subissent une cure en ambiance humide (humidité relative supérieure à 95% ou dans l'eau) pendant 28 jours. Ils sont ensuite placés dans une étuve réglée à une température de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant deux jours. A cette température, l'impact sur les hydrates de la matrice cimentaire et donc de la microstructure est faible. Les corps d'épreuves sont placés dans une enceinte dans laquelle l'humidité relative est régulée à 65% à l'aide de solutions salines, et la teneur en  $\text{CO}_2$  est de 50%. La profondeur de carbonatation est mesurée par pulvérisation d'une solution de phénolphthaléine sur des fractures fraîches d'éprouvettes pour différentes échéances : 7, 14 et 28 jours.

***2.1.6.4. Essai de carbonatation accélérée développé au Laboratoire Central des Ponts et Chaussées (LCPC) – Thiery (2005)***

Le principe de carbonatation accélérée consiste à introduire du dioxyde de carbone dans une enceinte à humidité relative et température contrôlées dans laquelle sont placés des échantillons de bétons et de pâtes de ciment. A certaines échéances (généralement 3, 7, 14, 28, et 58 jours) les échantillons sont retirés de l'enceinte et pesés. A partir du fendage de deux éprouvettes, la profondeur de carbonatation est mesurée sur fractures fraîches à l'aide d'un indicateur coloré de pH. D'autres échantillons sont prélevés pour des essais complémentaires d'obtention de profils.

Les échantillons subissent un prétraitement avant la carbonatation : les bétons sont placés à l'étuve à  $45^\circ\text{C}$  pendant 1 mois, puis un mois dans une chambre de dessiccation où règne la même humidité relative que celle qui est utilisée pour la carbonatation, c'est-à-dire  $53 \pm 5\%$ . Pour les pâtes de ciment, le séchage à  $45^\circ\text{C}$  n'a pas lieu, les éprouvettes sont directement placées dans la chambre de dessiccation, pour une durée pouvant dépasser les 12 mois. Les échantillons sont ensuite placés dans l'enceinte de carbonatation. L'humidité relative est régulée à  $53 \pm 5\%$  par une solution saline saturée de nitrate de magnésium. L'ensemble du dispositif est placé dans une salle de laboratoire dont la température est maintenue à  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Une sonde thermohygro-métrique enregistre la température et l'humidité relative régnant dans l'enceinte. La profondeur de carbonatation est suivie par : (i) pulvérisation de phénolphthaléine

sur des fractures fraîches de béton ou de pâtes de ciments, (ii) gammadensimétrie, (iii) le suivi de la masse des échantillons (iv) l'analyse thermogravimétrique (ATG) complétée par l'analyse chimique (AC).

## 2.2. La lixiviation des matrices cimentaires

Lorsque les matériaux cimentaires sont mis dans un milieu agressif comme une eau déionisée ou faiblement minéralisée, il se produit plusieurs phénomènes physiques et chimiques complexes, des réactions chimiques, des processus de dissolution et un échange avec l'environnement. L'ensemble de ces phénomènes est généralement regroupé sous le nom de lixiviation (Nguyen, 2005).

La cinétique de lixiviation dépend fortement du ratio E/C de la pâte de ciment et de la solution lixiviante ; l'eau pure est plus agressive que l'eau minéralisée carbonatée. Ainsi, une eau minéralisée carbonate la surface, diminue la cinétique de lixiviation et modifie la profondeur de lixiviation, qui est 5 fois moins importante que celle obtenue dans l'eau pure (Moranville et al., 2004). Haga et al. (2005) ont montré que plus le volume poreux est grand, plus la dissolution de la portlandite est rapide.

D'un point de vue thermodynamique la lixiviation de matériaux à base de ciment Portland est un processus complexe, dû à la diminution du pH, et gouverné par la combinaison de processus de dissolution et précipitation tels que (Hidalgo et al., 2007) :

- La dissolution de la portlandite,
- La décalcification des C-S-H,
- La polymérisation des silicates,
- L'incorporation d'aluminium tétraédrique et/ou hexagonal dans un gel polymère, ce qui aboutit à la formation d'un aluminosilicate.

### 2.2.1. Influence de la lixiviation sur la porosité

Au cours de la lixiviation, la dissolution des hydrates et notamment de la portlandite, entraîne une augmentation importante de la porosité (de 14 à 35%) dû essentiellement à une augmentation de la porosité capillaire (pores de diamètre compris entre 36 et 380 000 nm) dont la proportion passe de 1,4 à 25% (Adenot, 1992). La dissolution sélective du calcium des

C-S-H provoque des modifications au niveau de la microporosité (inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ ) (Bishop, 1992 ; Gervais 1999).

### 2.2.2. Dissolution de la portlandite

Lors de la lixiviation, un processus de dissolution et de transfert des espèces chimiques est enclenché pour atteindre un nouvel équilibre. La concentration des espèces basiques dans la phase aqueuse des pores ainsi que son pH s'abaissent. Ces variations sont régulées par la présence simultanée de nombreux hydrates du ciment, c'est l'effet tampon. La portlandite est le premier hydrate à jouer un rôle dans les réactions de neutralisation (Gervais, 2004). Cet hydrate peut se dissoudre, pour générer des  $\text{OH}^-$ , ou inversement précipiter pour consommer les  $\text{OH}^-$  en excès. Une solution contenant de la portlandite est donc capable de réguler son pH ( $\sim 12,4$ ). Ce pouvoir tampon constitue un mécanisme régulateur important. Ensuite, lorsqu'une partie de la portlandite a déjà été lixiviée, les silicates et les aluminates, moins solubles, se décomposent progressivement (Gervais, 2004).

### 2.2.3. Décalcification des C-S-H

La décalcification des pâtes de ciment est étroitement associée à la lixiviation ; certains auteurs ont indiqué que, pour un matériau cimentaire, la décalcification des C-S-H se produit jusqu'à atteindre une valeur constante du rapport Ca/Si (Thomas et al., 2004, Harris et al., 2002). Comme dans les argiles, l'aluminium des C-S-H peut se substituer soit dans les sites octaédriques du calcium, soit dans les sites tétraédriques du silicium (Hidalgo et al., 2007). La génération de particules colloïdales Ca-Al-Si à partir de pâte de ciment hydratée a récemment été observée par MET (Fujita et al., 2003). Hidalgo et al. (2007) ont montré que la lixiviation de pâtes à base de ciment Portland produit une structure géopolymère proche de celle des zéolithes artificielles. Ces structures C-A-S-H sont constituées d'un motif polymère Si-O-Al, similaire à celui trouvé dans les zéolithes, et peuvent être considérés comme des précurseurs de zéolithes.

A cause de l'échelle nanométrique de la structure poreuse interne des C-S-H et de la nature hétérogène des pâtes de ciment, il est expérimentalement difficile de séparer les effets individuels des différentes phases du ciment sur les propriétés des pâtes de ciment (Chen et al., 2006). Néanmoins, Constantinides et Ulm (2004) trouvèrent que le module élastique des

pâtes de ciment mesuré par nano-indentation diminue plus sévèrement avec la décalcification des C-S-H qu'avec la dissolution de la portlandite.

#### **2.2.4. Profil de dégradation des matrices cimentaires lixiviées**

Faucon et al. (1998) ont montré que la lixiviation de pâtes de ciment par de l'eau déminéralisée produisait un gradient de la concentration en calcium qui diminue continuellement de la zone non altérée à la surface du matériau. Ce gradient est responsable du développement d'une zone dégradée dans la pâte de ciment et de la diffusion du calcium de la solution interstitielle vers la solution lixiviante. La diminution de la concentration en calcium dans cette zone induit la dissolution de la portlandite, et des précipitations secondaires (AFm, ettringite, calcite) dans la partie plus interne de la zone dégradée. Ces précipités se dissolvent dans les parties les plus externes de la zone dégradée. La progression du front de dissolution vers le cœur du matériau est régie par la cinétique de diffusion. Ainsi, dans la zone proche de l'interface solide/solution de lixiviation, la portlandite peut être complètement dissoute, et les C-S-H partiellement décalcifiées, alors que dans la zone adjacente (quelques centaines de micromètres de la surface), la portlandite peut être intacte (Gervais, 2004).

#### **2.3. Lixiviation de matrices cimentaires carbonatées**

La lixiviation et la carbonatation sont largement étudiées mais séparément. Peu de travaux dans la littérature font référence à la lixiviation de matrices cimentaires carbonatées. Nous pouvons citer néanmoins les travaux de Gervais (2004) et Van Gerven et al (2004, 2007).

Les travaux de Gervais (2004) montrent que la carbonatation préalable des bétons modifie fortement le relargage du calcium : après 6000 heures de lixiviation, la quantité de calcium relarguée est 5 fois moins importante si le béton est carbonaté. L'auteur explique ce phénomène par la fixation du calcium sous forme de carbonate de calcium, suite à la carbonatation du matériau. En effet, le carbonate de calcium est beaucoup moins soluble que la portlandite : sa solubilité dans l'eau à 25°C est de 15 mg/l alors que celle de l'hydroxyde de calcium est de 1185 mg/l (valeur à 0°C). De plus, la lixiviation en continu à l'eau déminéralisée d'un béton carbonaté se traduit par une inhibition, dans la première période, du relargage du calcium, apparemment compensée par un relargage plus important en sodium et en potassium.

Van Gerven et al (2007) montrent que la carbonatation et la lixiviation diminuent la quantité de pores capillaires. Selon les auteurs, la carbonatation affecte la lixiviation à 3 niveaux : diminution de la porosité, diminution du pH, et transformation des hydroxydes en carbonates. La diminution de la porosité diminue la lixiviation du sodium et du potassium, alors que la diminution du pH augmente la lixiviation. L'effet de la porosité est cependant plus important que celui du pH, ce qui résulte en une nette diminution de la lixiviation due à la carbonatation.

### 3. Conclusion

Ce chapitre nous a permis de voir que la matrice cimentaire est un système complexe, qui réagit avec son environnement. Les points qui nous intéressent plus particulièrement pour la suite de notre étude sont les suivants :

- Les pâtes de ciment hydratées sont des matériaux fortement basiques, pH~13, qui sont principalement composées par les C-S-H, la portlandite, la série des aluminates.
- La carbonatation accélérée de la portlandite conduit à la formation de calcite, celle des C-S-H à la formation d'aragonite et de vaterite, ce qui se traduit par une diminution du pH et de la porosité.
- La lixiviation des matrices cimentaires provoque la dissolution de la portlandite et la décalcification des C-S-H, ce qui conduit à une diminution du pH et une augmentation de la porosité.
- La carbonatation préalable de matériaux cimentaires ralentit leur lixiviation.

## DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

La mise au point du test accéléré de laboratoire pour étudier la biodétérioration d'une matrice cimentaire nécessite une approche multidisciplinaire, prenant en compte les interactions entre les différents compartiments du système « **M**atrice – **M**icro-organismes – **M**ilieu », les 3M (Figure 12).

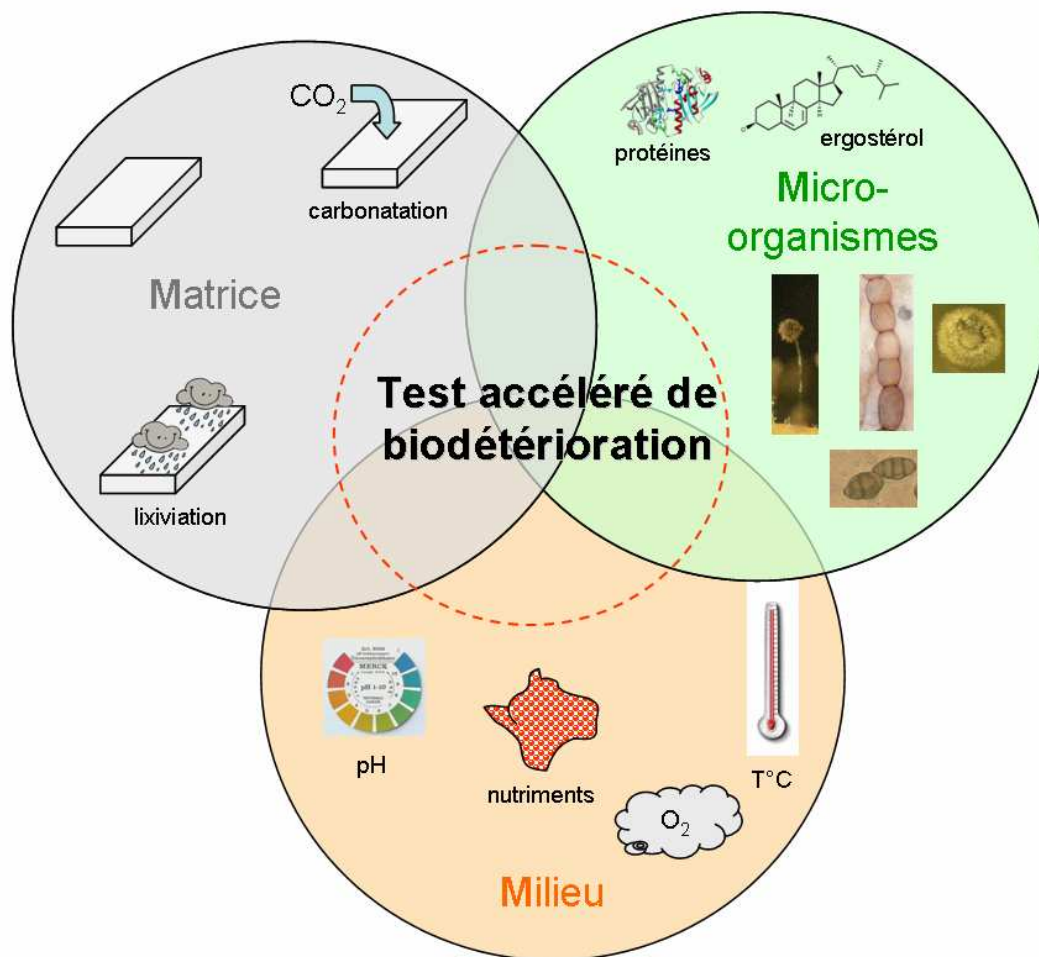
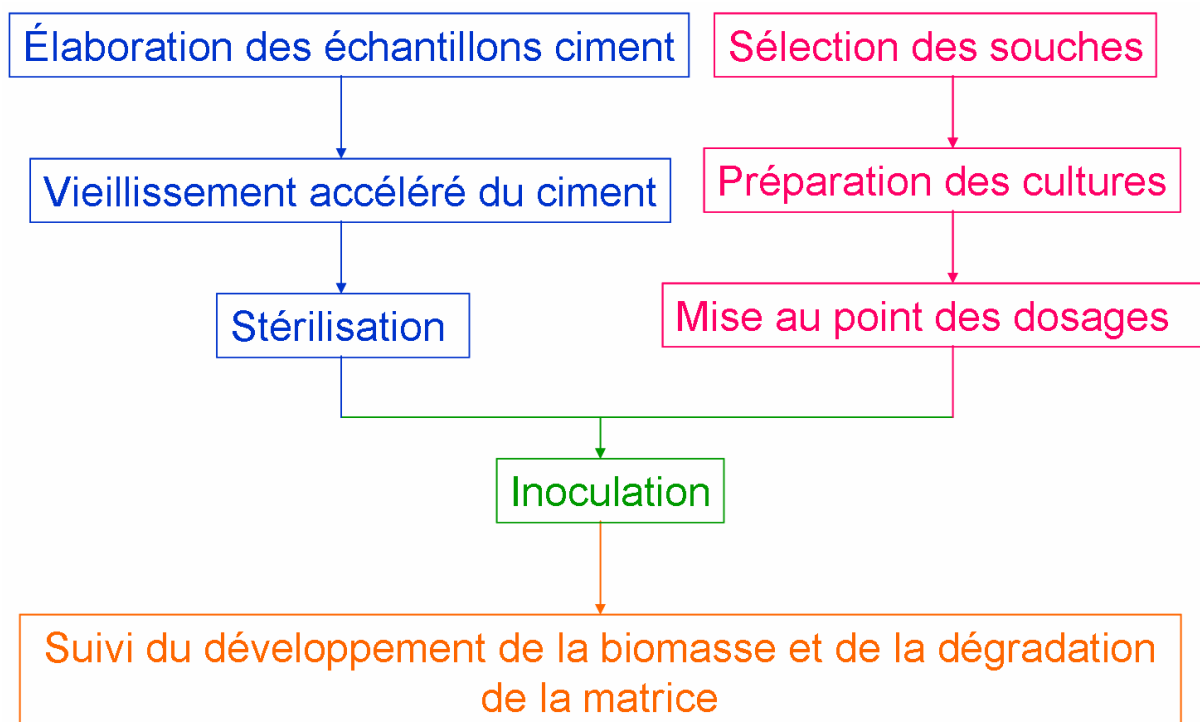


Figure 12 : Représentation schématique du système considéré pour l'étude de la biodétérioration

L'étude du système des 3M a été proposée par Damien Féron, pour l'étude de la biocorrosion. Dans ce cas les micro-organismes étaient des bactéries, la matrice des aciers, et le milieu des

eaux naturelles, aérées, ou milieu anaérobie.... La biocorrosion est une forme de biodétérioration, cette approche qui souligne le coté pluridisciplinaire de la biodétérioration peut donc être transposable à notre étude.

Dans un premier temps nous considérons séparément la préparation de la matrice et des micro-organismes. La démarche expérimentale adoptée peut être schématisée de la façon suivante :



En ce qui concerne la matrice, nous avons choisi de travailler avec une pâte de ciment, qui nous permettra par la suite d'étudier des systèmes plus hétérogènes tel que le béton. Le pH de surface d'une pâte de ciment fraîche est de l'ordre de 12-13. Afin d'accélérer le développement fongique, nous procédons à un vieillissement accéléré de la matrice pour diminuer ce pH de surface. Les modes de vieillissement étudiés sont la carbonatation et la carbonatation couplée à la lixiviation des éprouvettes en ciment. La confection des éprouvettes ainsi que la mise au point de l'essai de carbonatation accéléré se déroulent au département Génie Civil de l'Ecole des Mines de Douai. L'étude de la lixiviation des éprouvettes carbonatées est réalisée au centre SPIN – département PMMC de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne.



Concernant les micro-organismes, cette étude porte sur la biodétérioration par les champignons. Nous avons sélectionné 4 souches fongiques appartenant à chaque catégorie de champignon que l'on retrouve impliqué dans la biodétérioration : *Alternaria alternata* pour représenter un Hyphomycète producteur de mélanine, *Aspergillus niger* pour un Hyphomycète acidogénique, *Exophiala* sp. pour un « yeast like fungi », *Coniosporium uncinatum* pour un champignon méristématique.

Une attention particulière est portée à l'étude des paramètres physico-chimiques pouvant accélérer le développement fongique, avant inoculation sur milieu de culture mais aussi pendant le test de biodétérioration sur la matrice cimentaire.

Dans un second temps, nous avons mis au point deux dosages biochimiques pour quantifier la biomasse : le dosage de l'ergostérol et le dosage des protéines.

Cette partie de l'étude est réalisée au département PPMC de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne.

Enfin, nous étudions le développement fongique sur la matrice cimentaire. Cette partie de l'étude est dédiée à la mise en place du test de laboratoire proprement dit, avec la détermination du dispositif expérimental. Divers modes d'inoculation et d'incubation sont testés. Les observations au microscope (optique, stéréomicroscope, électronique à balayage) pendant et après le test, la coloration des échantillons par le réactif de Schiff en fin de test permettent d'étudier l'interaction entre les champignons et la matrice mais aussi d'estimer l'étendue de la colonisation microbienne sur et dans la matrice.

Les premiers essais sont réalisés avec *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger* au département PPMC de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne. La phase finale de la mise au point du test accéléré de biodétérioration avec les quatre souches se déroule au département des Sciences Microbiologiques, Génétiques et Moléculaires au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Environnement et Appliquée aux Ouvrages d'Art de l'Université de Messine (Sicile).

## CHAPITRE IV : MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. La matrice cimentaire

#### 1.1. Confection et conservation des éprouvettes

##### 1.1.1. Détermination du rapport Eau/Ciment (E/C)

La première étape dans la préparation des éprouvettes a été de déterminer le rapport E/C de travail. Ce premier point est important pour la suite de l'étude car le rapport E/C détermine la porosité capillaire de la pâte de ciment : plus ce rapport est élevé, plus la porosité capillaire est importante, mais aussi plus la pâte de ciment est liquide avec un ressuage\* important. Plusieurs éprouvettes de pâtes de ciment sont coulées avec différents rapports E/C dans des moules cylindriques en plastique transparent. Nous avons noté dans chaque cas le ressuage de l'eau, et la texture de la pâte (+/- liquide). Il est apparu que le meilleur compromis est obtenu pour un rapport E/C=0,55. C'est avec cette valeur que nous travaillerons par la suite.

##### 1.1.2. Confection des éprouvettes

Dans un premier temps, des éprouvettes de deux tailles différentes ont été confectionnées.



Les essais réalisés pour la mise au point de l'essai de carbonatation accélérée (cf. annexe F) ont montrés que la carbonatation était plus homogène et rapide pour les petites éprouvettes. L'étude est donc réalisée avec les petites éprouvettes.

---

\* Ressuage : remontée d'eau à la surface d'un coulis de ciment, d'un mortier ou d'un béton après la mise en place.

Le ciment est mélangé à l'eau dans un malaxeur 4 litres, 1 minute à petite vitesse, puis après homogénéisation de la pâte manuellement, 2 minutes à grande vitesse. Les moules sont ensuite remplis à moitié, placés sur table à vibrations pendant 30 secondes, puis complétés. Après arasage de la surface, un film plastique est placé sur les moules pour éviter les contacts avec l'air.

### 1.1.3. Conservation des éprouvettes

Les éprouvettes sont démoulées après 24 heures, puis conservées 28 jours à 100% d'humidité relative et à 21°C. Elles sont ensuite emballées individuellement sous film plastique de polyéthylène afin d'éviter les contacts avec l'air, avant leur utilisation.

## 1.2. Vieillessement accéléré

### 1.2.1. La carbonatation

Le dispositif expérimental est placé dans une pièce fermée où la température est réglée à  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , l'humidité relative est de  $65\pm 5\%$ . Le montage se compose principalement de 3 parties (Figure 13) :

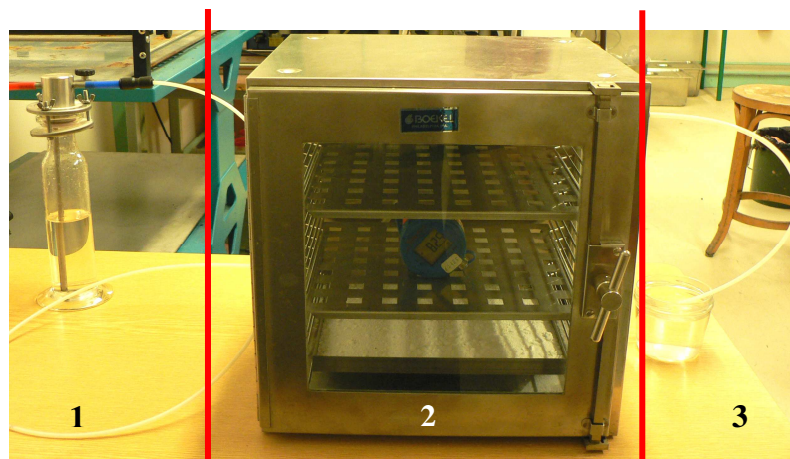


Figure 13 : Dispositif expérimental pour l'essai de carbonatation accélérée

- le premier compartiment est constitué par le barboteur : son rôle est de faire buller le gaz ( $\text{CO}_2$ ) dans l'eau avant l'entrée dans l'enceinte afin de pouvoir réguler le débit et amener une certaine humidité.

- l'enceinte compose la seconde partie du montage : c'est un dessiccateur (30 x 30 x 25 cm<sup>3</sup>), partagé en 3 étages. Les deux étagères supérieures sont destinées à recevoir les éprouvettes pendant l'essai, l'étagère inférieure constitue le réservoir de solution saline. Un hygromètre est placé à l'intérieur de l'enceinte, et permet d'obtenir un enregistrement de l'évolution de l'humidité relative et de la température au cours de l'essai.
- enfin, la dernière partie, constituée d'un tuyau plongeant dans l'eau, assure la sortie du gaz. Le bullage de sortie nous renseigne sur le balayage à l'intérieur de l'enceinte.

Le bullage de CO<sub>2</sub> dans l'eau provoque un apport en continu d'humidité dans l'enceinte. Une solution saline de carbonate de potassium : K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Normapur AR) est utilisée afin de réguler l'humidité relative à une valeur proche de 65% à l'intérieur de l'enceinte :

Les éprouvettes subissent un prétraitement et sont placées 24 heures dans une enceinte à 40°C avant l'essai de carbonatation accélérée.

La profondeur de carbonatation est mesurée au moyen d'un indicateur de pH, la phénolphthaléine, dont le pH de virage se situe autour de 9. La matrice cimentaire non carbonatée se colore en rose tandis que la partie carbonatée ne change pas de couleur.

### 1.2.2. La lixiviation

Le dispositif expérimental est composé d'un bac en polypropylène d'une contenance de 10 litres (Figure 14). Le bac est alimenté en continu par de l'eau distillée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (Ismatec labortechnik analytik ISM 834), le débit est réglé à 7 ml/min ce qui représente un renouvellement total de la solution lixiviante du bac en 24 heures. Trois éprouvettes 1 x 2,5 x 8,5 cm<sup>3</sup> sont placées dans le bac, elles sont retournées à intervalle de temps régulier, afin d'homogénéiser la lixiviation. La solution lixiviante est agitée en permanence avec un agitateur magnétique placé au fond du bac. Une électrode pH mesure le pH de la solution lixiviante en continu. Toutes les semaines, les éprouvettes sont retirées du bac, et le pH de surface est mesuré avec une électrode de contact Sentix Sur, pour avoir des données plus précises sur l'évolution du pH de la matrice.

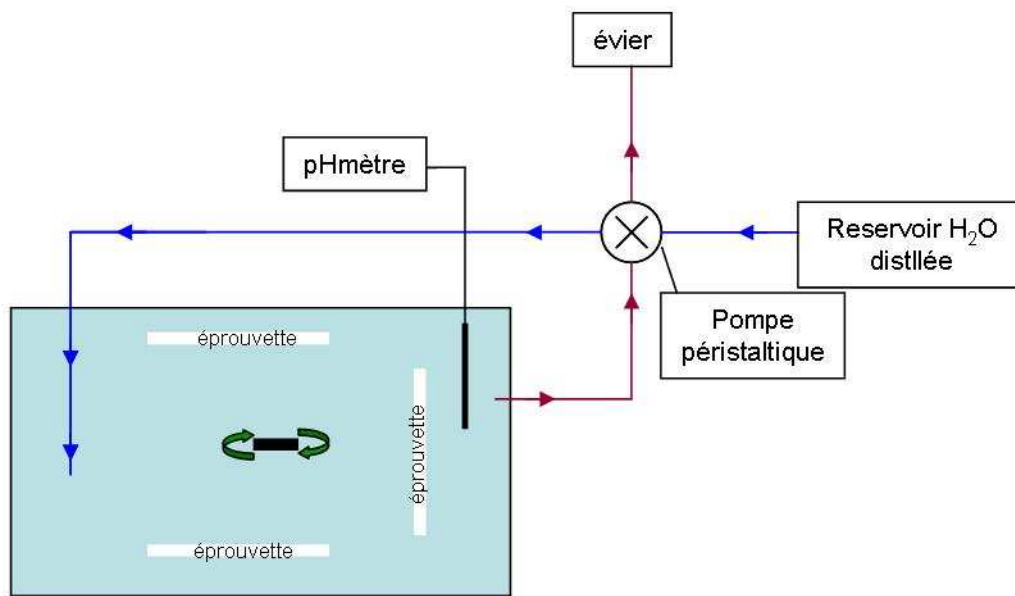


Figure 14 : Dispositif expérimental pour l'essai de lixiviation

### 1.3. Techniques analytiques

#### 1.3.1. Diffractométrie des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X permet l'analyse non destructive d'échantillons cristallisés. L'interaction d'un faisceau de rayons X avec la matière donne naissance à une émission dans toutes les directions d'un rayonnement de même longueur d'onde et de phase cohérente. La diffusion d'un ensemble d'atomes, entraîne une interférence des ondes cohérentes diffusées par chaque atome (Broll, 1996). Cette onde, dite diffractée, dépend de la structure atomique de la matière. La direction du faisceau diffracté est donnée par la loi de Bragg :

$$n\lambda = 2.d.\sin\theta$$

$n$  = ordre de diffraction

$\lambda$  = longueur d'onde du rayonnement diffracté

$d$  = distance interréticulaire séparant deux plans de même famille (h, k, l)

La diffractométrie des rayons X est réalisée sur un appareil Bruker D8 advance. On utilise la raie K $\alpha$ 1 du cuivre ( $\lambda = 0,15406$  nm). Le dispositif comprend une anticathode de cuivre et un détecteur ponctuel. L'analyse se fait sur une plage  $2\theta$  allant de 5 à 59°. Les analyses sont

effectuées sur les échantillons massifs de ciment hydraté après une cure de conservation de 28 jours à 100% HR, les éprouvettes carbonatées, les éprouvettes carbonatées et lixiviées.

### 1.3.2. Spectrométrie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF)

En spectrométrie infrarouge, les rotations et les vibrations moléculaires sont le résultat de l'absorption d'un rayonnement électromagnétique dans le domaine de l'infrarouge. La position d'une bande d'absorption est donnée par la longueur d'onde  $\lambda$ .

La longueur d'onde  $\lambda$  peut être convertie en nombre d'onde  $\bar{\nu}$  par la formule :

$$\bar{\nu} (\text{cm}^{-1}) = 1/\lambda (\mu\text{m})$$

La région normale d'un spectre infrarouge s'étend de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Energie et nombre d'onde sont liés par la loi de Planck :

$$\Delta E = h.c. \bar{\nu}$$

$h$  = constante de Planck ;

$\Delta E$  = différence entre deux niveaux d'énergie (électronique, vibrationnels ou rotationnels) caractérisés par des nombres quantiques différents.

$c$  = vitesse de propagation de la lumière

L'appareil est un spectromètre à transformée de Fourier BIORAD FTS 185 (digilab). Les échantillons de ciment non vieillis, carbonatés, et carbonatés puis lixiviés sont analysés en mode Réflexion Totale Atténuée (ATR) (cf. Annexe G). Les spectres sont enregistrés avec une résolution de 2  $\text{cm}^{-1}$  et avec 32 scans.

### 1.3.3. Fluorescence X

L'analyse par fluorescence X permet de déterminer quantitativement la teneur en éléments exprimée en équivalent d'oxydes du ciment de l'étude (Tableau 3).

Oxydes	Teneur
%SiO <sub>2</sub>	21,84
% Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,13
% Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,28
% CaO	65,82
% MgO	0,61
%SO <sub>3</sub> Leco	2,56
% MnO	0,001
% TiO <sub>2</sub>	0,2
% K <sub>2</sub> O	0,11
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,07
% Na <sub>2</sub> O	0,04

**Tableau 3 : Composition chimique en équivalent d'oxydes du ciment anhydre utilisé pour l'étude**

A partir de la teneur en oxydes, la formule de Bogue est une approximation qui permet de remonter avec précision aux concentrations relatives des phases en présence. Toutefois, cette approximation parfaitement exacte dans le cas du clinker nécessite une correction pour être valable dans le cas du ciment. En effet, il faut tenir compte du CaO présent dans la chaux libre et le gypse. Ainsi, un facteur correctif est appliqué à la teneur en CaO expérimentale, en déduisant 0,7 fois la teneur en SO<sub>3</sub> pour obtenir la teneur en CaO corrigée (Tableau 4).

$$C_3S = 4,0710 C - 7,6024 S - 1,4297 F - 6,7181 A$$

$$C_2S = -3,0710 C + 8,6024 S + 1,0785 F + 5,0683 A$$

$$C_3A = -1,6920 F + 2,6504 A$$

$$C_4AF = 3,0432 F$$

Phases	teneur après correction
% C <sub>3</sub> S	66,47
% C <sub>2</sub> S	12,48
% C <sub>3</sub> A	10,47
% C <sub>4</sub> AF	0,85

**Tableau 4 : Formule de Bogue et teneur des phases du ciment anhydre utilisé pour l'étude**

### 1.3.4. Pycnométrie à hélium

La densité d'éprouvettes non-vieilles, carbonatées, et carbonatées puis lixiviées est déterminée par pycnométrie à hélium. L'appareil utilisé est un AccuPyc 1330 Micromeritics. Le pycnomètre permet de déterminer le volume d'un matériau donné. Connaissant sa masse, on en déduit sa masse volumique. Le principe du pycnomètre à hélium repose sur la loi de Mariotte. Un échantillon de volume  $V_s$  est placé dans une cellule de mesure de volume  $V_1$  connu (Figure 15).

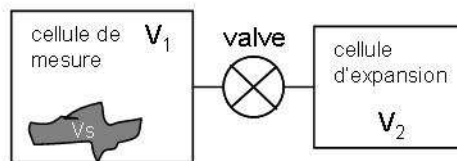


Figure 15 : Schéma simplifié du pycnomètre

Après avoir purgé l'air de cette cellule, on la remplit de gaz (hélium). Lorsque la pression est stabilisée à la valeur  $P_1$ , on opère alors une détente, par l'ouverture d'une vanne, dans une deuxième cellule de volume  $V_2$  initialement vide puis on attend l'équilibre. Lorsque celui-ci est atteint, on mesure la nouvelle valeur  $P_2$  de la pression. En considérant le gaz comme un gaz parfait, il est facile de montrer que le volume  $V_s$  du solide que l'on a introduit dans la cellule est donné par (1) :

$$V_s = V_1 - \frac{V_2 \cdot P_2}{P_1 - P_2} \quad (1)$$

### 1.3.5. Porosimétrie par intrusion de mercure

Cette technique repose sur le principe que tout liquide non mouillant peut pénétrer dans les pores d'un corps poreux sous l'effet d'une pression  $p$  sur ce liquide ; la pression doit être d'autant plus élevée que le rayon de pore  $r$  est petit, obéissant à l'équation de Washburn et Jurin (2) :



$$p = \frac{-2 \gamma \cos \theta}{r} \quad (2)$$

$\gamma$  = tension superficielle du liquide (480 dynes/cm pour le mercure)

$\theta$  = angle de mouillage du liquide avec le matériau (130° pour le mercure)

Parmi les liquides non mouillants, le plus utilisé est le mercure. L'intérêt de cette méthode est de pouvoir établir un histogramme de distribution des diamètres d'accès des pores (Charpin et Rasneur, 1983 ; Girodet, 1996).

### **1.3.6. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

#### ***1.3.6.1. Observation des éprouvettes en ciment***

Des éprouvettes non-vieillies, carbonatées, et carbonatées puis lixiviées sont cassées. Après une métallisation à l'or, les échantillons correspondant à la surface des éprouvettes sont observés au MEB conventionnel JEOL 840 à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

#### ***1.3.6.2. Observations de sections polies***

Les sections polies d'éprouvettes non-vieillies, carbonatées, et carbonatées puis lixiviées sont préparées par imprégnation sous vide dans une résine époxy. Elles sont réalisées par Patrick Dégrugilliers au Département Génie Civil de l'Ecole des Mines de Douai. Après métallisation par une couche d'or/palladium, les sections polies sont observées au MEB JEOL 840 couplé à une sonde d'analyse X à dispersion d'énergie (EDS). La microanalyse X permet une analyse élémentaire, par détection des raies caractéristiques des éléments en présence. Elle permet des analyses ponctuelles avec une résolution spatiale de l'ordre de  $1 \mu\text{m}^3$ . Elle est qualitative et quantitative. Nous dosons les éléments suivants : le silicium, le calcium, l'aluminium et le soufre au cœur et en superficie de nos échantillons. Les observations MEB couplées à l'analyse EDS nous permettent de suivre l'évolution de la microstructure et de la composition chimique de la matrice avec le vieillissement accéléré.

### ***1.3.6.3. Préparation des échantillons biologiques***

Les échantillons biologiques contiennent beaucoup d'eau ainsi que d'autres liquides. Dans le vide du microscope, cette eau va s'évaporer violemment et la structure de l'échantillon va s'effondrer. Pour remédier à cet inconvénient, les échantillons hydratés doivent subir un traitement de fixation suivi d'une étape de déshydratation. Nos échantillons sont préparés selon le protocole proposé par Urzì et Albertano (2001) : les échantillons sont fixés chimiquement dans une solution de paraformaldéhyde 2% (m/v) toute la nuit à 4°C. Ils sont ensuite rincés trois fois dans un tampon phosphate 0,01M pendant 10 minutes. La déshydratation est réalisée en plongeant les échantillons dans des solutions d'éthanol de plus en plus concentrées : 70%, 85%, et 95% (v/v) puis dans l'éthanol anhydre (100%), 15 minutes dans chaque. Les échantillons sont ensuite séchés à l'air avant la métallisation à l'or/palladium. Les observations sont réalisées au MEB conventionnel, et pour certains échantillons, au MEB équipé d'un canon à émission de champ (FEG : Field Emission Gun).

### **1.3.7. Microscopie optique, et stéréoscopique**

Pendant le test de biodétérioration, les éprouvettes sont directement observées au stéréomicroscope Wild Heerbrugg M8 à l'École des Mines de Saint-Etienne, et avec un Leica Wild M10 à l'Université de Messine, avec des grossissements compris entre 6 et 80.

Des montages entre lame et lamelle de prélèvements de culture fongique sont réalisés afin d'observer la morphologie des souches, durant leur développement sur milieu de culture, au microscope optique (Olympus - BH<sub>2</sub>).

### **1.4. La stérilisation des éprouvettes**

La manipulation de micro-organismes nécessite certaines mesures de sécurité, comme le travail sous hotte à flux laminaire, ou encore à proximité d'une flamme, ayant pour but d'éviter toutes sources de contamination de la culture, mais également de l'environnement de travail. Il est donc nécessaire de stériliser tout matériel et objet faisant partie de l'expérimentation.

Le but de la stérilisation d'un objet est la destruction ou l'inactivation irréversible de tous les micro-organismes qui se trouvent dans ou sur cet objet. Etant donné qu'un objet stérile peut être contaminé par contact avec le milieu extérieur, une première exigence est de conditionner l'objet avant la stérilisation. Ce n'est qu'au moment de son utilisation qu'il peut être déballé

de manière aseptique. Le conditionnement et le mode de conservation du matériel stérile font intégralement partie de la stérilisation.

L'efficacité de la stérilisation dépend de trois facteurs : (i) le temps d'exposition à l'agent létal, (ii) la dimension de la population microbienne, (iii) le taux de mortalité des micro-organismes à détruire. Ce dernier facteur est lui-même influencé par la nature du micro-organisme, ainsi que par la nature et l'intensité de l'agent létal (Regnault, 1990).

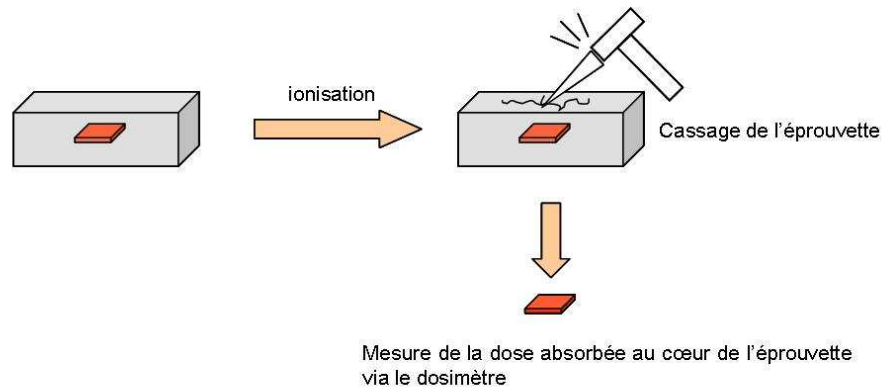
Différentes méthodes de stérilisation existent (stérilisation à la chaleur humide, à l'oxyde d'éthylène, expositions aux UV, ionisation...). Le choix se fait selon les contraintes imposées par l'objet à stériliser, sa résistance ou non aux températures et pressions élevées, par exemple.

Les éprouvettes sont stérilisées après 28 jours de conservation à 100% HR, ou après l'étape de vieillissement accéléré.

#### **1.4.1. Stérilisation par rayonnements ionisants**

L'ionisation des éprouvettes par rayonnement gamma est réalisée au centre du Commissariat à l'Energie Atomique de Cadarache. Les éprouvettes sont emballées sous film de polyéthylène et déposées à l'intérieur d'un cylindre ( $\varnothing=12$  cm,  $h=30$  cm). Le cylindre descend dans la chambre d'ionisation, où il est proche de la source. Pendant l'ionisation, le cylindre tourne sur lui-même, ce qui permet une ionisation homogène de toutes les éprouvettes. La dose délivrée est calculée à partir de la densité du matériau à ioniser, par l'intermédiaire d'un logiciel de calcul. Ce logiciel est paramétré pour des densités  $\leq 1$  (densité de l'eau), il détermine en fonction de la densité le temps d'ionisation nécessaire. Plus la densité est élevée, plus le temps d'ionisation est élevé. Pour des matériaux ayant une densité  $\geq 1$ , l'expérimentateur estime le temps nécessaire et vérifie la dose réellement délivrée à l'aide d'un dosimètre.

Dans notre cas (ionisation d'éprouvettes en ciment), on peut estimer la dose absorbée par l'éprouvette, à partir de la densité. Pour avoir une valeur précise de la dose absorbée au cœur de l'éprouvette, nous avons préparé quelques éprouvettes contenant un dosimètre à l'intérieur. Après l'irradiation, il suffit de mesurer la dose absorbée par le dosimètre pour connaître avec certitude la dose absorbée au cœur de l'éprouvette (Figure 16). Une dose de 30kGy assure la stérilité de l'échantillon.



**Figure 16 : Mesure de la dose absorbée au cœur de l'éprouvette**

### 1.4.2. Stérilisation aux UV

Les éprouvettes sont exposées une nuit à la lumière UV de la hotte à flux laminaire, puis placées dans des boîtes stériles jusqu'à l'inoculation.

## 2. Techniques microbiologiques

Toutes les manipulations avec les micro-organismes sont effectuées en environnement stérile, sous hotte à flux laminaire.

### 2.1. Cultures fongiques

#### 2.1.1. Souches fongiques utilisées

La souche *Alternaria* utilisée pour la première partie de l'étude, *Alternaria alternata* Fries von keissler DSM 62006, provient de la collection allemande de micro-organismes DSMZ. Dans la phase finale de la mise au point du test de biodétérioration, nous travaillons avec une souche *Alternaria alternata* issue d'un prélèvement sur un monument en Inde (données non publiées).

*Aspergillus niger* DSM 823 provient de la collection DSMZ.

*Coniosporium uncinatum* – MC557 – a été isolée à partir d'un prélèvement sur une statue en marbre située dans le jardin du musée de Messine (Sicile) (De Leo et al, 1999).

*Exophiala* sp. a été isolée à partir d'un prélèvement sur un monument en Inde (données non publiées).

*Alternaria alternata*, *Coniosporium uncinatum*, *Exophiala* sp. sont conservées dans la collection du département des Sciences Microbiologiques, Génétiques et Moléculaires de l'Université de Messine.

### 2.1.2. Conditions de culture des souches fongiques

Les cultures sont réalisées en plusieurs étapes : dans la première partie de l'étude, nous travaillons uniquement avec *Alternaria alternata*. Plusieurs facteurs jouent un rôle sur la croissance du champignon tels que la température, l'humidité relative, le pH, la composition du milieu. Il est reporté dans la littérature que toutes les espèces d'*Alternaria* sporulent mieux dans des milieux pauvres en sucre tels que jus V<sub>8</sub> agar (J. Rotem, 1994). De plus, la lumière aurait un impact positif sur la sporulation de certaines souches d'*Alternaria*, bien que son rôle ne soit pas complètement élucidé. Nous avons donc choisi d'étudier l'influence du milieu de culture et de la lumière sur la sporulation.

Trois milieux solides de culture sont testés : Agar Jus V<sub>8</sub>, Agar jus V<sub>8</sub> modifié (le jus de légumes est remplacé par de la purée de tomates) et Czapeck-Dox modifié (le saccharose est remplacé par la cellulose en poudre), dont les compositions sont détaillées en annexes. Le pH des milieux est ajusté à 7,2 par ajout de NaOH 0,1M ou HCl 0,1M avant stérilisation à l'autoclave (20 minutes à 120°C). La souche est cultivée en boîte de Pétri et en tube. Les cultures sont incubées à 90±5% HR et 24±1°C. Une partie des cultures est placée sous néons horticoles, ayant un rayonnement spectral accentué dans le bleu (450 nm) et le rouge (650 nm), avec des photopériodes de 10h/jour. Les cultures exposées à la lumière reçoivent une intensité lumineuse de 560 Lux contre 3,5 Lux pour les cultures non exposées.

La deuxième partie de l'étude est menée avec *Aspergillus niger*. La souche est cultivée en boîte de Pétri et en tubes, sur milieu solide Potatoes Dextrose Agar (PDA - Sigma). Le pH du milieu est ajusté à 7,2 par ajout de NaOH 0,1M avant stérilisation à l'autoclave. Les cultures sont incubées à 75±5% HR et 24±1°C.

La dernière phase de l'étude se déroule au département des Sciences Microbiologiques, Génétiques et Moléculaires de l'Université de Messine. Nous travaillons dans cette partie avec les quatre souches sélectionnées : *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Exophiala* sp., *Coniosporium uncinatum*. Ces souches sont cultivées en milieu solide PDA (Oxoid) en boîtes

de Pétri, et en milieu liquide Malt Extract Broth (MEB - Oxoid). Les cultures sont incubées à 26°C.

## 2.2. Préparation d'une suspension de spores

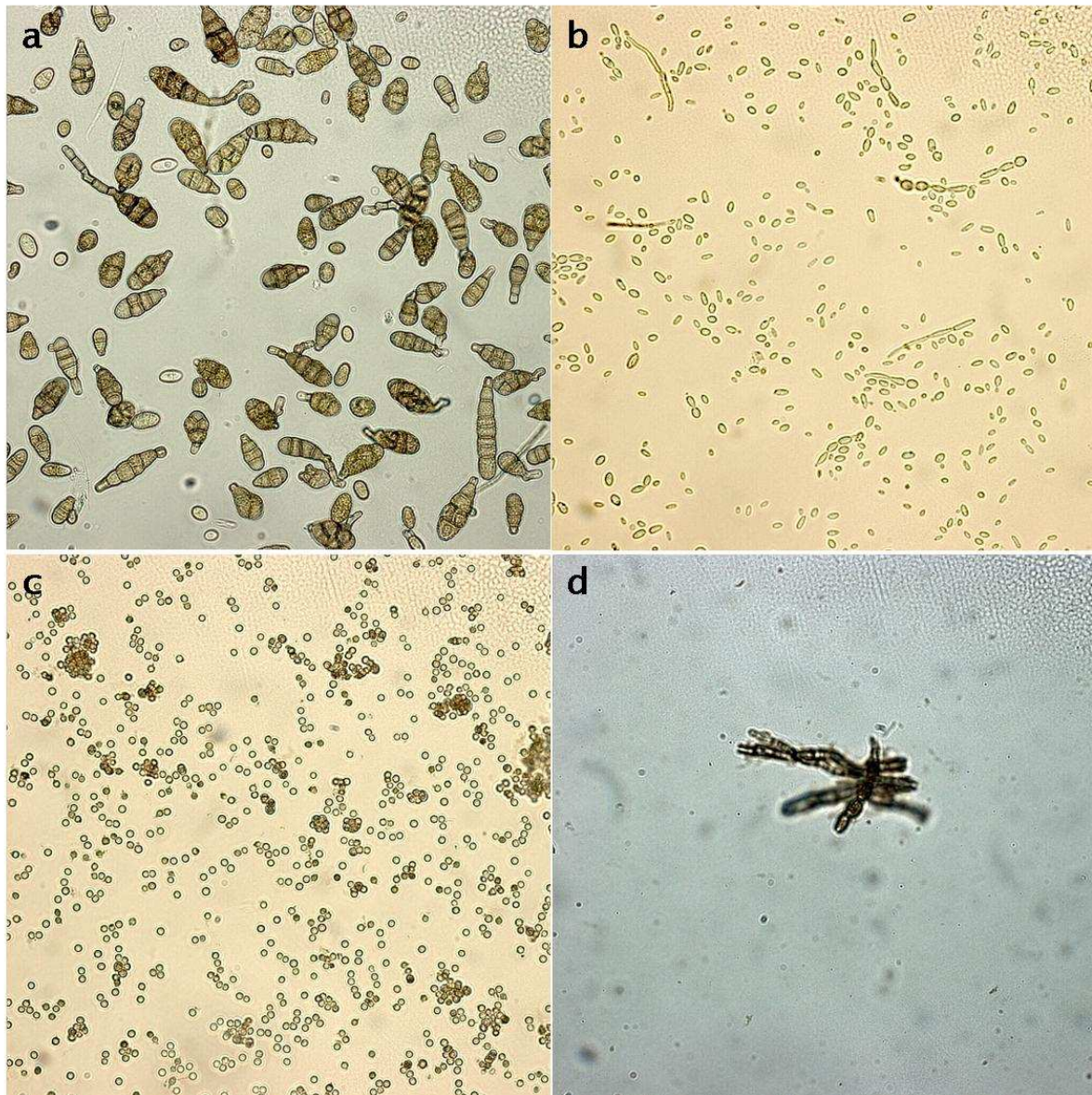
La suspension de spores est préparée dans une solution physiologique (0,9% NaCl). Deux millilitres de solution physiologique sont répartis sur la surface de la boîte de Pétri. La surface de la culture est raclée avec une anse d'ensemencement pour récupérer les spores. La suspension obtenue est filtrée sur de la gaze. L'opération est répétée 2 fois mais avec 1 ml de solution physiologique. Le comptage des spores se fait sur une cellule de Malassez\* (W. Schreck Hofheim/Ts, Allemagne) au microscope optique. La concentration de la suspension ajustée à la valeur désirée par ajout de solution physiologique. La suspension est utilisée dans les 6h qui suivent sa préparation.

## 2.3. Préparation d'une suspension de cellules fongiques

La suspension est préparée après une semaine de culture des différentes souches, à l'exception de *Coniosporium uncinatum* qui nécessite trois semaines de cultures. Les cellules sont collectées en raclant la surface de la boîte de Pétri contenant du milieu PDA, puis sont transférées dans un tube de centrifugation contenant 1 ml de solution physiologique (0,9% NaCl). Les cultures en milieu liquide MEB sont directement transvasées dans les tubes de centrifugation. Les suspensions sont centrifugées 15 minutes à 2095 g (3000 rpm avec une centrifugeuse Allegra X-12R Beckman and Coulter – rotor SX 4750A). Les culots sont suspendus dans un volume minimum de solution physiologique. La concentration de chaque suspension fongique est déterminée par comptage des cellules sur une cellule de Bürker\* (ProSci Tech, Australie) au microscope optique. La concentration finale est ajustée à la valeur désirée par dilution dans le milieu nutritif composé de Yeast Nitrogen Broth (YNB) 1x + Glucose 0,01%. La Figure 17 présente les spores et cellules fongiques pour chaque suspension préparée.

---

\* Cellule de Malassez ou de Bürker: cellule de numération, c'est une lame porte-objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. Ce dernier est déterminé par (i) la surface du quadrillage gravé sur la lame, (ii) la profondeur de la chambre. ( $V_{\text{cellule Malassez}} = 1 \text{ mm}^3$ ,  $V_{\text{cellule Bürker}} = 0,9 \text{ mm}^3$ ).



**Figure 17 : Observation au microscope optique des suspensions de cellules fongiques, grossissement x40 – (a) *Alternaria alternata*, (b) *Exophiala* sp., (c) *Aspergillus niger*, (d) *Coniosporium uncinatum***

## 2.4. Dosages biochimiques

Plusieurs méthodes de quantification de la biomasse existent, certaines étant spécifiques à un type de micro-organismes. Parmi ces méthodes nous avons choisi de développer pour notre étude un dosage spécifique de la biomasse fongique : celui de l'ergostérol, et un plus global : le dosage des protéines qui permet l'estimation de la biomasse microbienne totale.

## 2.4.1. Dosage de l'ergostérol

### 2.4.1.1. Principe du dosage

Les techniques de dosage de l'ergostérol s'appuient sur une caractéristique de cette molécule : son absorbance U.V à 282 nm. Le dosage est réalisé par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Le système est étalonné avec une solution d'ergostérol préparée à partir d'ergostérol standard (SIGMA) dans du méthanol. Le système WATERS utilisé 616 LC est équipé d'une colonne Novapack C<sub>18</sub> de 60Å. L'ensemble de l'appareillage est piloté par le logiciel Millennium 32.

### 2.4.1.2. Paramètres testés

Pour la mise au point du dosage, nous faisons varier la composition de la phase mobile. Les mélanges suivants sont testés : (i) eau/acétonitrile 50:50 v/v, et (ii) acétonitrile/méthanol 80:20 v/v. Le dosage est réalisé avec un débit de 0,5ml/min et 1 ml/min. Enfin, le volume d'échantillon injecté est ajusté pour optimiser le dosage, 20 et 100µL.

## 2.4.2. Dosage des protéines

### 2.4.2.1. Principe du dosage

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford. Le dosage est basé sur la formation d'un complexe entre le réactif de Bradford et les protéines en solution. Le complexe protéine-colorant crée un changement du maximum d'absorbance du colorant entre 465 nm et 595 nm. L'absorption est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu.

### 2.4.2.2. Paramètres testés

Cette méthode de dosage nécessite que les protéines soient en solution. Il faut donc extraire les protéines du matériel biologique pour les solubiliser dans une solution de composition adaptée.



Les paramètres suivants ont été étudiés :

- **protocoles de dosage** : le dosage 1,55 ml (1,5 ml de réactif de Bradford sont ajoutés à 50 µl d'échantillon) et le micro-dosage (1ml de réactif de Bradford sont ajoutés à 1 ml d'échantillon).
- **Solution d'extraction** : eau UHQ, méthanol, solution NaCl 0,9%, PBS (Phosphate Buffered Saline).
  - H<sub>2</sub>O ultra-pure : Solution de référence, afin d'éviter les interférences avec les protéines, et avec le réactif de Bradford.
  - Solution NaCl 0,9% : Les protéines sont plus stables dans une solution saline, de plus le serum bovin albumine est conservé dans une solution saline.
  - PBS : C'est un tampon salin (NaCl 8g/l), donc favorable à la stabilité des protéines en solution. De plus, l'acide ascorbique joue le rôle d'agent réducteur, et évite l'oxydation des protéines.
  - Méthanol : Nous souhaitons associer le dosage des protéines au dosage d'ergostérol. L'extraction de l'ergostérol doit obligatoirement se faire dans le méthanol. Il serait intéressant de procéder à une extraction globale du matériel biologique (ergostérol et protéines), et d'effectuer les dosages spécifiques sur une partie de l'extrait.
- **Nombre de cycles de sonication pour l'extraction.**

#### 2.4.2.3. *Extraction des protéines*

Les échantillons sont préparés à partir de cultures âgées de 10 jours sur boîtes de Pétri. Le mycélium est gratté de la surface de la boîte avec une spatule, et inséré dans 10 ml de PBS. La suspension est soniquée avec un sonicateur Vibracell à microprocesseur Vibracell (Bioblock scientifique) équipé d'une micro-sonde. Un cycle de sonication comprend 3 secondes de pulsations et 1 seconde d'arrêt pendant 30 secondes avec une amplitude de 10 %. Ce cycle est répété plusieurs fois avec un temps de pause de 30 secondes entre chaque cycle, pour éviter l'échauffement de l'échantillon. La suspension est maintenue dans un cristallisateur contenant des glaçons pour conserver une température basse, et ne pas dénaturer les protéines. Nous avons testé l'extraction avec 7, 10, et 12 cycles de sonication.

La suspension est centrifugée 10 min à 2000 tour/min à 4°C. Le dosage est effectué sur le surnageant. L'absorbance est mesurée à 595 nm après 12 min d'incubation avec un spectrophotomètre UV-vis VARIAN Cary 300 Scan.

## 2.5. Coloration au réactif de Schiff (PAS)

La coloration PAS (Periodic Acid Schiff) est une coloration couramment utilisée en histologie\* pour mettre en évidence les polysaccharides présents dans certains tissus. C'est l'acide périodique qui agit le premier en révélant les fonctions des aldéhydes et cétones qui constituent des groupements réducteurs. Intervient ensuite le réactif de Schiff qui, incolore à l'origine, apparaît rouge-fuchsia au contact de ces groupements réducteurs.

Cette technique a été proposée pour les matériaux de construction par Warscheid et appliquée avec succès pour l'estimation de la colonisation microbienne sur et dans les pierres. La coloration PAS permet dans ce cas, de colorer en rose-rouge les composés tels les substances polymériques extracellulaire (EPS), le glycogène, l'amidon, la cellulose, les complexes protéines-carbohydrates, et les glycolipides. Nous suivons le protocole de coloration proposé par Urzì et Albertano (2001).

A la fin du test de biodétérioration, les éprouvettes sont cassées en petits morceaux (Figure 18).



Figure 18 : échantillonnage des éprouvettes pour la coloration PAS

Les échantillons sont fixés 2h dans l'éthanol 70% (v/v), puis transférés dans l'acide périodique 1% (m/v) et agités pendant 5-8 min. Ils sont ensuite placés 5 min dans l'éthanol 70% (v/v). Les échantillons sont rincés 5 min dans H<sub>2</sub>O distillée et placés 10 min dans le réactif de Schiff, puis introduits dans une solution de sodium métabisulfite 0,6% (m/v),

---

\* Histologie : est la branche de la biologie qui étudie les tissus. Elle a pour but d'explorer la composition, la structure, le renouvellement des tissus ainsi que les échanges cellulaires en leur sein.

2x3min. Ils sont rincés 2 fois dans H<sub>2</sub>O distillée (5 min chaque fois) et introduits dans l'éthanol 70% (v/v) pendant 35 min.

### 3. Test de biodétérioration

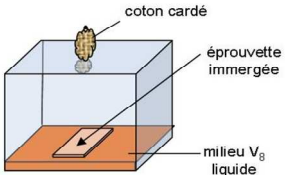
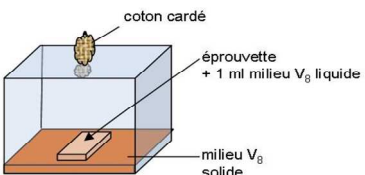
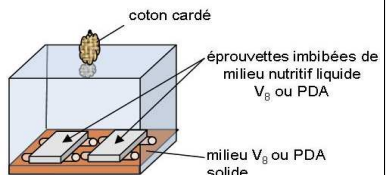
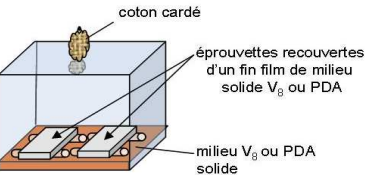
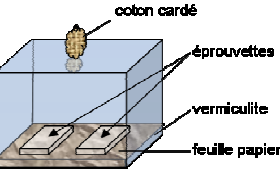
Différents dispositifs expérimentaux sont testés, en faisant varier notamment le mode d'inoculation, et l'apport d'éléments nutritifs. Le Tableau 5 présente les conditions expérimentales des différents tests réalisés.

Dans tous les cas nous utilisons des boîtes en polypropylène 9,5 x 9,5 x 9,5 cm<sup>3</sup>. Les boîtes, les milieux de culture, la vermiculite, les feuilles de papier sont stérilisées à l'autoclave 20 minutes à 120°C avant le test.

Les inoculations sont réalisées en duplicat. Ainsi pour chaque souche fongique étudiée, nous inoculons deux éprouvettes ayant subi le même vieillissement. Les témoins sont inoculés avec une solution physiologique (NaCl 0,8 g/L).

Les quatre premiers tests concernent le développement de la méthodologie en termes de dispositif expérimental, mode d'inoculation, apport de milieu nutritif. Seules les observations au stéréomicroscope et dans certains cas au MEB ont été effectuées. Lors du cinquième test, la préparation spécifique des échantillons pour le MEB et la coloration au réactif de Schiff ont pu être réalisées.

Tableau 5 : Comparaison des dispositifs expérimentaux des différents tests réalisés

		Essai A	Essai B	Essai C	Essai D	Essai E
<b>Souche</b>		<i>A. alternata</i> DSM 62006	<i>A. alternata</i> DSM 62006	<i>A. alternata</i> DSM 62006 <i>A. niger</i> DSM 823	<i>A. alternata</i> DSM 62006 <i>A. niger</i> DSM 823	<i>A. alternata</i>  <i>A. niger</i> DSM 823 <i>Exophiala sp.</i>  <i>C. uncinatum</i> MC 557
<b>Milieu de culture</b>		jus V <sub>8</sub>	jus V <sub>8</sub>	jus V <sub>8</sub> , PDA	jus V <sub>8</sub> , PDA	PDA
<b>Eprouvettes inoculées</b>		non vieilles carbonatées	non vieilles carbonatées	non vieilles carbonatées carbonatées + lixiviées	non vieilles carbonatées carbonatées + lixiviées	non vieilles carbonatées carbonatées + lixiviées
<b>Stérilisation éprouvette</b>		ionisation rayons $\gamma$	ionisation rayons $\gamma$	ionisation rayons $\gamma$	ionisation rayons $\gamma$	rayons UV
<b>Inoculation</b>	<b>mode</b>	suspension spores	suspension spores	suspension spores	suspension spores	suspension cellules
	<b>volume</b> <b>concentration</b>	1 mL 6,5.10 <sup>5</sup> spores/mL	1 mL 6,5.10 <sup>5</sup> spores/mL	1 mL 12.10 <sup>5</sup> spores/mL	1 mL 12.10 <sup>5</sup> spores/mL	1,5 mL 8,7.10 <sup>5</sup> cell/mL
<b>Incubation</b>		24±1°C et 90±5% HR	24±1°C et 90±5% HR	24±1°C et 90±5% HR 24±1°C et 75±5% HR	24±1°C et 90±5% HR 24±1°C et 75±5% HR	26±1°C
<b>Ajout nutriments</b>		non	1 ml jus V <sub>8</sub> liq / semaine	1,5 ml jus V <sub>8</sub> liq / semaine	1,5 ml jus V <sub>8</sub> liq / semaine	non
<b>Dispositif expérimental</b>						

# CHAPTER V :

## ACCELERATED WEATHERING OF THE MATRIX

This fifth chapter is devoted to the cementitious matrix. The first part deals with the characterization of hydrated cement paste before the weathering. The second part presents the development of a method to accelerate matrix weathering: accelerated carbonation operation and leaching operation. Finally, the influence of accelerated weathering of the matrix on its microstructure is discussed in the third part.

### 1. Characterization of hydrated cement paste

#### 1.1. X-ray diffraction (XRD) analysis

The XRD analysis of hydrated cement paste is presented in Figure 19. The assignments of the XRD peaks to phases were based on  $2\theta$  values and the corresponding d-spacing (Table 1).

**Table 1: XRD Data for hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% HR**

$2\theta$	d (Å)	Phase	$2\theta$	d (Å)	Phase
9.3	9.671	Ettringite	34.0	2.628	Portlandite
16.1	5.583	Ettringite	47.1	1.927	Portlandite
18.1	4.900	Portlandite	51.5	1.796	Portlandite
23.3	3.859	Ettringite	55.1	1.687	Portlandite
28.7	3.112	Portlandite			

Diffraction investigation indicates that the hydrated cement paste studied is mainly composed of portlandite, and ettringite. The peaks corresponding to portlandite appear at 4.900, 3.112, 2.628, 1.927, 1.796, and 1.687 Å. The main peaks corresponding to ettringite are present at 9.671, 5.583, and 3.859 Å. Presence of calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) and gypsum can be observed but at a lower extent.

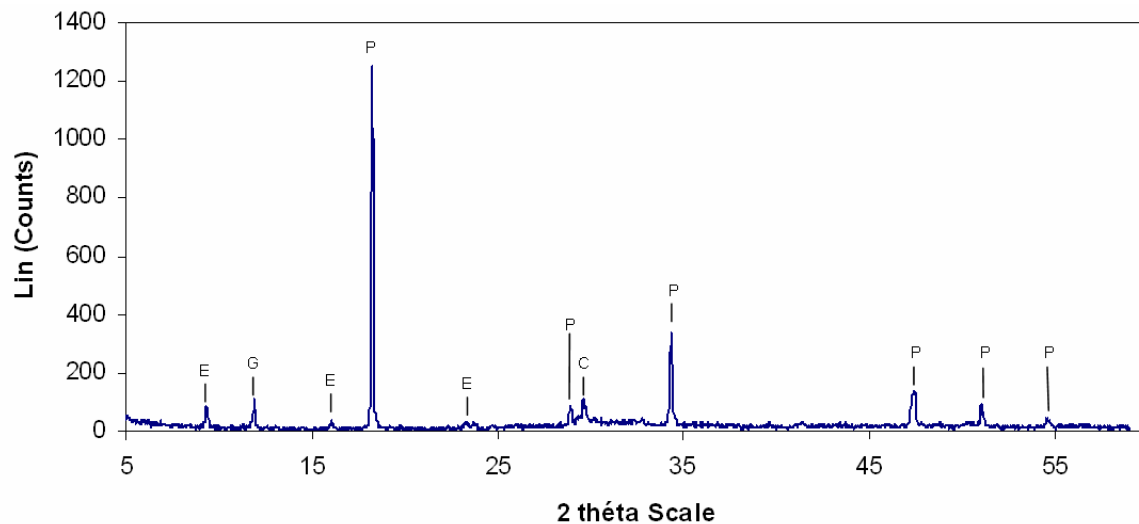


Figure 19: X-ray diffractogram of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH

E=ettringite, G=gypsum, P=portlandite, C=calcite

## 1.2. Fourier Transformed infrared (FT-IR) analysis

FT-IR spectra of hydrated cement paste are shown in Figure 20 and Figure 21. Usually band assignments reported in literature are deduced from spectra performed in diffuse reflectance.

Table 2: FT-IR characterization of hydrated cement paste

Band assignments	Hydrated cement <sup>a</sup> 1 month (cm <sup>-1</sup> )	Hydrated cement <sup>b</sup> after mixing (cm <sup>-1</sup> )	Hydrated cement <sup>c</sup> paste (cm <sup>-1</sup> )	Hydrated cement <sup>d</sup> paste (cm <sup>-1</sup> )
$\nu_3$ SiO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	980 s, b	970 s, b	977 s, b	959 s
$\nu_4$ SiO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	536 w, sh	-----	-----	-----
$\nu_2$ SiO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	467 s	-----	453 w	446 w
$\nu_3$ SiO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1105 w, sh 1155 w, sh	-----	-----	-----
$\nu_4$ SiO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	667 w	610	-----	-----
$\nu_1 + \nu_3$ H <sub>2</sub> O	3325 3450 s, b	----- 3415 s, b	----- 3436 s, b	----- 3414 m, b
$\nu_2$ H <sub>2</sub> O	1630 w	1638 m	1656 m	1640 w
$\nu$ OH	3645 sr, sh	3640 sr	3644 sr, sh	3636 sr, sh
$\nu_3$ CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	1425 1497 s, b	1421 s, b	1462 s, b	1414 s
$\nu_2$ CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	876 m, sr	874 m, sr	875 m, sr	872 s, sr
$\nu_4$ CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	732 w	713 w	718 w	710 w

<sup>a</sup> Reference Mollah et al., 1995; 2004

<sup>b</sup> Reference Farcas and Touzé, 2001

<sup>c</sup> Present study diffuse reflectance

<sup>d</sup> Present study ATR

b: broad, s: strong, sh: shoulder, sr: sharp, m: medium, vw: very weak, w: weak

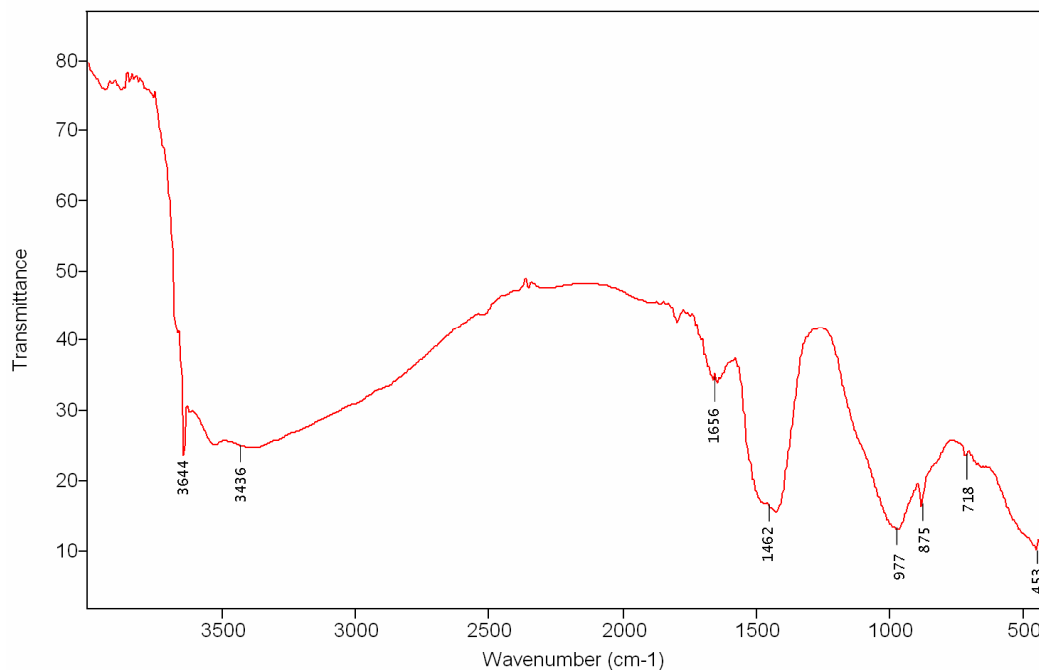
$\nu_1$  = symmetric stretching

$\nu_2$  = symmetric bending

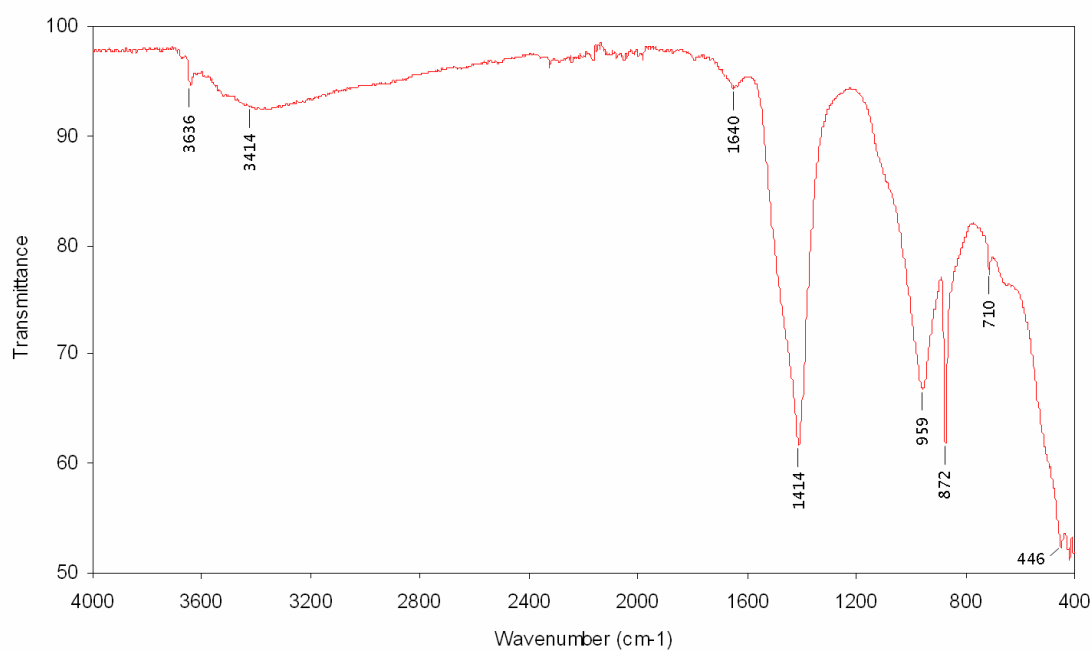
$\nu_3$  = asymmetric stretching

$\nu_4$  = asymmetric bending

In the present work, spectra acquisition is mainly performed in ATR. Band assignments on ATR spectrum (Figure 21) are deduced from spectrum performed first in diffuse reflectance (Figure 20).



**Figure 20: Diffuse reflectance FT-IR spectrum of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH**



**Figure 21: ATR FT-IR spectrum of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH**

A shift of about 10-20 wave number units is noted between both spectra. Nevertheless the band assignments for hydrated cement paste are in close agreement with those previously reported by Mollah et al., 1995; 2004; and Farcas and Touzé, 2001 (Table 2). The band at  $3645\text{ cm}^{-1}$  is due to the OH band from  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Mollah et al., 2000). The water bands appear at approximately  $3440$  (stretching) and  $1660$  (bending)  $\text{cm}^{-1}$  (Mollah et al., 1998). The bands at  $1480$ - $1430\text{ cm}^{-1}$ ,  $875\text{ cm}^{-1}$  and  $720\text{ cm}^{-1}$  are due to carbonates. The wide and deep band between  $1480$  and  $1430\text{ cm}^{-1}$  is attributed to  $\nu_3$  of  $\text{CO}_3^{2-}$  and the sharp bands at  $875$  and  $720\text{ cm}^{-1}$  are due to  $\nu_2$  and  $\nu_4$  vibrations, respectively (Mollah, 1998). The band at  $975\text{ cm}^{-1}$  is due to the Si-O asymmetric stretching band ( $\nu_3$ ) from C-S-H (Mollah et al., 1995).

### 1.3. Mercury Intrusion Porosimetry (MIP)

In the usual procedure, a small specimen is first dried emptying the pores of any existing fluid. It is then weighed, transferred to a chamber, where the air is evacuated. Then mercury fills this chamber surrounding the specimen. Since mercury does not wet cementitious solids spontaneously, it does not intrude into empty pores unless pressure is applied. Therefore pressure in progressive increments is then applied. The intrusion of mercury at each step is monitored. The set of pressure steps and corresponding volumes intruded provides the basic data for pore size distribution calculation. The Washburn model used to convert mercury intrusion data into pore size distribution curves invokes two distinct assumptions: (i) that pores are cylindrical, and (ii) that they are entirely and equally accessible to the outer surface of the specimen. There is no distinction in the model between intrusion into a single long, continuous cylinder or intrusion into a multitude of shorter cylinders of the same diameter, as long as they are all open to the outer surface (Diamond, 2000). The access to large regions of porosity may be controlled by very small size entries and all the pores in this region (whatever their actual size) will be assigned to the size of the smallest entry (Scrivener, 2004). So, MIP data should be investigated and interpreted with care.

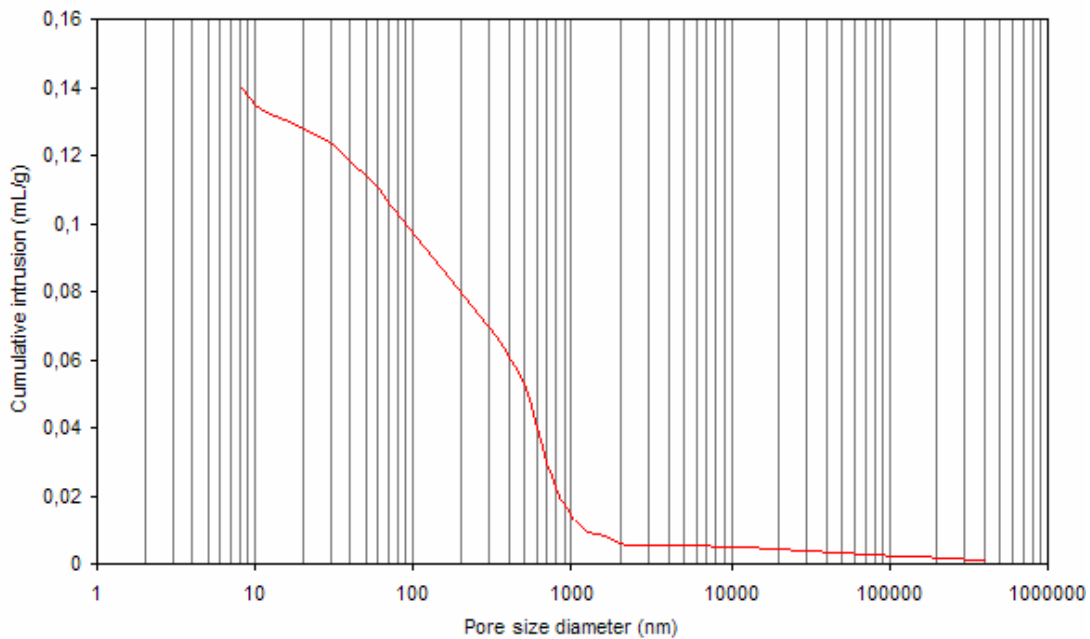
According to Diamond (2000), MIP measurements are useful only to provide threshold diameters and intrudable pore space measurements, which can serve as comparative indices for the connectivity and capacity of the pore systems in hydrated cements. MIP measurements should be abandoned as measures of the actual pore size present.

The apparent threshold diameter corresponds to a pressure above which very little intrusion into specimen is recorded, and immediately below which the greatest portion of intrusion



takes place. This apparent threshold diameter is greater for higher water: cement (w/c) ratios and for younger cement pastes; reducing with age (Diamond, 2000).

Pore size distribution of the hydrated cement paste studied is presented in Figure 22. The threshold diameter obtained is about 2  $\mu\text{m}$ , that is to say that essentially all of the space can be allocated to pores less than 2  $\mu\text{m}$  in size. The total porosity corresponding to the MIP measurements is of 21.6%.



**Figure 22: Pore size distribution of hydrated cement paste at 28 days of curing at 100% RH**

#### 1.4. Helium pycnometry

Usually, helium pycnometry is used to determine skeletal density of a solid, and could give indirect information about pore volume and closed porosity when the sample's apparent volume and density are known. In our case the specimens are shaped irregularly, so it is not quite as easy to determine their apparent volume. Hence, only skeletal bulk density is obtained from pycnometry measurements performed. The skeletal density of hydrated cement paste measured is to  $2.197 \pm 0.002 \text{ g/cm}^3$  after 28 days of curing at 100% RH.

A synthesis of XRD and FT-IR analyses indicates that the major components in hydrated cement are portlandite  $\text{Ca(OH)}_2$ , calcium-silica-hydrate C-S-H. The formation of ettringite -  $\text{C}_3\text{A}$ ,  $3 \text{ CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , and calcite  $\text{CaCO}_3$  is also observed. These observations are in close agreement with previous publication. Upon hydration the alite ( $\text{C}_3\text{S}$ ) and belite ( $\text{C}_2\text{S}$ ) phases

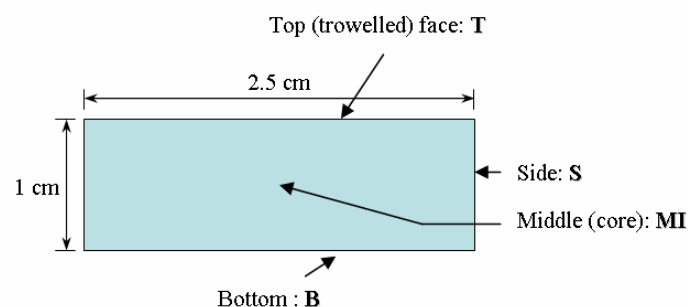
produce mainly portlandite  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (20-25%) and amorphous calcium-silica-hydrate (C-S-H) (60-70%) (Mollah, 1998). Calcium carbonate  $\text{CaCO}_3$  is also produced as a result of secondary reactions between  $\text{CaOH}_2$  and C-S-H with atmospheric  $\text{CO}_2$  (Reardon et al., 1989). The hydrated cement paste studied is also characterized by: (i) a threshold diameter of 2  $\mu\text{m}$ , (ii) a total porosity of 21.6%, and (iii) a skeletal density of 2.197  $\text{g}/\text{cm}^3$ .

## 2. Accelerated weathering of the matrix

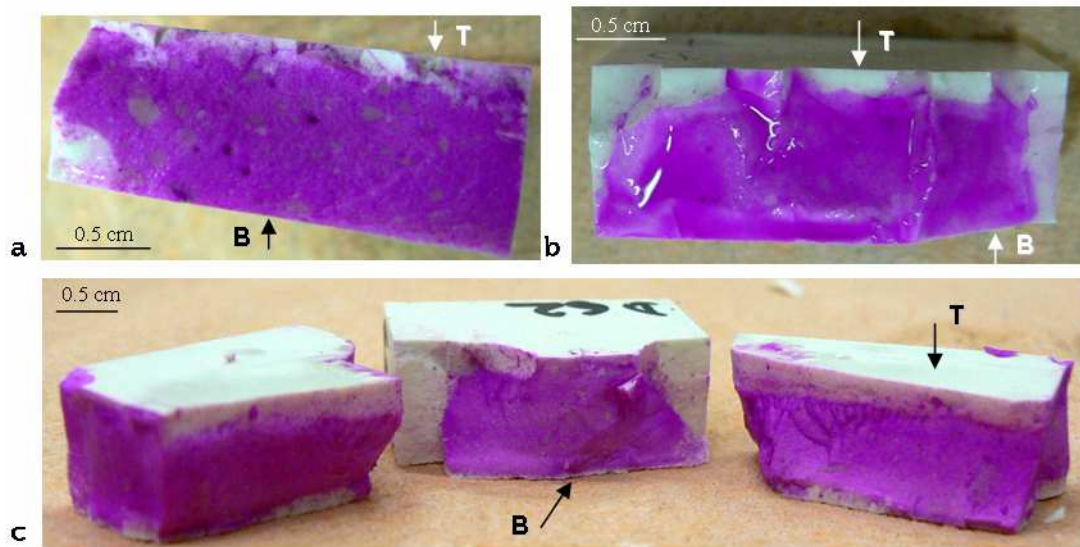
### 2.1. Accelerated carbonation

The accelerated carbonation is performed on hydrated cement pastes after 28 days of curing at 100% RH. Prior to exposure to carbonation, the majority of specimens (four exceptions) were oven dried at 40°C for 24h. The saturated solution of potassium carbonate is renewed after 30h. Hence, RH is maintained between 52% and 65% in the chamber. This saturated salt solution is known to provide 43% RH at 20°C when in an enclosed space (OIML R 121, 1996). In the experimental set-up,  $\text{CO}_2$  bubbled through a column of deionised water before entering the inlet chamber, providing continuously humidity. Thus, RH is maintained in the chamber at a higher value than the one expected. According to Chaussadent (1997) and Gervais (2004) the carbonation reaction is optimum when the RH in the pores of the matrix is close to 65% and decreases as the RH in the pores increases. The reaction is quasi-inhibited when the RH is below ca. 50%.  $\text{K}_2\text{CO}_3$  appears to be a suitable salt to maintain an appropriate level of RH during the carbonation operation.

Owing to the cement's bleeding effect when water is present and which occurs in the early stages after casting, the porosity and pore size distribution is expected to vary between the top (trowelled) layer and deeper layers of the paste (Khatib, 2003). The trowelled face is located on the top of specimens and each face is identified as shown in Figure 23.



**Figure 23: Identification of faces for carbonation operation (section through vertically cast cube)**



**Figure 24: Carbonation depth for hydrated cement pastes after 48h of accelerated carbonation – Example of: (a) non pre-dried specimen, (b) and (c) pre-dried specimen**

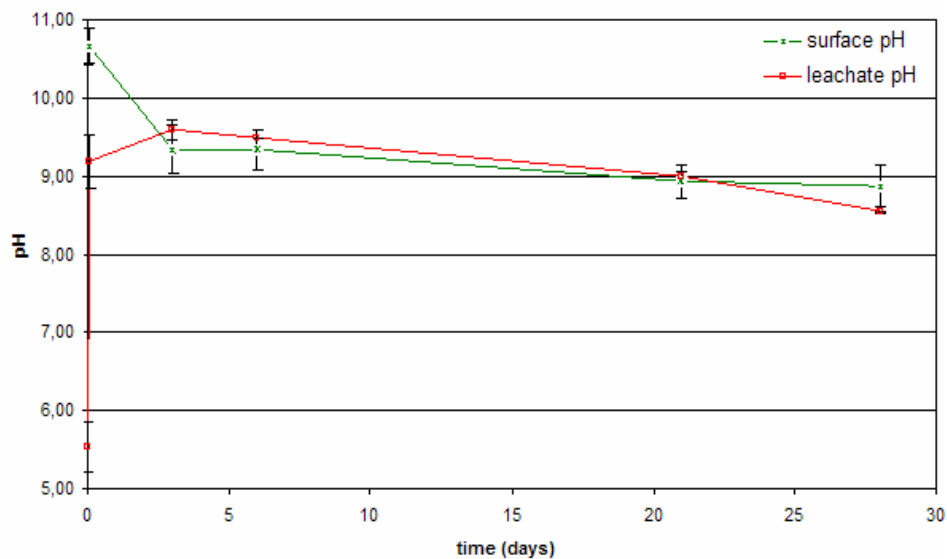
Figure 6 shows that the pre-dried specimens (Figure 24 b, and c) are more carbonated than those without pre-treatment (Figure 24 a). These observations are in accord with those previously reported. The formation of calcium carbonate requires that carbon dioxide diffuses from the atmosphere into the pores of material. This gas needs liquid water to form carbonic acid. However, the carbonation will be largely ruled out if the pore system is completely filled with water, which will hinder or block the diffusion of carbon dioxide in its gaseous phase. Thus, the situation where pores are only partly filled with water makes possible both diffusion of carbon dioxide in the gaseous phase and formation of carbonic acid (Rougeau, 1997; Johannesson et al., 2001; Gervais et al., 2004; Thiery, 2007).

The same carbonation profile (Figure 24 b) is observed for all pre-dried specimens whatsoever its location inside the chamber: both the top faces and sides are carbonated on about 1.5-2 mm whereas the bottom is almost non carbonated. The top surface (trowelled) of a cement paste possesses more numerous pores with often larger volume than the bottom face. The pore volume near the top surface can be twice as large as that for the bottom face (Khatib et al., 2003), which facilitates CO<sub>2</sub> penetration. In the following experiment the carbonated specimens used are pre-dried.

The results of carbonation influence on the matrix microstructure are presented and discussed in section 3.

## 2.2. Leaching operation

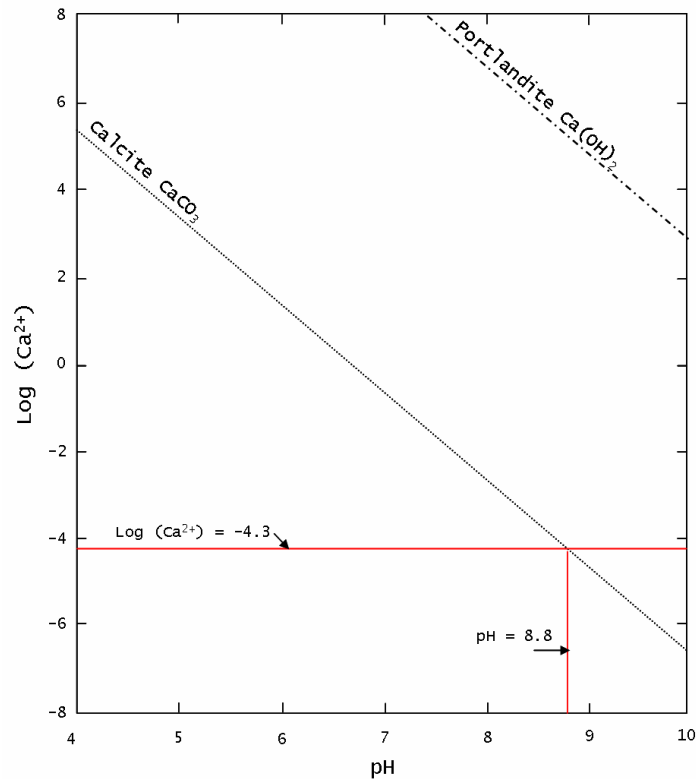
Leaching occurs in which species such as calcium exit dissolve in the pore solution, This phenomenon leads to an increase of the matrix pore volume (Watanabe et al., 2006). The leaching operation is performed on carbonated specimens. Leachate pH and surface pH of the matrix as a function of time are shown in Figure 25. Relating to the leachate pH curve, note that pH increases rapidly from about 5.5 to 9.2 in the first hours, reaches a maximum at 9.6 after 3 days, and then decreases slowly to about 8.5 after 28 days. On the contrary, the surface pH of the matrix decreases rapidly from ~10.6 to 9.3 during the first 3 days, and then decreases slowly and seems to reach a plateau around 8.8.



**Figure 25: Evolution of pH in function of the leaching period (average of duplicates) - green curve: surface pH of the matrix, red curve: leachate pH**

Prior to the leaching operation, specimens were carbonated for only 48h, and portlandite and ettringite remained present near the matrix surface (Figure 27). When specimens are submerged in water, soluble alkaline compounds, such as portlandite and ettringite, are rapidly dissolved. This results in the release of hydroxide ions and thereby increasing leachate pH and decreasing the surface pH of the matrix. In addition, portlandite dissolution involves the release of calcium (Ca) in leachate. The calcium concentration measured in leachate oscillates between 3.9 and 6.3 mg/L ( $-4.4 < \log(\text{Ca}) < -4.2$ ). Calcium carbonate is much less soluble than portlandite (Figure 26), so once all portlandite is dissolved, local quasi-stationary state between the matrix pore solution and leachate progressively takes place. This is

consistent with the slow decrease in pH, calcium carbonate solubility and carbonate equilibria (Figure 26, calculations relating the considered system are detailed in annexe).



**Figure 26: Soluble Calcium derived from calcite and portlandite for  $\text{CaCO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$  system – calcium carbonate in water with a fixed partial pressure of carbon dioxide (Bureau and Zasoski, 2002)**

According to the curves of the Figure 26, pH should certainly decrease even more with time. Our objective is to accelerate the weathering of the matrix in order to decrease the surface pH. Hence, we have to find a compromise between the experimental time and pH obtained, that's why we decided to stop the experiment at 28 days corresponding to a surface pH about 8.8. The influence of leaching on the matrix microstructure is discussed in the next section.

### 3. Influence of accelerated weathering on the matrix microstructure

#### 3.1. X-ray diffraction analysis

Figure 27 shows the XRD analysis performed on non weathered and weathered specimens. Additional peaks are noticed on the diffractogram of the carbonated specimen compared to non weathered one. They are attributed to the formation of calcium carbonate polymorphs – aragonite and vaterite – as a result of accelerated carbonation.

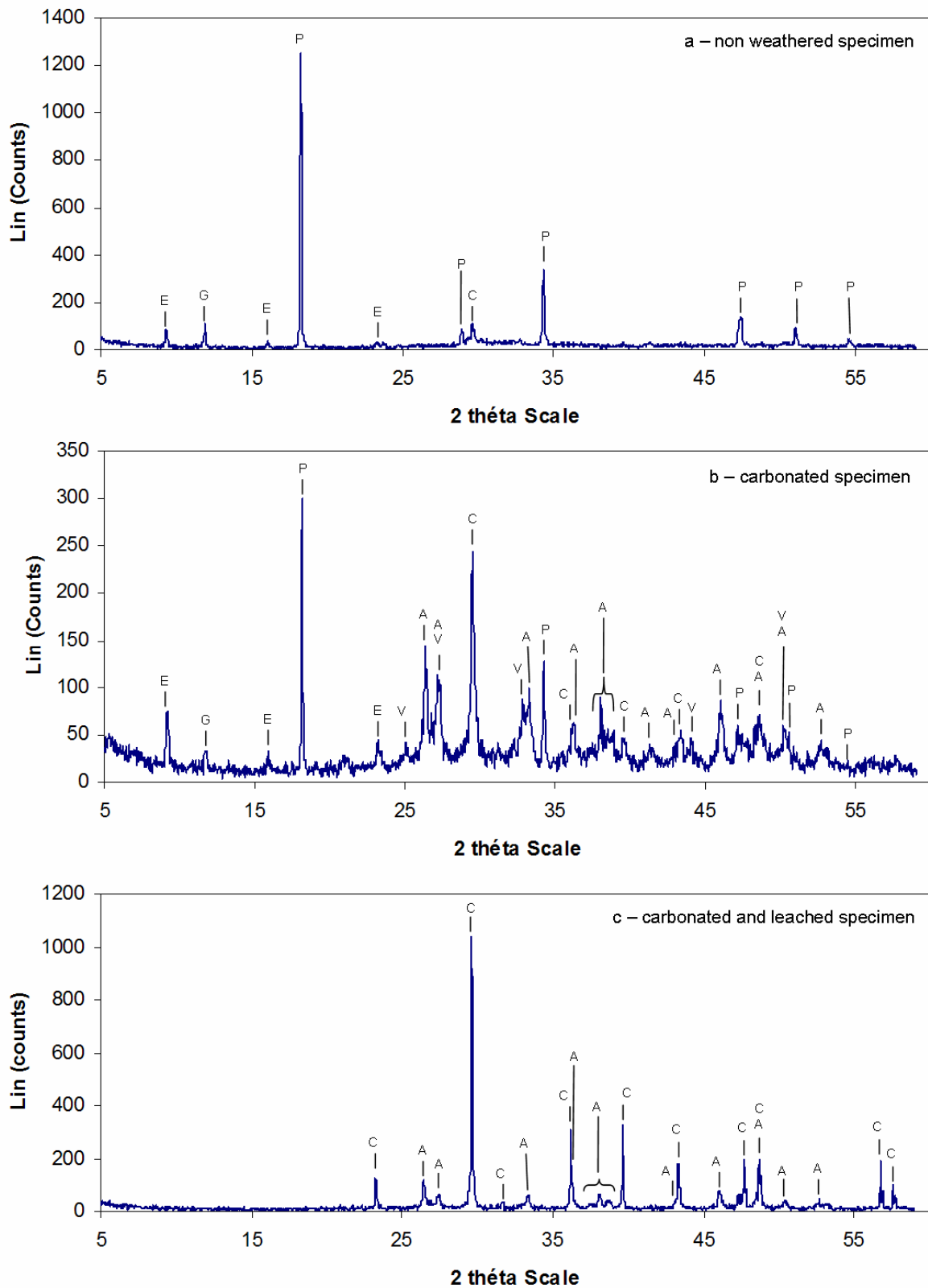
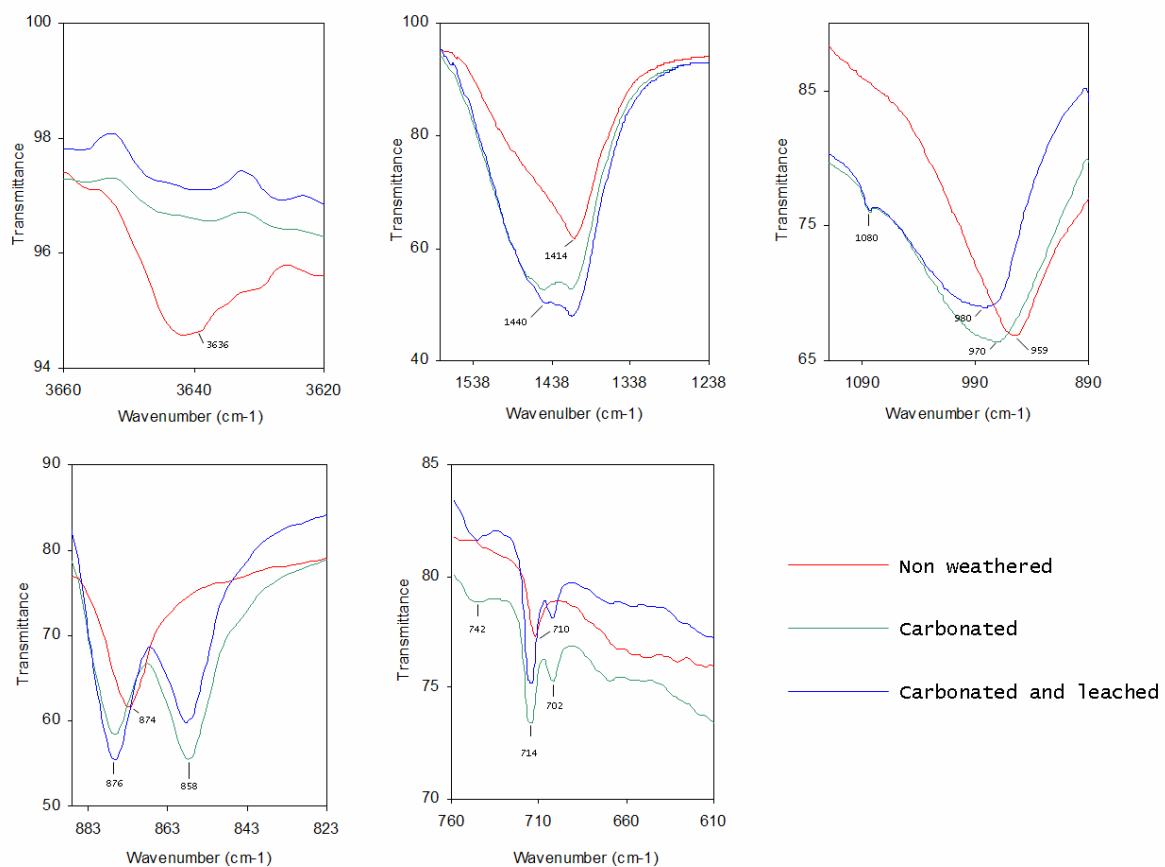


Figure 27: X-ray diffractogram of specimen before (a) and after (b), (c) accelerated weathering of the matrix – E=ettringite, G=gypsum, P=portlandite, C=calcite, A=aragonite, V=vaterite

The decrease in relative intensity of portlandite peaks is due to the dissolution of portlandite to form calcium carbonate. The diffractogram of the carbonated and leached specimen exhibits only calcite and aragonite peaks. The disappearance of portlandite and ettringite is a consequence of their dissolution as a result of leaching. Vaterite is the less stable calcium carbonate polymorph, and it is easily transformed into other forms.

### 3.2. Fourier Transformed Infrared analysis

The major bands identified for the non weathered specimen are: the OH band at  $3636\text{ cm}^{-1}$  from portlandite, the carbonates bands at  $1414$ ,  $875$ , and  $710\text{ cm}^{-1}$  from calcite, and the silicate band at  $959\text{ cm}^{-1}$  from C-S-H. The spectral data changes upon weathering and analyses of these changes can provide valuable information about the reactions involved. The FT-IR data for band assignments are presented in Table 3. Details of FT-IR spectra for the most characteristic bands are shown in Figure 28.



**Figure 28: Details of FT-IR spectra (ATR) of the cementitious matrix before and after accelerated weathering**

**Table 3: FT-IR characterization of specimens before and after accelerated weathering**

Band assignments	Calcium carbonate <sup>a</sup> CaCO <sub>3</sub> (cm <sup>-1</sup> )	Non weathered <sup>b</sup> specimen (cm <sup>-1</sup> )	Carbonated <sup>c</sup> specimen (cm <sup>-1</sup> )	Carbonated and <sup>d</sup> leached specimen (cm <sup>-1</sup> )
v <sub>3</sub> SiO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	970 s, b	959 s	970 s	970 s
v <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	-----	446 w	-----	-----
v <sub>3</sub> SiO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1100	1113 vw, sh	-----	-----
v OH <sup>-</sup>	3640 sr	3636 sh	-----	-----
v <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> calcite	1421 s, b	1414 s	1414 s	1414 s
v <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> aragonite	1400-1500 s, b		1414 - 1440 s, b	1414 - 1440 s, b
v <sub>1</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> vaterite	1080 w	-----		
v <sub>1</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> aragonite	1083	-----	1080 w, sh	1080 w, sh
v <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> calcite	874 m, sr	875 s, sr	876 s, sh	876 s, sh
v <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> vaterite	860 s, sr	-----	?	?
	850 m, sr	-----	?	?
v <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> aragonite	856 m	-----	858 s, sh	858 s, sh
v <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> calcite	713 w	710 w	714 m	714 m
v <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> vaterite	740 w	-----	742 w, sh	-----
	710 m	-----	?	?
v <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> aragonite	700	-----	702 w	702 w

<sup>a</sup> References Simpson, 1997; Ghosh, 1998; Farcas and Touzé, 2001; Devarajan et al., 2007

<sup>b</sup> Present study - Non weathered specimen

<sup>c</sup> Present study - Carbonated specimen

<sup>d</sup> Present study - Carbonated and leached specimen

b: broad, s: strong, sh: shoulder, sr: sharp, m: medium, vw: very weak, w: weak

v<sub>1</sub> = symmetric stretching

v<sub>2</sub> = symmetric bending

v<sub>3</sub> = asymmetric stretching

v<sub>4</sub> = asymmetric bending

? = certainly covered by another band

The OH band at 3636 cm<sup>-1</sup> from portlandite disappears with carbonation. However, XRD analyses show the presence of portlandite on carbonated specimen, but in small amounts. The majority of portlandite is mainly transformed during carbonation operation, and totally during leaching. The small amounts present on the carbonated specimen are probably non detectable with FT-IR.

The FT-IR spectra of weathered specimens (carbonated and leached or carbonated only) show a strong broad band at 1414-1440 cm<sup>-1</sup>, which is broader than the calcite band, characteristic of aragonite. According to the intensity it can be assumed that the aragonite overlays the calcite band. New bands appear at 1080, 858, 702 cm<sup>-1</sup> and are assigned to aragonite formed as a result of accelerated carbonation. The band at 742 cm<sup>-1</sup> belonging to vaterite, appears only in the carbonated specimen. Other characteristic bands at 860, 850, and 710 cm<sup>-1</sup> may be overlaid by calcite bands. As aforementioned, vaterite is a less stable polymorph of calcium carbonate and thereby transforms into more stable forms calcite and aragonite with leaching operation. The Si-O stretching (v<sub>3</sub>) band now appears at approximately 970 and 980 cm<sup>-1</sup> for



the carbonated and carbonated then leached specimens respectively, while the same band in the non weathered specimen appears at  $959\text{ cm}^{-1}$ . Hence, this shifting to higher frequency is caused by the polymerization of the orthosilicate units ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ) during weathering process. The magnitude of this shift is indicative of the degree of polymerization (Mollah et al., 1995).

### 3.3. Mercury Intrusion Porosity and helium pycnometry

The measured porosities vary from approximately 21% for the non weathered specimen to 17% for the carbonated one (Table 4). The leaching of hydrated cement pastes leads traditionally to an increase of the porosity. In our case, it doesn't. The leaching takes place after the carbonation, and a slight decrease of porosity is even noted.

The decrease in total porosity results in an increase of skeletal density. Well-defined threshold diameters are evident from  $2\text{ }\mu\text{m}$  for the non weathered specimen to 500 and 400 nm for the carbonated and the carbonated then leached specimens respectively. Increased weathering time results in lower total porosity and smaller values for threshold diameter (Figure 29). The threshold diameter is a characteristic property of the pore structure and therefore varies with the microstructure of the material (Arandigoyen, 2006). A lower threshold value is indicative of a finer pore size distribution (Khatib, 2003). The lower threshold observed for the weathered specimens is a consequence of the disappearance of large pores around  $1\text{ }\mu\text{m}$ .

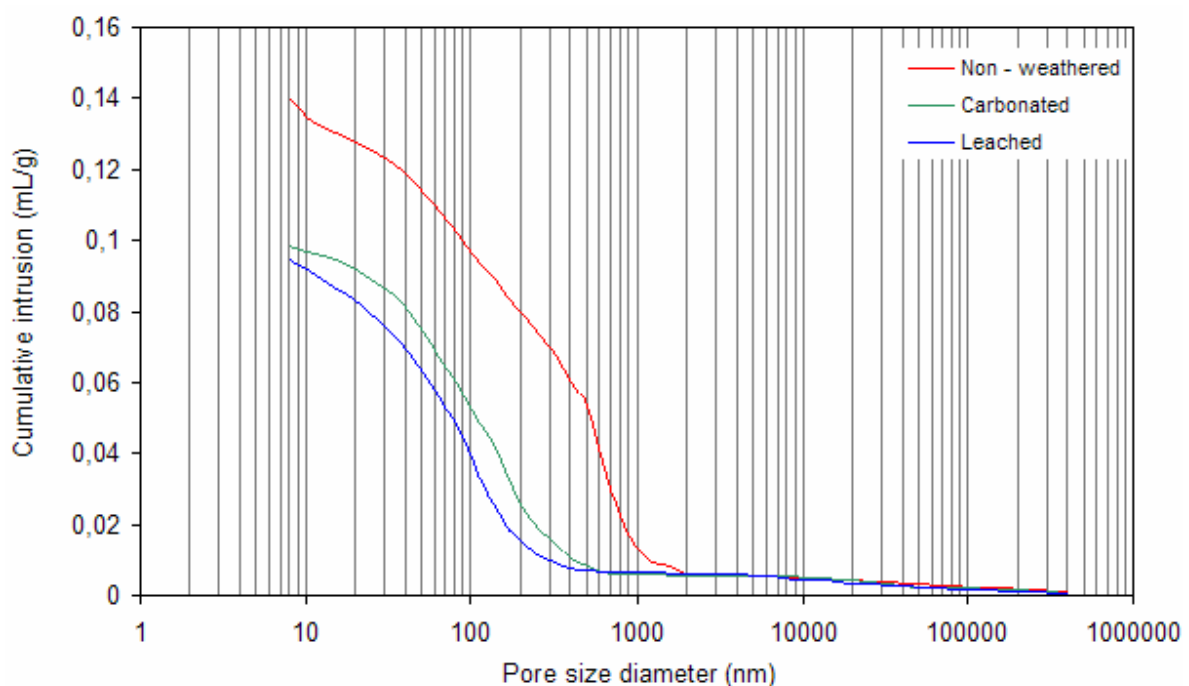


Figure 29: Change over time for the pore size distribution with accelerated weathering

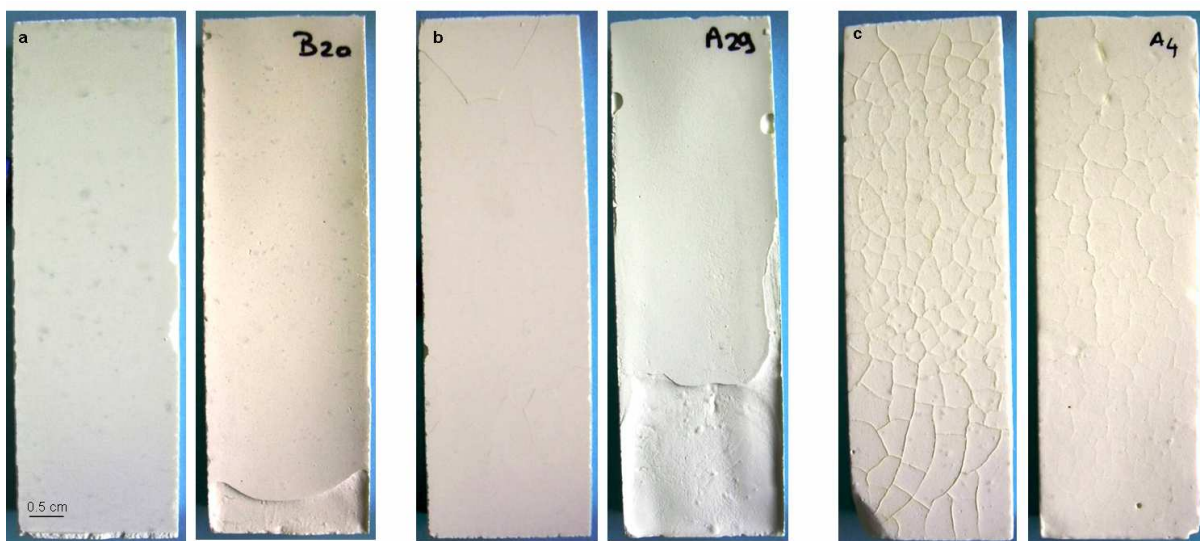
**Table 4: Characterization of the matrix microstructure**

Specimen	Threshold diameter (nm)	Porosity (%)	Skeletal density (g/cm <sup>3</sup> )
Non weathered	2000	21.6	2.1968
Carbonated	500	17.2	2.3352
Carbonated and leached	400	16.8	2.5383

The overall shape of the carbonated and leached or carbonated only curves is similar for weathered specimens, but differs from those of non weathered specimens. Beyond the threshold of the curve for the non weathered specimen (i.e. from approximately 2000 nm to 500 nm) there is a more profound decrease in the slope than for weathered specimens curve. But after a pore diameter of approximately 500 nm the slope increases again. This change in shape of the pore size distribution is a consequence of the increase in the proportion of smaller pores (Figure 29).

### 3.4. Direct observations

Figure 30 shows direct observations of specimens at different stages of accelerated weathering. The appearance of cracks on the surface specimen is observed after carbonation. This cracking is considerably augmented by leaching. Moreover, precipitate formation was noted inside the cracks, which according to XRD and FT-IR analysis should be CaCO<sub>3</sub>.

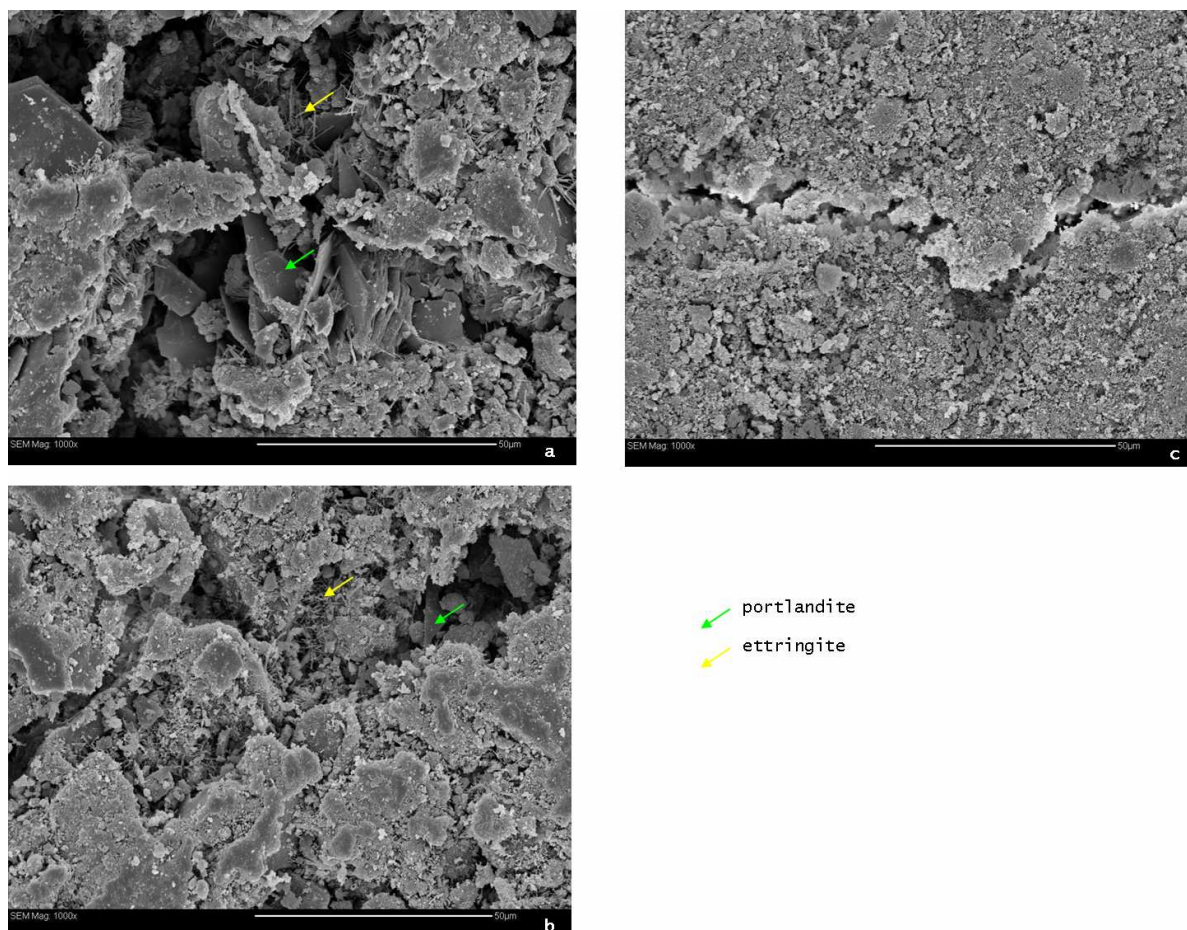


**Figure 30: Direct observations of specimen before and after accelerated weathering – (a) non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen**

These observations point out the significant alterations of the specimen surface after the accelerated weathering.

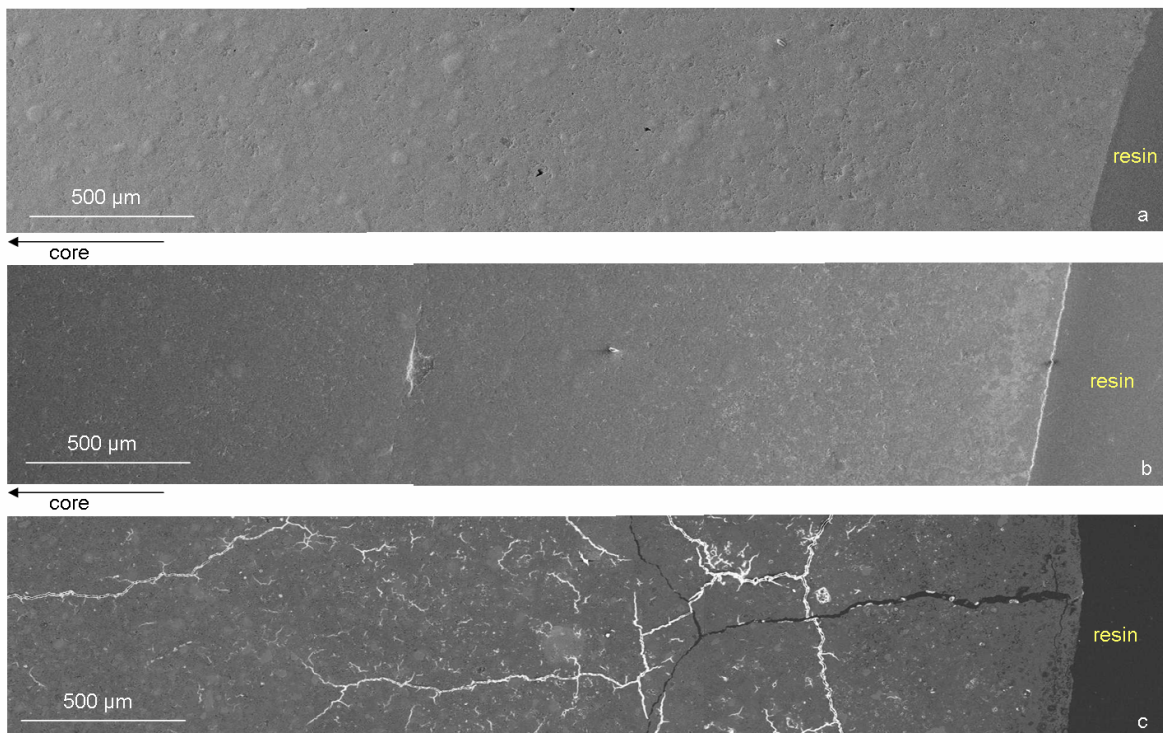
### 3.5. Scanning Electron Microscope (SEM) observations

Figure 31 shows surface fractures. Platy crystals and fine needles are the distinguishing characteristic shapes of portlandite and ettringite respectively (Diamond, 1976; Pratt, 1986). A thin layer covers progressively the specimen surface as accelerated weathering progresses. This is consistent with the weathering performed: carbonation results in a decrease in the amount of portlandite and the leaching gives rise to the dissolution of portlandite and ettringite. A net decrease in porosity is also observed: pores are progressively filled by  $\text{CaCO}_3$  precipitation and become smaller and smaller as the matrix is weathered.



**Figure 31: SEM images of fracture surfaces – (a) non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen**

Now, if one examines the following images of thin sections, microstructure alteration is not observed between non weathered and carbonated specimens (Figure 32 a and b, Figure 34 a and b). Contrarily, numerous cracks are observed for the carbonated and leached specimen (Figure 32 c). These cracks are distributed along the periphery (Figure 33). This phenomenon may be explained by one of two scenarios: (i) the cracks appear progressively during leaching operation, this could be confirmed by direct observation (Figure 30 c) or (ii) the matrix structure is weakened by the leaching operation, and thereby the cracks are due to the sample preparation. We also notice on the carbonated and leached sample the presence of a thin band which seems to be more porous than the rest of specimen (Figure 32 c, Figure 34). Its thickness is estimated to be 70  $\mu\text{m}$  (Figure 34).



**Figure 32: SEM images of thin sections – (a) non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated and leached specimen**

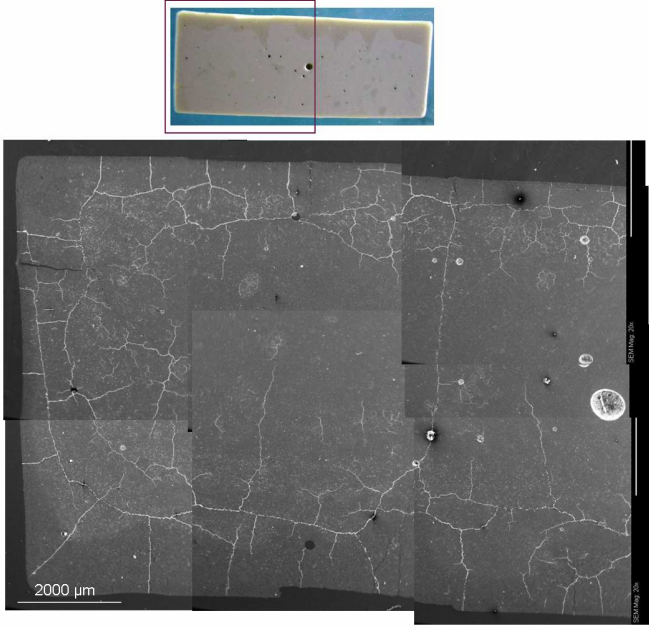


Figure 33: Global SEM images of thin sections of a carbonated and leached specimen

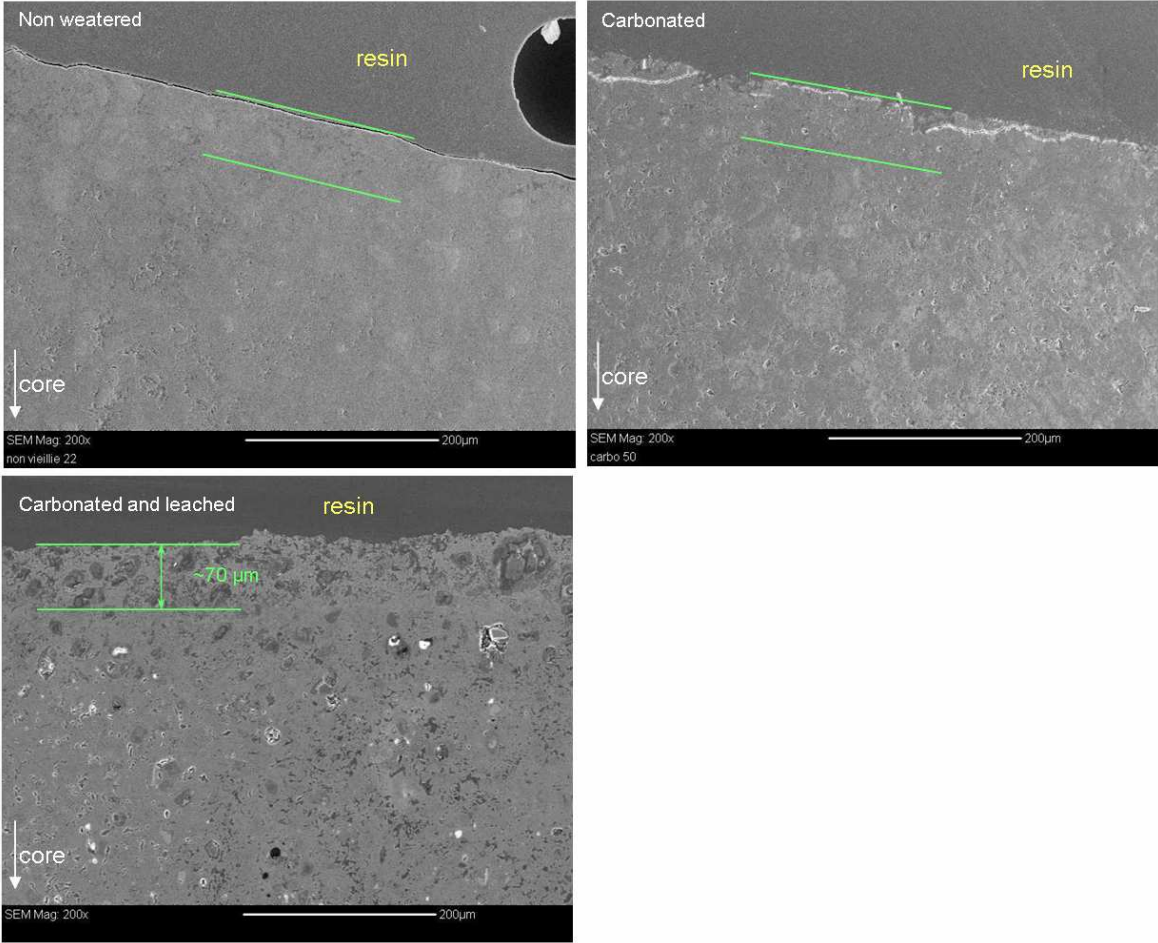
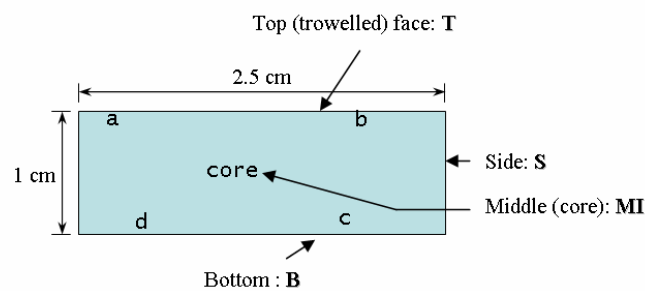


Figure 34: Measured thickness in close ups of earlier images

### 3.6. SEM/EDX analysis

Direct and microscopic observations point out surface alterations and changes in microstructure of carbonated and leached specimens. Hence, chemical change was expected from EDX analysis. Figure 36 presents EDX analysis performed on carbonated and leached specimens, and Figure 35 shows the different areas analysed. Twenty punctual analyses are performed for each area, mean values are plotted on graphs. Each analysis is performed on a surface about  $20 \times 200 \mu\text{m}$ .

We compare concentrations in calcium, silicon, aluminium between analyses performed on the side and in the core. We assume that accelerated weathering has a superficial impact, so the chemical composition in the core is representative of a non weathered matrix. This was confirmed with comparison with analyses performed on non weathered specimens.



**Figure 35: Localization of EDX analyzed areas**

EDX data shows no change in chemical composition, there is just a tendency of Ca enrichment and thereby Si depletion on the sides of specimen

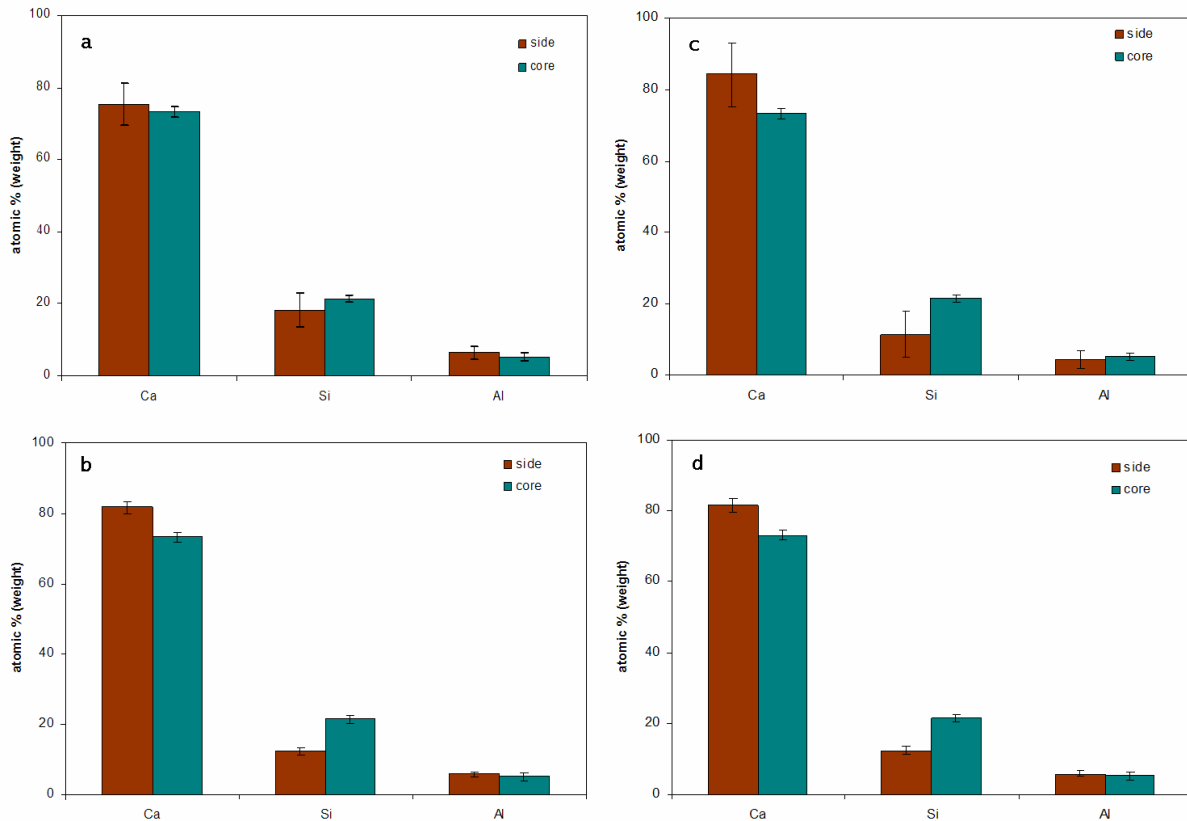


Figure 36: SEM / EDX analysis of thin sections for carbonated and leached specimen

### 3.7. Discussion

Our results show that accelerated carbonation results in calcite, vaterite and aragonite formation (Figure 27, Figure 28). This is consistent with literature. The presence of metastable forms (vaterite and aragonite) in the carbonated area seems to be a feature of accelerated carbonation tests (Thiery et al., 2007). According to Thiery (2005), the thermal stability of  $\text{CaCO}_3$  produced is lower as the carbonation level increases. This author also showed that the thermodynamically metastable forms of  $\text{CaCO}_3$  correspond to the carbonation of C-S-H. The shift of the  $\nu_3\text{SiO}_4^{4-}$  from the FT-IR spectrum (Figure 28) to higher wave number units suggests also a polymerisation of C-S-H with the carbonation as well as with leaching operations (Mollah et al., 1995).

The carbonation reaction mainly has two effects on the cement matrix and its pore water solution (Van Gerven et al., 2004): lowering of the pH of the pore water, and decreasing of the matrix porosity. This is because of the formation of calcite, which is less dense than portlandite, thereby can clog pores more easily. A decrease of total porosity of about 20% is noticed with accelerated weathering (Table 4). The porosity decrease observed in literature

ranged from 10 to 19 % (Houst and Wittmann, 1994; Ngala and Page, 1997). Evolution of total porosity with carbonation is dependent of w/c ratio and cement type.

The presence of cracks for weathered specimen is not detected with MIP analyses. This can be explained by the sampling method used. Specimens are broken into small pieces. They break along cracks, so these fissures don't appear in the final sample.

Generally, the leaching of cement paste gives rise to matrix decalcification due to the dissolution of portlandite and C-S-H decalcification. Haga et al. (2005) concluded from their work that the major leached constituents of hardened ordinary Portland cement are portlandite and C-S-H gel, and the large pore size, associated with the leaching of portlandite, will significantly affect the diffusion of leached constituents. An increase in porosity was expected after the leaching of our carbonated specimen from the dissolution of portlandite and the transformation of vaterite into calcite (Thiery et al., 2007). However, results show a slight decrease in total porosity after leaching operation (Table 4). In the present study leaching occurs after carbonation. The porosity decrease diminishes the leaching of matrix constituents, while the decrease in pH increases leaching. The effect of porosity, however, exceeds that of pH, resulting in a net decrease of leaching due to carbonation (Van Gerven et al., 2007). It can be assumed that the dissolution of portlandite and decalcification of C-S-H result in  $\text{CaCO}_3$  precipitation in the pore volume. Gervais (1999) found that carbonation prior to leaching operation results in a decrease of calcium release compared to the leaching of non carbonated specimens. The mobility of  $\text{Ca}^{2+}$  is reduced, and it may precipitate with  $\text{CO}_3^{2-}$  before, thus not reaching leachate. This could explain EDX analyses and lack of the matrix decalcification observed (Figure 36): most of the dissolved  $\text{Ca}^{2+}$  precipitates into  $\text{CaCO}_3$  before, hence not exiting the matrix with the outcome: an enrichment in calcium near the specimen surface.

## 4. Conclusion

To conclude, the key points to remember are:

- Accelerated weathering of the matrix alters the general surface aspects of the specimens.
- Carbonation of specimen leads to a decrease of the surface pH and total porosity, as well as the formation of calcite, vaterite and aragonite as a result of the depletion of portlandite, and polymerization of C-S-H respectively.



- Carbonated and leached specimens are characterized by a lower surface pH and lesser porosity than carbonated only. They are mainly composed by calcite, aragonite and C-S-H gel.

## CHAPTER VI :

# FUNGAL DEVELOPMENT

This chapter contains cultural informations on fungal strains, and more especially about culture of *Alternaria alternata*. Then the development of biochemical assays is described.

### 1. Cultural methods

The first step relating to the fungal cultivation is to determine physico-chemical parameters which promote optimum fungal development. Most if not all methods for the production of spores in culture were developed to provide a supply of inoculum for inoculation (Rotem, 1994). Fungal growth is affected by incubation temperature, nutrient media, time period of cultivation, and the type of culture conditions (i.e., stationary or shake culture). Conditions for optimal growth and sporulation were reported to differ within and among fungal species (Gupta et al., 1999). The major work performed about determination of optimal culture conditions was carried out with *Alternaria alternata*.

#### 1.1. Culture of *Alternaria alternata*

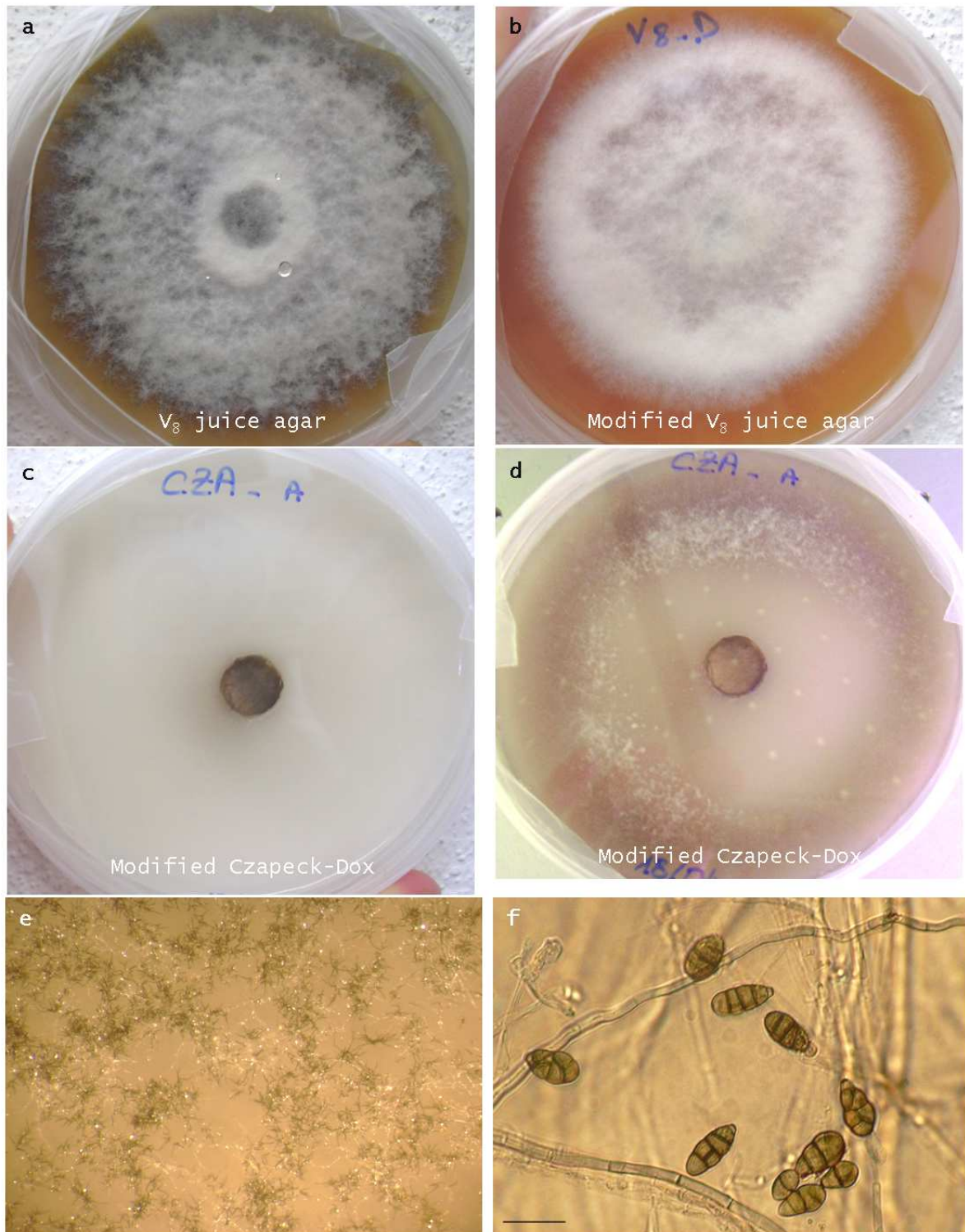
##### 1.1.1. Influence of culture media

*A. alternata* was grown in three different media at 24°C: V<sub>8</sub> juice agar (V<sub>8</sub>), modified V<sub>8</sub> juice agar (mV<sub>8</sub>), and modified Czapeck-Dox agar (mCD) in order to determine suitable media and conditions for optimum yield of spores and mycelial development. The mCD is a synthetic medium widely used in mycological laboratories. Many moulds produce very characteristic colonies on it and may also exude pigmented substances. Aerial growth is often suppressed and sporulation may be enhanced. Some mould, however, grows poorly on this medium and may even fail to sporulate altogether, often because of their inability to synthesize vitamins. The addition of agar to this medium makes it, in reality, a semi synthetic one (Malloch, 1997). The V<sub>8</sub> and mV<sub>8</sub> are natural media because they are partly or completely composed of natural materials. The V<sub>8</sub> juice used in V<sub>8</sub> medium probably contains many nutrients that fungi can

use, but we have a little idea what they may be. It is a medium that is used routinely in plant pathology and seems to be a good complement to Leonian's or PDA. Moulds that fail to sporulate on those media often sporulate heavily on  $V_8$ , or vice versa (Malloch, 1997).

Figure 37 shows fungal development after 9 or 14 days of incubation. The growth at 9 days of *A.alternata* in  $V_8$  medium is characterized by a short downy grey mycelium which is dark coloured on its periphery. Culture in  $mV_8$  medium presents an abundant white mycelium while mCD medium exhibits a much dispersed mycelium. Sporulation is highest on mCD medium, and lacking on  $mV_8$ . It is characterized by a dark ring on plate periphery after 14 days on mCD medium (Figure 37d) and appears less dense in  $V_8$  medium after 20 days and is more located around central inoculate.

Hence, mCD medium promotes sporulation more than vegetative growth. According to Rotem (1994) all *Alternaria* species sporulate better in media poor in sugars, such as  $V_8$  medium prepared without the addition of sugar. Such media suffice for easily sporulating *Alternaria*. Inhibition of vegetative development by starvation triggered sporulation of *A.alternata*, *A.dauci*, and *A.solani* transferred from an agar medium with nutrients to water agar (Shahin and Shepard, 1979). Spores of *A.alternata* are formed in long chain of approximately 10 spores or more, either beakless or with very short beaks.

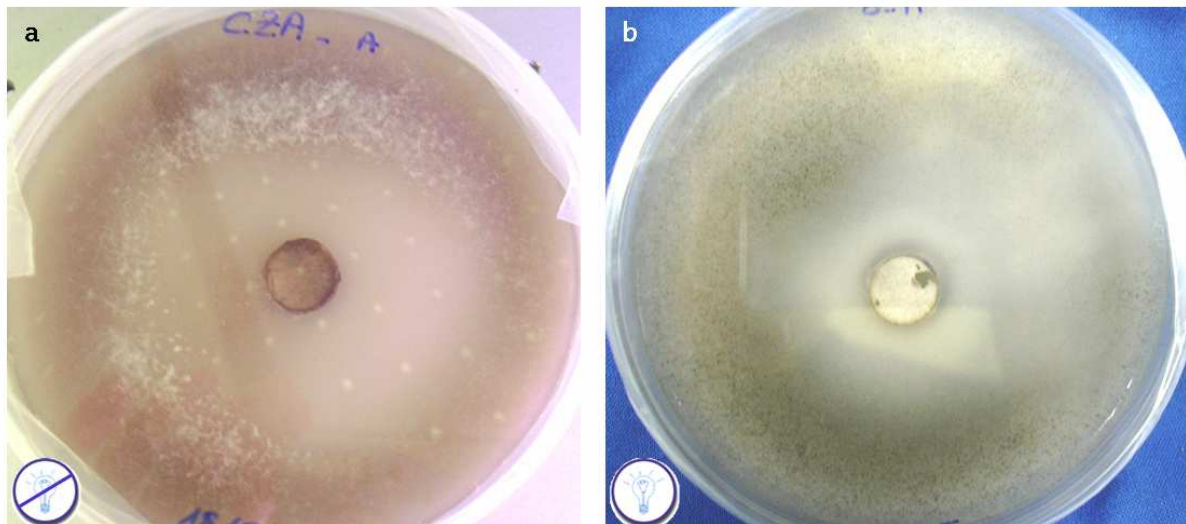


**Figure 37 : *Alternaria alternata* grown on different media at  $24\pm 1^\circ\text{C}$  -  $90\pm 5\%$  RH – (a) 9 days in V<sub>8</sub>, (b) 9 days in mV<sub>8</sub>, (c) 9 days in mCD, (d) 14 days in mCD, (e) observation of spore chains from (d) with stereomicroscope x50, (f) observation of (e) with optic microscope (scale bare = 20 μm)**

### 1.1.2. Influence of light on sporulation

Most species that form spores in chains sporulate easily and usually do not need triggering. Nevertheless, in some cases external induction increases sporulation in such species. Among all triggers for mass production of spores, irradiation is undoubtedly the strongest. Irradiation with UV light is the main element in most formulas for sporulation. For practical purposes it does not matter whether the source of light is a germicidal bulb with short UV wavelengths or a lamp with long UV or near ultraviolet (NUV) wavelength. It also does not matter whether glass or plastic dishes are used for the cultivation of fungi (Rotem, 1994). In species that sporulate in culture without induction, conidiophores\* are obviously formed in darkness but become dark and look more typical when exposed to light (Rotem, 1994).

Figure 38 shows culture in mCD exposed or not to light after 14 days of incubation at  $24\pm 1^\circ\text{C}$  and  $90\pm 5\%$  RH. Cultures exposed to light were submitted to horticol neon (blue and red wavelengths are increased). For both sporulation is noticed but higher spore density is observed when cultures are exposed to light. According to Rotem (1994), mechanism of photosporogenesis involves two distinctive phases. The first, or inductive, phase leads to the formation of conidiophores; the second, or terminal, phase leads to the formation of conidia (spore). The temperature and light requirements for these two phases are distinct.



**Figure 38: Influence of light exposition on sporulation for culture grown 14 days in mCD medium – (a) Not exposed to light, (b) exposed to light**

\* Conidiophore: It is a specialized hypha that bears conidia (spore).

The inductive phase is stimulated by NUV wavelengths in the range of 310-400 nm. The terminal phase proceeds best in darkness and is often inhibited by light (Leach, 1967).

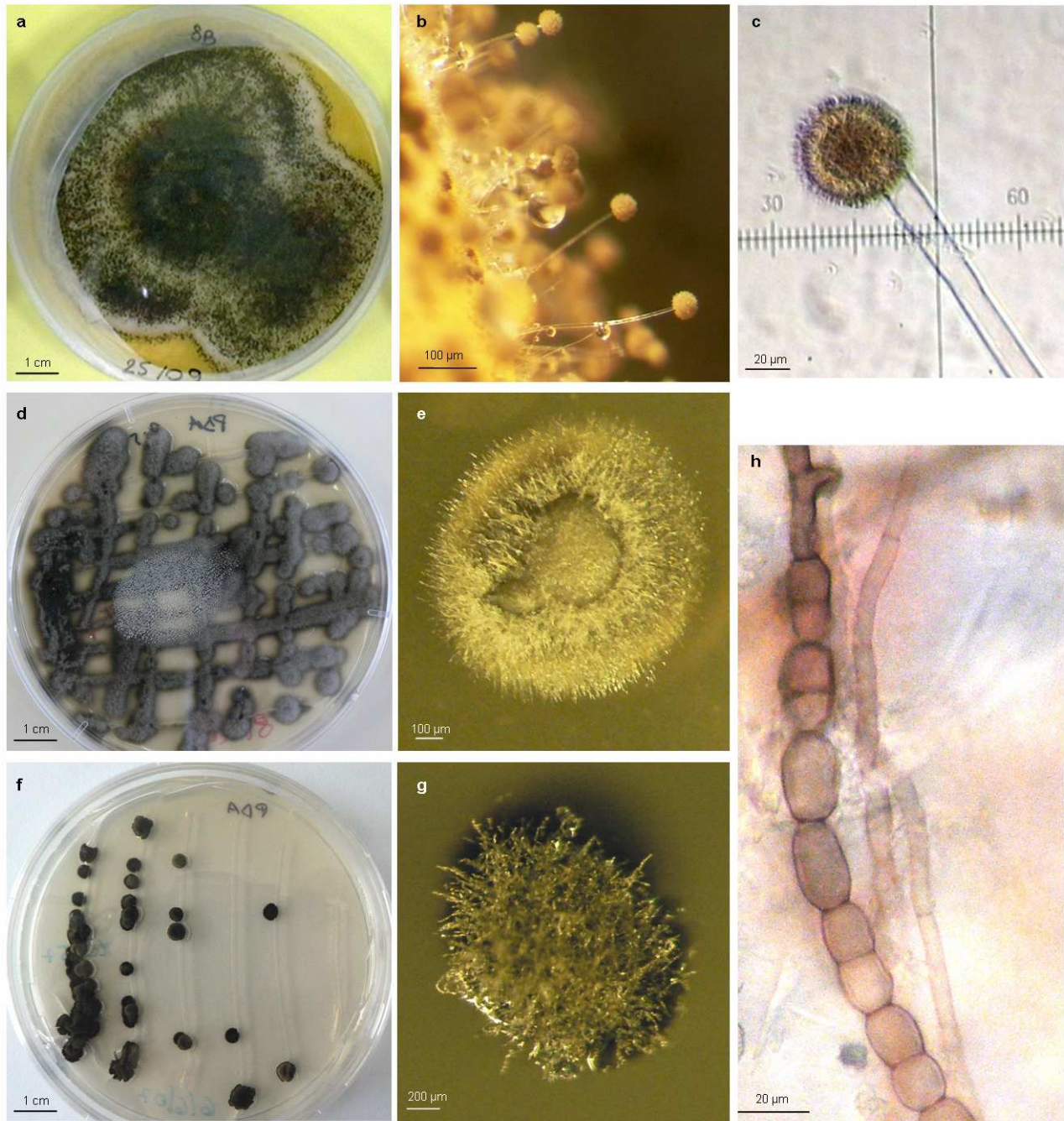
Fungal growth is also affected by temperature, water activity ( $a_w$ ), and pH. They are considered to be some of the most important factors (McMeekin and Ross, 1996). The ability to grow at high or low values of either temperature or pH increases when  $a_w$  increases. On the other hand, a decrease in  $a_w$  does not necessarily mean a decrease in pH or temperature optimum (Andersen and Frisvad, 2002). We follow DSMZ instructions relating to optimum temperature, pH and relative humidity for *A.alternata* cultivation.

The culture in mCD provides mainly spores, whereas one in  $V_8$  favours mycelial development but permits also sporulation. Two points are important for the development of an accelerated laboratory test:

- (i) Inoculation has to be reproducible in terms of concentration. For this, the use of spores suspension appeared first the most suitable method. It implies that large amounts of spores must be available. Hence, before the test *A.alternata* is grown in mCD 14 days and is daily exposed 5h to light.
- (ii) To study biodeterioration of a matrix, both hyphae and spores have to be produced. At this stage of the study we plan to bring nutritive medium during the biodeterioration test, therefore we select  $V_8$  medium to promote vegetative growth and sporulation.

## 1.2. Culture of *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* was grown in Potatoes Dextrose Agar (PDA) medium. Vegetative growth and sporulation were rapidly observed in these conditions (Figure 39a, Figure 39b, Figure 39c). Culture of *A.niger* yields numerous spores and promote in the same time mycelial development, which are the two main parameters for the biodeterioration test. Therefore, no further investigations about influence of parameters such as media, light exposition are carried out.



**Figure 39: Observations of fungal cultures – (a) Culture in plate of *Aspergillus niger* grown 9 days in PDA, (b) observation of *A.niger* with stereomicroscope, (c) observation *A.niger* with optic microscope, (d) culture in plate of *Exophiala* sp. grown 15 days in PDA, (e) observation of *Exophiala* sp. with stereomicroscope, (f) culture in plate of *Coniosporium uncinatum* grown 1 month in PDA, (g) observation of *C.uncinatum* with stereomicroscope, (h) observation of *C.uncinatum* with optic microscope**

### 1.3. Cultures of *Exophiala* sp. and *Coniosporium uncinatum*

Both strains *Exophiala* sp. and *Coniosporium uncinatum* are involved in the final step of the study only. They are studied at the time of final optimization of biodeterioration test performed in the department of Microbiology, Genetic and Molecular sciences in Messina. We based our experiments on culture knowledge and ability of researchers working there. Therefore, no investigations on optimization of fungal growth were required. Figure 39d to 39h show culture and observations of both strains.

## 2. Development of assays for biomass quantification

### 2.1. Proteins assay

#### 2.1.1. Bradford assay

The Coomassie Brilliant Blue protein assay established by Bradford (1976) is a spectroscopic analytical procedure used to measure the concentration of proteins in solution. The principle of the Bradford Protein Assay is based on an absorbance maximum shift from 465 nm to 595 nm for Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG) when binding to protein occurs. The Bradford method is commonly employed since it is sensitive, fast, simple and inexpensive. The reaction between CBBG dye and protein occurs quickly and the product is stable for approximately 1h (Lü, 2006).

Some substances may interfere with the Bradford reagent during the proteins assay. Therefore to optimize the assay different solvent were tested: H<sub>2</sub>O, methanol, physiologic solution (NaCl 0.9%), and Phosphate Buffer Saline (PBS). The performance of each assay is characterized by the limit of detection (LD) and the limit of quantification (LQ). According to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), the limit of detection, expressed as a concentration or quantity, is derived from the smallest measure that can be detected with reasonable certainty for a given analytical procedure (Mocak, 1997). The limit of quantification is not defined in the IUPAC. It can be defined in words that the LQ refers to the smallest concentration or the mass which can be quantitatively analysed with reasonable reliability by a given procedure (Mocak, 1997). The Table 5 presents characteristics of standard and micro-assay. The LD and LQ are calculated as follow (Recueil International des methods d'analyses – OIV, 2006):

The standard curve fit for use in the linear concentration range. It is defined by equation (1):



$$y = ax + b \quad (1)$$

The LD is the smallest concentration which can be distinguished from the blank with 0.13% of risk to keep sample holding nothing and is determined by (2) and (3):

$$y_{LD} = b + 3 S_a \quad (2)$$

$$x_{LD} = (b + 3 S_a) / a \quad (3)$$

With  $S_a$  = standard deviation at the intercept point of the standard curve.

The same reasoning is applied for LQ determination but with a multiplication factor of 10 (risk of 0.5‰ to conclude at the presence of the substance whereas it is absent).

$$y_{LQ} = b + 10 S_a \quad (4)$$

$$x_{LQ} = (b + 10 S_a) / a \quad (5)$$

Results show that the linear concentration of standard assays ranges from 0 to 500  $\mu\text{g/mL}$  (Table 5) no matter the solvent used. The standard curve obtained for standard assay performed in PBS only is presented in Figure 40. The lowest LD and LQ are obtained with assay performed in PBS. Relating to the micro-assay, the standard curve is linear over all the concentration range tested, 0-10  $\mu\text{g/mL}$ , with NaCl 0.9% and  $\text{H}_2\text{O}$ , whereas precipitation of proteins is noticed for assay carried out in methanol. While very low LD and LQ are reached with the micro-assay, a large volume of protein sample is used. The standard assay performed in PBS seems to be best compromise between low LD and LQ, the linear range of concentration, and the volume sample required.

### 2.1.2. Extraction of proteins

These assays were performed with standard proteins samples from Bovine Serum Albumin (BSA). Now, the next step is to determine the best method and protocol to extract proteins from sample that is to say to release proteins from the cell. The amount of energy that must be put into the breakage of cells depends very much on the type of organism and to some extent on the physiology of the organism. Some types of cell are broken readily by gentle treatment such as osmotic shock (e.g. animal cells and some gram-negative bacteria), whilst others are highly resistant to breakage. These include yeasts, green algae, fungal mycelia and some gram-positive bacteria which have cell wall and membrane structures capable of resisting

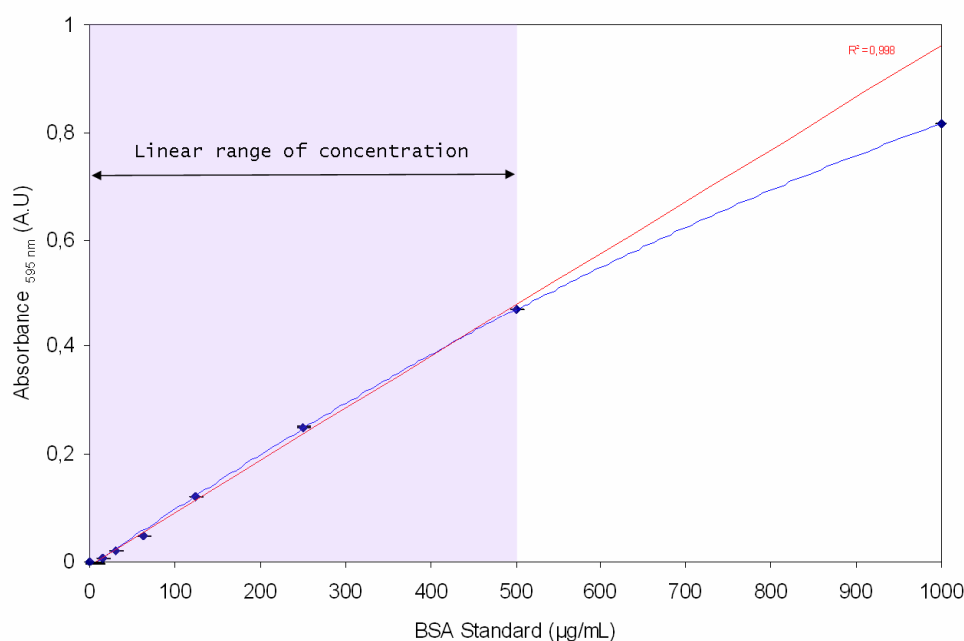
internal osmotic pressures of around 20 atmospheres (2 MPa) and therefore have the strength, weight for weight, of reinforced concrete (Chaplin, 2004).

**Table 5: Characteristics of proteins assay performed in different solvents**

Assay	Solvent	LD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Linear domain ( $\mu\text{g/ml}$ )
standard	NaCl 0,9%	12,8	14,2	0 - 500
standard	MeOH	7	7,8	0 - 500
standard	H <sub>2</sub> O	9,1	9,8	0 - 500
standard	PBS	5,3	6	0 - 500
micro	NaCl 0,9%	0,27	0,36	0 - 10
micro	MeOH	0	0	0
micro	H <sub>2</sub> O	0,2	0,252	0 - 10

LD = Limit of detection

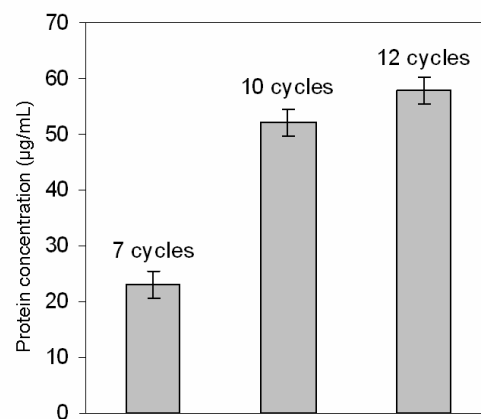
LQ = Limit of quantification



**Figure 40: Standard curve produced from standard assay performed in PBS**

Consequently a variety of cell disruption techniques have been developed involving solid or liquid shear or cell lysis. Ultrasonication produces cavitation phenomena when acoustic power inputs are sufficiently high to allow the multiple production of micro-bubbles at nucleation sites in the fluid. The bubbles grow during the rarefying phase of the sound wave, and then are collapsed during the compression phase. On collapse, a violent shock wave passes through the medium. The whole process of gas bubble nucleation, growth and collapse

due to the action of intense sound waves is called cavitation. The collapse of the bubbles converts sonic energy into mechanical energy in the form of shock waves equivalent to several thousand atmospheres (300 MPa) pressure. This energy imparts motions to parts of cells which disintegrate when their kinetic energy content exceeds the wall strength. Much of the energy absorbed by cell suspensions is converted to heat so effective cooling is essential. Fungal cells were typically subjected to 7, 10, 12 cycles of sonication. After centrifugation of sonicated solution measurements of proteins content are performed on the supernatant.



**Figure 41: Influence of sonication on proteins extraction**

The protein concentration increases between 7 and 10 cycles of sonication whereas similar concentrations are obtained after 10 and 12 sonication cycles (Figure 41). Although samples are kept in ice, heating of sample is noticed after 12 cycles. Ten cycles of sonication seems to be necessary to release all proteins content without heating the samples.

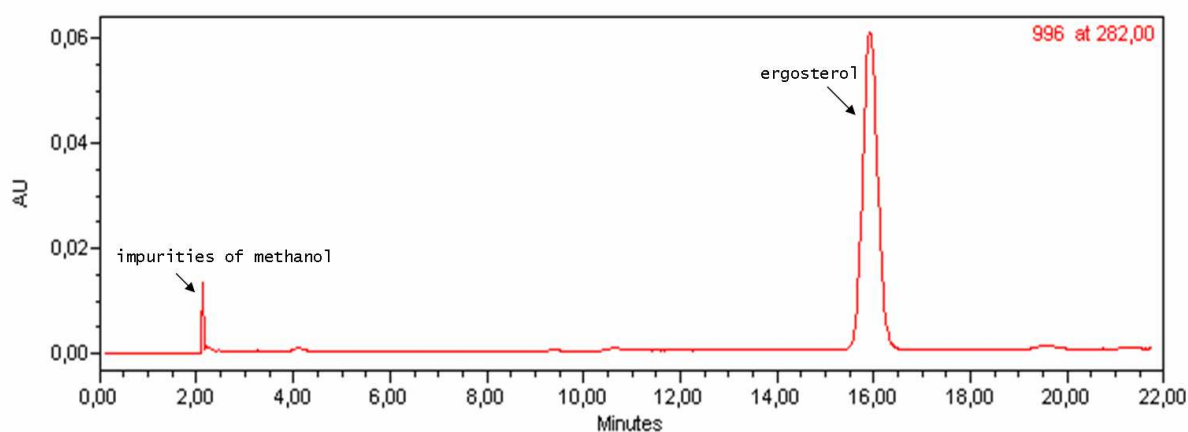
## 2.2. Ergosterol assay

Ergosterol is the most abundant sterol held in the cell membranes of most filamentous fungi, certain microalgae, protozoa and yeasts (Newell, 1992; He et al., 2000).

The ergosterol assay was developed by Seitz et al (1976), and consisted of four major steps: initial extraction; saponification; partitioning and evaporation; and HPLC determination. This basic technique has been applied with modifications (Bentham et al., 1992; Hill et al., 1993). Despite all the modifications, the analytical techniques of ergosterol determination involving saponification remain time-consuming, which may serve to limit the utility of the analysis (Ruzicka et al., 1995; de Ridder-Duine et al., 2006). Hence, the use of a simplified method of extraction is primordial to make ergosterol analysis attractive.

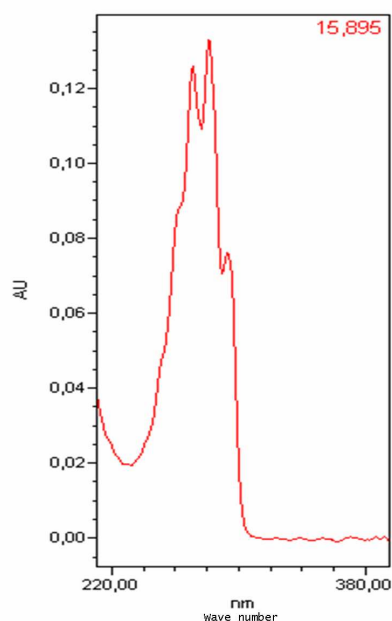
### 2.2.1. HPLC determination

The ergosterol is eluted with acetonitrile – methanol (80:20 v/v) at a flow rate of 0.5 or 1 mL.min<sup>-1</sup>. The injected sample volume was 20 or 100 µL. The retention time of ergosterol obtained at 0.5 mL/min was 22 min with the first test. Therefore, it was decided to increase the flow rate to 1 mL/min to lower retention time. In these conditions, the ergosterol peak appears at about 16-18 min.



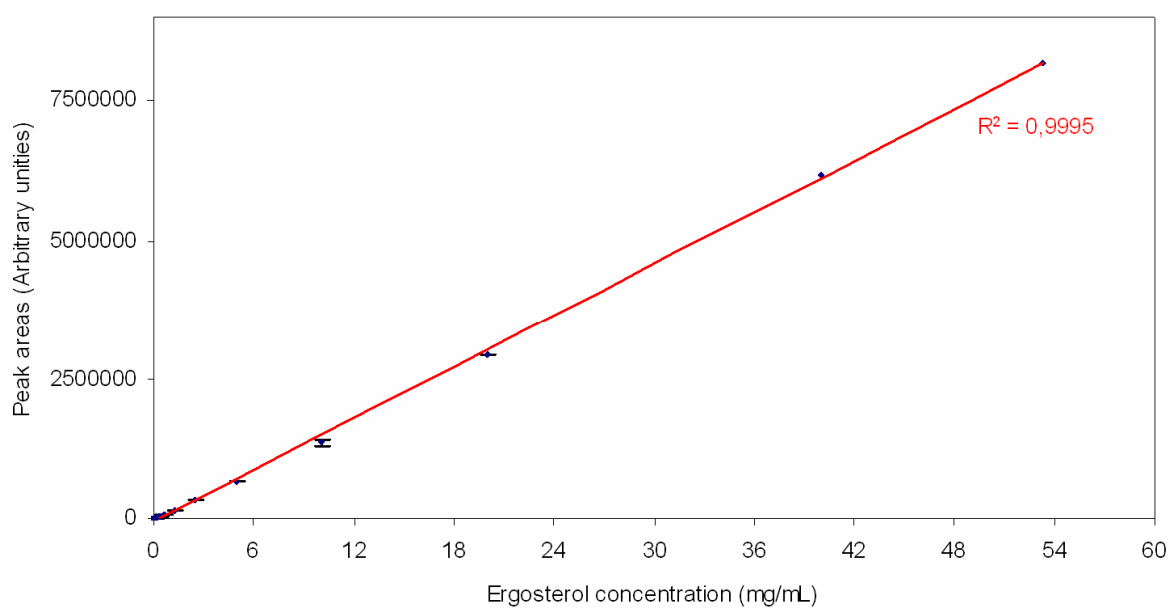
**Figure 42: HPLC chromatogram of solution of commercial ergosterol eluted with acetonitrile-methanol (80:20 v/v) with a flow rate of 1 mL/min**

The chromatogram obtained with a 100 µL loop is shown on Figure 42. Two peaks are observed: the first one appearing at 2.3 min remains constant no matter the dilution factor used. This peak is attributed to impurities present in methanol. The ergosterol is identified thanks its UV spectrum. Figure 43 presents the UV spectrum corresponding to the second peak, eluting at 15.9 min. A strong absorbance at 282 nm, characteristic of ergosterol is observed.



**Figure 43: UV spectrum corresponding to the eluted peak at 15.895 min**

The peak area at the absorption maximum of 282 nm was used for quantification with an external standard via eight point-calibrations. For a standard range of ergosterol solutions at concentrations of between 0 and 53 mg/mL, the relationships between peak surface areas and ergosterol concentrations were linear, with a coefficient of correlation,  $r^2$ , of 0.999 (Figure 44).



**Figure 44: Standard curve of ergosterol solution**

The limit of detection (LD) and quantification (LQ) are shown in Table 6. LD and LQ were determined as three and ten times the standard deviation of noise over the time range of the eluting peak, respectively.

**Table 6: HPLC data for ergosterol assay**

Mobile phase v:v	Retention time min	Flow rate mL/min	Injected volume $\mu$ L	LD ng/mL	LQ ng/mL
ACN / MeOH - 80:20	22	0,5	20	-----	-----
ACN / MeOH - 80:20	17,7	1	20	120	398
ACN / MeOH - 80:20	15,9	1	100	24	79,6

LD = Limit of Detection  
LQ = Limit of Quantification

ACN = Acetonitrile  
MeOH = Methanol

LD and LQ obtained are consistent with those reported in literature (Boissier, 2003; Robine et al., 2006).

### 2.2.2. Extraction of ergosterol

Two fractions of ergosterol have been recognized, namely free and bound (esterified with fatty acids) (Weete, 1989). The original method consisted of an extraction of free ergosterol in methanol, followed by alkaline hydrolysis of fatty acids (saponification) (de Ridder-Duine et al., 2006). The utility of the saponification step has been under discussion (Davis and Lamar, 1992; Ruzicka et al., 1995; Djajakirana et al., 1996; Gong et al., 2001). Whereas Davis and Lamar (1992) found that more ergosterol was obtained by alkaline extraction, such differences were not found by others (Ruzicka et al., 1995; Djajakirana et al., 1996). It was argued that the saponification phase not only resulted in the release of esterified ergosterol, but also in the loss of heat-unstable free ergosterol. Therefore, Ruzicka et al. (1995) proposed a method of non-alkaline extraction in combination with ultrasonication to enhance the release of ergosterol from fungal membranes. The basic idea of this extraction is that ergosterol can be released from fungal membranes by mechanical disruption. This can replace the time- and chemical-consuming saponification step of the original method. The omission of the saponification step allowed for considerable increase in sample throughput (de Ridder-Duine et al., 2006). The Ruzicka method uses the separation of ergosterol from a polar (methanol) to a non-polar solvent (hexane: propan-2-ol).

The use of a sonic probe to extract ergosterol from sample was also reported by Boissier (2003) and Robine et al. (2006) which obtained reliable results.

The Ruzicka method appears very interesting from time consuming and simplicity point of view. Hence, extraction of ergosterol by mean of a sonic probe has been selected for this study. To validate the extraction protocol adapted to our conditions, cement specimens exposed to fungal colonization are needed. At this stage of the study, the experimental set-up relating to the biodeterioration test is not well defined. Thereby, samples are not available to test and optimize the extraction phase selected. Moreover, the method validation should also comprise a recovery study. For this, known volumes of ergosterol standard solutions should be added to cement specimens non-exposed to fungal colonization, at different level. The spiked samples should be extracted following the Ruzicka method.

### 2.2.3. Discussion

Before extraction varying amounts of ergosterol are lost during sample preparation and storage, with losses tending to be ordered: storage in methanol  $\leq$  freezing followed by lyophilisation  $<$  lyophilisation  $\leq$  freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$   $\ll$  air or oven drying (West et al., 1987; Newell et al., 1988; Zelles et al., 1991; Davis and Lamar, 1992). Gessner et al. (1991) stored samples in methanol at room temperature for one week without losses of ergosterol, and extracted sample could mostly be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  under air for 4-6 months without pronounced losses.

Moreover, knowledge of ergosterol concentration alone, does not allow conclusions about the absolute amount of fungus present. For this, appropriate factors to convert ergosterol values into biomass in terms of mycelial dry mass (or similar parameters) are necessary (Gessner and Chauvet, 1993). If valid conversion factors are to be obtained, then, culturing conditions must be chosen such that natural growth conditions are closely simulated. Indeed, the amount of ergosterol in fungal tissue is not constant. It depends among others on the fungal species, age of the culture, developmental stage (growth phase, hyphal formation and sporulation) and growth conditions (growth media, pH and temperature). Unfortunately, no clear trend relating ergosterol to any of these factors has yet been determined (Parsi and Gõrecki, 2006).

The method of ergosterol assay was developed in centre SPIN in Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. The final biodeterioration was performed with four fungal strains. While fungal growth was observed, no biomass quantification was carried out as the

experiment was not achieved in Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne but in the Science University of Messina.

### 3. Conclusion

- Cultivation of *Alternaria alternata* on V<sub>8</sub> medium favours vegetative development and allows sporulation, whereas cultivation on mCD medium promotes sporulation essentially. The exposition to light enhances sporulation phenomenon.
- Proteins assay, using the standard, method allowed obtaining a limit of quantification of 6 µg/mL.
- Ergosterol assay performed with standard solution, using the mobile phase composed of acetonitrile/methanol (80:20 v/v), permitted to quantify and characterize ergosterol at 15.9 min. The limit of quantification obtained is 79.6 ng/mL.
- More investigations about ergosterol assay must be carry out with specimens exposed to fungal colonization. Factors to convert ergosterol values into biomass must be determined for each strain.



## CHAPTER VII:

# ACCELERATED LABORATORY TEST OF BIODETERIORATION

The development of the accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of a cementitious matrix is described in this chapter. Five tests were performed before to define the best methodology. Each test was optimized as a result of the previous one. Therefore, results relating to each test are presented chronologically.

## **1. Test A**

### **1.1. Set up of the experimental device**

#### **1.1.1. Experimental device**

Boxes in polypropylene were used for the experimental device (Figure 45). The use of such boxes permits to keep a sterile environment inside it, as they are autoclavable. The experimental device chosen is inspired by the one used in test for wood preservatives involving wood destroying basidiomycetes (NF EN 113). The advantage is that the methodology described was already developed in our laboratory previously. Hence, the procedure was just adapted to our experimental conditions.

#### **1.1.2. Nutrients brought**

Stone surfaces will be colonized by micro-organisms if enough humidity and nutrients are available (Kussmaul et al, 1998). For the first test, the idea was that nutritive medium should be brought to trigger and enhance fungal development. The first choice was ported on liquid medium. By this way, the liquid solution could rise continuously by capillarity into the submerged specimens, bringing the humidity for fungal development.

### 1.1.3. Specimen weathering

Relating to specimens, freshly prepared hydrated cement pastes are characterized by a pH value of 12 or higher. Under such alkaline conditions most micro-organisms are unable to grow (Shirakawa et al, 2003). The progressive carbonation of hydrated cement paste leads to the neutralization of the alkalinity of the water in the matrix pores. This results in a decrease of the surface pH (cf. chap V), thus creating favourable conditions for microbial propagation (Shirakawa et al., 2003). At this stage of the study only carbonation was considered as weathering step. The specimens are sterilized by  $\gamma$ -radiation (30 kGy), which appears to be the most suitable way of sterilization.

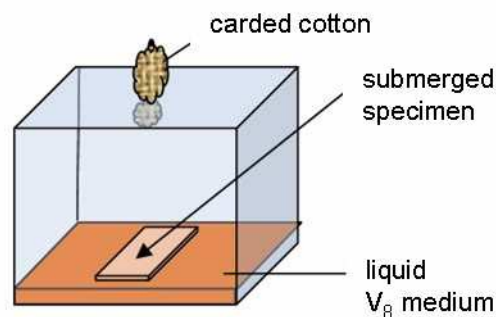


Figure 45: Experimental device developed for the 1<sup>st</sup> test

### 1.1.4. Inoculation

Inoculation is performed by means of spores' suspension spread on the whole specimen surface. This way of inoculation is the most widely reported in literature relating to laboratory tests of biodeterioration involving fungi (Oshima et al, 1999; Shirakawa et al, 2003; de Moraes Pinheiro et al., 2003; Urzì and De Leo, 2007). Therefore, experiments can be easily reproducible as the concentration inoculated is exactly known.

## 1.2. Observations

After seven days of incubation at  $24\pm 1^\circ\text{C}$  and  $90\pm 5\%$  RH, no fungal growth is noticed on the specimen surface and also in the liquid nutritive medium. Furthermore, the liquid medium became gel like.

From these first observations, it appears that the specimens should not be submerged in liquid medium. In this way, the RH imposed in the culture chamber plus the humidity provided by the presence of liquid medium may result in a too high RH inside the box. Moreover, the specimen may be too damp to trigger an optimal fungal development. These conditions are nearer from culture in liquid medium than one in solid medium. Therefore the experimental conditions withdrew from ones expected.

The first step of optimization will be to change the supply of nutrients: liquid medium will be replaced by solid one.

## 2. Test B

### 2.1. Optimization of the experimental device

For this second test, solid nutritive medium covers the box bottom as suggested in NF EN 113. When the spores' suspension is inoculated on the specimen, it will draw along sides and spill on the solid medium. Fungal development should be faster on the nutritive medium than on the specimen surface. Therefore, the presence of nutritive medium should trigger and enhance fungal growth.

Liquid nutritive medium is also spread on the specimen surface. Once it has been absorbed, the specimen is placed vertically in the box, as shown in Figure 46. The suspension of *Alternaria alternata*'s spores are inoculated on the upper face. This way of inoculation was chosen in order to promote the maximum spreading of spores on the specimen, on the two vertical larger sides.

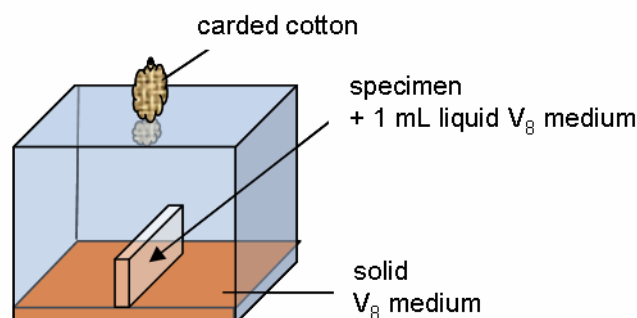
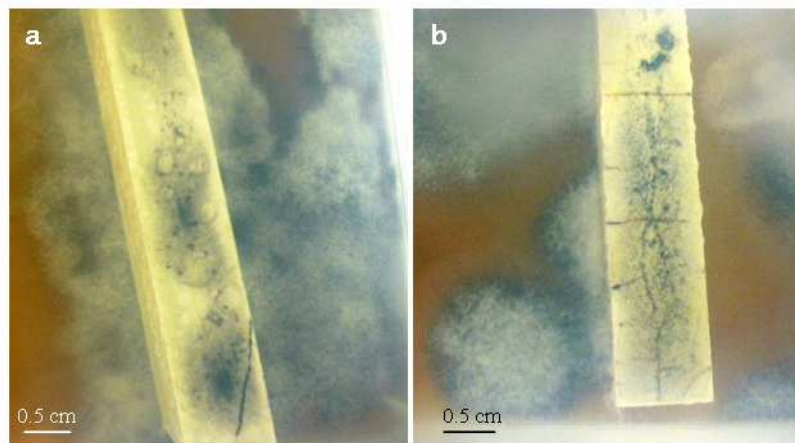


Figure 46: Experimental device for test B

## 2.2. Observations

After five days of incubation, no fungal growth is noticed on the specimens. Nevertheless, fungal development is observed on the nutritive medium (Figure 47), which indicates that spores inoculated are viable.

After two months of incubation, the entire solid nutritive medium is covered by *Alternaria alternata*. A progressive covering of the specimen was expected at the bottom from the fungal development on the solid nutritive medium, and on the upper face from the germination of spores inoculated. However, no fungal development is noted on the non weathered and the carbonated specimen. The dark colour observed on the specimen surface (Figure 47) corresponds to the spores inoculated and not at all to the fungal development.



**Figure 47: Observations of boxes after 5 days of incubation at  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $90\pm 5\%$  RH – (a) Non weathered specimen, (b) carbonated specimen**

The vertically disposition of the specimen doesn't seem to be the best choice. Spores are probably not enough spread on the surface. They remained agglomerated which does not promote their germination. Actually, spores inoculation on the larger side should be a better solution: spores could be shared out in a more homogeneous way.

The lack of fungal growth on the specimen could also be explained by another important fact; the surface pH of cement specimens is generally about 12-13. Shirakawa et al (2003) recorded no fungal growth on any of their mortar not exposed to accelerated carbonation. The pH values below or close to 9 allowed the colonisation of mortars by *Cladosporium sphaerospermum*, while pH close to or higher than 10, inhibited such growth (Shirakawa et al., 2003). In the present study, the carbonation operation leads to decrease of surface pH to a

value near 10 (cf chap V). This value remains too high to favour fungal growth. It is necessary to decrease this surface pH to allow the fungus to develop rapidly. With this aim in view, leaching operation was performed on carbonated specimens for the next test. Thus, surface pH of 8.8 was obtained (cf. chap V).

### 3. Test C

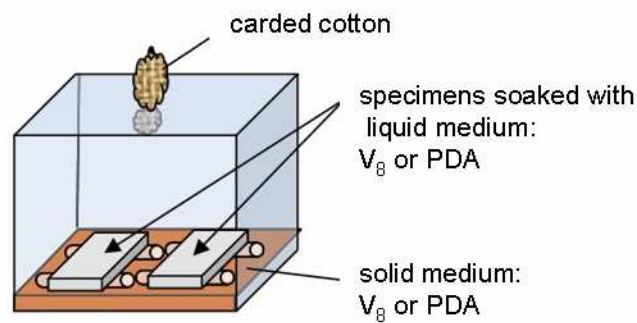
#### 3.1. Optimization of the experimental device

This test is performed with specimens non weathered, carbonated and leached, and carbonated only. As previously, solid nutritive medium covers the box bottom, V<sub>8</sub> medium or PDA is used for *Alternaria alternata* or *Aspergillus niger* respectively (Figure 48).

Two specimens with the same weathering are placed into each box. Specimens are disposed on thin glass rod in order to avoid direct contact between the solid nutritive medium and specimens.

The way to brought nutrients is also changed. The specimens are soaked with liquid nutritive medium as suggested by Shirakawa et al. (2003). Therefore, nutrients are provided inside the matrix. By this way, water is available to support fungal growth and the fungus may also be forced to penetrate inside the matrix to develop. The question of the necessity to provide regularly nutrients also arises. Some developed tests bring nutrients during incubation (Oshima et al., 1999; Barberousse 2006), while some others don't (Sirakawa et al., 2003; De Moraes Pinheiro et al., 2003; Nielsen et al., 2004). We aim at developing an accelerated test, so optimum fungal development is needed. Therefore, the content of nutrients during the test shouldn't be a limiting parameter. On the other hand, the amount of nutrients available should not hinder interaction between fungi and the matrix.

In the present case, liquid nutritive medium is added on the specimen surface, one millilitre each week.

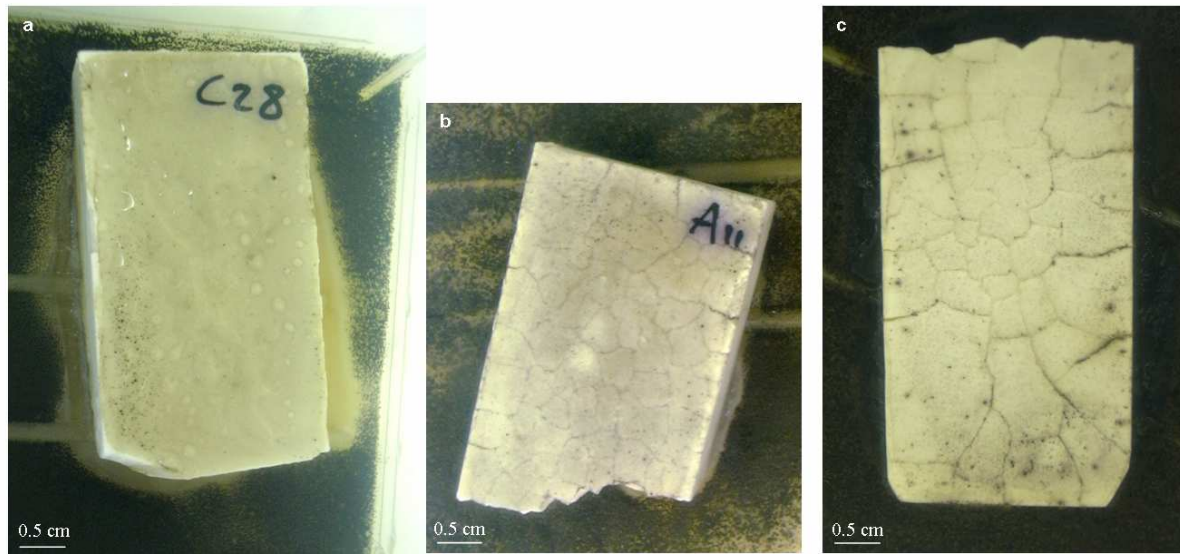


**Figure 48: Experimental device for test C**

### 3.2. Observations

Firstly, a rapid fungal development is noticed on the surface of the solid nutritive medium in the box, for *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger*. The whole surface is covered after 10 days. This indicates that culture conditions inside the box are compatible with a rapid fungal growth. Nevertheless, no fungal development is observed on the specimen surface, even after two months of incubation. It appears that the experimental device is not optimum, but the way it doesn't is not clear: nutrients are provided to fungi, fungal growth is possible on the solid medium, and spores are visible at the specimen surface. Relating to the relative humidity, it is regulated inside the incubation chamber to  $75$  or  $90 \pm 5\%$  for *Aspergillus niger* or *Alternaria alternata* respectively. Inside the box, the RH appears to be suitable for fungal development as fungi grow on the solid nutritive medium.

Specimens with different weathering (non weathered, carbonated then leached, carbonated only) were inoculated. From these observations, no influence of the matrix weathering on the fungal development is noted. At this stage of the study, it could be assumed that fungal development is favoured on the solid medium to the detriment of the specimen surface, no matter the weathering of the matrix. Therefore, a solution to trigger fungal growth on the specimen surface must be determined.



**Figure 49: Observations of specimens inoculated with *Aspergillus niger* after 10 days of incubation at  $24\pm 1^\circ\text{C}$  and  $75\pm 5\%$  RH – (a) Non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen**

It seems difficult to work more on the matrix weathering to improve its bioreceptivity. Actually, chapter V points out the important matrix' alterations induced by the accelerated weathering (carbonation followed by leaching operation). The surface of carbonated then leached specimens is mainly composed by  $\text{CaCO}_3$ , which yet differs significantly from the initial composition of the matrix (non weathered specimen). Hence, we have first to determine or at least to estimate the real impact of this accelerated weathering on the matrix biodeterioration before to envisage a more extended matrix weathering. That is to say if:

- (i) the deterioration induced by fungal development can be observed and evaluated on the weathered specimens,
- (ii) or the structural and chemical modifications due to the accelerated weathering alters the matrix in such a way that biodeterioration couldn't be more deleterious to the matrix. In this case, while carbonation and leaching occurs in natural environment, the methodology of the accelerated weathering should be reconsidered.

For this reason, the way of the experimental device improvement focuses on the inoculation step rather than on the matrix weathering.

## 4. Test D

### 4.1. Optimization of the experimental device

The experimental methodology is similar to the previous one except the way the nutrients are provided. In the present case, specimens are not soaked with liquid medium, but covered by a thin layer of solid nutritive medium (Figure 50). For this, they are rapidly plunged in the solid medium still hot and let to dry under laminar flow hood before inoculation. The test is performed with *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger*, on specimens non weathered, carbonated then leached, and carbonated only.

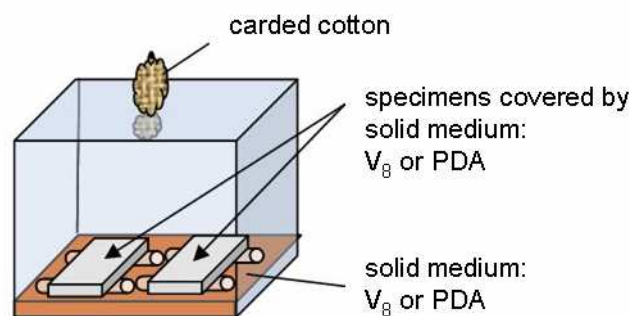
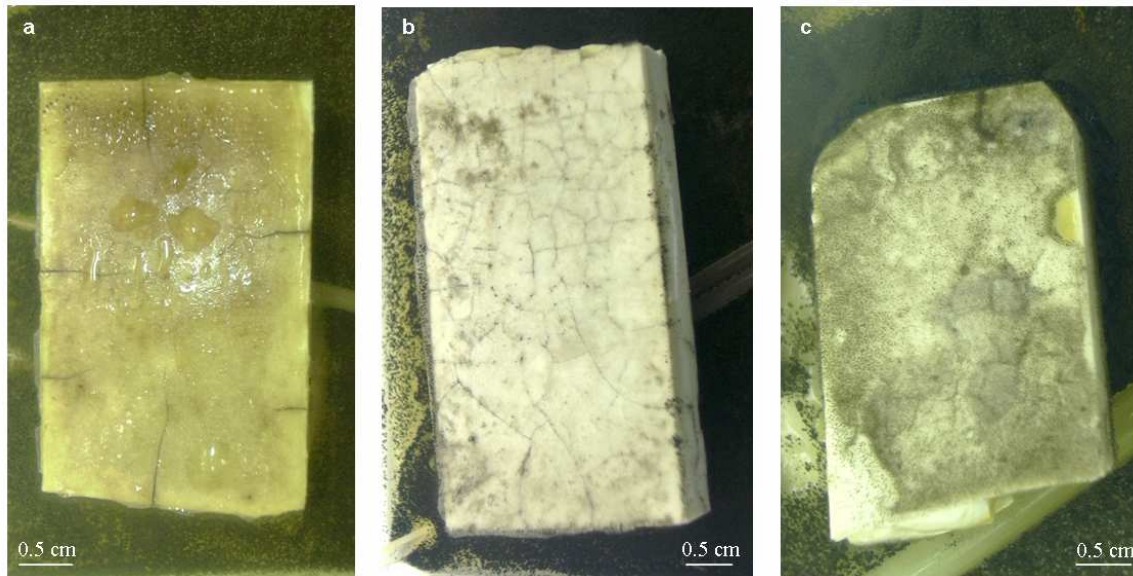


Figure 50: Experimental device for test D

### 4.2. Observations

As previously, after 10 days of incubation fungal development is noticed on the nutritive medium covering the box bottom for both strains. Now the specimens' surfaces are observed according to the weathering performed. For the non weathered ones, no fungal growth is noted no matter the strain inoculated. For the first time, fungal growth is observed after 10 days of incubation, only for one out of three carbonated specimens inoculated with *Aspergillus niger*. The most interesting point is that on all the carbonated then leached specimens *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger*'s growth is observed (Figure 51, Figure 52).





**Figure 51: Observations of specimens inoculated with *Aspergillus niger* after 10 days of incubation at  $24\pm 1^\circ\text{C}$  and  $75\pm 5\%$  RH – (a) Non weathered specimen, (b) carbonated specimen, (c) carbonated then leached specimen**

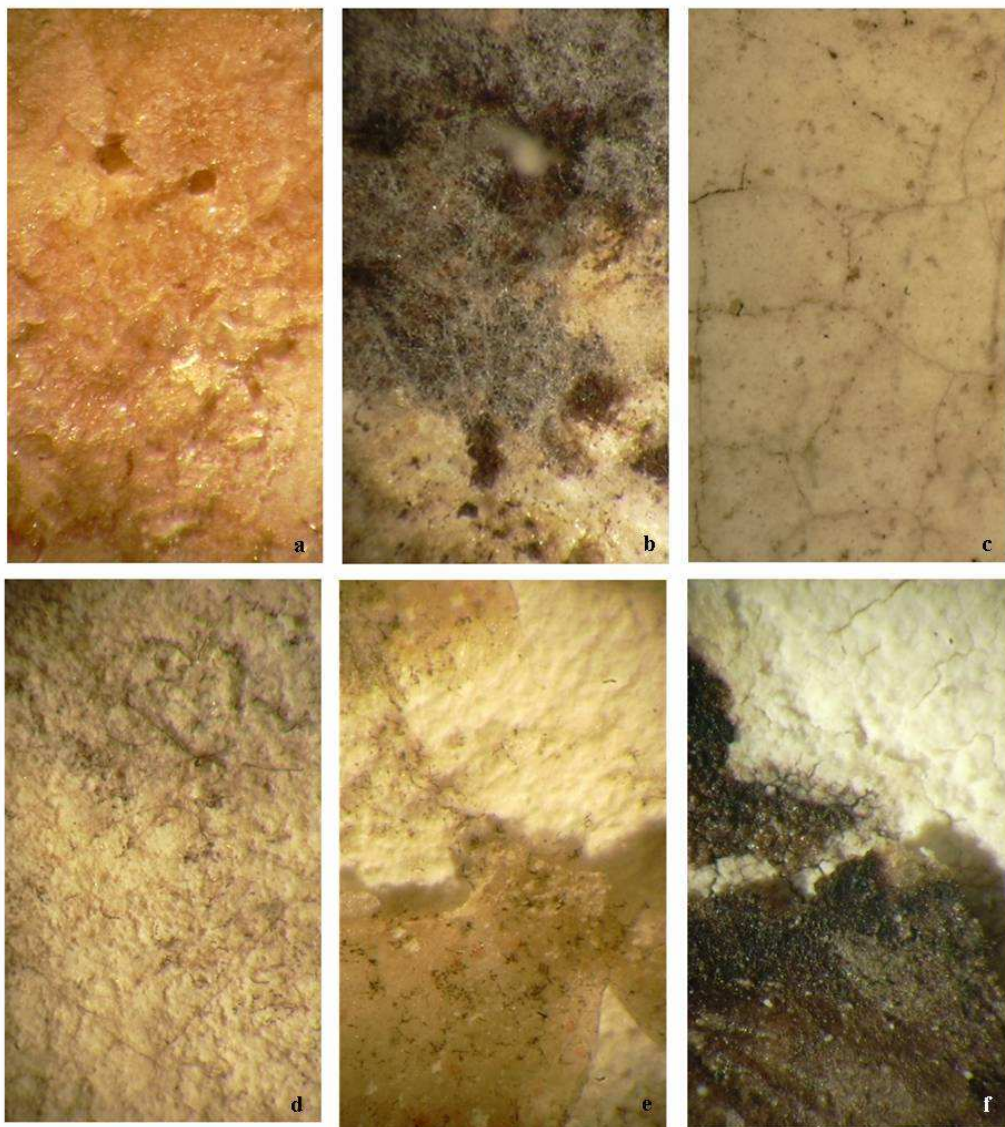
However, after 20 days of incubation, the fungal development observed at 10 days seems to have reached its maximum. After this period, no further growth is noted on the specimen surface.



**Figure 52: Observations of carbonated and leached specimens inoculated with *Alternaria alternata* after 10 days of incubation at  $24\pm 1^\circ\text{C}$  and  $90\pm 5\%$  RH**

After three months of incubation, specimens are removed from the box. They are observed with the stereomicroscope and then prepared for the SEM observations. Then a surprising observation was performed for one carbonated specimen for which no *Aspergillus niger* development was noted on the inoculated surface (top face). The bottom surface, separated

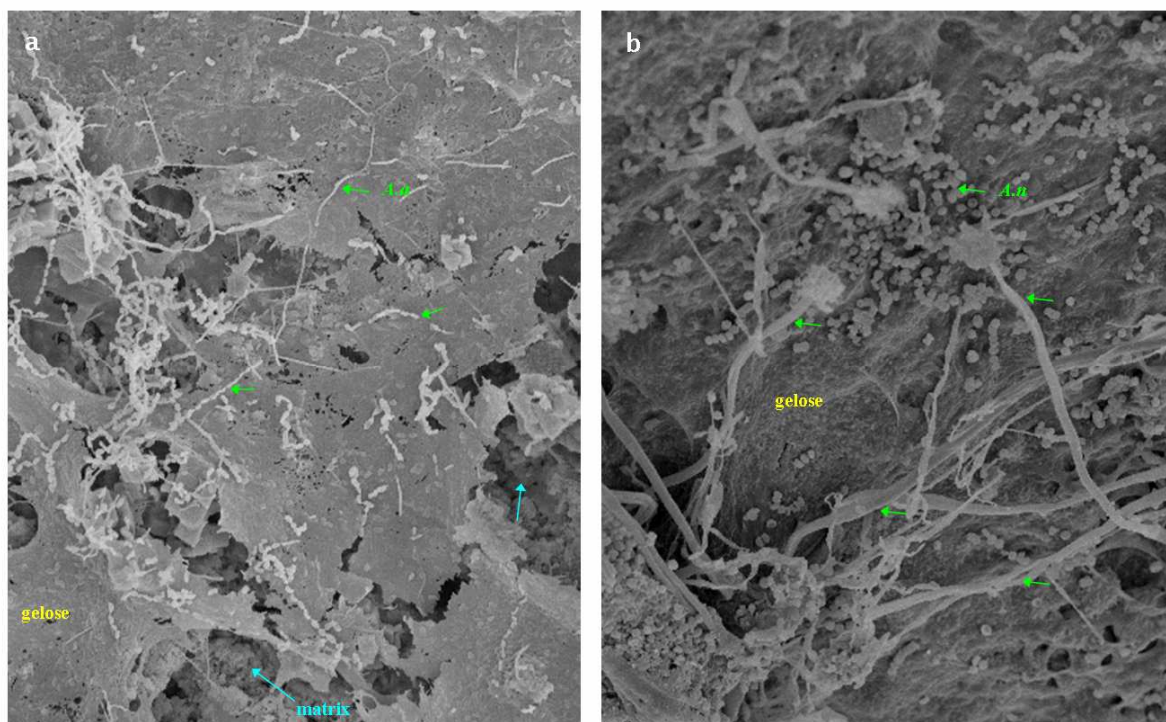
from the solid nutritive medium by glass rod was covered by *A.n* (Figure 53b). Nevertheless, this observation is valid just for this single specimen. Nothing comparable was noted for others and for the specimens inoculated with *Alternaria alternata*. Hence, this observation is hardly explainable. The following assumption can be proposed; although specimens are prepared all together, and the accelerated weathering is performed simultaneously on all of them, their chemical composition can change locally one from each others. The carbonation performed on the considered specimen may have led to a surface pH lower than the one generally noted for the other specimens. Therefore, this constitutes favourable condition for the fungal development.



**Figure 53: Observations with stereomicroscope (x 50) of the specimen surface after 3 months of incubation – (a), (d) non weathered, (b), (e) carbonated, and (c), (f) carbonated then leached specimen**

Stereomicroscope observations show that on all specimens (with or without weathering, and no matter the fungal development observed) the film of agared medium adheres not completely to the specimen surface. The film permits to obtain fungal development on the specimen surface, but also seems to act as an interface or a barrier between fungi and the matrix surface, avoiding a direct interaction between fungi and matrix.

The results of visual and stereomicroscopy assessment of specimen were confirmed with scanning electron microscopy observations. Figure 54a shows spores' chain and hyphae of *Alternaria alternata* which confirms the fungal development previously observed. Actually, inoculation was performed by mean of spores' suspension, so when they are spread on the specimen surface they appear as single cell. Hyphae are the results of spores' germination, and chain of spores resulted from the sporulation. Both observations are due to the fungal development. This growth occurs only superficially on the film, without interfering with the matrix surface. Figure 54b leads to same observations: *Aspergillus niger* grew only on the film surface.



**Figure 54: SEM pictures of specimen surface after 6 months of incubation for carbonated then leached specimen inoculated with (a) *Alternaria alternata*, and (b) *Aspergillus niger***

These results show that this methodology allows the fungal development to occur only on the film of solid agared medium and not at all on the surface specimen as it was expected. Nevertheless, it clearly appears that the accelerated weathering of the matrix acts upon the fungal development. Therefore, the fungal growth on the film is mainly observed with the carbonated then leached specimen that is to say to the lowest surface pH. It can be assumed that once the film of solid nutritive medium is in contact with the matrix surface, its pH is balanced with the surface pH of the matrix.

Although the methodology must be improved, it is concluded that the surface pH of the matrix is incontestably a major point to control for the development of the accelerated laboratory test of biodeterioration. This is consistent with results obtained by Shirakawa et al. (2003); they concluded that the degree of carbonation and pH values played a key role in the susceptibility of mortar to fungal colonization. Decrease of surface pH increases considerably matrix bioreceptivity. Carbonation is the most common chemical reaction influencing cement-based materials in natural environmental scenarios (Macias et al., 1997; Gervais et al., 2004) that's why accelerated weathering of matrix is generally performed by carbonation. This accelerated weathering leads to a pH to 8.5 after 120 days of curing (de Moraes Pinheiro et al., 2003) or to a value near 9 after 56 days of curing (Shirakawa et al., 2003). The experimental conditions and sample size should be taken in account for a comparison. Nevertheless, cement based materials are also exposed to the elements (humidity, acidic rain, snow...) which leads to cement compounds leaching (Barbieri Albert, 2002). In our case, carbonation is followed by leaching operation. This allows us to obtain a surface pH about 8.8 after 30 days, and also to have two ways of weathering involved in natural weathering of materials.

So the overall methodology of the test has to be rethought, in particular the inoculation step. This is crucial to obtain a fungal development on the matrix surface in order to study the interactions between fungi and the matrix. The preparation of the matrix does not seem to need further investigations for its improvement at this stage of the study. Besides, the development of the test should be now envisaged from a microbiology point of view. For this, investigations to improve the biodeterioration test are carried out in the department of Microbiology, Genetic and Molecular Sciences of the Sciences University of Messina (Sicily).

## 5. Test E

### 5.1. Improvement of the experimental device

#### 5.1.1. Conditioning of boxes

The present test is developed in collaboration with Prof. Clara Urzì and Dr. Filomena De Leo. In the laboratory, incubator with temperature regulation only is available. Relative humidity can't be exactly adjusted. So the first modification performed on the experimental device is the use of vermiculite directly in the box (Figure 55). Keeping the vermiculite wet will bring constantly humidity necessary for fungal development inside the box. A sheet of paper separates the specimens from the vermiculite to avoid the direct contact. For sterilization, specimens are exposed overnight to UV lamp. Two specimens with the same weathering are set in each box.

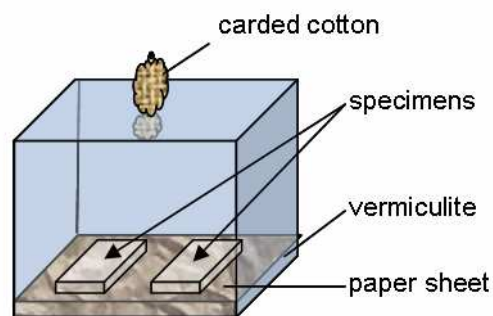


Figure 55: Experimental set-up for test E

#### 5.1.2. Inoculation

Four fungal strains are studied in this test: *Alternaria alternata* (melanin producer hyphomycete), *Aspergillus niger* (acidogenic hyphomycete), *Exophiala* sp. (yeast-like fungus), *Coniosporium uncinatum* (meristematic fungus).

Inoculation is performed by mean of suspension of fungal units and not only spores suspension. Firstly because it would have no sense to talk about spores relating to meristematic and yeast like fungi as they don't sporulate. Then fungi can develop from spores but also from hyphal fragment. Therefore, relating to *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger*, which sporulate, this way of inoculation should increase the potential of development.

### 5.1.3. Results

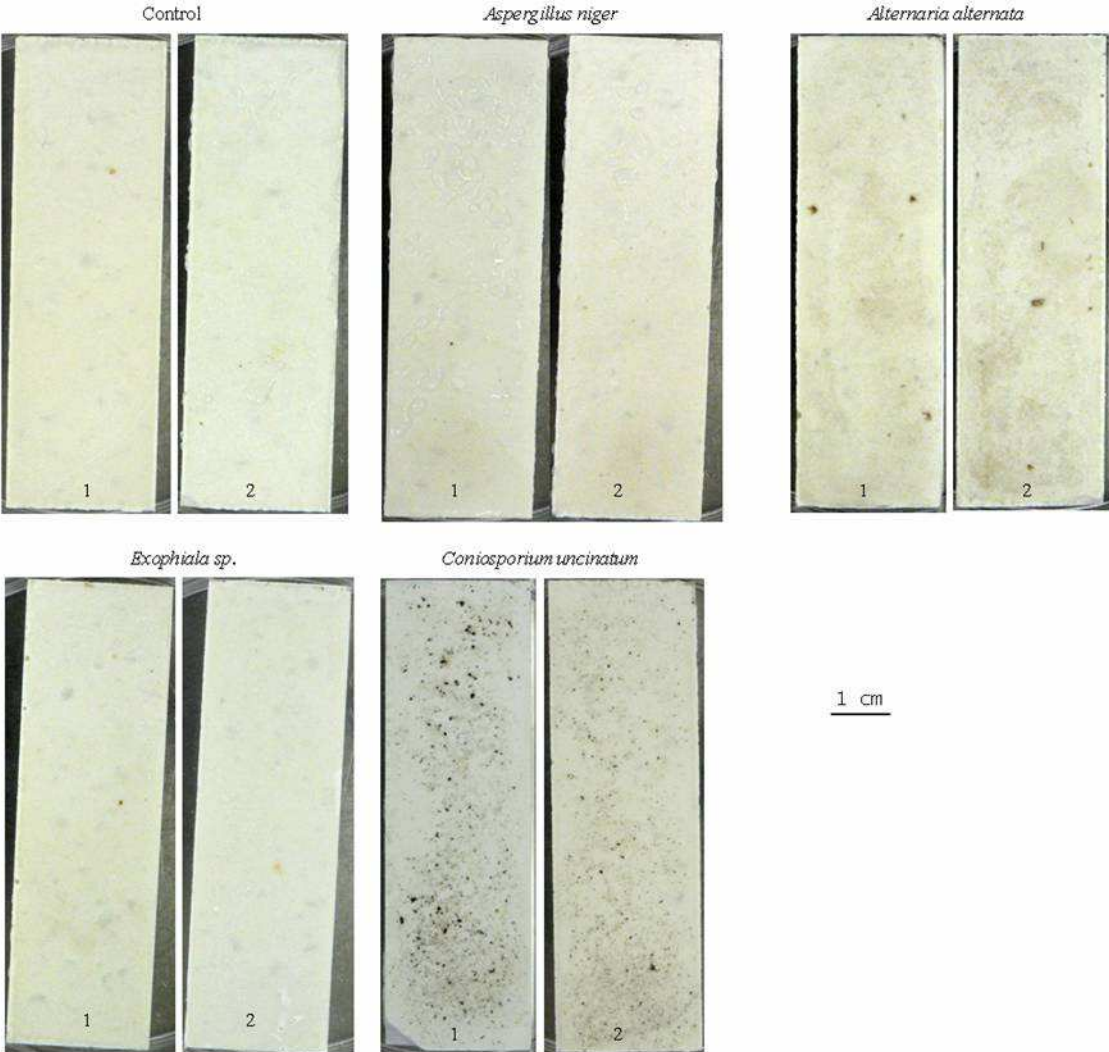
The results obtained are first described. They are presented following analytical techniques used: direct observation, stereomicroscopy, staining with periodic acid Schiff's reagent, scanning electron microscopy. They are then connected and compared to be discussed.

#### 5.1.3.1. Direct observations

Observations are classified according to the weathering of the matrix.

##### ♦ Non weathered specimens

Figure 56 presents direct observations of the non weathered specimens performed after four weeks of incubation. No microbial growth is noticed on all exposed specimens. *Coniosporium uncinatum* cells are dark pigmented and taller than those of other fungi inoculated. Hence, this results in the presence of black spots on the specimen. Moreover, when the suspension of cells is inoculated on the non weathered specimens, it does not penetrate immediately into the matrix. Thus, cells can agglomerate on the surface, resulting in observation of black spots. These spots are, in this case, absolutely not due to the fungal development.



**Figure 56: Direct observations of the non weathered specimens after 4 weeks of incubation**

#### ♦ Carbonated specimens

Figure 57 shows direct observations performed on the carbonated specimens just after inoculation (T0) and after four weeks of incubation (T4). No microbial growth is noted on the control and specimens inoculated with *Exophiala* sp., *Aspergillus niger*. A fungal development is observed on one specimen inoculated with *Coniosporium uncinatum*. It appears after three weeks of incubation and looks like small dark area of about 1cm diameter. Nevertheless, it doesn't seem to be characteristic of *Coniosporium uncinatum* development, but looks more like *Alternaria alternata*. While boxes are handled with lot of care, they remain very close during experiment, so a fungal contamination can easily occurs. This should be confirmed with microscopic observations. Interesting results are obtained with the specimens inoculated with *Alternaria alternata*. Therefore, a fungal development is noticed after one week only of incubation for one specimen. For the second specimen inoculated, it appears after three weeks of incubation. The fungus grows until the fourth week. It appears as dark area, scarcely spread on the specimen surface. Hydrated cement paste are heterogeneous material, and there are likely to exist micro-regions that could be prone to preferential fungal colonisation due to e.g. differences in the carbonation rate. Differences in specimen porosity would lead to different rates of CO<sub>2</sub>, which in turn would produce varying degree of carbonation. This would result in differences in the pH values in the micro-niches, thus influencing fungal growth (Shirakawa et al., 2003). The fungal spreading may also reflect the distribution of fungal cells on the specimen surface after inoculation.



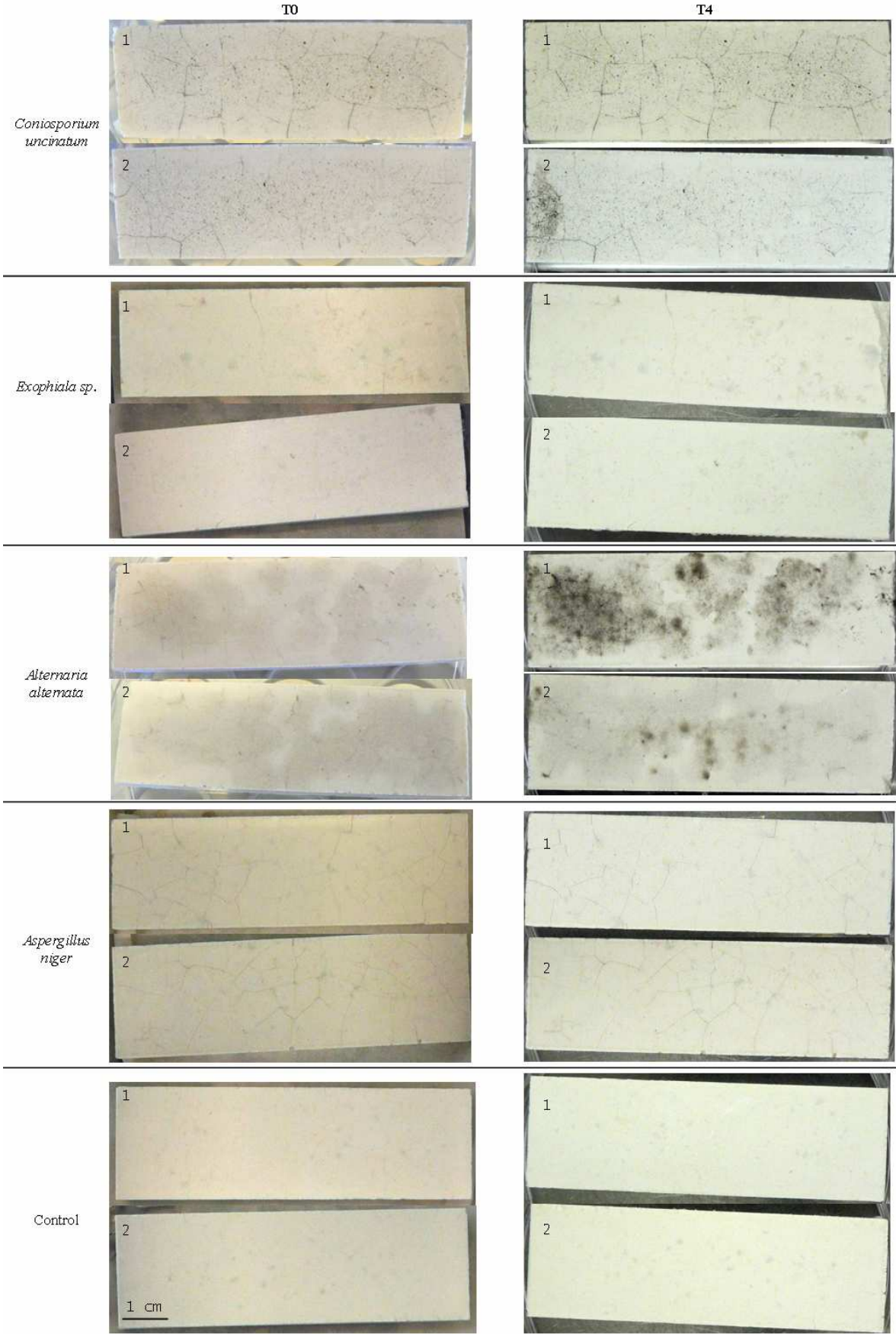


Figure 57: Direct observations of the carbonated specimens

---

♦ **Carbonated then leached specimens**

Figure 58 presents direct observations performed on the carbonated then leached specimens. Microbial development is noticed on all the specimens after one week of incubation only. For the specimens inoculated with *Aspergillus niger*, *Exophiala* sp. and surprisingly also controls, it appears as pink coloured spots which seem to grow along the specimen cracks. It is certainly due a bacterial contamination. Moreover, the specimens were inoculated in two series with one day of interval: firstly inoculation with *Aspergillus niger*, *Exophiala* sp., and controls were performed, then the day after with *Alternaria alternata* and *Coniosporium uncinatum*. The bacterial contamination occurred probably during the inoculation of the first series. Nevertheless, this contamination remains localized on restricted area and doesn't spread all over the surface.

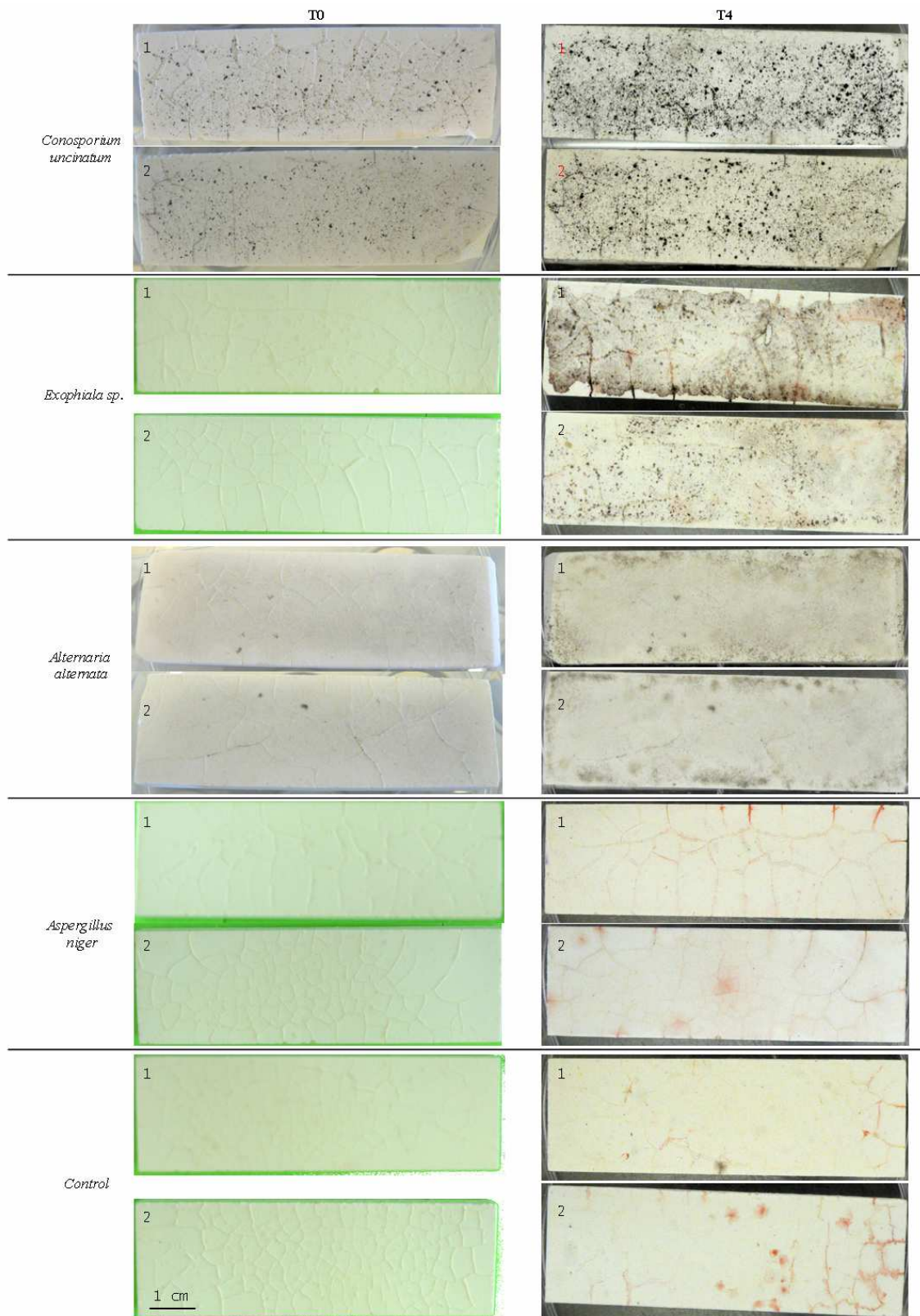
Relating to controls, the bacterial contamination is not the only one. For one specimen, a small fungal development is noted after two weeks of incubation. It is characterized by the development of white mycelium on about 0.5 cm diameter.

For the specimens inoculated with *Aspergillus niger*, except the bacterial contamination, no microbial growth is observed.

*Exophiala* sp. growth is noticed after the first week on both specimens inoculated. The bacterial contamination doesn't seem to prevent the fungal development. The growth is more pronounced on the periphery area of the specimen surface.

*Alternaria alternata* development is observed since the first week of incubation. It is characterized first with mycelial development and then sporulation is observed. The growth appears more homogeneously than for the carbonated only specimens. Others fungal developments are noted, different from the *Alternaria alternata*'s one. It should be fungal contamination. Each week, specimens are not kept in sterile atmosphere during the stereomicroscope observations. While the time of contact with the not sterile air is a maximum shorten, a contamination is still possible.

The development of *Coniosporium uncinatum* is observed since the first week of incubation. It is characterized by the increase of the number and the size of the black spots. Mycelial growth is noted as the incubation time increase. As with *Alternaria alternata*, the specimens are certainly contaminated by some other fungi. Microscopic observations should inform us more precisely on the kind of fungi. The development seems to occur all over the surface, rather homogeneously.



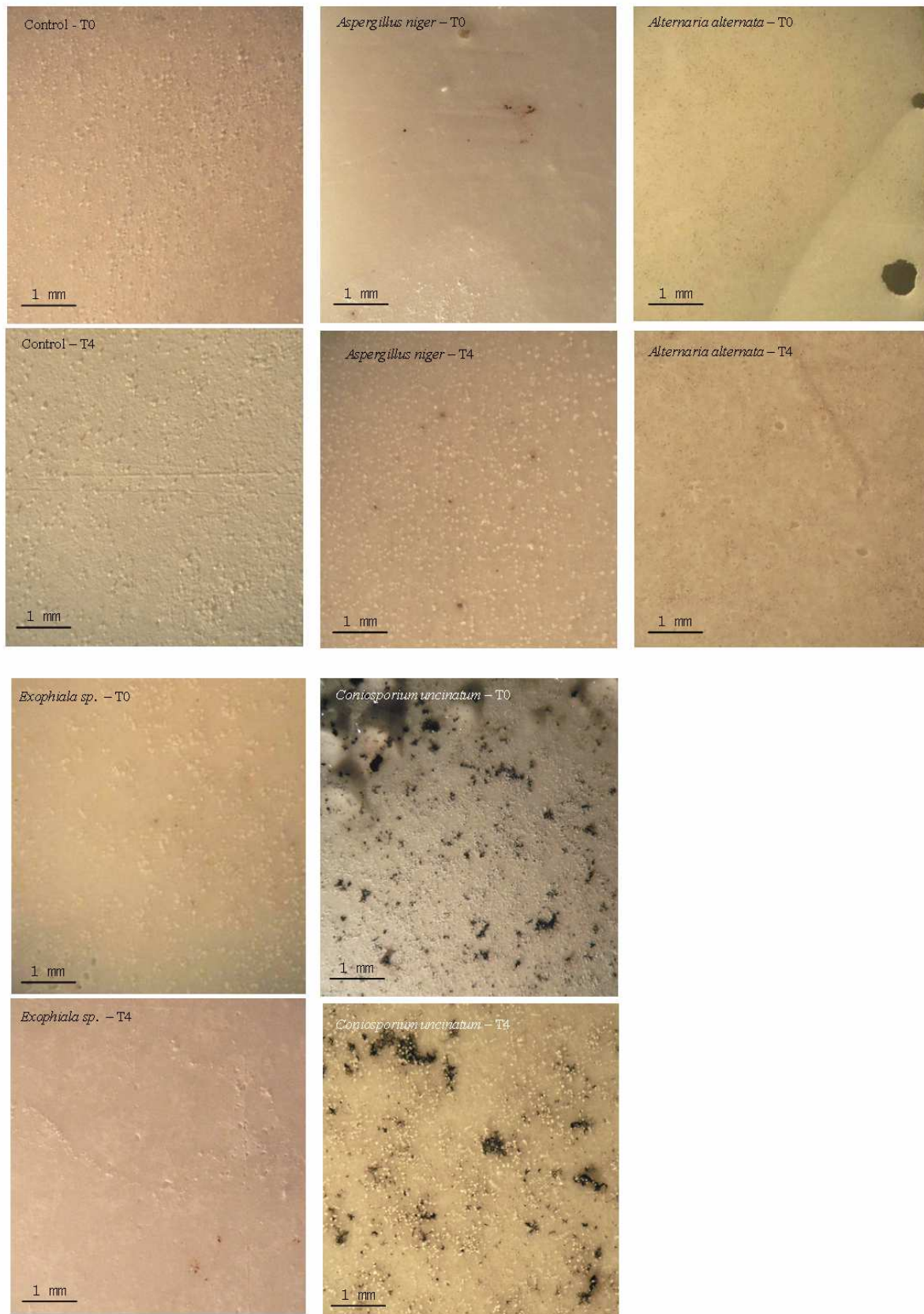
**Figure 58: Direct observations of the carbonated then leached specimens – (T0) after inoculation, (T4) after four weeks of incubation**

### ***5.1.3.2. Stereomicroscope observations***

The observations performed with stereomicroscopy confirm and complete the direct observations.

#### **♦ Non weathered specimen**

Figure 59 presents the stereomicroscopic observations performed on the non weathered specimens, just after inoculation (T0) and after four weeks of incubation (T4). The absence of microbial growth is confirmed for all the non weathered specimens. Spores and fungal cells are visible on the specimen surfaces. Moreover, no fungal development is observed on the paper sheet on which the specimens are disposed in the box. Therefore, the assumption that the suspension could flow away along the sides during inoculation can reasonably be ruled out.



**Figure 59: Observation with stereomicroscope of the non weathered specimens – T0: just after inoculation; T4: after 4 weeks of incubation**

---

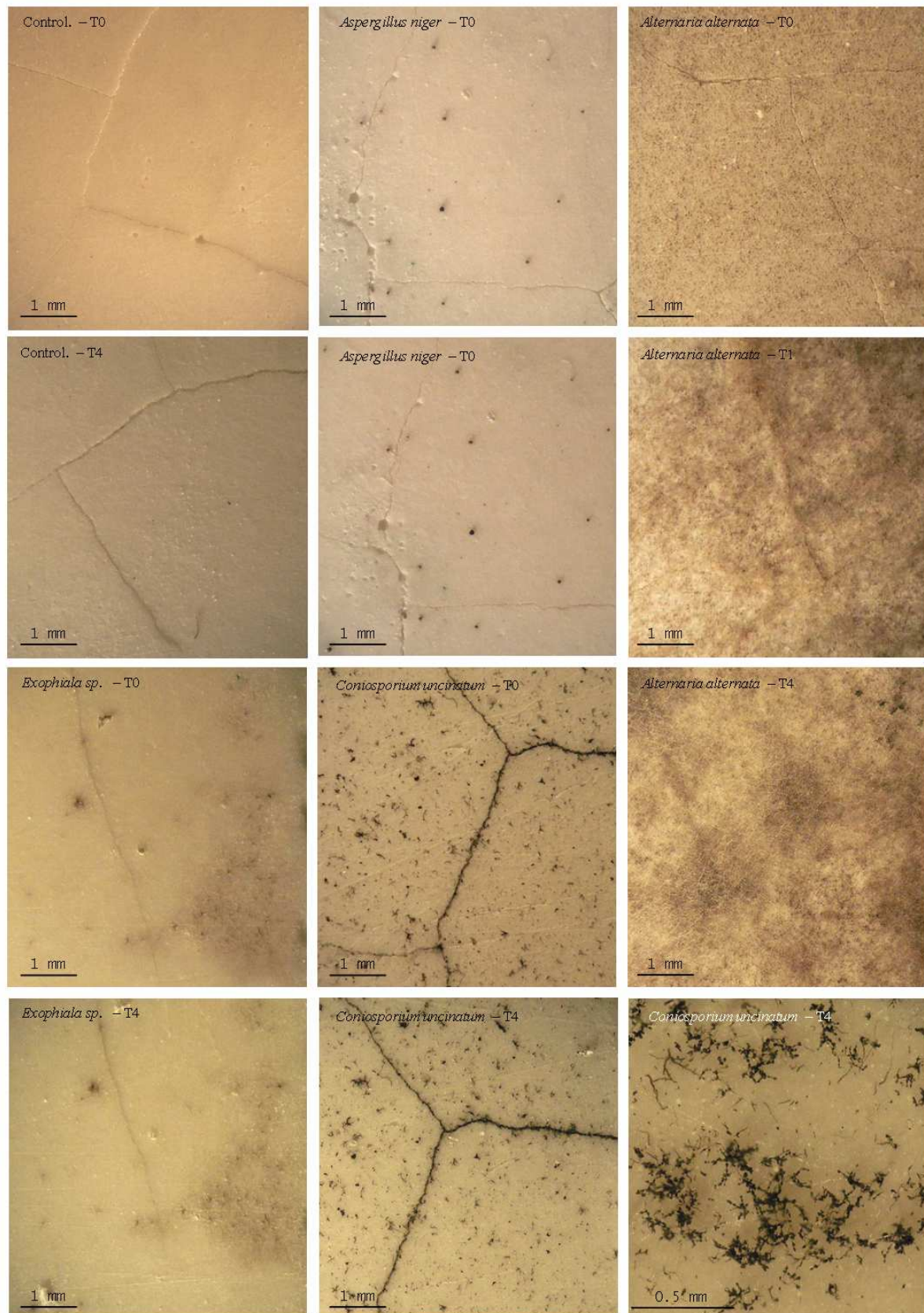
♦ **Carbonated specimens**

Figure 60 shows observations of the carbonated specimens performed with the stereomicroscope. Fungal contamination is observed at the third week of incubation on one carbonated specimen inoculated with *Exophiala* sp. . It appears as white mycelium localized on surface of about 0.5 cm diameter.

The fungal development noticed on the specimen inoculated with *Coniosporium uncinatum*, is the result of a contamination. The spores are produced in chain, and are very similar to those of *Alternaria alternata* (Figure 60l). Moreover, both fungi (*Coniosporium uncinatum* and *Alternaria alternata*) were inoculated in the same time. These considerations linked at the closeness of boxes during the observations, lead to think that the contamination is certainly due to *Alternaria alternata*.

Relating to the specimens inoculated with *Alternaria alternata*, the growth is characterized by mycelial development and production of spores (Figure 60j). Nevertheless, the observations performed after four weeks of incubation show that the fungal development is not exclusively due to *Alternaria* growth. Therefore, spores which differ in shape and grouping from those of *Alternaria alternata* are noticed on the specimen surface (Figure 60k). Their development remained localized in restricted area and do not prevent *Alternaria alternata* growth. However, these strains were not identified.

As previously, fungal cells and spores are observed on the specimen surface for which no fungal growth was noticed. Furthermore, fungal development was also noted in some cases. So the absence of fungal growth can't be explained by a possible too low suspension concentration.



**Figure 60: Observations performed with stereomicroscope of the carbonated specimens – (T0) just after inoculation, (T1) after one week of incubation, (T4) after four weeks of incubation**

#### ♦ Carbonated then leached specimens

Figure 61 presents the stereomicroscopic observations performed on the carbonated then leached specimens after inoculation and after four weeks of incubation. The pink coloured contamination observed for the controls and the specimens inoculated with *Aspergillus niger* has creamy like aspect which comforts the assumption of bacterial contamination. Moreover, this contamination seems to grow along the cracks (Figure 61c, Figure 61g, Figure 61h). After two weeks of incubation, fungal contamination is also noticed for the control, appearing as white mycelium localized on small area (Figure 61d). These observations point out the inefficiency of the sterilization with exposition to UV lamp.

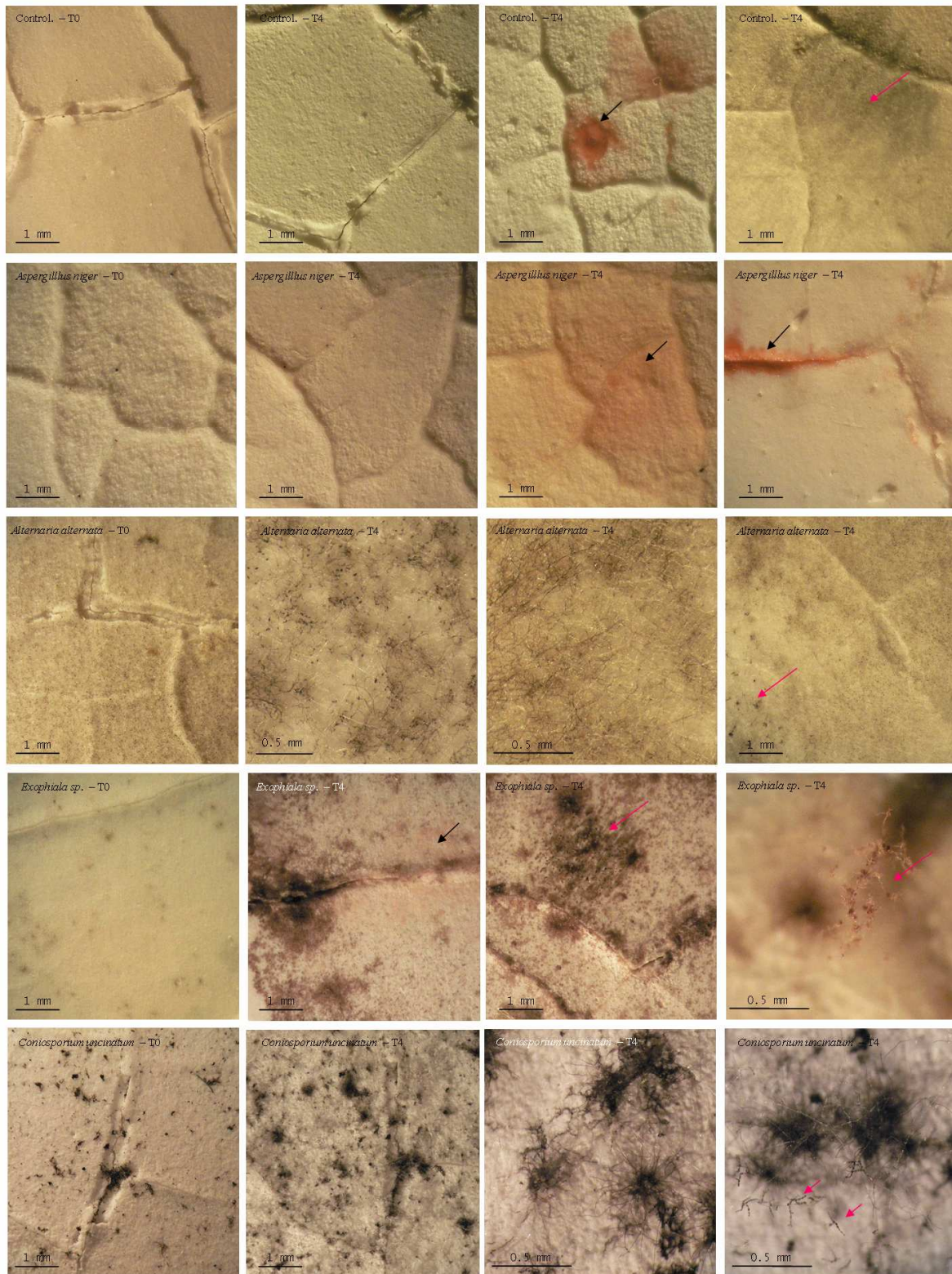
Relating to the specimens inoculated with *Alternaria alternata*, the growth is observed since the first week of incubation. It develops more mycelium and produces fewer spores than on the carbonated only specimen. Moreover, after four weeks of incubation; fungal contamination is noticed (Figure 61i).

*Exophiala* sp. growth is not spread all over the surface but rather occurs from numerous spots. It seems characteristic of the yeast like development. A fungal contamination, the same than the one observed for the carbonated specimens is also noticed.

A homogeneous growth of *Coniosporium uncinatum* is observed on the specimen surface after one week of incubation. White mycelium and spores are also noticed. They are certainly due to a fungal contamination. Moreover, among them, some spores very similar in size and shape to those of *Alternaria alternata* are noted (Figure 61t). As previously mentioned the contaminations noted don't seem to prevent the fungal growth of the inoculated strain.

These observations show that the fungal development appears to be favoured as the pH surface decreases. pH values seem to play a key role in the susceptibility of mortars to fungal colonisation (Shirakawa et al., 2003).

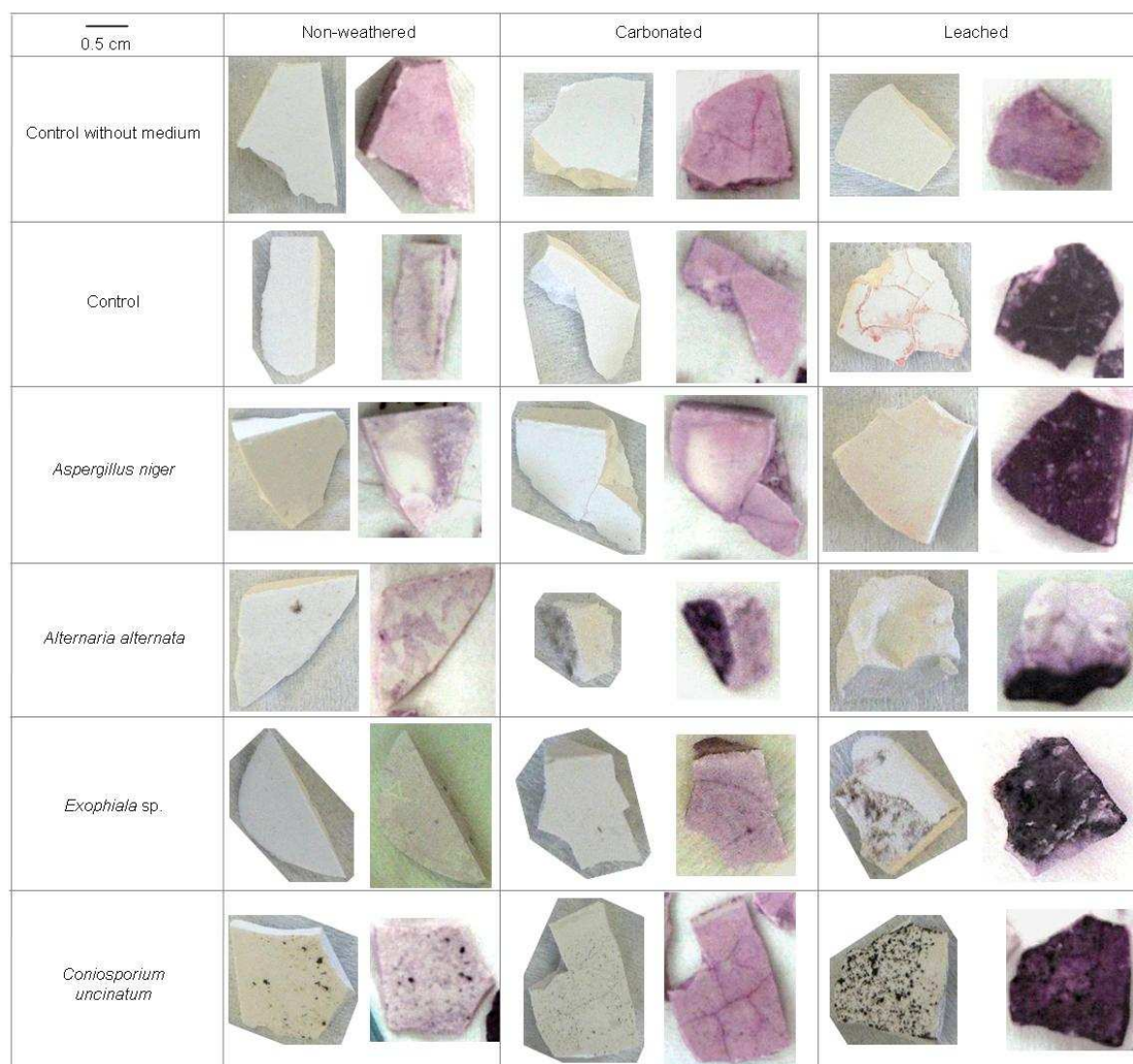




**Figure 61: Stereomicroscopic observation performed on the carbonated then leached specimens – black arrows point out the assumed bacterial contamination; pink arrows the fungal one**

### 5.1.3.3. Periodic acid Schiff staining

The staining with the Schiff's reagent permits estimation to the extent of the microbial colonisation on and within the matrix. Therefore, it completes the visual and stereomicroscopic observations which give information only on the presence of microbial growth on the specimen surface.



**Figure 62: Observations with stereomicroscope of samples before (left pictures) and after (right picture) PAS staining**

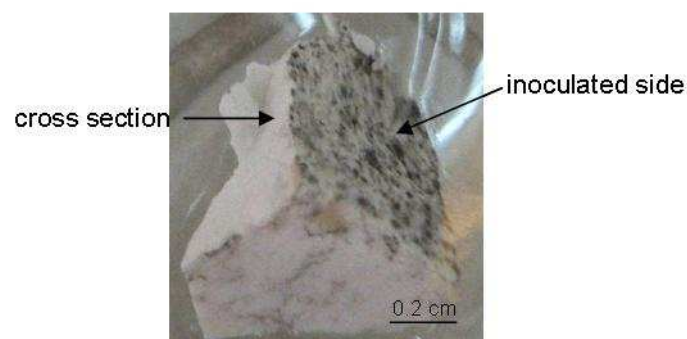
First, the PAS is performed on the non-incubated specimens. That is to say on specimens which were neither inoculated with fungi nor medium only. These specimens are named “control without medium”. This stage should be performed to be sure that nutritive medium doesn't react with the Schiff's reagent, and also to confirm that the staining is independent

from weathering status of the specimen. Therefore, it might be assumed that as the weathering changes the porosity and the chemical composition of the matrix it could result in a different staining in the altered area.

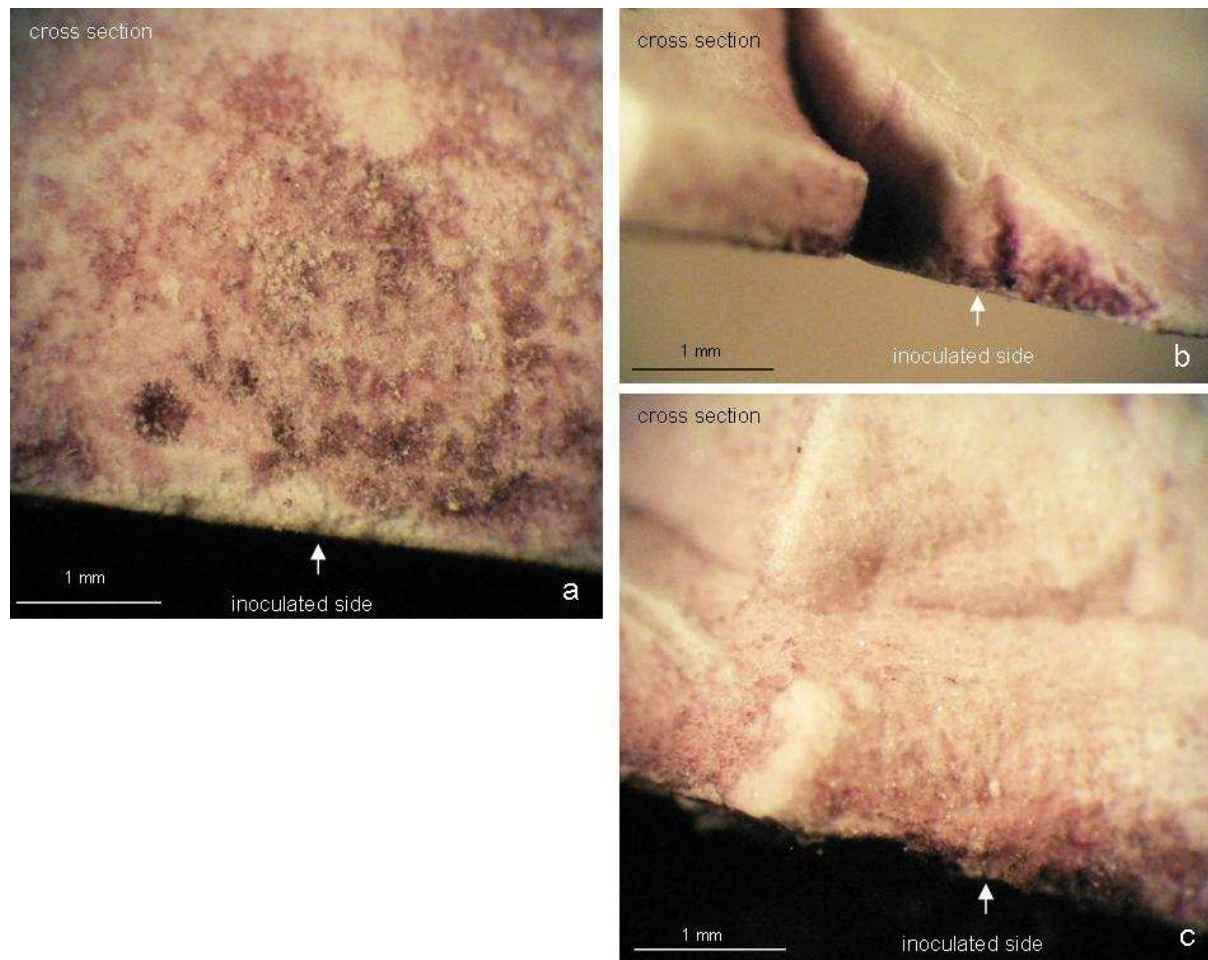
The staining with Periodic Acid Schiff's reagent provides interesting results. They are presented on Figure 62. The staining performed on control without medium shows the coloration of samples without microbial growth, and without eventual interactions with nutritive medium. In this case, all samples (non-weathered, carbonated, carbonated then leached) appear pale purple coloured (Figure 62). Now, comparing these results with those obtained for control (with medium) and the non-weathered specimens, the same pale purple colour is noticed.

For the carbonated specimens, deep purple coloration is observed only on the sample surface exposed to *Alternaria alternata*.

For carbonated then leached specimens, all samples are coloured in deep purple in homogeneous way all over the exposed surfaces. This confirms previous observations, namely that leached specimens were subjected to microbial colonisation. The PAS staining allows a better visualization of microbial development extent: from stereomicroscopical observations for control and specimens inoculated with *Aspergillus niger*, pinkish contamination only on restricted areas on the specimen surface was noted. Whereas, the PAS staining reveals that the micro-organisms grew on the whole surface. Moreover, observations of cross section (Figure 63, Figure 64) show that microbial colonisation also penetrates within the first micrometers of the matrix.



**Figure 63: Location on the specimen of the different side observed**



**Figure 64: Observations with stereomicroscope of cross-sections details of carbonated then leached specimen after the PAS staining – (a) inoculated with *Aspergillus niger*, (b) control, (c) inoculated with *Coniosporium uncinatum***

#### **5.1.3.4. Scanning Electron Microscopic (SEM) analyses**

The SEM observations of the surface and cross section of specimens were performed in order to study interactions between microbes and the matrix. The pictures corresponding to the specimens for whom a microbial development was previously noticed are presented, except for the control without medium. Briefly, specimens are fixed in glutaraldehyde solution and then dehydrated in alcohol.

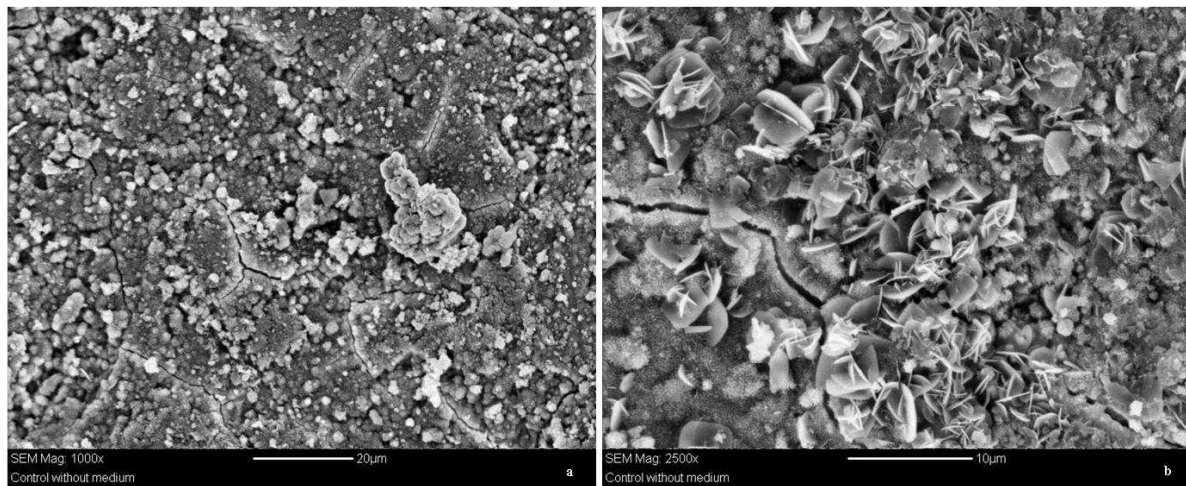
##### **♦ Controls without medium**

Controls without medium are also sampling and prepared for the SEM. Therefore, the fixation of samples for SEM analyses involves chemical reactions to fix the biological material.

During this fixation step, the matrix itself may react and be modified by the chemical solution. Figure 65 presents pictures of the surface of the controls without medium.

Observations for the carbonated then leached specimens are presented. Those corresponding to the non weathered and the carbonated only specimens were also performed and lead to the same conclusions.

Crystals are noticed on the sample surface. They look like very thin plates clustered in rosettes, fairly crystalline. This precipitation certainly occurred during the sample preparation.



**Figure 65: SEM observations of the carbonated then leached control without medium – (a) and (b) surface observations**

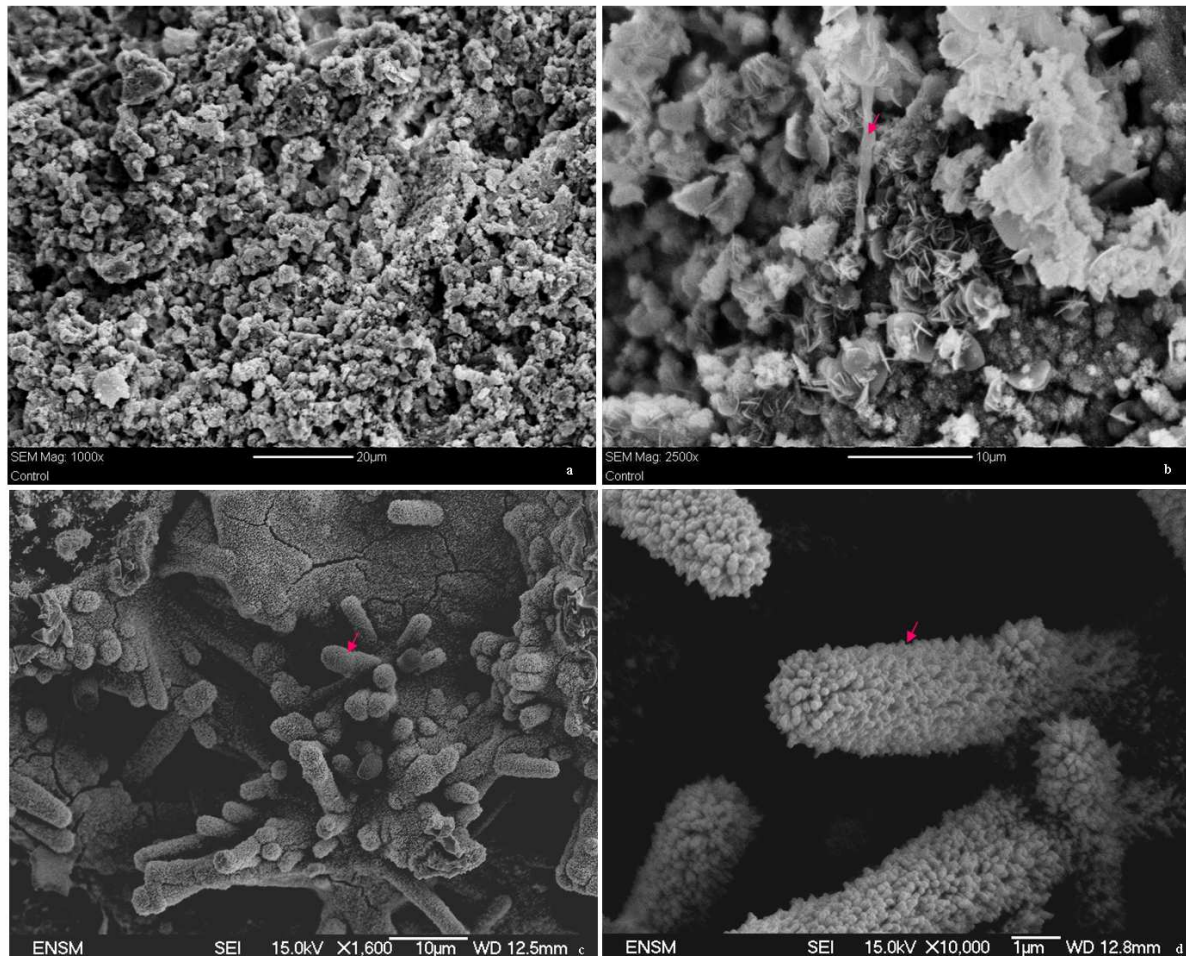
#### ♦ Controls

Examination of the sample surface does not give any information about possible microbial growth (Figure 66a). All compounds observed seemed to belong to the matrix.

Characteristic shapes of bacteria are noticed on the examinations of the cross-sections. They are indicated by the pink arrows on pictures (Figure 66b). Nevertheless, observations with higher magnification and with FEG show that these long cylindrical shapes seemed to be covered by numerous little grains (Figure 66c, Figure 66d). In addition, the chemical analyse shows the presence of Ca, Si, and Al. It can be assumed that these shapes could belong to the matrix, namely ettringite covered by aragonite layer. Hence, ettringite crystals are usually elongated particles, sometimes roughly circular in cross section, and sometimes bounded by plane surfaces, which are hollow or partly hollow (de Moraes Pinheiro et al., 2003).

On the other hand, the chemical analyse performed directly on mycelium of one sample for which fungal development was observed shows the presence of Ca, Si, Al, Cl, Ag and Cu,

and not of C. The question that comes to mind is if the chemical analyse is enough precise to examine sample as punctually as we expect.



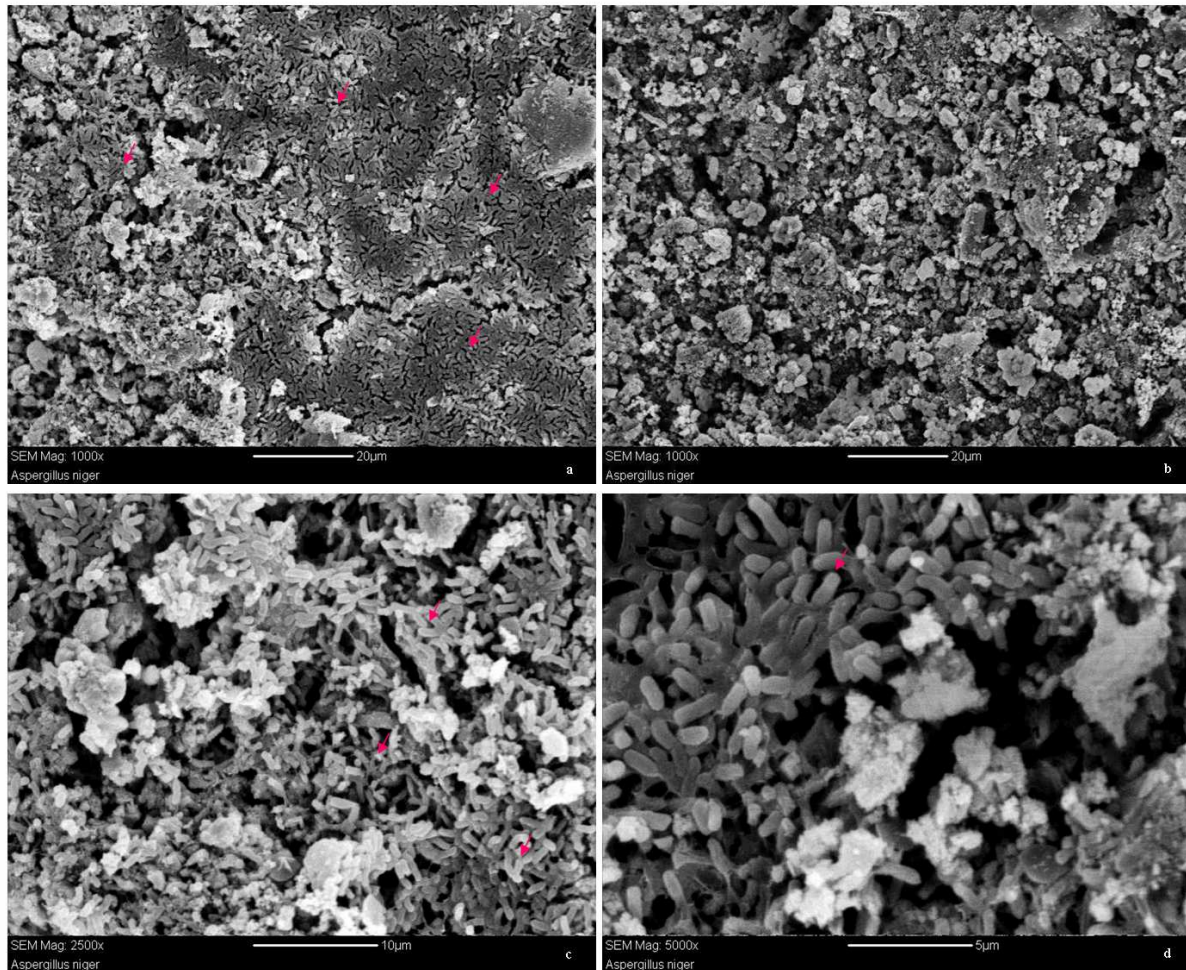
**Figure 66: SEM observations of the carbonated then leached controls – (a) surface observation; (b), (c) and (d) observation of the cross-section**

The presence of bacteria inside the matrix may also confirm the microbial development pointed out with the PAS staining. According to the information available, it seems difficult to conclude about the nature of the observed shapes, both assumptions could be possible.

Moreover, Figure 66b and Figure 66 c, Figure 66d were performed on the same specimen but not the same day and not with the same SEM. Close examination of these pictures lead to think that shapes are very similar but not correspond to the same area on the specimen and so not refer necessary to the same element. In the first case, Figure 66b, it is probably bacteria. But, on Figure 66c, Figure 66d the shapes seem to be slightly taller, and so could rather belong to the matrix element.

♦ **Specimens inoculated with *Aspergillus niger***

Cylindrical shapes typical of those of bacteria are observed on the sample surface (Figure 67a, Figure 67c, Figure 67d). Contrary to observations of the controls, these cylindrical shapes don't seem to be covered by any layer. Moreover, examination of the surface shows areas for which no microbial development is apparent (Figure 67b).

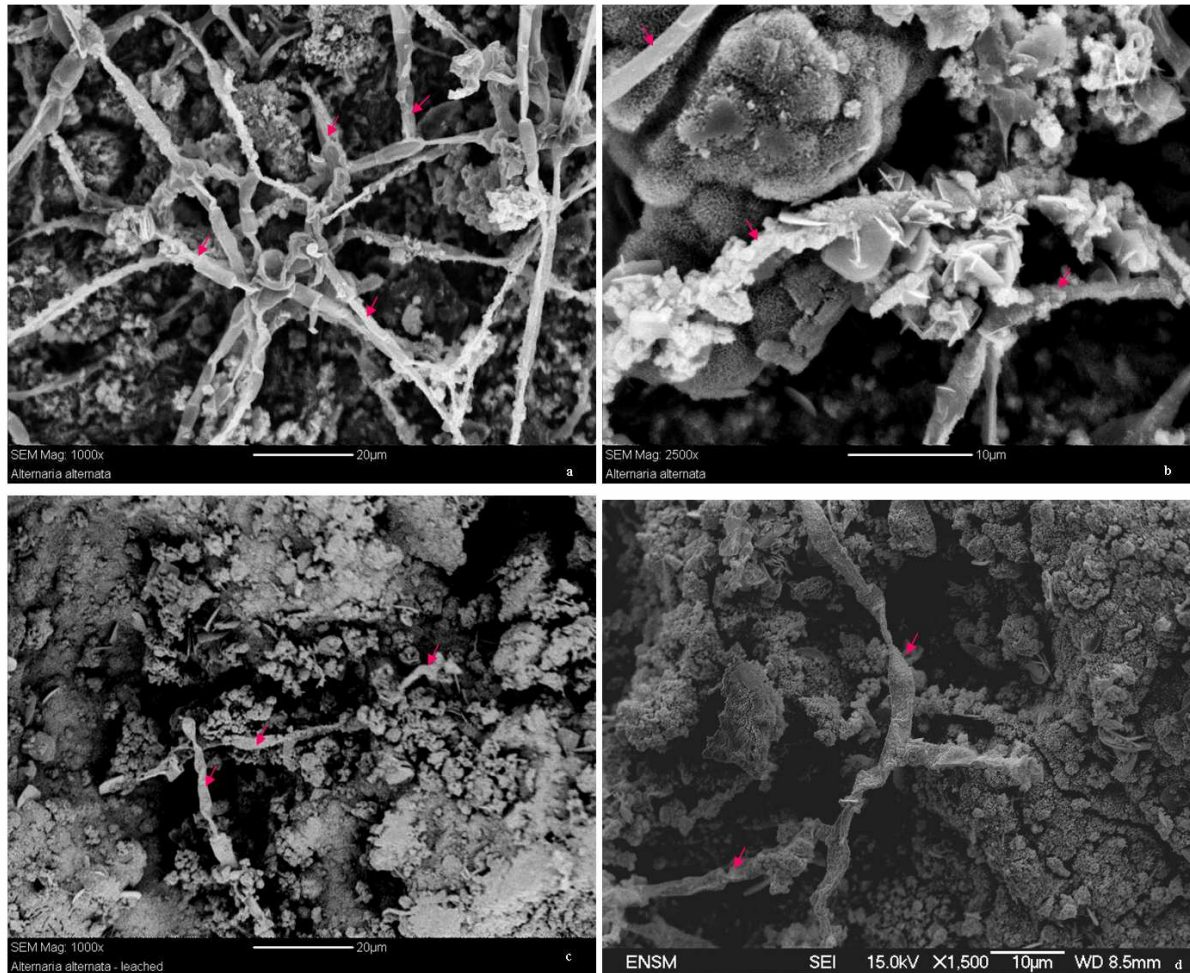


**Figure 67: SEM observations of the carbonated then leached specimens inoculated with *Aspergillus niger* - (a), (b), (c) and (d) surface observation**

The development seems to occur on various areas on the surface exposed, which may confirm stereomicroscopic observations and PAS staining. Nevertheless, no bacteria shapes are observed on the cross-section.

♦ **Specimens inoculated with *Alternaria alternata***

For both samples, carbonated then leached and carbonated only, numerous hyphae are noticed on the surface (Figure 68a, Figure 68b). Crystals, plates like, resulting probably from the sample preparation, are noted on the specimen surface.



**Figure 68: SEM observations of specimens inoculated with *Alternaria alternata* – (a), (b) surface observation of the carbonated specimen; (c) observation of the cross section of the carbonated then leached specimen, (d) observation of the cross-section of the carbonated specimen**

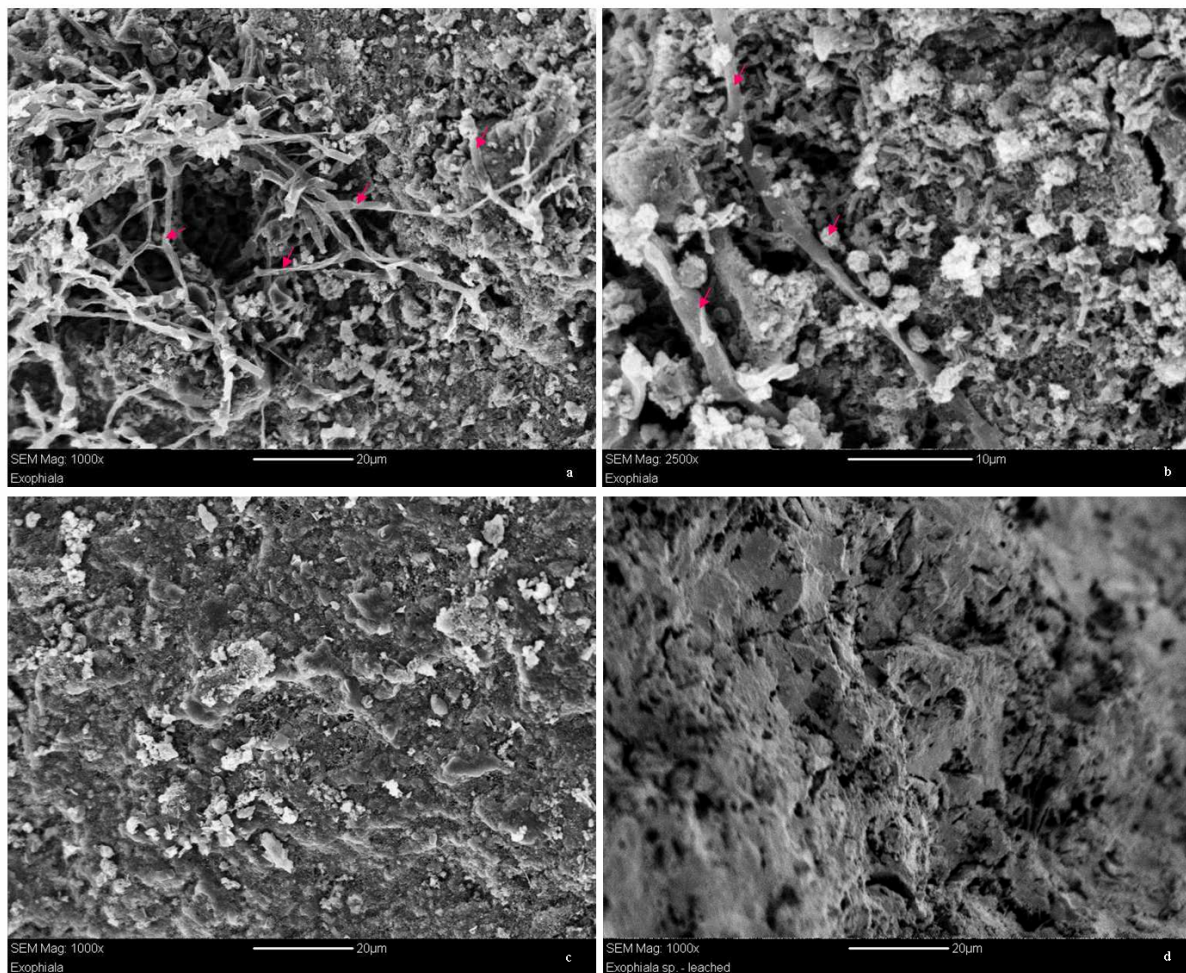
Observations of the cross-section show also hyphae but in a more dispersed way (Figure 68c, Figure 68d). It is explained by the fact that fungi can penetrate inside the matrix only by the open porosity, provided the pore diameter is large enough, or through the existing cracks. Therefore, the space available for the fungal growth inside the matrix does not permit extensive development. Nevertheless, the resulting biodeterioration could be more intense inside the exposed material than on the surface.



♦ **Specimens inoculated with *Exophiala* sp.**

Hyphae are observed on the specimen surface (Figure 69a, Figure 69b). They are not homogeneously spread all over the surface, but grouped in clusters. They seem to be closely linked to the matrix. Moreover, some spherical shapes are observed very close to hyphae (Figure 69b), which lead us to think that it could be spores. It could be in this case, a fungal contamination. In addition, cylindrical shapes are also observed near these hyphae and spores, which could reflect a bacterial contamination. These assumptions are consistent with previous stereomicroscopic observations.

Zones on the sample surface don't seem to be colonised neither by bacteria nor fungi (Figure 69c)

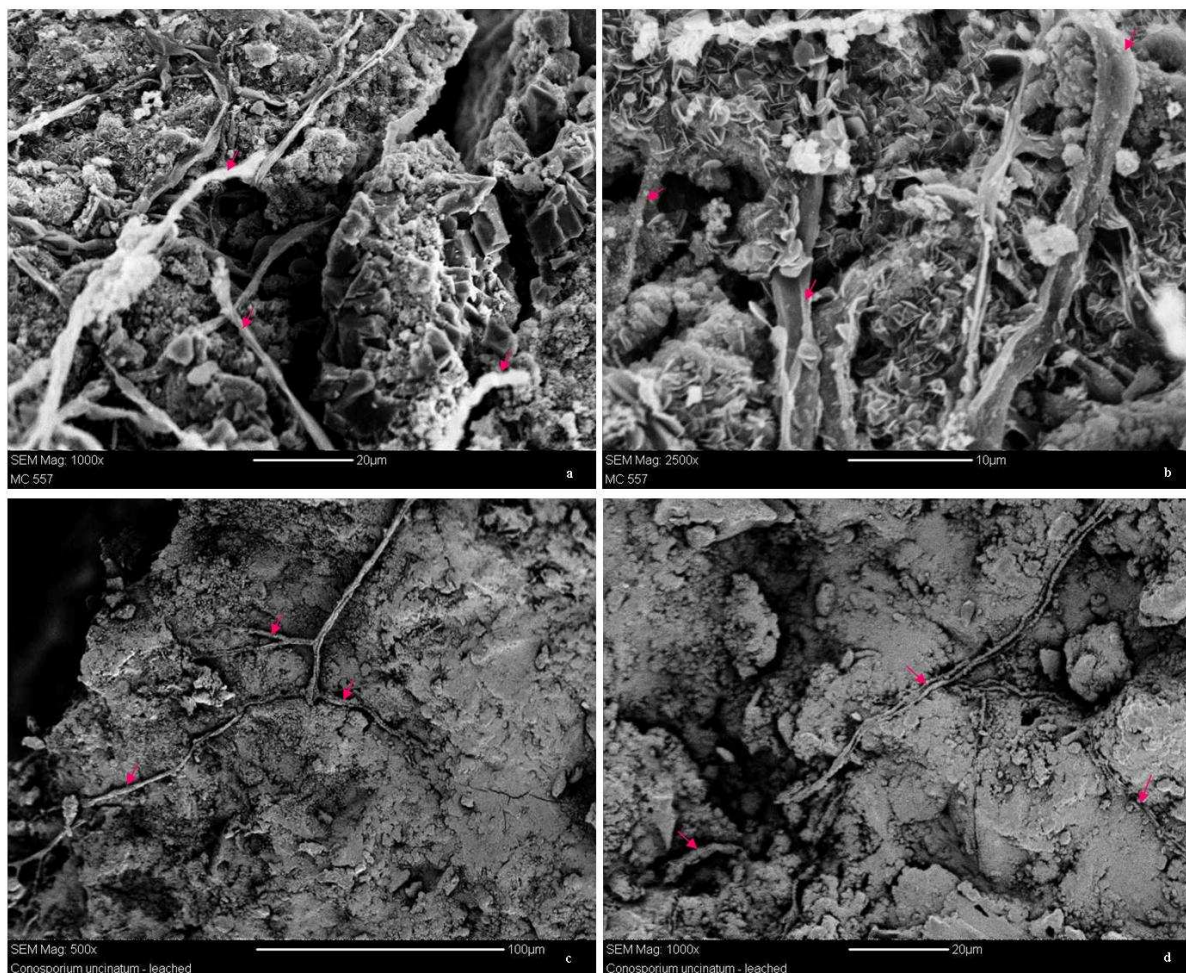


**Figure 69: SEM observations of the carbonated then leached specimens inoculated with *Exophiala* sp. – (a), (b), (d) surface observation; (d) observation of the cross-section**

Nevertheless, no microbial element is observed on the examination of the cross-sections (Figure 69d). This observation is a little bit surprising. Hence, from the surface examination it looks like the fungus doesn't develop by spreading all over the surface, but agglomerates in spots. It could be thinking that the fungus wants to penetrate deeper into the matrix to search nutrients and develop inside it.

♦ **Specimens inoculated with *Coniosporium uncinatum***

SEM pictures of the carbonated then leached specimens inoculated with *Coniosporium uncinatum* provide interesting information. The surface observations exhibit the hyphae spread on all over the surface (Figure 70a, Figure 70b). Moreover, hyphae are closely linked to the matrix, and even seem to penetrate inside it.



**Figure 70: SEM observations of the carbonated then leached specimens inoculated with *Coniosporium uncinatum* – (a), (b) surface observation; (c) and (d) observation of the cross-section**

Examinations of the cross-section clearly show hyphal penetration into the matrix through cracks. It points out the capacity of the fungi to develop not only superficially but also inside the matrix, via structural default, accentuating the physical deterioration.

#### 5.1.4. Discussion

Results about microbial development according to the weathering of the matrix are summarized in Table 7.

**Table 7: Observations and evolution of microbial growth on specimen surfaces during 4 weeks of accelerated biodeterioration test**

		unweathered				
		control	<i>Asp. niger</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Alt. alt</i>	<i>C. uncinatum</i>
fungal growth	1st week	-	-	-	-	-
	2nd week	-	-	-	-	-
	3rd week	-	-	-	-	-
	4th week	-	-	-	-	-
contamination		-	-	-	-	-

		carbonated				
		control	<i>Asp. niger</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Alt. alt</i>	<i>C. uncinatum</i>
fungal growth	1st week	-	-	-	+	-
	2nd week	-	-	-	++	+
	3rd week	-	-	+	+++	++
	4th week	-	-	+	++++	+++
contamination		-	-	+	+	+

		carbonated and leached				
		control	<i>Asp. niger</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Alt. alt</i>	<i>C. uncinatum</i>
fungal growth	1st week	-	-	+	++	+
	2nd week	-	-	++	+++	++
	3rd week	-	-	+++	++++	+++
	4th week	-	-	+++	+++++	++++
contamination		++	+	+	++	++

*Asp. niger* = *Aspergillus niger*

*Exophiala* = *Exophiala* sp.

*Alt. alt* = *Alternaria alternata*

*C. uncinatum* = *Coniosporium uncinatum*

The results point out that in the present study the microbial growth is promoted with the accelerated weathering of the matrix. It plays a major role. No microbial growth is noticed on non-weathered specimens (Table 7). These observations were also made by Shirakawa et al. (2003). Decrease of surface pH increases considerably matrix bioreceptivity. The microbial colonisation is observed on some carbonated specimens and on all carbonated then leached specimens. Carbonation is the most common chemical reaction influencing cement-based materials in natural environmental scenarios (Macias et al., 1997; Gervais et al., 2004). This is the reason why accelerated weathering of matrix is generally performed by carbonation (Dubosc, 2000, Shirakawa et al., 2003; de Moraes Pinheiros et al., 2003). But cement based materials are also exposed to the elements (humidity, acidic rain, snow...) which leads to cement compounds leaching (Barbieri Albert, 2002). In our case, carbonation is followed by leaching operation. This allows to obtain a surface pH about 8.8 after 30 days, but also to have two ways of weathering involved in natural weathering of materials. Beside the pH decrease, the accelerated weathering results in the fissure formation all over the surface. This allows the fungi to penetrate and develop inside the matrix.

Physical weathering of a mineral substrate acts to enhance or accelerate rates of chemical, biomechanical and biochemical weathering and *vice versa*. The development of cracks, fissures and weathering rinds in rocks accelerates biological weathering by providing a niche that can easily be exploited by opportunistic micro-organisms (Burford et al., 2003).

The presence of *Alternaria alternata* and *Coniosporium uncinatum*, two melanin producers, was noted on the SEM observations of the cross-sections. Melanin pigmentation of rock-inhabiting fungi confers extra-mechanical strength to the hyphae that are then better able to grow into crevices (Dornieden et al., 1997; Sterflinger and Krumbein, 1997; Gorbushina, 2007). Increased penetration augments contact of fungal hyphae and their metabolites with the rock, amplifying their geochemical influence on the mineral substrate. Expansion of hyphal growth into deeper rock layers also helps to protect the cells from the UV radiation (Gorbushina, 2007). One characteristic of meristematic fungi is the ability to form filamentous hyphae that develop from clump-like colonies to penetrate deep into rocks thus protecting themselves from environmental stresses. In this sense, the visible portion of melanized micro colonial fungi is like the tip-of-the-iceberg, because the hyphae can rapidly penetrate several mm to cm into hard rocks in search of more protected environments (Gorbushina, 2007). The fungi form explorative hyphae to seek nutrients on the surface, or mycelium during the growth. Under natural conditions, nutrient availability, even if small,

enhances the chance of fungal units (single cells, conidia, or hyphae fragments) surviving and starting the colonization (Urzi et al., 2001a, Urzi and De Leo, 2007).

The presence of contaminations is noticed on all the leached specimens. This underlines the importance of matrix sterilisation for the test. Sterilisation by exposition to UV is not a sufficient way, the better solution for future test is to sterilise specimens by ionisation with  $\gamma$ -radiations.

*Aspergillus niger* doesn't develop as it was expected. It must be noticed that only this strain didn't come from site sampling. It underlines a major point: presence of a strain on a monument doesn't obligatory mean it is source of the deterioration. Although *Aspergillus niger* has been identified from many site sampling, its presence on sample may appear after a first microbial colonisation.

Results obtained with *Coniosporium uncinatum* are encouraging as we notice a good development all over incubation time. It could be thinking that the fungal growth is really accelerated because generally meristematic fungi grow slowly.

## 6. Discussion

These results underline two essential points:

Firstly, relating to the methodology itself, the various test performed permits to point out the key parameters. It appears that the inoculation step and the accelerated weathering of the matrix are crucial points. Table 8 presents an overview of the results relating to the development of the methodology for the biodeterioration test. Therefore, for the time of experiment studied (4 weeks) the fungal development is faster on the carbonated then leached specimens and inexistent for on the non weathered one.

Moreover, nutrients should be brought in restricted quantities, to avoid creating interface between the matrix and fungi.

The fungal growth is accelerated by two ways (except the pH decrease):

- Fungal units' suspension is used as fungi can develop from hyphae fragment and not only from spores.
- An important quantity of fungal units' suspension is inoculated, greater than in test developed to study microbial growth on building materials (Shirakawa

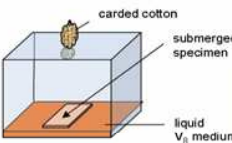
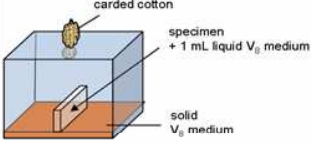
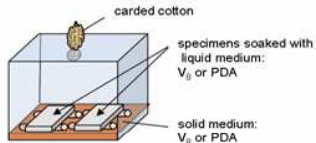
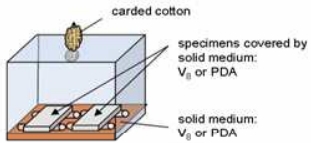
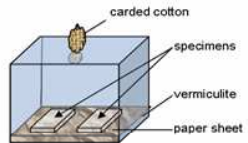
et al., 2003; de Moraes Pinheiros, 2003; Nielsen et al., 2004; Urzì and De Leo, 2007).

Secondly, from a biodeterioration point of view, the test developed permits to observe and to point out aesthetical and physical biodeterioration mainly. Table 9 sums up the results in terms of fungal development for the carbonated then leached specimens inoculated in the test E. Microbial development was really observed for this test only, so the biodeterioration can be studied from these results essentially.

Results point out the necessity to have not only microscopic observations to study the microbial development and colonisation. From stereomicroscopical observations we notice microbial growth only on the specimen surface. While this shows the aesthetical biodeterioration of specimens, it underestimates the real extent of the microbial colonization. The PAS staining reveals microbial growth on and within the matrix. Hence, for all the carbonated then leached specimens, microbial development is observed all over the surface and penetrates into the matrix. The SEM observations permit to identify characteristic bacterial shapes on sample inoculated with *Aspergillus niger* and on controls. Observations of cross section show penetration of micro-organisms inside the matrix. These analytical methods appeared very complementary and essential for the study of biodeterioration. They permit to access to the physical biodeterioration, which is certainly the most critical aspect of biodeterioration to study. Moreover, bacterial development is observed inside the matrix. It can be assumed that their growth results in the release of acid metabolites which can interact with the matrix, leading to the chemical biodeterioration. Nevertheless, this remains only presumptions as no analytical methods were developed in this study to follow the chemical biodeterioration specifically.

Ergosterol and protein assays were developed in order to quantify the biomass during the biodeterioration test. Nevertheless, these assays couldn't be performed in the inoculated specimens. Experiments were carried out in another laboratory and experimental device weren't available for the assays. Besides, ergosterol and protein assays should be included in the biodeterioration test.

Table 8: Overview of the results obtained for the development of the biodeterioration test

	Test A	Test B	Test C	Test D	Test E
<b>Strain inoculated</b>	<i>A. alternata</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. alternata</i> <i>A. niger</i>	<i>A. alternata</i> <i>A. niger</i>	<i>A. alternata</i> <i>A. niger</i> <i>Exophiala sp.</i> <i>C. uncinatum</i>
<b>Specimens inoculated</b>	non weathered carbonated	non weathered carbonated	non weathered carbonated carbonated + leached	non weathered carbonated carbonated + leached	non weathered carbonated carbonated + leached
<b>Nutrients brought</b>	-	1 ml V <sub>8</sub> liq / week	1,5 ml V <sub>8</sub> liq / week	1,5 ml V <sub>8</sub> liq / week	-
<b>Experimental device</b>					
<b>Observations</b>	Liquid medium became gel like	Fungal development on the solid medium only Spores remains agglomerated on the specimen surface	Fungal development on the solid medium only	<b>Non weathered specimens:</b> --> no fungal growth <b>Carbonated specimens:</b> -> fungal growth only for 1/3 specimens inoculated with <i>A. niger</i> <b>Carbonated the leached specimens</b> -> fungal development on all the specimens  The growth occurs on the thin layer of solid medium only and doesn't interact with the matrix	<b>Non weathered specimens:</b> --> no fungal growth <b>Carbonated specimens:</b> -> fungal growth of <i>A. alternaria</i> only <b>Carbonated the leached specimens</b> -> fungal development on all the specimens except for <i>A. niger</i>  Microbial contamination on all the specimens included the controls
<b>Conclusion</b>	The supply of nutrient should be changed	The vertically disposition of the specimen should be changed	Inoculation step should be improved	Inoculation step should be improved	Validation of the experimental part of the biodeterioration test

**Table 9: Overview of the results obtained for the carbonated then leached specimens inoculated in the Test E, from a fungal growth point of view**

	<b>Controls</b>	<b><i>Aspergillus niger</i></b>	<b>Specimens inoculated with</b>		
			<b><i>Exophiala sp.</i></b>	<b><i>Alternaria alternata</i></b>	<b><i>Coniosporium uncinatum</i></b>
<b>Direct and stereomicroscopic observations</b>	Bacterial contamination	Bacterial contamination	Bacterial contamination Fungal contamination Fungal growth	Fungal contamination Fungal growth	Fungal contamination Fungal growth
<b>PAS staining</b>	Microbial colonisation spread on the whole inoculated surface and also in the matrix volume on the first micrometers				
<b>MEB observations</b>	Bacterial contamination on the surface and probably inside the matrix	Bacterial contamination	Hyphae only on the surface	Hyphae on the surface AND inside the matrix	Hyphae on the surface AND inside the matrix
<b>Aestetical biodeter.</b>	+	+ (bacteria)	++	++++	+++++
<b>Chemical biodeter.</b>	assumed	assumed	not controled	not controled	not controled
<b>Physical biodeter.</b>	+	-	-	++	++++

biodeter. = biodeterioration



## 7. Conclusion

The accelerated laboratory test developed permits to obtain a rapid fungal growth on cement specimens. Accelerated conditions chosen are:

- Accelerated weathering of matrix by carbonation (2 days) followed by leaching operation (28 days).
- Acceleration of fungal growth by inoculation of concentrated fungal cells suspension.

To avoid contamination during test, specimen sterilization should be performed by ionisation.

Analyses used to study microbial growth during test are complementary methods:

- Stereomicroscopical observations permit a direct observation of specimens without sample preparation.
- PAS staining allows visualization of microbial colonisation extent on/within matrix.
- SEM observations provide information on interactions between matrix and fungi, and also to recognize some characteristic microbial shapes.
- Ergosterol and protein assays for the biomass quantification.

Relating to the fungal strains studied, the results pointed out that *Exophiala* sp., *Alternaria alternata* and *Coniosporium uncinatum* are obviously responsible of an aesthetical biodeterioration. *Alternaria alternata* and *Coniosporium uncinatum* were observed inside the matrix, hence they could be responsible of physical biodeterioration.

---

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Le développement des micro-organismes (bactéries, cyanobactéries, algues, champignons) sur les matériaux de constructions conduit à l'altération des propriétés du matériau. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la biodétérioration permettra de mieux lutter contre les dommages engendrés et à terme de prévenir le développement de ces micro-organismes. Le but de cette étude était de développer un test accéléré de laboratoire pour étudier la biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons.

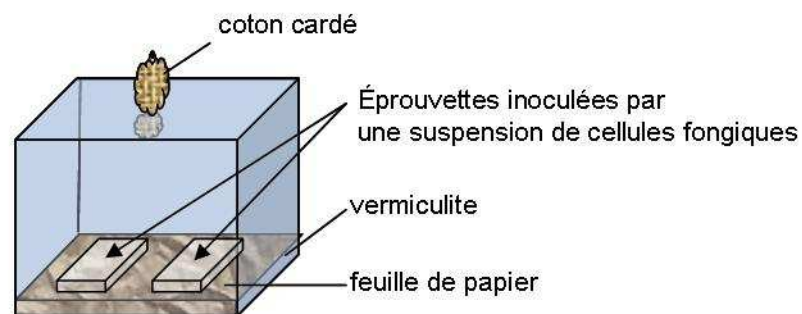
L'étude de la biodétérioration nécessite une approche pluridisciplinaire. Dans un premier temps, ce travail a été abordé d'un point de vue purement « micro-organismes ». Cela a permis d'identifier et de définir les paramètres optimums de culture et croissance fongique. Dans un second temps, l'attention s'est portée sur la préparation d'une matrice cimentaire compatible avec le développement fongique. Enfin, les deux approches ont été combinées permettant l'étude de la croissance des micro-organismes sur le matériau. Ce travail a conduit au développement d'un test accéléré permettant une croissance fongique rapide (< 4 semaines) sur une matrice cimentaire.

Concernant les micro-organismes, notre intérêt s'est porté sur l'étude des champignons microscopiques (micromycètes). Ceci nous permet d'aborder les différents aspects de la biodétérioration : esthétique, chimique mais aussi physique. L'étude bibliographique montre que les micromycètes colonisateurs des matériaux de construction peuvent se regrouper en quatre grandes catégories. Ainsi, nous avons sélectionné une souche représentative de chaque catégorie : (i) *Alternaria alternata* pour représenter un hyphomycète producteur de mélanine, (ii) *Aspergillus niger* pour un hyphomycète acidogénique, (iii) *Exophiala* sp. pour un champignon lévuriforme, et (iv) *Conosporium uncinatum* pour les champignons méristématiques.

D'un point de vue matériau, le vieillissement accéléré de la matrice s'est rapidement imposé ; le pH basique des matrices cimentaires fraîchement préparées ne favorisant pas la croissance

fongique. Les éprouvettes en ciment ont été dans un premier temps carbonatées, puis lixiviées. Ce traitement a permis d'abaisser le pH de surface de 12 à 8,8. Le vieillissement a également conduit à une modification importante de l'aspect de surface et de la composition chimique de la matrice. Ces changements ont été caractérisés à l'aide de différentes techniques analytiques : DRX, IR-TF, porosimétrie mercure, pycnométrie hélium, et observations au MEB. Le vieillissement de la matrice se traduit par l'apparition de fissures, une diminution de la porosité et une composition chimique de surface proche de celle d'une roche calcaire. La surface est progressivement recouverte d'une couche de  $\text{CaCO}_3$ . Ce phénomène est d'autant plus prononcé que le vieillissement accéléré est important.

A propos du test de biodétérioration, une partie importante de la mise au point concerne l'optimisation de l'inoculation. En effet, cinq configurations ont été testées avant de déterminer les conditions optimales. Le dispositif expérimental retenu est le suivant :



Ce travail a abouti au développement d'une méthodologie permettant d'une part d'obtenir une croissance fongique rapide sur la matrice cimentaire, et d'autre part de disposer d'un panel de techniques analytiques très complémentaires pour l'étude de la biodétérioration.

En cours de test, le développement fongique est suivi toutes les semaines par observations directes et au stéréomicroscope. L'étendue de la colonisation microbienne est estimée par coloration des échantillons au réactif de Schiff (PAS) en fin de test. L'interaction entre les micro-organismes et la matrice a été observée au microscope électronique à balayage (MEB). Enfin, les dosages de l'ergostérol et des protéines ont été développés au sein du laboratoire. Ces dosages pourront être utilisés pour quantifier la biomasse.

Les résultats obtenus ont notamment mis en évidence le rôle fondamental joué par le pH de surface sur le développement microbien, confirmant ainsi les observations faites par

Shirakawa et al. (2003). Les travaux ont montré que l'analyse des échantillons au stéréomicroscope sous-estime l'étendue réelle de la colonisation microbienne. L'analyse doit donc être complétée par d'autres méthodes. Ainsi, la coloration au réactif de Schiff a mis en évidence que la colonisation microbienne n'est pas seulement en surface mais intervient également dans le volume. De plus, des hyphes d'*Alternaria alternata* et de *Coniosporium uncinatum* ont été observés au MEB à l'intérieur de la matrice, soulignant ainsi leur potentiel de biodétérioration physique.

La pénétration des micro-organismes à l'intérieur de la matrice est rendue possible et facilitée par l'existence des fissures. De plus, la respiration des bactéries et des champignons augmente la concentration en CO<sub>2</sub> localement. Cela conduit à la formation de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et à la diminution du pH du matériau en contact avec ces micro-organismes (Gorbushina, 2007). La biodétérioration est un domaine complexe pour lequel l'impact biologique ne peut être dissocié des conditions environnementales jouant sur le vieillissement naturel du matériau. Tous ces facteurs sont étroitement liés et agissent en interaction. Les résultats montrent qu'il ne peut y avoir de développement microbien sans un vieillissement préalable du matériau. Le même scénario est rencontré en environnement naturel. La carbonatation et la lixiviation sont deux phénomènes qui interviennent dans le vieillissement naturel du matériau.

Le test développé dans cette étude nécessite trois mois d'expérimentation pour obtenir des résultats significatifs en terme de développement fongique. Ces trois mois sont répartis de la façon suivante : un mois de conservation des éprouvettes, un mois de vieillissement accéléré, un mois d'incubation. En ce sens, ce test se distingue des tests de laboratoires existants qui nécessitent des durées de vieillissement ou d'incubation, de quatre à quinze mois (Dubosc, 2000 ; Shirakawa et al., 2003 ; De Moraes Pinheiro et al., 2003 ; Nielsen et al., 2004 ; Urzi et De Leo, 2007).

Les conditions expérimentales retenues sont proches de celles utilisées par Escadeillas et al. (2007). Les mortiers étudiés par les auteurs subissent également un vieillissement accéléré composé d'une carbonatation suivie d'une lixiviation, pour une durée totale de deux à cinq mois. Néanmoins, ces deux tests se distinguent par la durée de chaque opération. Escadeillas et al. réalisent une carbonatation totale des échantillons puis une lixiviation rapide (7 jours), alors que dans notre cas la carbonatation superficielle des éprouvettes est suivie d'une lixiviation importante de la matrice. D'autre part, la différence fondamentale entre ces deux

tests porte sur la nature des micro-organismes étudiés ; Escadeillas et al. (2007) étudient les algues, alors que notre travail porte sur les micromycètes.

L'originalité de ce test tient d'une part dans la complémentarité des souches fongiques étudiées : l'étude de leur développement permet de travailler sur les différents aspects de la biodétérioration : esthétique, chimique et physique pour un même matériau.

D'autre part, une méthodologie expérimentale et analytique a été développée pour suivre le développement fongique sur une matrice cimentaire et caractériser la biodétérioration selon ses différents aspects.

---

## PERSPECTIVES

Ce travail ouvre plusieurs perspectives, sur l'optimisation du test mais aussi sur les différentes applications envisageables.

D'un point de vue expérimental, l'étape de vieillissement accéléré de la matrice peut être optimisée. Nous pouvons logiquement nous demander quels seraient les effets sur la matrice dans un premier temps, et sur le développement fongique dans un second temps d'une carbonatation plus longue suivie d'une lixiviation plus rapide. Ceci pourrait aboutir à un vieillissement plus rapide (< 1 mois) de la matrice.

Un point important pour compléter ce travail serait d'étudier l'évolution des propriétés mécaniques de la matrice par micro-indentation. Les informations obtenues pourraient d'une part nous renseigner sur l'impact réel du vieillissement accéléré sur le matériau, et d'autre part nous permettre d'évaluer la contribution biologique dans la biodétérioration de la matrice.

Ceci aboutirait à une étude beaucoup plus complète de la biodétérioration, et pourrait mettre en évidence la biodétérioration physique engendrée par des champignons. Ce concept n'est pas toujours évident à admettre pour les non spécialistes.

Deux applications peuvent être envisagées pour ce test :

- Sur une courte durée, c'est-à-dire quatre semaines d'incubation, nous pouvons comparer la bioréceptivité soit de différents matériaux, soit d'un même matériau présentant différentes formulations,
- Sur une longue durée, plusieurs mois, l'étude des mécanismes peut être envisagée.

Un test réalisé sur une courte durée va surtout mettre en évidence la biodétérioration esthétique, celui envisagé sur une durée plus longue permettra une étude plus fine et complète de la biodétérioration (esthétique, chimique et physique).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adenot, F., Buil, M.,** 1992. Modelling of the corrosion of the cement paste by deionized water. *Cement and Concrete Research*, 22, 259-272.
- Allsopp, C., Allsopp, D.,** 1983. An updated survey of commercial products used to protect materials against biodeterioration. *International Biodeterioration Bulletin*, 19-99-146.
- Allsopp, D., Seal, K. J., Gaylarde, C. C.,** 2004. Introduction to biodeterioration. Second Edition, Cambridge University Press, ISBN 0-521-52887-9.
- Antibus, R. K., Sinsabaugh, R. L.,** 1993. The extraction and quantification of ergosterol from ectomycorrhizal fungi and roots. *Mycorrhiza*, 3, 137-144.
- Arandigoyen, M., Bicer-Simsir, B., Alvarez, J. I., Lange, D. A.,** 2006. Variation of microstructure with carbonation in lime and blended pastes. *Applied Surface Science*, 252, 7562-7571.
- Arino, X., Gomez-Bolea, A., Saiz-Jimenez, C.,** 1997. Lichens on ancient mortars. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40, 217-224.
- Ashurst, J., Ashurst, N.,** 1990. Stone masonry. In: *Practical Building Conservation*, Vol 1, Gower Technical Press Ltd, London.
- Axelsson, B., Saraf, A., Larsson, L.,** 1995. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 666, 77-84.
- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R.,** 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods*, 50, 227-236.
- Barberousse, H.,** 2006. Etude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et recherche des facteurs favorisant leur implantation. Thèse de doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle, 186 pages.
- Barbieri Albert, B.,** 2002. Altération de matrices cimentaires par des eaux de pluie et des eaux sulfatées : approche expérimentale et thermodynamique, Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne et Institut National Polytechnique de Grenoble, 294 pages.
- Barron, P.,** 1999. Le traitement naturel Candidose (*Candida Albican*), Laval (Eds).

- Bensasson, R. V. V., Truscott, T. G., Land, E. J.,** 1993. Excited states and free radicals in biology and medicine: Contribution from flash photolysis and pulse radiolysis. Oxford University Press, 442 pages.
- Berthelin, J.,** 1983. Microbial weathering processes. In: Krumbein, W. E. (Ed), Microbial Geochemistry. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 223-262.
- Bishop, P. L., Gong, R., Keener, T. C.,** 1992. Effects of leaching on pore size distribution of solidified/stabilizes wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 31, 59-74.
- Boiron, P.,** 2002. Mycologie, généralités. Support de cours, université de Lyon1.
- Boissier, M.,** 2003. Etude et compréhension des phénomènes environnementaux régissant la colonisation des produits de construction par les aérosols fongiques : Application à l'hygiène des environnements intérieurs. Thèse de l'Université de Paris XII – Val de Marne, 133 pages.
- Bollote, B.,** 2004. Les ciments courants. Support de cours, Italcementi group.
- Bourbonnais, G.,** 2005. Evolution et diversité des êtres vivants : Introduction à la taxinomie. Support de cours, 101-NYA-05, Département de biologie, Cégep de Sainte-Foy, Canada.
- Braams, J.,** 1992. Ecological studies on the fungal microflora inhabiting historical sandstone monuments. PhD Thesis, University of Oldenburg, 104 pages.
- Bradford, M. M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bending. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Broll, N.,** 1996. Caractérisation de solides cristallisés par diffraction X. *Techniques de l'ingénieur*, PE 1 080.
- Bureau, R. G., Zasoski, R. J., Davis, U. C.,** 2002. Soil and water chemistry. Courses notes, SSC 102 – Extract from Environmental Soil Chemistry by Sparks, D. L., ISBN 0126564469, 300 pages.
- Burford, E. P., Fomina, M., Gadd, G. M.,** 2003. Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineralogical Magazine*, 67 (6), 1127-1155.
- Caneva, G., Salvadori, O.,** 1989. Biodeterioration of stone. In: Larraini, L., Pieper, R., (Eds), The deterioration and conservation of stone. UNESCO, Paris, 182-234.
- Charpin, J., Rasneur, B.,** 1983. Caractérisation de la texture poreuse des matériaux. *Techniques de l'ingénieur*, P 1 050 1.
- Chaussadent, T.,** 1997. Analyse des mécanismes de carbonatation du béton. In : Etat des lieux et réflexions sur la carbonatation du béton armé. Laboratoire Central des Ponts et Chaussées Paris, OA9 : sujet 1.49.02.7, 75-86.



- Chen, J. J., Thomas, J. J., Jennings, H. M.,** 2006. Decalcification shrinkage of cement paste. *Cement and Concrete Research*, 34, 801-809.
- Constantinides, G., Ulm, F. J.,** 2004. The effects of two types of C-S-H on the elasticity of cement-based materials: results from nanoindentation and micromechanical modeling. *Cement and Concrete Research*, 34, 67-80.
- Dales, R. E., Miller, D., McMullen, E.,** 1997. Indoor air quality and health: validity and determinants of reported home dampness and moulds. *International Journal of Epidemiology*, 26 (1), 120-125.
- De Belie, N., Monteny, J., Beeldens, A., Vincke, E., Van Gemert, D., Verstraete, W.,** 2004. Experimental research and modelling of the effect of chemical and biogenic sulfuric acid on different types of commercially produced concrete sewer pipes. *Cement and Concrete Research*, 34, 2223-2236.
- De Hoog, G.S.,** 1993. Evolution of black yeasts: possible adaptation to human host, *Anton van Leeuw* 63, 105-109.
- De la Torre, M. A., Gomez-Alarcon, G., Melgarejo, P., Saiz-Jimenez, C.,** 1991. Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral (Spain). *Science of the Total Environment*, 107, 159-168.
- De Leo, F., Urzì, C.,** 2006. Fungi in the biodeterioration of Cultural Heritage. In: *The Materials of Cultural Heritage in their environment*, Lefèvre, R. A., (Eds), Edipuglia 2006. ISBN 8872284473.
- De Leo, F., Urzì, C., de Hoog, G. S.,** 1999. Two *Coniosporium* species from rock surfaces. *Studies in Mycology*, 43, 70-79.
- De Leo, F., Urzì, C., de Hoog, G. S.,** 2003a. A new meristematic fungus *Pseudotaeniolina globosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 351-360.
- De Leo, F., Urzì, C.,** 2003. Fungal colonization on treated and untreated stone surfaces. In: Saiz-Jimenez (Ed.), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Swets & Zeitlinger BV, Lisse, The Netherlands, 213–218.
- De Leo, L., Criseo, G., Urzì, C.,** 1996. Impact of surrounding vegetation and soil on the colonization of marble statues by dematiaceous fungi. In: Reiderer (Eds), *Proceeding of the eighth international congress on deterioration and conservation of stone*, 625-630, Berlin.
- de Moraes Pinheiro, S. M., Ribas Silva, M.,** 2003. Alteration of concrete microstructure by biodeterioration mechanisms. *Proceeding of conference on Microbial Impact on Building Materials*, 48-57.

- Delene, M.**, 1998. L'apport de l'infrarouge à l'analyse. AVH Association, 5<sup>th</sup> symposium, Reims, France.
- Devarajan, A., Khadar, M.A., Chattopadhyay, K.**, 2007. Effect of ball milling on chemically synthesized nanoparticles of CaCO<sub>3</sub>. *Materials Science & Engineering A*, 452-453, 395-400.
- Deveau, P. A., Jacob, V.**, 2004. New methodology for the determination of functional group and chemical bond information of atmospheric particles. *Atelier Experimentation et Instrumentation*, Paris – France.
- Diakumaku, E., Gorbushina, A. A., Krumbein, W. E., Panina, L., Soukharjevski, S.**, 1995. Black fungi in marble and limestones – an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. *The Science of the Total Environment*, 167, 295-304.
- Diamond, S.**, 1976. Cement paste microstructure – An overview at several levels, in *hydraulic cement pastes: Their structure and properties*, Cement and Concrete Association, Wexham Springs, Slough, 2-30.
- Diamond, S.**, 2000. Mercury porosimetry: An inappropriate method for the measurement of pore size distributions in cement-based materials. *Cement and Concrete Research*, 30, 1517-1525.
- Diamond, S.**, 2004. The microstructure of cement paste and concrete - a visual primer. *Cement & Concrete Composite*, 26, 919-933.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T. H.**, 1980. *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London.
- Dubosc, A.**, 2000. Etude du développement de salissures biologiques sur les parements en béton: Mise au point d'essais accélérés de vieillissement. Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 250 pages.
- Eckhardt, F. E. W.**, 1978. Micro-organisms and weathering of a sandstone monument. In: *Krumbein, W. E. (Eds), Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. The Terrestrial Environment*. Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 675-686.
- Eggins, H. O. W., Oxley, T. A.**, 1980. Biodeterioration and biodegradation. *International Biodeterioration Bulletin*, 16, 53-56.
- Eggins, H. O. W., Oxley, T. A.**, 2001. Biodeterioration and biodegradation. Reprint from *International Biodeterioration Bulletin*, 16, 53-56. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48, 12-15.

- Escadeillas, G., Bertron, A., Blanc, P., Dubosc, A.,** 2007. Accelerating testing of biological stain growth on external concrete wall. Part 1: Development of the growth test. *Materials and Structures*, 40, 1061-1071.
- Farcas, F., Touzé, P.,** 2001. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) : Une méthode intéressante pour la caractérisation des ciments. *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées*, 230, 77-86.
- Faucon, P., Adenot, F., Jacquinot, J. F., Petit, J. C., Cabrillac, R., Jorda, M.,** 1998. Long-term behaviour of cement pastes used for nuclear waste disposal : review of physico-chemical mechanisms of water degradation. *Cement and Concrete Research*, 28 (6), 847-857.
- Flint, E. P., Wells, L. S.,** 1934. Study of the system CaO-SiO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O at 30°C and the reaction of water on the anhydrous calcium silicates. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 12, 751-783.
- Follstad, M. N.,** 1966. Mycelial growth rate and sporulation of *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, and *Rhizopus stolonifer* in low oxygen atmosphere. *Phytopathology*, 56, 1098-1099.
- Franckland, J. C., Bailey, A. D., Gray, T. R. G., Holland, A. A.,** 1981. Development of an immunological technique for estimating mycelial biomass of *Mycana galopus* in leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 13, 87-92.
- Frostegard, A., Baath, E.,** 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility Soil*, 22, 59-65.
- Fujita, T., Sugiyama, D., Swanton, S. W., Myatt, B. J.,** 2003. Observation and characterization of colloids derived from leached cement hydrates. *Journal of Contaminant Hydrology*, 61, 3-16.
- Gargani, G.,** 1968. Fungus contamination of Florence art masterpieces before and after the 1966 disaster, in Walters, A. H. and Elphick, J. J., (Eds), *Deterioration and protection of materials*, Vol 1, Elsevier, Amsterdam, 252-257.
- Garcia Vallès, M., Vandrell-Saz, M., Krumbein, W.E., Urzì, C.,** 1997. Coloured mineral coatings on monument surfaces as a result of biomineralization: the case of Tarragona cathedral (Catalonia), *Applied Geochemistry*, 12 (3), 255-266.
- Garg, K. L., Mishra, A. K. Singh, A., Jain, K. K.,** 1995. Biodeterioration of cultural heritage: Some case studies. In *Conservation, Preservation and Restoration: Traditions, Trends and Techniques*, ed. G. Kamlakar and V. Pandit Rao, 31-38. Hyderabad, India: Birla Archaeological and Cultural Research Institute.

- Gaylarde, C., Ribas Silva, M., Warscheid, T.,** 2003. Microbial impact on building materials: an overview. *Materials and Structures*, 36, 342-352.
- Gervais, C.,** 1999. Evaluation environnementale des perspectives de valorisation en BTP de scories de première fusion de plomb et de zinc. Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 218 pages.
- Gervais, C., Garrabrants, A.C., Sanchez, F., Barna, R., Moszkowicz, P., Kosson D.S.,** 2004. The effects of carbonation and drying during intermittent leaching on the release of inorganic constituents of cement-based matrix. *Cement and Concrete Research*, 34, 119-131.
- Gessner, M.O., Chauvet, E.,** 1993. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 502-507.
- Ghosh, S. N.,** 1998. IR Spectroscopy. In: *Handbook of analytical techniques in concrete science and technology – Principles, techniques, and applications*. Ed. Ramachandran, V. S., and Beaudoin, J. J., ISBN 081551437, 174-204.
- Girodet, C.,** 1996. Endommagement des Mortiers sous sollicitations thermo-mécaniques – Influence des caractéristiques des matériaux au gel interne des bétons. Thèse de L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 299 pages.
- Glasser, F. P., Lachowski, E. E., Macphee, D. E.,** 1987. Compositional model for calcium silicate hydrate (C-S-H) gels, their solubilities, and free energies and formation. *Journal of the American Ceramic Society*, 70, 481-485.
- Gominet, M.,** 2001. Traitement des denrées alimentaires par rayonnements ionisants. *Techniques de l'ingénieur F 3050*.
- Gong, P., Guan, X., Witter, E.,** 2001. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. *Applied Soils Ecology*, 17, 285-289.
- Gorbushina, A. A., Lyalikova, N. N., Vaslov, D. Y., Khizhnyak, T. V.,** 2002. Microbial communities on the monuments of Moscow and St. Petersburg: Biodiversity and trophic relations. *Microbiology*, 71 (3), 350-356.
- Gorbushina, A. A., Whitehead, K., Dornedien, T., Niese, A., Schulte, A., Hedges, J. I.,** 2003. Black fungal colonies as units of survival: hyphal mycosporines synthesized by rock-dwelling microcolonial fungi. *Canadian Journal of Botany*, 81 (2), 131-138.
- Gorbushina, A.A.,** 2007. Life on rocks. *Environmental microbiology*, 9 (7), 1613-1631.
- Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Hamman, C.H., Panina, L., Soukharjevski, S., Wollenzien, U.,** 1993. Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiology Journal*, 11, 205-221.

- Goulet, D.**, 1983. Contribution à l'étude de la stérilisation du matériel médico-chirurgical non réutilisable par l'oxyde d'éthylène. Connaissance des matériaux. Aspects analytiques. Interférence avec les rayonnements ionisants. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Pharmaceutiques, n°196, Lyon.
- Grant, C., Hunter, C. A., Flannigan, B., Bravery, A. F.**, 1989. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *International Biodeterioration*, 25, 259-284.
- Gu, J. D., Ford, T. E., Berke, N. S., Mitchell, R.**, 1998. Biodeterioration of concrete by the fungus *fusarium*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 101-109.
- Guillaume, P. Y.**, 2005. Biotechnologie, vues pédagogiques, support de cours.
- Guillitte, O.**, 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *The Science of the Total Environment*, 167, 215-220.
- Haga, K., Sutou, S., Hironaga, M., Tanaka, S., Nagasaki, S.**, 2005. Effects of porosity on leaching of Ca from hardened cement ordinary Portland cement paste. *Cement and Concrete Research*, 35, 1764-1775.
- Harris, H. W., Manning, M. C., Tearle, W. M., Tweed, C. J.**, 2002. Testing of models of the dissolution of cement-leaching of synthetic C-S-H gel. *Cement and Concrete Research*, 32, 732-746.
- Hidalgo, A., Petit, S., Domingo, C., Alonso, C., Andrade, C.**, 2007. Microstructural characterization of leaching effects in cement paste due to neutralization of their alkaline nature – Part I: Portland cement pastes. *Cement and Concrete Research*, 37, 63-70.
- Hirsh, P., Eckhardt, F. E. W., Palmer, R. J.**, 1995. Methods for the study of rock-inhabiting micro-organisms: a mini review. *Journal of Microbiological Methods*, 23, 143-167.
- Hostomsky, J., Jones, A. G.**, 1991. Calcium carbonate crystallization, agglomeration and form during continuous precipitation from solution. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 24, 165-170.
- Houst, Y. F.**, 1992. Diffusion de gaz, carbonatation et retrait de la pâte de ciment durcie. Thèse l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 228 pages.
- Houst, Y. F., Wittmann, F. H.**, 1994. Influence of porosity and water content on the diffusivity of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> through hydrated cement paste. *Cement and Concrete Research*, 24, 1165-1176.
- Houst, Y. F., Wittmann, F. H.**, 2002. Depth profiles of carbonates formed during natural carbonation. *Cement and Concrete Research*, 32, 1923-1930.
- Hyrdo-Quebec**, 1997. Le Cobalt 60. Bibliothèque nationale du Québec. ISBN 2-550-31083-7.

- ISO 846: 1997**, Plastiques – Evaluation de l'action des micro-organismes. Norme ISO.
- Jaton, C.**, 1973. Aspects microbiologiques des altérations des pierres des monuments. In: Romanowski, V (Eds), International symposium on the deterioration of building stones ? Les imprimeries réunies de Chambéry, Chambéry, 149-154.
- Johannesson, B., Utgenannt, P.**, 2001. Microstructural changes caused by carbonation of cement mortar. *Cement and Concrete Research*, 31, 925-931.
- Jones, J. A.**, 1987. Formulation of biologically active surface. UK patent application, INT CL: C09D 3/00, B05D 5/00, 3 pages.
- Jones, P. C. T., Mollison, J. E. J.**, 1948. A technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, 2, 54-69.
- Khandelwal, A.**, 2001. Sampling and estimate fungal biodeteriogens of Lucknow, India. *In* Pre-print proceedings onf the 5th International Conference on Biodeterioration of cultural property: 12-14 november, Sydney-Australia.
- Khatib, J. M., Mangat, P. S.**, 2003. Porosity of cement paste cured at 45°C as a function of location relative to casting position. *Cement & Concrete Composite*, 25, 97-108.
- Kubeldis, D. E.**, 2003. Mold, the fungus among us. Water intrusion and mold claims semainar, The mold issue, Sterling education services, Pittsburg.
- Kumar, R., Kumar, A. V.**, 1999. Biodeterioration of stone in tropical environments: An Overview. Oxford university press, 96 pages.
- Kussmaul, M., Wilimzig, M., Bock, E.**, 1998. Methanotrophs and methanogens in masonry. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11), 4530-4532.
- Leach, C.** 1967. Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, and *Stemphylium*. *Canadian Journal of Botany*, 45, 1999-2016.
- Lees, N. D., Skaggs, B., Kirsch, D. R., Bard, M.**, 1995. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*—a review. *Lipids*, 30, 221–226.
- Leznicka, S.**, 1992. Antimicrobial protection of stone monuments with p-hydroxybenzoic acid esters and silicone resin. In: Rodrigues, J. D., Henriques, F., Jeremias, F. T. (Eds), Proceedings of the seventh international congress on deterioration and conservation of stone. Laboratorio Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, Portugal, 481-490.
- Leznicka, S., Strzelczyk, A. B., Wandrychowska, D.**, 1988. Removing of fungal strains from stone works. Proceedings of the Sixth International Congress on Deterioration and

- Conservation of Stone. Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland, 12.-14 september, 102-110.
- Macias, A., Kindness, A., Glasser, F.P.,** 1997. Impact of carbon dioxide on the immobilization potential of cemented wastes: chromium. *Cement and Concrete Research*, 27 (2), 215-225.
- Martin, F., Delaruelle, C., Hilbert, J. L.,** 1990. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research*, 94, 1059–1064.
- May, E., Lewis, F. J., Pereira, S., Tayler, S., Seaward, M.R.D., Allsopp, D.,** 1993. Microbial deterioration of building stone: a review. *Biodeterioration Abstracts*, 7 (2), 109-123.
- May, E., Lewis, F., J.,** 1988. Strategies and techniques for the study of bacterial populations on decaying stonework. *Proceedings of the sixth international congress on deterioration and conservation of stone*. Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland, 59-70.
- Medical devices,** 2004. Sterilisation methodologies and implication. In *Medical Devices Newsletter* 1 (9):2-3. Ashfield Press, Dublin.
- Mitchell, R., Gu, J. D.,** 2000. Changes in the biofilm microflora of limestone caused by atmospheric pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 299-303.
- Mollah, M. Y. A., Kesmez, M., Cocke, D. L.,** 2004. An X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopic (FT-IR) investigation of the long-term effect on the solidification/stabilization (S/S) of arsenic (V) in Portland cement type-V. *Science of the Total Environment*, 325, 255-262.
- Mollah, M. Y. A., Lu, F., Cocke, D. L.,** 1998. An X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopic (FT-IR) characterization of the speciation of arsenic (V) in Portland cement type-V. *The Science of the Total Environment*, 224, 57-68.
- Mollah, M. Y. A., Palta, P., Hess, T. R., Vempati, R. K., Cocke, D. L.,** 1995. Chemical and physical effects of sodium lignosulfonate superplasticizer on the hydration of Portland cement and solidification/stabilization consequences. *Cement and Concrete Research*, 25 (3), 671-682.
- Mollah, M. Y. A., Yu, W., Schennach, R., Cocke, D. L.,** 2000. A Fourier transform infrared spectroscopic investigation of the early hydration of Portland cement and the influence of sodium lignosulfonate. *Cement and Concrete Research*, 30, 267-273.
- Moranville, M., Kamali, S., Guillon, E.,** 2004. Physicochemical equilibria of cement-based materials in aggressive environment – experiment and modeling. *Cement and Concrete Research*, 34, 1569-1578.

- Moudilou, E.**, 2000. Cinétiques et mécanismes de relargage des métaux lourds présents en traces dans les matrices cimentaires. Thèse de l'Université d'Orléans, 218 pages.
- Newell, S. Y., Fell, J. W.**, 1992. Ergosterol content of living and submerged decaying leaves and twigs of red mangrove. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 979-982.
- NF-EN-113**, 1996. Produits de préservation du bois - Méthode d'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores - Détermination du seuil d'efficacité.
- Ngala, V. T., Page, C. L.**, 1997. Effects of carbonation on pore structure and diffusional properties of hydrated cement pastes. *Cement and Concrete Research*, 27 (7), 995-1007.
- Nguyen, V. H.**, 2005. Couplage dégradation chimique – comportement en compression du béton. Thèse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 200 pages.
- Nielsen, K. F.**, 2002. Mould growth on building materials: secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Thesis Biocentrum-Technical University of Denmark, 106 pages.
- Nielsen, K. F., Nielsen, P. Holm, G.**, 2000. Growth of moulds on building materials under different humidities. *Proceedings of Healthy Buildings*, 3, 283-288.
- Nielsen, K.F., Holm, G., Uttrup, L.P., Nielsen, P.A.**, 2004. Mould growth on building materials under low water activity. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 325-336.
- Nimis, P. L., Pinna D., Salvadori O.**, 1992. Licheni e conservazione dei monumenti. Bologna, :CLUEB.
- Organisation Internationale de Métrologie Légale**, 1996. Echelle d'humidité relative de l'air certifiée par rapport à des solutions saturées en sels. Recommandation Internationale – OIML R 121.
- Ortega-Calvo, J. J., Arino, X., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C.**, 1995. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic micro-organisms. *The Science of the Total Environment*, 167, 329-341.
- Ortega-Calvo, J. J., Arino, X., Stal, L. J., Saiz-Jimenez, C.**, 1994. Cyanobacterial sulfate accumulation from black crusts of a historic building. *Geomicrobiology Journal*, 12, 15-22.
- Ortega-Calvo, J. J., Saiz-Jimenez, C.**, 1996. Polycyclic hydrocarbon-degrading bacteria in building stones. In: Riederer, S. (Eds), *Proceedings of the eighth international congress on deterioration and conservation of stone*. Vol 2. Rathgen-Forschungslabor, Berlin, Germany, 681-685.



- Oshima, A., Matsui, I., Yuasa, N., Henmi, Y.,** 1999. A study on growth of fungus and algae on mortar. Transactions of The Japan Concrete Institute, 21, 173-178.
- Papadakis, V. G., Fardis, M. N., Vayenas, C. G.,** 1992. Effect of composition, environmental factors and cement-lime mortar coating on concrete carbonation. Materials and Structures, 25, 293-304.
- Pietrini, A. M., Ricci, S., Bartomini, M., Guiliani, M. R.,** 1985. A reddish color alteration caused by algae on stoneworks. In: Felix, G. (Eds), Proceeding of the fifth international congress on deterioration and conservation of stone, Vol 2. Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, 653-663.
- Pinar, G., Gurtner, C., Lubitz, W., Roelleke, S.,** 2001. Identification of Archaea in objects of art by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and shotgun cloning. Methods in Enzymology, 336, 356-366.
- Pochon, J., Jatou, C.,** 1967. The role of microbiological agencies in the deterioration of stone. Chemistry and Industry, 9, 1587-1589.
- Pochon, J., Jatou, C.,** 1968. Biological factors in the alteration of stone. In: Wolters, A. H., Elpick, C. C. (Eds). Biodeterioration of materials. Elsevier, Amsterdam, 258-268.
- Pochon, J., Tardieux, P., Lajudie, J., Charpentier, M.,** 1960. Dégradation des Temples d'Angkor et processus biologiques. Annales d'Institut Pasteur, 98, 457-461.
- Pratt, P. L.,** 1986. Current developments in cement and concrete microstructure, in Research on the manufacture and use of cements, Proceeding of the Engineering foundation Conference (Frohnsdorf Ed), Engineering foundation, New York, 107-116.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A.,** 2003. Microbiologie. De Boeck Université (Eds), 2ème édition, 1164 pages. ISBN 2804142566.
- Ranalli, G., Matteini, M., Tosini, I., Zanardini, E., Sorlini, C.,** 2000. Bioremediation of cultural heritage: removal of sulfates, nitrates and organic substances. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G., (Eds), Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage. Kluwer Academic/Plenum Publishers, new-York, 231-246.
- Reardon, E. J., James, B. R., Abouchar, J.,** 1989. High pressure carbonation of cementitious grout. Cement and Concrete Research, 19, 385-399.
- Regnault, J. P.,** 1990. Microbiologie générale. Ed(s) Vigot. 859 pages.
- Ren, P., Ahearn, D. G., Crow, S. A.,** 1998. Mycotoxins of *Alternaria alternata* produced on ceiling tiles. Journal of Industrial Microbiology, 20, 53-54.

- Ribas Silva, M.**, 1995. Biological deterioration of concrete observed in Brazilian structures. *International Journal for Restoration of Buildings*, 1-2, 153-157.
- RILEM Recommendations CPC-18** 1989. Measurement of hardened concrete carbonation depth.
- Roberts, D. J., Nica, D., Zuo, G., Davis, J. L.**, 2002. Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, 227-234.
- Roelleke, S., Witte, A., Wanner, G., Werner, L.**, 1998. Medieval wall paintings – a habitat for Archea: Identification of Archea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wallpainting. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 85-92.
- Roquebert, M. F.**, 1997. Les moisissures : nature, biologie et contamination. Documentation Muséum d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie.
- Rotem, J.**, 1994. Sporulation mechanisms in culture. In: *The genus alternaria, Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*, 73-75. Saint-Paul, Minnesota: APS Press.
- Rougeau, P.**, 1997. Les résultats d'essais croisés AFREM: essai de carbonatation accéléré. In : *Etat des lieux et reflexions sur la carbonatation du béton armé*. Laboratoire Central des Ponts et Chaussées Paris, OA9 : sujet 1.49.02.7, 87-103.
- Ruzicka, S., Edgerton, D., Norman, M., Hill, T.**, 2000. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 989-1005.
- Saiz-Jimenez, C.**, 1993. Deposition of airborne organic pollutants on historic buildings. *Atmosphere Environment*, 27B, 77-85.
- Saiz-Jimenez, C.**, 1997. Biodeterioration vs Biodegradation the role of micro-organisms in the removal pollutants deposited on historic building, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40, 225-232.
- Saiz-Jimenez, C.**, 2000. Presentation of COALITION. Newsletter 1: 2-4
- Sand, W.**, 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates: A general mechanistic overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40 (2), 183-190.
- Sauman, Z., Lach, V.**, 1972. Long term carbonization of the phases  $3 \text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  and  $3 \text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{SiO}_2 \cdot 4 \text{H}_2$ . *Cement and Concrete Research*, 435-446.
- Saxena, J., Munimbazi, C., Bullerman, L. B.**, 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 29-34.
- Scrivener, K. L.**, 2004. Backscattered electron imaging of cementitious microstructures: understanding and quantification. *Cement and Concrete Composite*, 26, 935-945.

- Seitz, L. M., Sauer, D. B., Burroughs, R., Mohr, H. E., Hubbard, J. D.,** 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology*, 69, 1202-1203.
- Shahin, E. A., Shepard, J. F.,** 1979. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology*, 69, 618-620.
- Shirakawa, M.A., Beech, I.B., Tapper, R., Cincotto, M.A., Gambale, W.,** 2003. The development of a method to evaluate bioreceptivity on indoor mortar plastering to fungal growth, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 83-92.
- Simonovicova, A., Godyova, M., Sevc, J.,** 2004. Airborne and soil microfungi as contaminants of stone in a hypogean cemetery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 7-11.
- Simpson, L. J.,** 1997. Electrochemically generated CaCO<sub>3</sub> deposits on iron studied with FTIR and Raman spectroscopy. *Short communication, Electrochimica Acta*, 43 (16-17), 2543-2547.
- Singh, J.,** 1994. Biodeterioration of building materials. In: *Recent advances in biodeterioration and biodegradation. Volume I: biodeterioration of cultural heritage.* Calcutta: Naya Prokash, 399-427.
- Söderström, B. E.,** 1977. Vital staining of fungi in pure cultures and soil with fluorescein diacetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 9, 59-63.
- Sterfingler, K.,** 2000. Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal*, 17, 97-124.
- Sterfingler, K.,** 1995. Geomicrobiological investigations on the alteration of marble monuments by dematiaceous fungi (Sanctuary of Delos, Cyclades, Greece), PhD Thesis, University of Oldenburg, 138 pages.
- Sterfingler, K.,** 1999. Patination of marble at "euromarble" sites – iron stains versus biopigments. In: *Snethlage, R. (Eds), Proceeding of the ninth euromarble eurocare EU 496 workshop*, 83-91, Munich.
- Sterfingler, K., Krumbein, W. E.,** 1997. Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiology Journal*, 14(3), 219-230.
- Tai, C. Y., Chen, F. B.,** 1998. Polymorphism of CaCO<sub>3</sub> precipitation in a constant composition environment. *Journal for the American Institute of chemical engineers*, 44 (8), 1790-1798.
- Taylor, H. F. W.,** 1990. *Cement chemistry*, Academic Press, New York.
- Thiery, M.,** 2005. *Modélisation de la carbonatation atmosphérique des matériaux cimentaires ; Prise en compte des effets cinétiques et des modifications microstructurales et hydriques.* Thèse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 304 pages.

- Thiery, M., Villain, G., Dangla, P., Platret, G.,** 2007. Investigation of the carbonation front shape on cementitious materials: Effects of the chemical kinetics. *Cement and Concrete Research*, 37, 1047-1058.
- Thomas, J. J., Chen, J. J., Allen, A. J., Jennings, H. M.,** 2004. Effects of decalcification on the microstructure and surface area of cement and tricalcium silicate pastes. *Cement and Concrete Research*, 34, 2297-2307.
- Tiano, P.,** 2001. Biodegradation of cultural heritage: Decay mechanisms and control methods. ADRIANE workshop.
- Tomaselli, L.,** 2002. Biodeterioration processes in inorganic substrata. In: Special Issue: COALITION Advanced Course "Biological Problematics in Cultural Heritage", Florence, Italy, 8-9 November 2002 (First part), 5-8.
- Urzi, C.,** 2006. Biodeterioration of stone mortar and wallpainting. Presentation for Sciences of Materials of Cultural Heritage, European Doctoral Theoretical and Practical Course, 16-20 October, Ravello – Italy.
- Urzi, C., Albertano, P.,** 2001. Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments. *Methods in Enzymology*, 336, 340-355.
- Urzi, C., De Leo, F.,** 2000. Biodeterioration of cultural heritage in Italy: State of art. ARIADNE workshop.
- Urzi, C., De Leo, F.,** 2001. Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 1–11.
- Urzi, C., De Leo, F.,** 2007. Evaluation of the efficiency of a water repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60, 25-34.
- Urzi, C., De Leo, F., de Hoog, G.S., Sterflinger, K.** 2000a. Recent advances in the molecular biology and ecophysiology of meristematic stone-inhabiting fungi. In: Ciferri, O., Tiano P., Mastromei, G. eds. *Proceedings of the International Congress on Microbes and Art*, Plenum Publishing Co. Ltd., New York, 3-19.
- Urzi, C., Krumbein, W. E., Warscheid, T.,** 1992. On the question of biogenic colour changes of mediteranean monuments (coatings-crust-microstromatoloite-patina-scialbatura-skin-rock varnish). In: Decrouez, D., Chamay, J., Zezza, F. (Eds), *Proceeding of the second international symposium on: The conservation of monuments in the mediteranean basins*. Geneva, 397-420.

- Urzi, C., Realini, M.,** 1998. Colour changes of Noto's calcareous sandstone as related to its colonisation by microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 42, 45-54.
- Urzi, C., Salamone, P., Schumann, P., Stackebrandt, E.,** 2000b. *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family Nocardioidaceae isolated from a marble statue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 529–536.
- Urzi, C., Wollenzien, U., Criseo, G., Krumbein, W. E.,** 1995. Biodiversity of the rock inhabiting microflora with special reference to black fungi and black yeasts. In: Allsopp, D., Colwell R. R., Hawksworth, D. L. (Eds), *Microbial diversity and ecosystem function*, 289-302, Wallingford: CAB International.
- Van Gerven, T., Cornelis, G., Vandoren, E., Vandecasteele, C.,** 2007. Effects of carbonation and leaching on porosity in cement-bound waste. *Waste Management*, 27, 977-958.
- Van Gerven, T., Van Baelen, D., Dutré, V., Vandecasteele, C.,** 2004. Influence of carbonation and carbonation methods on leaching of metals from mortars. *Cement and Concrete Research*, 34 (1), 149-156.
- Vincke, E., Boon, N., Verstraete, W.,** 2001. Analysis of microbial communities on corroded sewer pipes – Case study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (5-6), 776-7850.
- Wang, C. J. K., Zabel, R. A.,** 1990. Identification manual for fungi from utility poles in the Eastern United States. Wang, C. J. K., Zabel, R. A. (Eds), Allen Press, Lawrence, Kansas, 356 pages.
- Warscheid, T., Becker, Th., Braams, J., Bruggerhoff, S., Gehrman, C., Krumbein, W.E., Petersen, K.,** 1993. Studies on the temporal development of microbial infection of different types of sedimentary rocks and its effect on the alteration of the physico-chemical properties in building materials. In: Thiel, M.-J. (Ed.), *Conservation of Stone and Other Materials*, Vol. 1. E & FN Spon, London, 303-310.
- Warscheid, T., Braams, J.,** 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 343-368.
- Warscheid, T., Krumbein, W. E.,** 1996. Biodeterioration of inorganic nonmetallic materials – general aspects and selected cases. In: Heitz, H., Sand, W., Flemming, H. C. (Eds), *Microbially Induced Corrosion of Materials*, Springer, Berlin, 273-295.

- Warscheid, T., Petersen, K., Krumbein, W. E.,** 1988. Effects of cleaning on the distribution of micro-organisms on rock surfaces. In: Houghton, D. R., Smith, R. N., Eggins, H. O. W. (Eds), *Biodeterioration*, Vol 7, Eslevier Applied Science, London, New-York, 455-460.
- Warscheid, T., Petersen, K., Krumbein, W.E.,** 1989a. Die Besiedlung unterschiedlicher Sandsteine durch chemoorganotrophe Bakterien und deren Einuß auf den Prozeß der Gesteinszerstörung. *Zeitschrift Deutsche Geologische Gesellschaft*, 140, 209-217.
- Warsheid, T.,** 1990. Untersuchungen zur biodeterioration von sandsteinen unter besonderer berücksichtigung der chemoorganotrphen bakterien. PhD thesis, University of Oldenburg.
- Warsheid, T., Oelting, M., Krumbein, W. E.,** 1991. Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollution. *International Biodeterioration*, 28, 37-48.
- Watanabe, K., Yokoseki, K., Ashizawa, R., Sakata, N., Morioka, M., Sakai, E., Daimon, M.,** 2006. High durability cementitious material with mineral admixtures and carbonation curing. *Waste Management*, 26, 752-757.
- Weete, J. D.** 1989. Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research*, 23, 115-167.
- Welton, R. G., Ribas Silva, M., Gaylarde, C., Herrera, L. K., Anleo, X., De Belie, N.,** 2005. Techniques applied to the study of microbial impact on building materials. *Materials and Structures*, 38, 883-893.
- Wendler, E., Prasartset, C.,** 1999. Lichen growth on olde Khmer styled sandstone monuments in Thaïland: damage factor or shelter? Proceeding of the 12<sup>th</sup> Triennial Meeting of the ICOM Committee for Conservation, Lyon.
- Witier, P., Platret, G., Huynh, H. T., Farcas, F., Bouteiller, V., André, D., Mouton, Y., Antoine, J. M.,** 1999. Analyse et caractérisation de matériaux de construction. *Techniques de l'ingénieur*, P3 660.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L.,** 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal fort he domains Archae, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science*, 87, 4576-4579.
- Wollenzien, U., de Hoog, G. S., Krumbein, W. E., Uijthof, J. M. J.,** 1997. *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Anton Leeuw*, 71, 281-288.
- Wollenzien, U., de Hoog, G.S., Krumbein, W.E., Urzi, C.,** 1995. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcereous rocks. *The Science of the Total Environment*, 167, 287-294.

- 
- Woody, M. A., Chu, F. S.,** 1992. Toxicology of *Alternaria* mycotoxins. In Chelkowski J, Visconti A. (eds.), *Alternaria*. Biology, plant disease and metabolites. 409-434. Elsevier, Amsterdam.
- Zanardini, E., Abbruscato, P., Ghedini, N., Realini, M., Sorlini, C.,** 2000. Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 35-42.
- Zelles, L., Bai, Q. Y., Beck, T., Beese, F.,** 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 317-323.
- Zhdanova, N.N., Pokhodenko, V.D.,** 1973. The possible participation of melanin pigment in the protection of the fungus cell from desiccation. *Microbiology*, 42, 753-757.

## ANNEXE A : LA STÉRILISATION

La manipulation de micro-organismes nécessite certaines mesures de sécurité, comme le travail sous hotte à flux laminaire, ou encore à proximité d'une flamme, ayant pour but d'éviter toutes sources de contamination de la culture, mais également de l'environnement de travail. Il est donc nécessaire de stériliser tout matériel et objet faisant partie de l'expérimentation.

Le but de la stérilisation d'un objet est la destruction ou l'inactivation irréversible de tous les micro-organismes qui se trouvent dans ou sur cet objet. Etant donné qu'un objet stérile peut être contaminé par contact avec le milieu extérieur, une première exigence est de conditionner l'objet avant la stérilisation. Ce n'est qu'au moment de son utilisation qu'il peut être déballé de manière aseptique. Le conditionnement et le mode de conservation du matériel stérile font intégralement partie de la stérilisation.

L'efficacité de la stérilisation dépend de trois facteurs : (1) le temps d'exposition à l'agent létal, (2) la dimension de la population microbienne, (3) le taux de mortalité des micro-organismes à détruire. Ce dernier facteur est lui-même influencé par la nature du micro-organisme, ainsi que par la nature et l'intensité de l'agent létal (Regnault, 1990).

Différentes méthodes de stérilisation existent, le choix se fait selon les contraintes imposées par l'objet à stériliser, sa résistance ou non aux températures et pressions élevées, par exemple.

### **Stérilisation à la chaleur humide**

Cette méthode doit seulement être utilisée pour les produits connus comme étant stables à la chaleur et n'étant pas volatils à la température de la vapeur d'eau. La stérilisation à la chaleur humide au moyen de vapeur d'eau saturée et sous pression réduite constitue le procédé de stérilisation le plus facile à contrôler. Ce mode de stérilisation constitue le premier choix pour le matériel qui résiste aux températures et pressions élevées, aux brusques changements de pression et à l'humidité (NF EN 113).



## **Stérilisation à l'oxyde d'éthylène**

L'oxyde d'éthylène est un gaz qui stérilise via son action d'agent puissant d'alkylation. Sous les bonnes conditions, les constituants cellulaires des organismes, tels que les complexes d'acides nucléiques, protéines fonctionnelles et enzymes, réagissent avec l'oxyde d'éthylène, provoquant l'addition de groupements alkyl. La reproduction cellulaire est alors empêchée et la mort cellulaire s'ensuit (Medical device, 2004). Les conditions de sécurité liées à l'utilisation de ce gaz et le prix de maintenance des installations spécialisées poussent les utilisateurs privés à se tourner vers les laboratoires proposant des prestations de services.

## **Stérilisation par les UV**

La stérilisation par les U.V est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. Des instruments ou des récipients peuvent être stérilisés de la sorte.

## **La stérilisation par les rayonnements ionisants**

Ce procédé fait appel, soit à des rayonnements électromagnétiques de grande énergie (rayons gamma), soit à des rayonnements corpusculaires électroniques (rayons bêta). Dans tous les cas, il s'agit de rayonnements fortement ionisants qui possèdent la propriété de pouvoir arracher des électrons aux atomes. L'action bactéricide des rayonnements ionisants a été mise en évidence par Minck, en 1896, au moyen des rayons X découverts un an auparavant par Roentgen. Le développement des applications de l'énergie nucléaire dès les premières années de l'après-guerre, 1939-45, puis l'introduction du matériel médico-chirurgical non réutilisable dans la pratique hospitalière, ont permis à la stérilisation par les rayonnements ionisants d'entrer en phase industrielle, pour le matériel thermosensible notamment (Goullet, 1983).

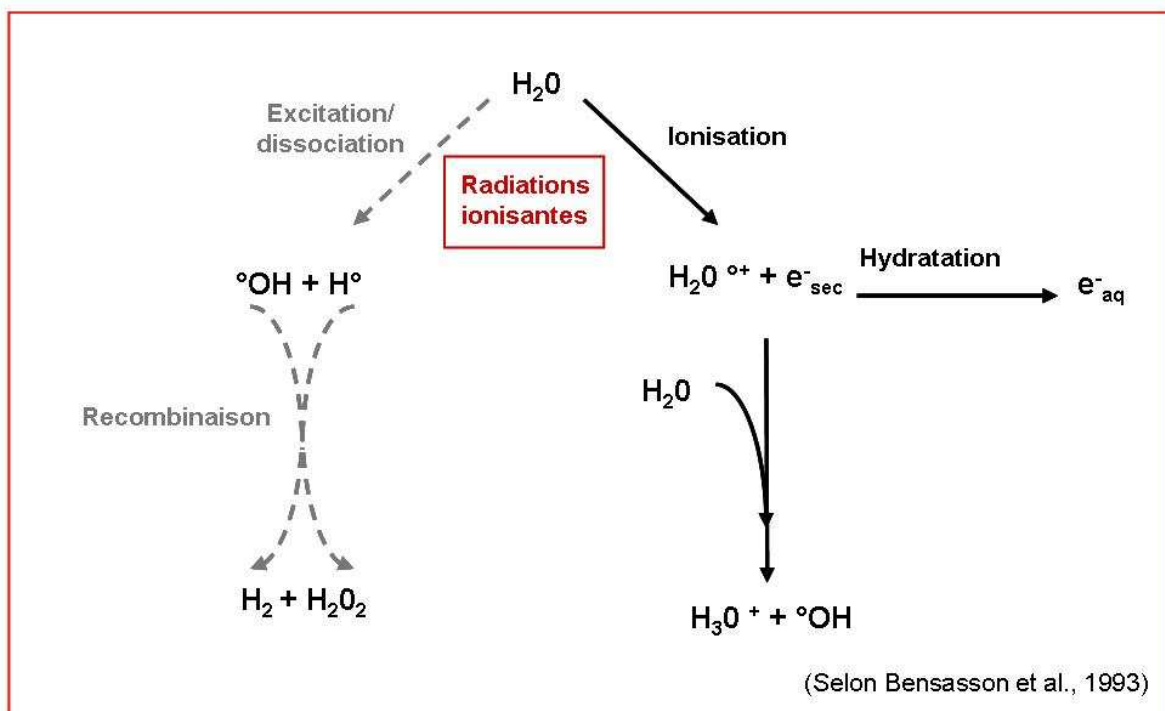
### *L'irradiation par rayons $\gamma$*

L'irradiation consiste à soumettre un produit aux rayonnements d'une source radioactive. Lorsque les atomes de ce produit sont exposés aux rayonnements  $\gamma$  du Co 60 dans un irradiateur, certains d'entre eux perdent un des électrons qui gravitent autour de leur noyau. Ils deviennent « ionisés » mais leurs noyau reste intact. Ces ions et ces électrons éjectés réagissent à leur tour avec d'autres atomes et molécules. Il est donc physiquement impossible aux noyaux des atomes du produit d'être altérés par le rayonnement du Co 60. En effet,

l'énergie des électrons éjectés, ou celle des rayons  $\gamma$ , est relativement faible par rapport aux forces qui lient les éléments du noyau du produit irradié entre eux (Hydro-Quebec, 1997).

*Mécanismes d'action des rayonnements ionisants sur les micro-organismes*

Sous l'action des rayonnements ionisants, l'eau subit une radiolyse (Goulet, 1983) : la formation d'espèces réactives de l'oxygène perturbe la structure des acides nucléiques et des protéines qui altère le fonctionnement cellulaire.



**Figure 71 : Radiolyse de l'eau**

*Dose de rayonnement*

Cette dose représente l'énergie de radiation totale absorbée par le produit. L'unité de mesure est le gray (Gy), qui est équivalent à 1J/kg. Dans le domaine qui nous concerne, les doses sont exprimées généralement en kilogray, kGy (Gominet, 2001).

*Puissance de la source*

La puissance de la source, associée au rendement du rayonnement, est le paramètre qui fixe le débit de dose utile, c'est-à-dire le temps d'exposition de l'échantillon pour un traitement donné. Dans les cas des radioéléments (cobalt 60 et césium 137), la puissance est représentée par son activité en curies (ci).

Pour utiliser au mieux le rayonnement  $\gamma$  émis, les sources sont placées au centre d'une cellule de taille importante dont la géométrie et les dimensions doivent être soigneusement étudiées. Le volume doit être occupé au maximum par les produits. L'activité des sources industrielles de Co 60 se situe entre 100 000 ci et 3 à 5 Mci pour les installations les plus importantes. Les débits de dose, compris entre 1 et 5 kGy/h, conduisent à des temps d'exposition de quelques heures pour l'obtention d'une dose de 10 kGy (Gominet, 2001).

#### *Energie du rayonnement*

L'énergie d'un rayonnement (exprimée en eV) est la caractéristique qui détermine son pouvoir de pénétration dans la matière, et donc, l'épaisseur du produit qu'il sera possible de traverser et de traiter dans des bonnes conditions d'homogénéité de dose ; en effet, le pouvoir de pénétration utile est directement proportionnel à l'énergie et inversement proportionnel à la densité moyenne du produit.

Dans le cas des sources radioactives, l'énergie des rayonnements  $\gamma$  émis est fixée par le radioélément émetteur (Gominet, 2001):

- cobalt 60 :  $E = 1,17$  et  $1,33$  MeV
- césium 137 :  $E = 0,66$  MeV

## ANNEXE B : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

**Yeast Nitrogen Broth (YNB, Difco - 288620) – Approximate formula per litre**

<b><i>Nitrogen source</i></b>	
Ammonium sulfate	5.0 g
<b><i>Amino acids</i></b>	
L-Histidine Monohydrochloride	10.0 mg
DL-Methionine	20.0 mg
DL-Tryptophan	20.0 mg
<b><i>Vitamins</i></b>	
Biotin	2.0 µg
Calcium pantothenate	400.0 µg
Folic acid	2.0 µg
Inositol	2 000.0 µg
Niacin	400.0 µg
p-Aminobenzoic acid	200.0 µg
Pyridoxine hydrochloride	400.0 µg
Riboflavin	200.0 µg
Thiamine hydrochloride	400.0 µg
<b><i>Compounds supplying trace elements</i></b>	
Boric acid	500.0 µg
Copper sulfate	40.0 µg
Ferric chloride	200.0 µg
Manganese sulfate	400.0 µg
Potassium iodide	100.0 µg
Sodium molybdate	200.0 µg
Zinc sulfate	400.0 µg
<b><i>Salts</i></b>	
Calcium chloride	0.1 g
Magnesium sulfate	0.5 g
Monopotassium phosphate	1.0 g
Sodium chloride	0.1 g

**Potatoes Dextrose Agar (PDA, Sigma – P 2182)**

Agar	15.0 g/L
Glucose (Dextrose)	20.0 g/L
Potatoes, Infusion from	4.0 g/L
Grains to prepare 1 L	39.0 g/L

**Malt Extract Broth (MEB, Oxoid – CM0057)**

Malt extract	17.0 g/L
Mycologic peptone	3.0 g/L
Grams to prepare 1 L	20.0 g/L

**Modified Czapeck-Dox Agar (mCZA) – Formula per litre**

Cellulose	30.0 g
Sodium nitrate	3.0 g
Magnesium sulfate	0.5 g
Potassium chloride	0.5 g
Ferric sulfate	10 mg
Di-potassium hydrogenophosphate	1.0g
Agar	13.0 g

**V<sub>8</sub> juice Agar (V<sub>8</sub>)**

Calcium carbonate	3.0 g/L
Agar	20.0 g/L
V <sub>8</sub> juice	200.0 mL

**Modified V<sub>8</sub> juice Agar (V<sub>8</sub>)**

Calcium carbonate	3.0 g/L
Agar	20.0 g/L
Tomato mash	200.0 mL

---

## ANNEXE C : CULTURAL MEDIA IN MICROBIOLOGY

(Malloch, 1997)

Most culture media fit into one of three categories: (i) synthetic, (ii) semi-synthetic, and (iii) natural.

### **Synthetic media**

Synthetic media are composed of ingredients of known chemical composition and concentration. These media are useful in physiological or descriptive studies when it is necessary to duplicate exactly a previous batch of medium or to record the effects of the deletion or addition of a particular substance. Few fungi show their best growth on synthetic media; they must sacrifice speed in order to build their necessary cell components from relatively simple materials. However, many produce the sporulating structures necessary for identification more easily on synthetic media than on other kinds.

### **Semi-synthetic media**

Semi-synthetic media resemble synthetic media in containing a known set of ingredients, but differ in that at least some of the ingredients are of unknown or variable composition. A synthetic medium, in which all ingredients are chemically defined, can be made semi-synthetic by adding a substance such as yeast extract. We know that the yeast extract contains thiamine and other vitamins, but we do not know the exact amounts or what else might be present. The result is a medium of quite predictable composition but one not completely known chemically. Semi-synthetic media are widely used in routine work and offer something of a compromise between synthetic and natural media.

### **Natural media**

Natural media are so called because they are partly or completely composed of natural materials, such as ground-up (or whole) plants or animals. Some natural media may consist of synthetic medium augmented by tomato juice, carrot strips, or plant stems. Natural media are often very good and allow sporulation in fungi that may otherwise remain sterile. Their major disadvantage is that they may differ considerably from batch and thus not yield reliable

experimental results. Nevertheless, natural media are widely used in laboratory work and cannot be replaced by any other kind.

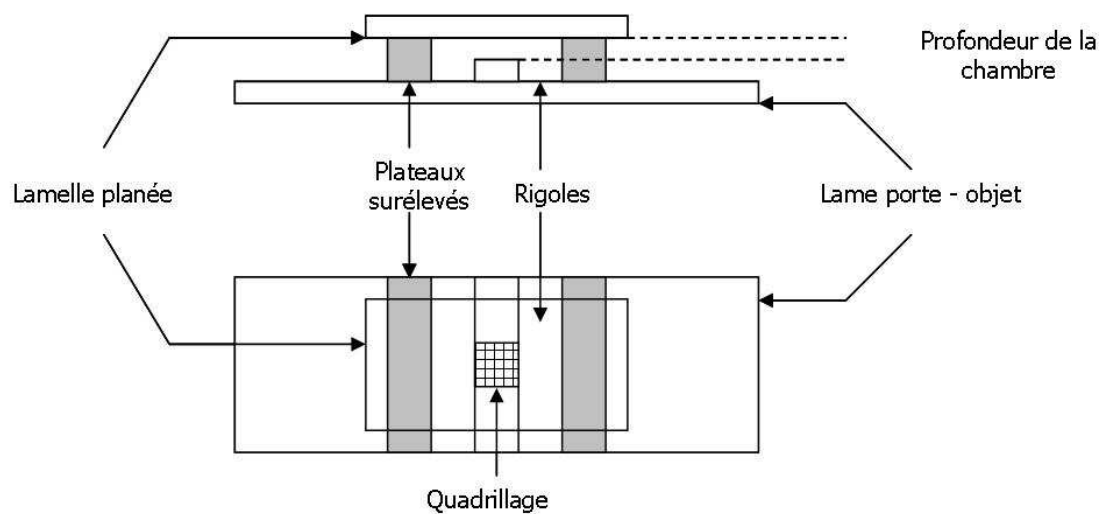
## ANNEXE D : NUMÉRATION CELLULAIRE

(Extrait des ressources académiques du réseau STI-Biotechnologies et SMS de l'académie de Rouen)

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est-à-dire en nombre de cellules par litre.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération).

La cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage :

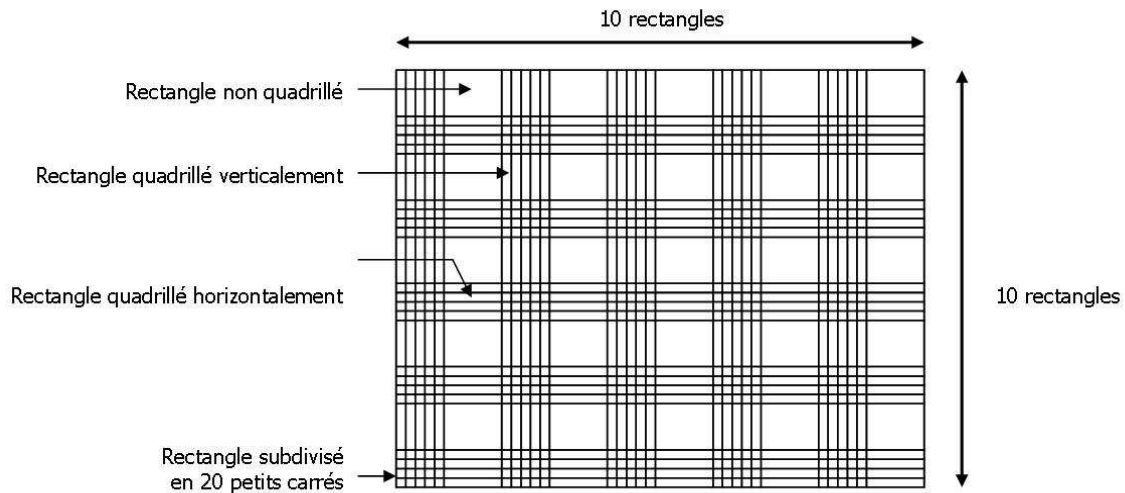


Le volume de comptage est déterminé par : (i) la surface du quadrillage gravé sur la lame, (ii) la profondeur de la chambre.

### La cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :





Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

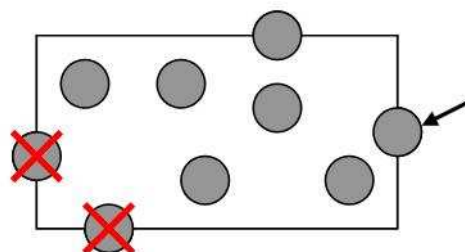
Le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$ .

Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit  $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$ .

La cellule de Bürker suit le même principe que la cellule de Malassez, mais dans ce cas, le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $0,9 \text{ mm}^3$ .

### Numération

Les cellules sont comptées au microscope à l'objectif x40 (1 rectangle par champ). Pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



**Numération sur le rectangle = 7 cellules**

**Calcul de la concentration cellulaire**

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

- Soient :
- **n** : nombre de cellules comptées
  - **V** : volume de comptage = volume d'un rectangle x nombre de rectangle comptés
  - **N** : nombre de cellules par litres

Si on a n cellules dans V litres, alors on a N cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1$$

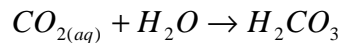
$$\mathbf{N = n/V}$$

## ANNEXE E: CARBONATE EQUILIBRIA

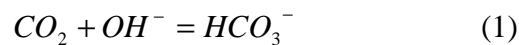
(Courses notes SSC 102, Bureau, R. G., Zasoski, R. J., Davis, U. C., 2002 / Extract from Environmental Soil Chemistry – by D. L. Sparks)

First, considering the open system CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O:

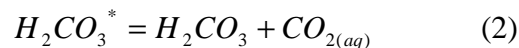
Aqueous carbon dioxide reacts to form carbonic acid via the following reaction:



The hydration of carbon dioxide is slow to attain equilibrium below pH 8 in pure systems. However, above pH 11, the hydration reaction is relatively rapid as carbon dioxide reacts directly with hydroxide to form bicarbonate.



In biological systems the hydration of carbon is catalyzed by carbonic anhydrase a Zn-containing enzyme. Only a small portion of the aqueous carbon dioxide exists as carbonic acid. However, in H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>\*</sup> (as defined below) is used to represent solution carbonates.



Where H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>\*</sup> is the total dissolved carbon including aqueous carbon dioxide.

Carbonic acid dissociates into bicarbonate and carbonate according to the following equations:

$$\frac{(H^+)(HCO_3^-)}{(H_2CO_3)} = K^0_{H_2CO_3} = 10^{-6.4} \quad (3)$$

Where  $H_2CO_3 = H_2CO_3 + CO_{2(aq)} = H_2CO_3^*$

$$\frac{(H^+)(CO_3^{2-})}{(HCO_3^-)} = K_{HCO_3^-}^0 = 10^{-10.3} \quad (4)$$

As for every aqueous reaction the acid base relationship between the proton and hydroxide is an important relationship.

$$\frac{(H^+)(OH^-)}{(H_2O)} = K_w^0 = 10^{-14} \quad (5)$$

Starting with the electrical neutrality expression:

$$[H^+] = [OH^-] + [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] \quad (6)$$

The system is manipulated to collect terms in the variables of interest – hydrogen ion concentration and carbon dioxide partial pressure. Note that the electrical neutrality expression is defined in terms of concentrations (mol/L). Therefore, in order to utilize values from the thermodynamic equilibrium expressions, the conditional equilibrium constants must be used which relate concentrations rather than activities to the ionic distributions at equilibrium.

Defining  $OH^-$  in terms of  $H^+$  yields:

$$[OH^-] = \frac{K_w^c}{[H^+]} \quad (7)$$

Solving for  $HCO_3^-$  gives:

$$[HCO_3^-] = \frac{K_{H_2CO_3}^c [H_2CO_3]}{[H^+]} \quad (8)$$

Finding carbonate via bicarbonate:

$$[CO_3^{2-}] = \frac{K^c_{HCO_3^-} [HCO_3^-]}{[H^+]} \quad (9)$$

Substituting for  $HCO_3^-$ :

$$[CO_3^{2-}] = \frac{K^c_{H_2CO_3} K^c_{HCO_3^-} [H_2CO_3]}{[H^+]^2} \quad (10)$$

The rewritten electrical neutrality expression in terms of  $H^+$  and  $H_2CO_3$  is:

$$[H^+] = \left( \frac{K^c_w}{[H^+]} \right) + \left( \frac{K^c_{H_2CO_3} [H_2CO_3]}{[H^+]} \right) + 2 \left( \frac{K^c_{H_2CO_3} K^c_{HCO_3^-} [H_2CO_3]}{[H^+]} \right) \quad (11)$$

Rearranging, by  $(H^+)^2$  and substituting  $k_H \cdot P_{CO_2}$  for  $H_2CO_3$  yields:

$$\begin{aligned} [H^+]^3 - K^c_w [H^+] - K^c_{H_2CO_3} [H^+] k_H P_{CO_2} - 2K^c_{H_2CO_3} K^c_{HCO_3^-} k_H P_{CO_2} &= 0 \\ [H^+]^3 - [H^+] (K^c_w + K^c_{H_2CO_3} k_H P_{CO_2}) - 2K^c_{H_2CO_3} K^c_{HCO_3^-} k_H P_{CO_2} &= 0 \end{aligned} \quad (12)$$

$k_H$  = Henry's Law Constant

We are left with a polynomial equation in  $[H^+]$ . In this formulation the only variables are  $(H^+)$  and  $P_{CO_2}$ . If a known and constant value for the partial pressure of carbon dioxide is inserted into the above equation,  $(H^+)$  can be found by a variety of numerical techniques.

Now, calcium carbonate in water with a fixed partial pressure of carbon dioxide is considered. For the case of a fixed partial pressure of carbon dioxide and calcium carbonate dissolved in the aqueous phase one more equation is needed to describe the system. This is the solubility product of calcium carbonate:

$$\frac{(Ca^{+})(CO_3^{2-})}{(CaCO_3)} = K^0_{CaCO_3} \quad (13)$$

The electrical neutrality expression for this case is:

$$2[Ca^{2+}] + [H^+] = [OH^-] + [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] \quad (14)$$

Substituting to produce an equation in  $H^+$  and  $H_2CO_3$  results in the following:

$$[Ca^{2+}] = \frac{K^c_{CaCO_3}}{[CO_3^{2-}]} \quad (15)$$

As in the previous case:

$$[Ca^{2+}] = \frac{K^c_{CaCO_3}}{\left( \frac{K^c_{H_2CO_3} K^c_{HCO_3^-} [H_2CO_3]}{[H^+]^2} \right)} \quad (16)$$

$$[HCO_3^-] = \frac{K^c_{H_2CO_3} [H_2CO_3]}{[H^+]}$$

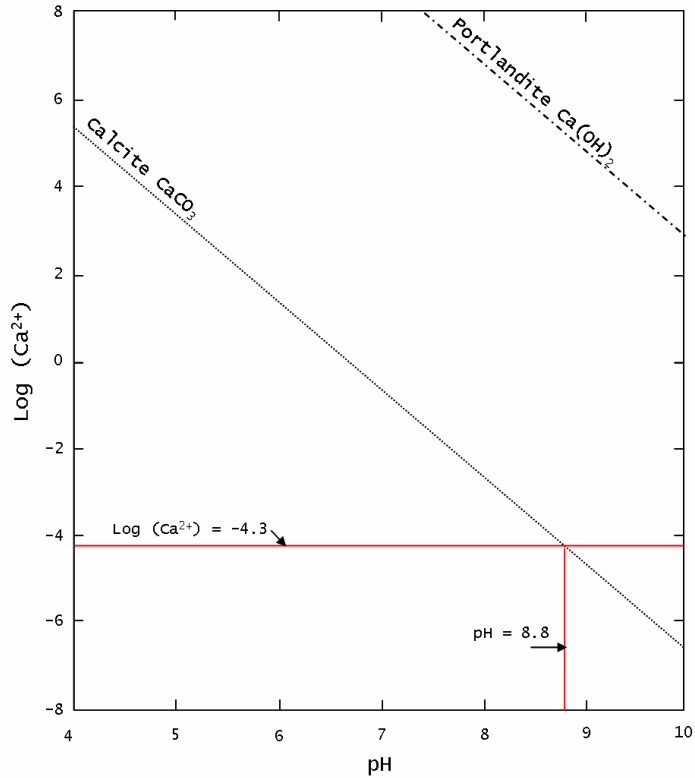
$$[CO_3^{2-}] = \frac{K^c_{H_2CO_3} K^c_{HCO_3^-} [H_2CO_3]}{[H^+]^2}$$

$$[OH^-] = \frac{K^c_w}{[H^+]}$$

These equations yield an expression in  $[H_2CO_3]$  and  $[H^+]$  at a given partial pressure of carbon.

Knowing  $[H^+]$  and  $P_{CO_2}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$  and  $CO_3^{2-}$  can be found.

Therefore, soluble Ca derived from calcite or portlandite in relation to solution is given in the following figure:

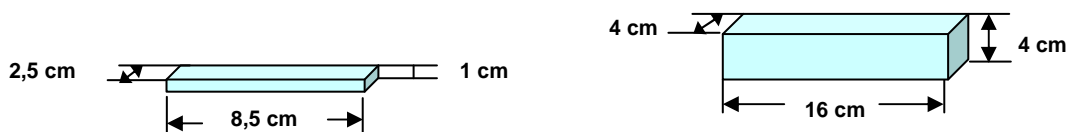


## ANNEXE F : ESSAI DE CARBONATATION ACCÉLÉRÉE – TESTS PRÉLIMINAIRES

### Matériels et méthodes

#### - Eprouvettes utilisées

Nous utilisons des éprouvettes en ciment blanc (CEM I, calcia), élaborées avec un rapport E/C= 0,55.



Après une cure de conservation de 28 jours sous eau ou à 100% HR, les éprouvettes sont conservées sous film plastique fermé hermétiquement, à  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  et  $65\pm 5\%$ .

Certaines éprouvettes sont séchées avant l'essai de carbonatation. Elles sont placées à l'étuve à  $40^{\circ}\text{C}$  24h (Chaussadent, 1997).

#### - Contrôle de l'humidité relative

Le bullage du  $\text{CO}_2$  dans l'eau provoque un apport en continu d'humidité dans l'enceinte. Deux sels sont utilisés afin de réguler l'humidité relative à l'intérieur de l'enceinte :

- le nitrate d'ammonium :  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Prolabo, Rhône-Poulenc)
- le carbonate de potassium :  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (Normapur AR)

Le sel anhydre est placé dans la partie inférieure de l'enceinte et est renouvelé toutes les 24h.

#### - Essais réalisés

Lors du premier essai, l'humidité relative est contrôlée avec du  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Le débit est régulé par bullage du  $\text{CO}_2$  en entrée uniquement. Pour le deuxième essai, nous avons utilisé du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  pour réguler l'humidité relative, le débit est ajusté afin d'obtenir un bullage à l'entrée et en sortie (figure 2 et 3).

Afin de suivre l'évolution de la profondeur de carbonatation, des échantillons de ciment sont cassés à intervalles de temps régulier de carbonatation, et aspergés par une solution de phénolphthaléine. La phénolphthaléine est incolore pour des pH inférieurs à 9,2 environ, et se colore en violet au dessus de cette valeur (RILEM, 1989).



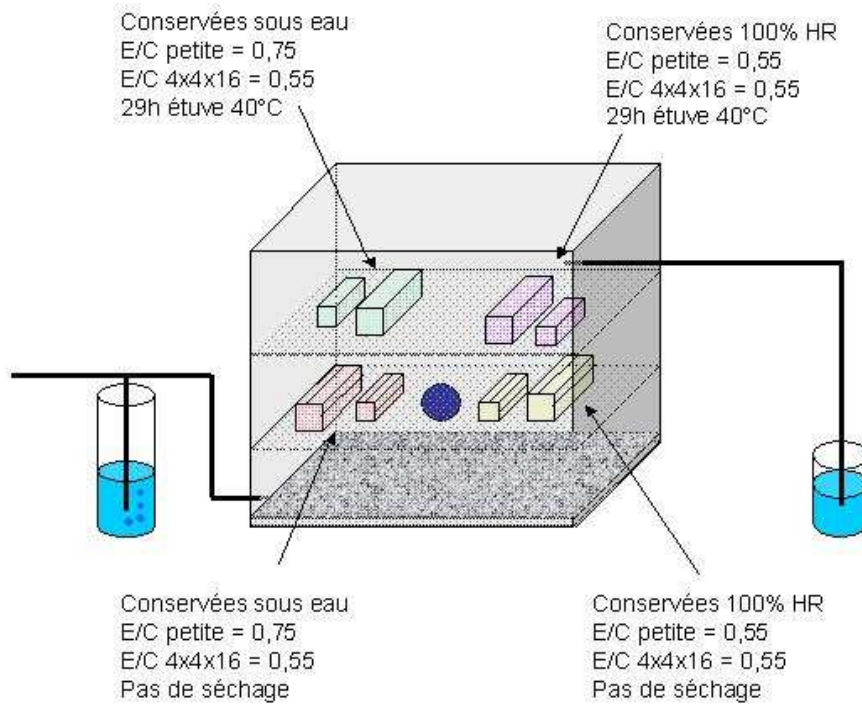


Figure 72 : montage essai 1

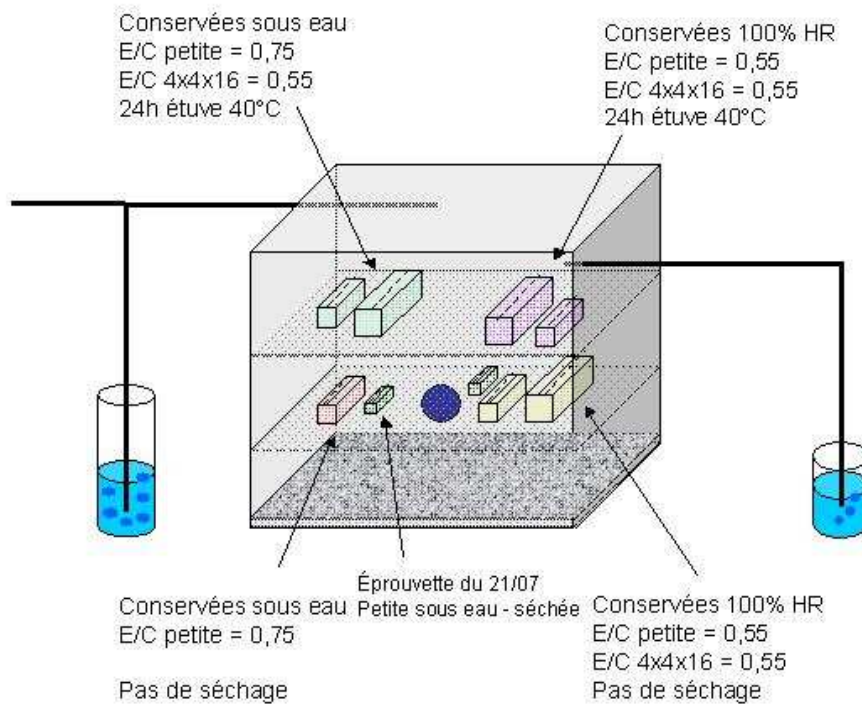


Figure 73 : montage essai 2

## Résultats

### - Essai 1

Après 4 jours de carbonatation le test à la phénolphthaléine révèle une zone carbonatée plus étendue et homogène sur les éprouvettes conservées à 100% HR séchées par rapport aux éprouvettes non séchées (photos non montrées). Cependant il semble que certaines faces soient privilégiées. Nous n'observons pas de carbonatation pour les éprouvettes conservées sous eau.

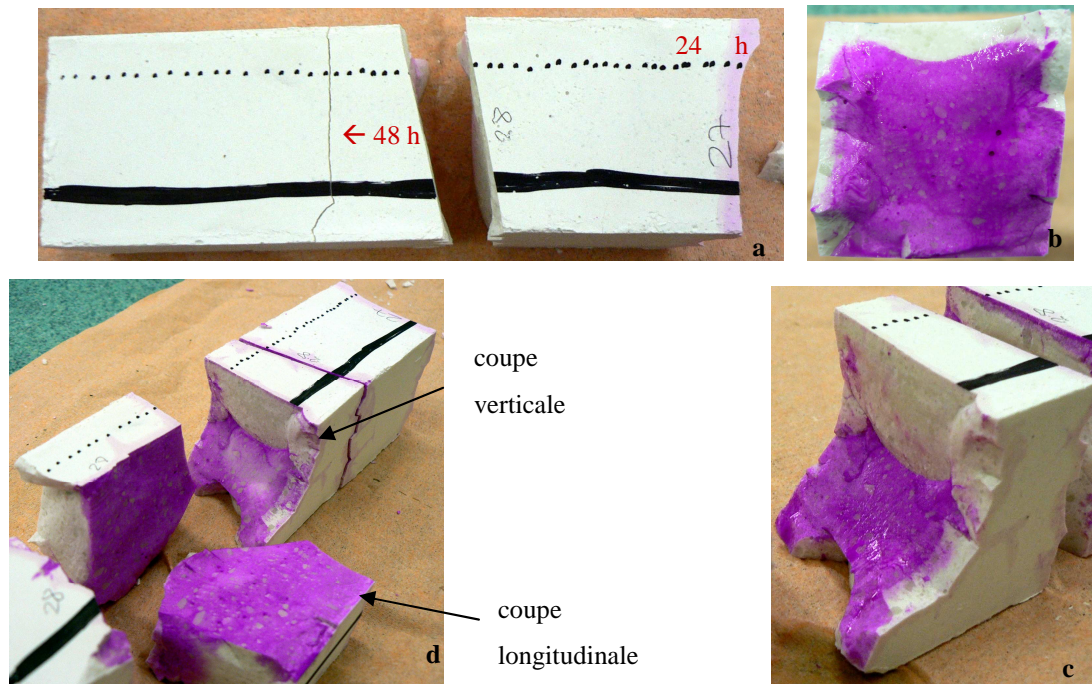
Ces premiers résultats nous laissent penser que la répartition du gaz n'est pas homogène dans l'enceinte, le deuxième essai est donc réalisé avec un débit de CO<sub>2</sub> plus élevé, avec bullage en entrée et en sortie.

D'autre part, d'après la littérature la vitesse de carbonatation serait maximale pour une HR de 65% (Chaussadent, 1997). Or, lors de cet essai, l'HR était réglée à 80%. Nous changeons donc de sel pour le deuxième essai.

### - Essai 2

*\* Eprouvettes 4x4x16 cm*

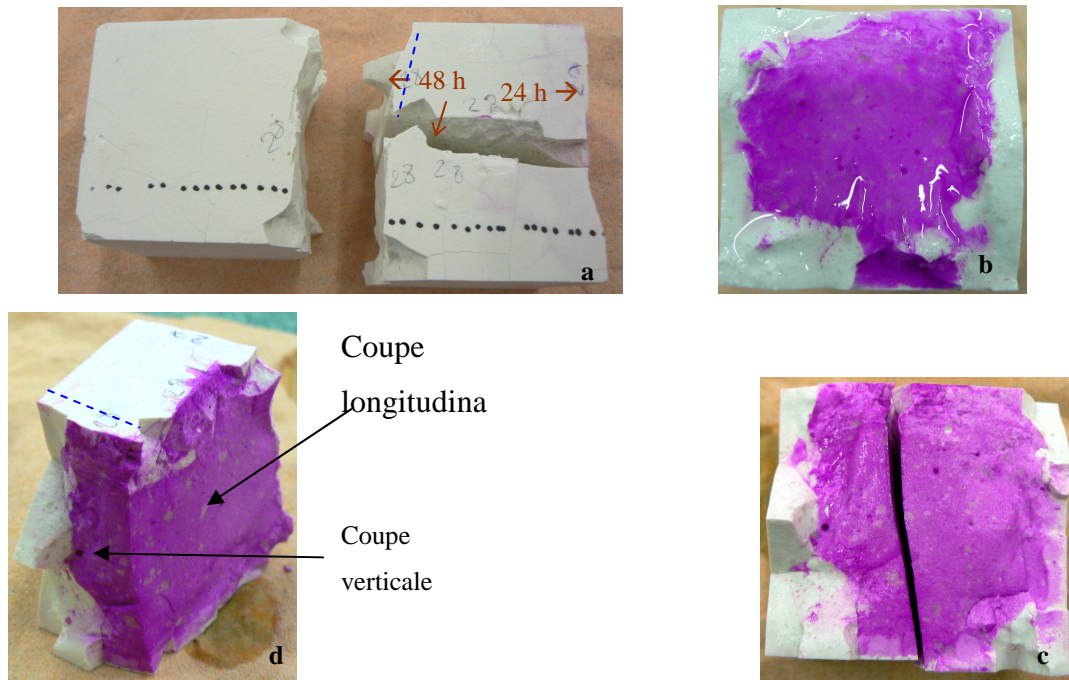
Les premières éprouvettes sont cassées après 24h de carbonatation. Le test à la phénolphthaléine révèle une zone carbonatée d'environ 0,5 cm sur la face supérieure et un coté. En revanche, la face inférieure n'est pas du tout carbonatée (Photo 1b). Cela peut s'expliquer par le fait que cette face était en contact avec la grille et donc très peu en contact avec le gaz. Après 48h de carbonatation, nous observons un front de carbonatation qui s'étend de la face supérieure à environ 1,7 cm vers le cœur de l'éprouvette (Photo 1c). Ces observations sont réalisées à partir de coupes verticales de l'éprouvette. Lorsque nous réalisons le test à la phénolphthaléine mais cette fois-ci sur une coupe longitudinale (Photo 1d) les observations sont très différentes : il n'y a pas de carbonatation. La carbonatation n'est pas homogène, et semble suivre des chemins préférentiels : il semblerait que la carbonatation suive dans un premier temps les défauts de l'éprouvette. Il serait intéressant de réaliser des observations pour des durées de carbonatation plus importants, de l'ordre de la semaine.



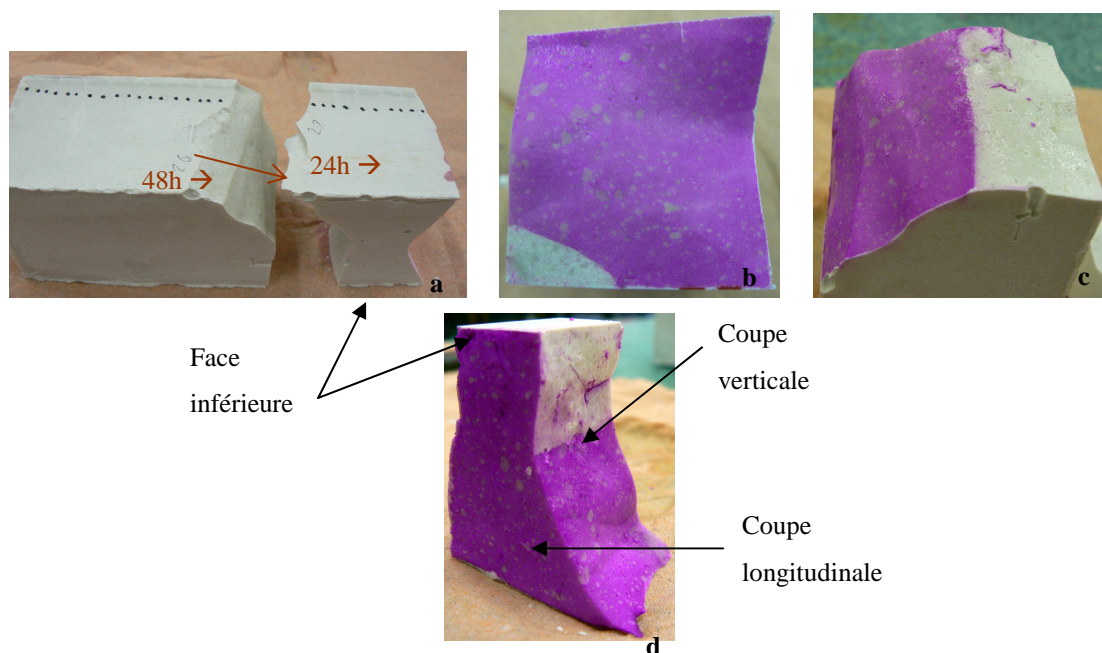
**Photo 1 : Résultats obtenus pour une éprouvette 4x4x16 cm conservée à 100% HR, non séchée – a. localisation des morceaux observés sur l'éprouvette – b. coloration après 24 h de carbonatation – c. coloration après 48h de carbonatation – d. comparaison du front de carbonatation selon la découpe verticale ou longitudinale après 48h de carbonatation**

Concernant l'éprouvette séchée avant l'essai de carbonatation, nous observons à 24h une zone carbonatée plus importante que sur l'éprouvette non séchée (Photo 2b). Après 48h de carbonatation, le test à la phénolphthaléine révèle une zone carbonatée plus grande qu'à 24h (Photo 2c). De même que précédemment, la comparaison des observations d'une coupe verticale avec une coupe longitudinale (Photo 2d) montre que le front de carbonatation n'est pas homogène sur une même face et plus globalement sur toute l'éprouvette. Cela nous laisse donc penser que sur les éprouvettes 4x4x16 cm la carbonatation se produit d'abord en suivant les défauts du matériau.

La tendance est plus accentuée sur les éprouvettes conservées sous eau. Nous n'observons aucune carbonatation sur celles qui n'ont pas été séchées (photos non montrées). A 24h de carbonatation sur l'éprouvette séchée nous observons une légère zone de carbonatation, certainement amorcée par un défaut du matériau (Photo 3b). Après 48h de carbonatation, nous observons un front homogène de carbonatation allant de la face inférieure de l'éprouvette vers le cœur sur une bande de l'ordre de 1,5 cm. Cependant, nous remarquons une fois de plus que selon la coupe longitudinale il n'y a pas de carbonatation.



**Photo 2 : Résultats obtenus pour une éprouvette 4x4x16 cm conservée à 100% HR, séchée – a. localisation des morceaux observés sur l'éprouvette – b. coloration après 24 h de carbonatation – c. coloration après 48h de carbonatation – d. comparaison du front de carbonatation selon la découpe verticale ou longitudinale après 48h de carbonatation**



**Photo 3 : Résultats obtenus pour une éprouvette 4x4x16 cm conservée sous eau, séchée – a. localisation des morceaux observés sur l'éprouvette – b. coloration après 24 h de carbonatation – c. coloration après 48h de carbonatation – d. comparaison du front de carbonatation selon la découpe verticale ou longitudinale après 48h de carbonatation**

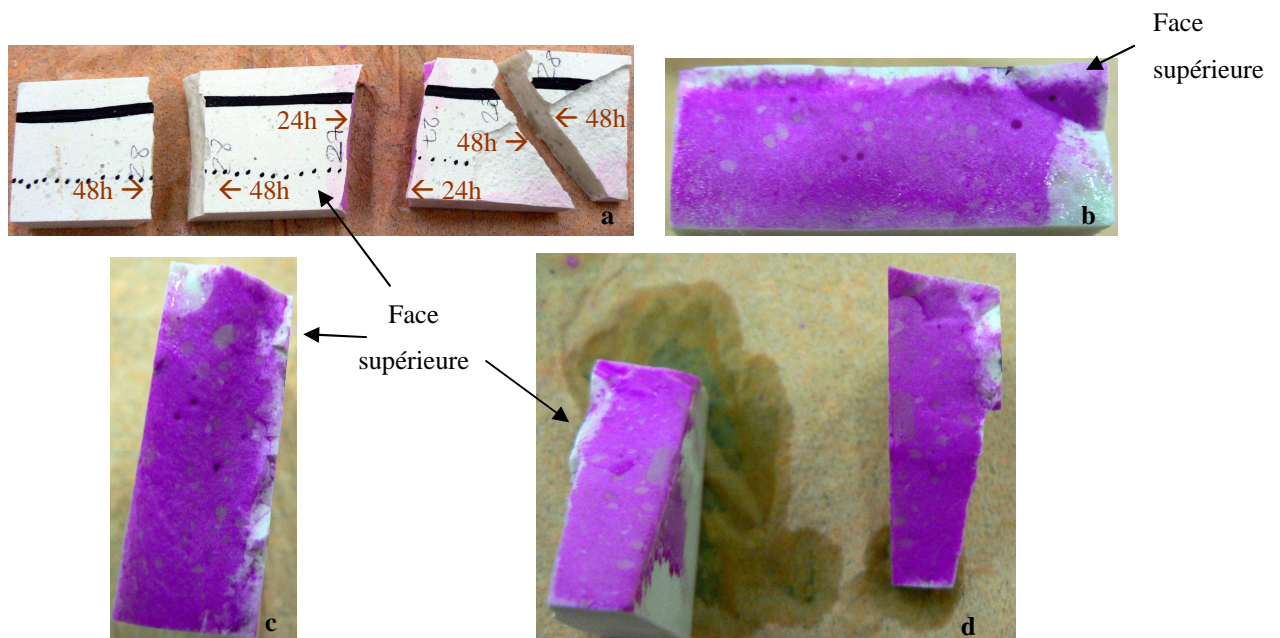
\* *Eprouvettes 1x2,5x8,5 cm*

Pour l'éprouvette conservée sous eau, le test à la phénolphthaléine révèle une zone carbonatée de l'ordre de 2 à 3 mm sur pratiquement toutes les faces de l'éprouvette dès 24h (Photo 4a). Le front de carbonatation évolue seulement à partir de la face supérieure de l'éprouvette (Photo 4b), à 48h la zone carbonatée atteint 3 à 5 mm d'épaisseur.

Intéressons nous aux éprouvettes ayant subi une cure de conservation de 28j à 100% HR. Nous observons pour l'éprouvette non séchée, à 24h un front de carbonatation s'étendant de la face supérieure de l'éprouvette jusqu'à 1-2 mm vers le cœur de l'éprouvette (Photo 5b). En revanche, nous constatons que selon la zone d'observation sur l'éprouvette (Photo 5a), le front de carbonatation n'a pas la même étendue à 48h : la zone carbonatée n'a pas évoluée à 48h par rapport à 24h pour la zone indiquée par la Photo 5c. Nous observons sur la Photo 5d que le front de carbonatation suit le défaut du matériau.

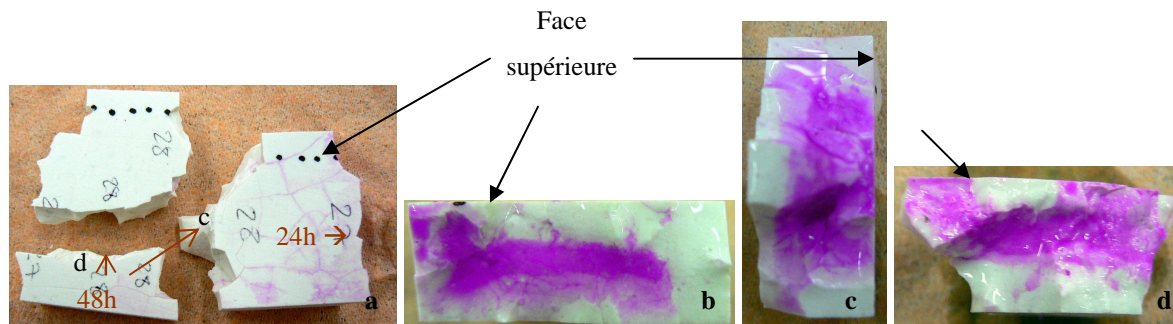


**Photo 4 : Résultats obtenus pour une éprouvette 1x2,5x8,5 cm conservée sous eau, séchée – a. coloration après 24 h de carbonatation – b. coloration après 48h de carbonatation**



**Photo 5 : Résultats obtenus pour une éprouvette 1x2,5x8,5 cm conservée 100%HR, non séchée - a. localisation des morceaux observés sur l'éprouvette – b. coloration après 24 h de carbonatation – c. coloration après 48h de carbonatation – d. coloration après 48h de carbonatation**

Pour l'éprouvette séchée, la carbonatation est plus spectaculaire. Dès 24h (photo 6b), nous observons une couronne symbolisant la zone carbonatée de 2-3 mm d'épaisseur partant des 4 faces de l'éprouvette vers le cœur, et de façon homogène. A 48h, la zone carbonatée n'a pas progressé (photo 6c et d). La carbonatation induit une diminution de la porosité, il est très probable qu'il y ait une limite du front de carbonatation dès que les pores sont bouchés, le gaz ne peut plus pénétrer et diffuser à l'intérieur de la matrice.



**photo 6 : Résultats obtenus pour une éprouvette 1x2,5x8,5 cm conservée 100%HR, séchée - a. localisation des morceaux observés sur l'éprouvette – b. coloration après 24 h de carbonatation – c. coloration après 48h de carbonatation – d. coloration après 48h de carbonatation**

De plus nous pouvons également relier ces résultats avec la conditions de fabrication des éprouvettes : en effet, dans nos essais, la face supérieure qui est la face privilégiée pour la carbonatation correspond à la face de laitance, c'est à dire la face qui est en contact avec l'air dans le moule.

## Conclusion

Les essais préliminaires de carbonatation accélérée nous ont permis dans un premier temps de fixer quelques paramètres expérimentaux tels que le débit de  $\text{CO}_2$ , le choix du sel pour réguler l'humidité relative. D'autres essais sont nécessaires pour étudier plus en détail l'influence de la durée de l'essai sur la carbonatation. Nous nous sommes limités à quelques jours de carbonatation, il serait intéressant d'étudier la carbonatation sur plusieurs semaines.

Nous avons également remarqué que la carbonatation était très hétérogène sur les éprouvettes 4x4x16 cm. La carbonatation suit dans un premier les défauts du matériau, les éprouvettes n'ont été laissées assez longtemps pour étudier davantage le phénomène.

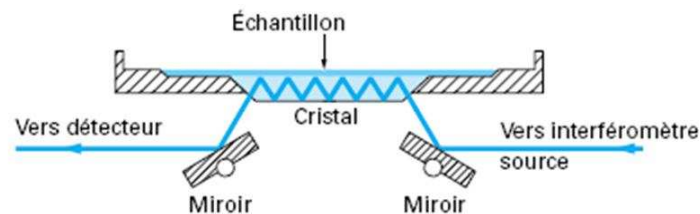
En revanche, les résultats obtenus pour les petites éprouvettes sont satisfaisant pour les objectifs que nous nous étions fixés : la carbonatation était nécessaire pour abaisser le pH en surface des éprouvettes. Bien que toutes les faces ne soient pas carbonatées de façon

homogène, le premier millimètre de la surface est toujours carbonaté. De plus le front de carbonatation est plus important sur la face de laitance.

## ANNEXE G : IRTF – MODULE ATR

(Extrait Delene, 1998 ; Deveau et Jacob, 2004)

Le principe de l'ATR (Réflexion Totale Atténuée) consiste à mettre en contact un cristal (ZnSe, Ge, diamant ou Si le plus souvent) avec l'échantillon à analyser. Le faisceau IR circule dans le cristal (Figure 74). Si l'indice de réfraction du cristal est supérieur à celui de l'échantillon, alors le faisceau subit des réflexions totales au-delà d'un certain angle d'incidence à l'interface échantillon/cristal.



**Figure 74 : Montage ATR horizontal**

En ATR, on travaille au-delà de l'angle critique. En réalité une onde, dite onde évanescente, émerge du cristal et est absorbée par l'échantillon. C'est cette onde qui est responsable du spectre IR observé.

Plusieurs points doivent être notés. Tout d'abord la profondeur de pénétration est de l'ordre de 1 à 2  $\mu\text{m}$ . Cela rend donc l'ATR particulièrement intéressant pour l'analyse des échantillons purs, puisque le risque de voir saturer les pics est très faible. L'ATR fournit donc une information de surface.





**Figure 75 : Dispositif ATR utilisé à l'EMSE**

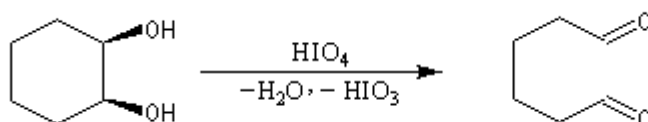
Il existe des cellules ATR qui sont capables de travailler en température, en flux continu ou sur des produits corrosifs (acides, peroxydes, ...). La Figure 75 présente la cellule ATR utilisée à l'Ecole des Mines de Saint-Etienne.

## ANNEXE H : COLORATION AU RÉACTIF DE SCHIFF

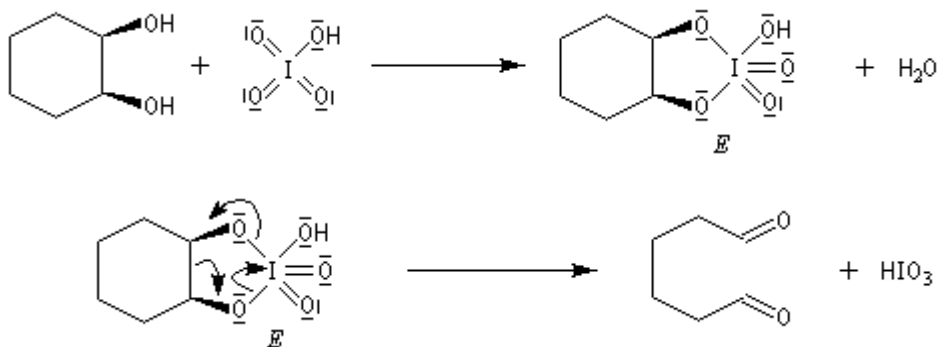
(Extrait de cours de chimie organique G. Dupuis)

Le réactif de Schiff (fuchsine décolorée par oxydation) se recolore en rouge en présence de substances réductrices (aldéhydes). La réaction se déroule en plusieurs étapes :

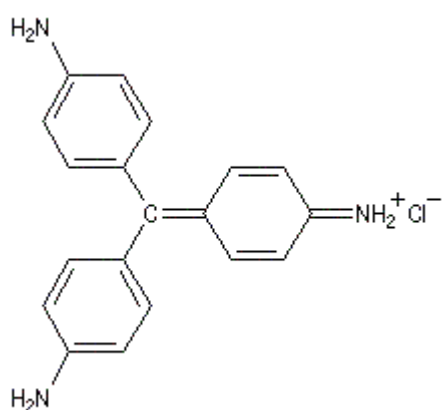
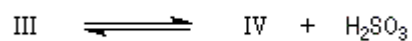
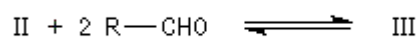
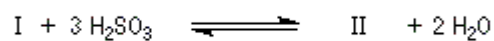
- 1- Une oxydation par l'acide périodique ouvre la liaison entre deux carbones voisins présentant des fonctions alcools et transforme ces fonctions en aldéhydes. Le squelette reste en place et n'est pas modifié.



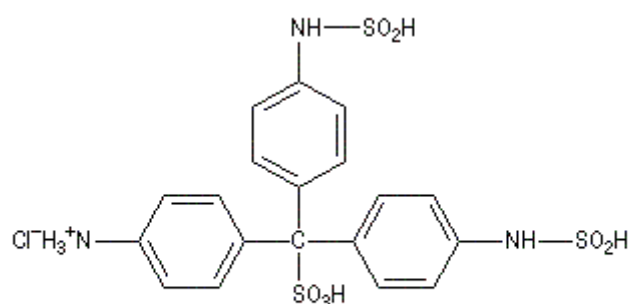
Cette réaction fait intervenir un ester de l'acide périodique comme intermédiaire :



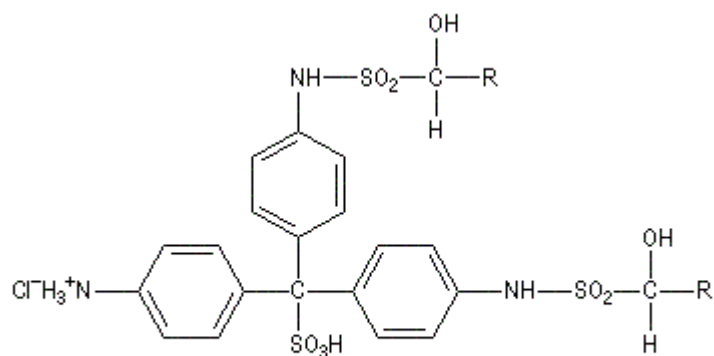
- 2- Le réactif de Schiff donne un précipité rouge au niveau des fonctions aldéhydes donc, spécifiquement au niveau des polysaccharides ou autres molécules comportant des fonctions alcools vicinales.



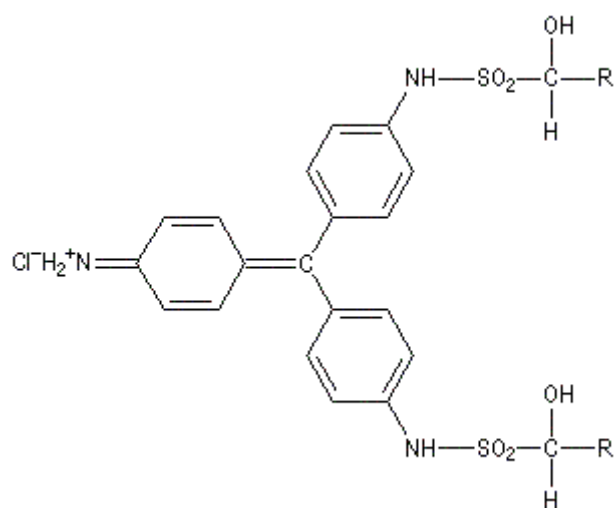
I chlorhydrate de *p*-rosaniline  
(rose)



II réactif de Schiff  
(incolor)



III (incolor)



IV (coloré)

---

## GLOSSAIRE

**Anthropogénique** : lié aux activités humaines.

**ATP** : Adénosine Tri-Phosphate. C'est une molécule dont la dégradation libère beaucoup d'énergie, récupérée pour le fonctionnement de nombreuses réactions chimiques.

**Autotrophe** : désigne un organisme capable de synthétiser par lui-même les matières organiques qui le composent à partir d'éléments minéraux.

**Biomasse** : masse totale (quantité de matière) de toutes les espèces vivantes présentes en un milieu donné.

**Cellule de Malassez** ou de Bürker: cellule de numération, c'est une lame porte-objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. Ce dernier est déterminé par (i) la surface du quadrillage gravé sur la lame, (ii) la profondeur de la chambre. ( $V_{\text{cellule Malassez}} = 1 \text{ mm}^3$ ,  $V_{\text{cellule Burker}} = 0,9 \text{ mm}^3$ ).

**Eutrophique** : se dit d'un milieu qui se retrouve enrichie en éléments nutritifs.

**Guano** : nom donné aux excréments des oiseaux et des chauves-souris.

**Histologie** : est la branche de la biologie qui étudie les tissus. Elle a pour but d'explorer la composition, la structure, le renouvellement des tissus ainsi que les échanges cellulaires en leur sein.

**Hyphe** : vient du grec *hyphe* = tissu, filaments longs, fins et ramifiés à structure cellulaire qui constituent les mycètes.

**Microbe** : vient du grec *mikros*=petit, et *bios*=vie. Ce mot désigne tous les micro-organismes visibles au microscope comme les bactéries, les champignons, ou plus petit encore comme les virus. Dans le langage familier, se dit de tout micro-organisme pathogène.

**Phototrophe** : désigne un organisme qui utilise la lumière comme source d'énergie.

**Phylloplan** : microenvironnement d'une feuille. Certains auteurs définissent le phylloplan comme la surface d'une feuille.

**Phylogénétique** : relatif à l'étude de la formation et de l'évolution des organismes vivants en vue d'établir leur parenté.

**Protozoaire** : organisme unicellulaire eucaryote.

**Ressuage** : remontée d'eau à la surface d'un coulis de ciment, d'un mortier ou d'un béton après la mise en place.

**Ubiquiste** : se dit des espèces susceptibles d'être observées dans de très nombreux habitats.

**Ecole Nationale Supérieure des Mines  
de Saint-Etienne**

N° d'ordre : 477GP

**Virginie WIKTOR**

**Titre de la thèse :**

Biodeterioration of cementitious matrix by fungi: Development of accelerated laboratory test

**Spécialité**

Process Engineering

**Mots clefs**

Biodeterioration; Cementitious matrix; Accelerated weathering; Fungi; Accelerated laboratory test

**Résumé**

Micro-organisms (bacteria, cyanobacteria, fungi, algae) can grow on building materials. They are liable to degrade materials properties: from an alteration of aesthetic aspect to a reduction of its service life. Biodeterioration is associated to chemical, physical and aesthetic mechanisms. To control and to act efficiently against biodeterioration of buildings materials, it is necessary to have a better understanding of those mechanisms.

The aim of this study is to develop an accelerated laboratory test to study the biodeterioration of cementitious matrix by fungi.

The study of biodeterioration involves a pluridisciplinary approach. Firstly, this work was considered from a biological point of view. Hence, optimum parameters for a rapid fungal development were determined. Then, attention was paid to the matrix preparation, to make it favourable for fungal growth. Finally, these two approaches were combined to study microbial development on the matrix prepared.

The accelerated laboratory test developed permits to obtain a rapid fungal growth on cement specimens. The results point out that in the present study the microbial growth is promoted with the accelerated weathering of the matrix. It plays a major role. No microbial growth is noticed on non-weathered specimens. From a biodeterioration point of view, the test developed permits to observe and to points out aesthetical and physical biodeterioration mainly. Results point out the necessity to have not only microscopic observations to study the microbial development. While this shows the aesthetical biodeterioration of specimens, it underestimates the real extent of the microbial colonization. The PAS staining reveals microbial growth on and within the matrix. The SEM observations permit to identify characteristic bacterial shapes.

**Ecole Nationale Supérieure des Mines  
de Saint-Etienne**

N° d'ordre : 477GP

**Virginie WIKTOR**

**Titre de la thèse**

Biodétérioration d'une matrice cimentaire par les champignons : Mise au point d'un test accéléré de laboratoire

**Spécialité**

Génie des Procédés

**Mots clefs**

Biodétérioration ; Matrice cimentaire ; Vieillissement accéléré ; Champignons ; Test accéléré de laboratoire

**Résumé**

Les micro-organismes (bactéries, cyanobactéries, champignons, algues) peuvent se développer sur les matériaux de construction. Ils sont capables de dégrader les propriétés du matériau : de l'altération de l'aspect esthétique jusqu'à une réduction de sa durabilité. La biodétérioration est associée aux mécanismes chimiques, physiques et esthétiques. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la biodétérioration permettra de mieux lutter contre les dommages engendrés et à terme de prévenir le développement de ces micro-organismes.

Le but de cette étude est de développer un test accéléré de laboratoire pour étudier la biodétérioration d'une matrice cimentaire par des champignons. L'étude de la biodétérioration nécessite une approche pluridisciplinaire. Dans un premier temps, ce travail a été abordé d'un point de vue purement « micro-organismes ». Cela a permis d'identifier et de définir les paramètres optimaux de culture et croissance fongique. Dans un second temps, l'attention s'est portée sur la préparation d'une matrice cimentaire compatible avec le développement fongique. Enfin, les deux approches ont été combinées permettant l'étude de la croissance des micro-organismes sur le matériau.

Le test développé a permis d'obtenir un développement fongique rapide sur des éprouvettes en ciment. Les résultats obtenus ont notamment mis en évidence le rôle fondamental joué par le pH de surface sur le développement microbien. Les résultats montrent qu'il ne peut y avoir de développement microbien sans un vieillissement préalable du matériau. D'un point de vue de la biodétérioration, le test développé a permis d'observer et de mettre en évidence la biodétérioration esthétique et physique principalement. Les résultats ont également montré la nécessité de ne pas se limiter aux observations au microscope pour étudier la biodétérioration. Bien que ces observations mettent en évidence la biodétérioration esthétique, elles sous-estiment l'étendue réelle de la colonisation microbienne. La coloration PAS révèle l'étendue de la colonisation microbienne sur et dans la matrice. De plus, les observations au MEB ont permis d'identifier des formes caractéristiques de bactéries, confirmant les observations au stéréomicroscope et après coloration.