

Biodétérioration d'une matrice cimentaire par les champignons : influence du vieillissement accéléré sur le développement fongique.

Biodeterioration of cementous matrix by fungi: influence of accelerated weathering on fungal development.

WIKTOR V., Doctorante - Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne - 158 cours Fauriel, 42023 Saint-Etienne Cedex 02- 04.77.42.02.74 - : wiktor@emse.fr

GROSSEAU P., Maître de recherche - Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne - 158 cours Fauriel, 42023 Saint-Etienne Cedex 02- 04.77.42.01.47 - : grosseau@emse.fr

GUYONNET R., Directeur de recherche - Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne - 158 cours Fauriel, 42023 Saint-Etienne Cedex 02- 04.77.42.00.30 - : guyonnet@emse.fr

GARCIA-DIAZ E., Maître assistant des Ecoles des mines - Ecole des Mines de Douai, 941 rue Charles Bourseul, BP 838, 59508 Douai Cedex – 03.27.71.24.29 – garcia-diaz@ensm-douai.fr

Résumé : Les micro-organismes ont la capacité de se développer sur les matériaux de construction et sont susceptibles de dégrader les fonctions des matériaux, d'abrèger leur durée de vie et d'en modifier l'aspect esthétique. La biodétérioration est associée aux mécanismes physique, chimique et esthétique. Elle est amplifiée par les facteurs environnementaux tels que la pollution atmosphérique ou les cycles gel-dégel, par exemple. Pour contrôler et lutter efficacement contre la biodétérioration des matériaux de construction, il est nécessaire d'avoir une meilleure compréhension de ces mécanismes. L'objectif de cette étude est de mettre au point un essai accéléré de laboratoire pour étudier la biodétérioration d'une pâte de ciment par deux souches de champignons *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger*. L'influence du mode de conservation et le vieillissement des éprouvettes sont étudiés : certains échantillons sont carbonatés afin de réduire le pH de la matrice. Les premiers résultats obtenus montrent que la carbonatation n'est pas suffisante pour permettre un développement fongique. En revanche, la carbonatation couplée à une lixiviation permet d'obtenir de meilleurs résultats. En parallèle, des essais sont réalisés afin d'optimiser l'étape d'inoculation des échantillons.

Abstract: Micro-organisms 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. Biodeterioration is enhanced by environmental factors such as air pollution or freeze/thaw cycles. 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 set up an accelerated laboratory test in order to study biodeterioration of a cement paste by two fungal strains: *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger*. Influence of conservation and weathering of specimens is studied: some samples are carbonated in order to reduce matrix pH. First results show that carbonation isn't sufficient to trigger fungal development. Carbonation associated to leaching give better results. Tests are performed too, in order to optimize inoculation stage.

Mots clés : ciment ; *Alternaria alternata* ; *Aspergillus niger* ; biodétérioration ; test accéléré.

1. Introduction

De nombreux matériaux de construction sont sujets à une colonisation par les micro-organismes. Cette colonisation est responsable de changements de la coloration, et des propriétés chimiques et/ou physique du matériau. Depuis la fin des années 60, ces changements ont été regroupés sous les termes de « biodégradation » ou « biodétérioration ». Ce dernier terme semble être utilisé principalement en relation avec l'altération du matériau [1]. Le degré de colonisation n'est pas seulement lié aux conditions environnementales, mais aussi aux propriétés intrinsèques du matériau utilisé qui déterminent sa bioréceptivité, c'est-à-dire sa susceptibilité à être colonisé par les organismes vivants [1, 2]. Le rôle précis des caractéristiques des matériaux de construction dans la colonisation n'est pas totalement compris, à l'exception de l'acidité, dont l'influence sur la composition taxonomique des micro-organismes colonisateurs est bien connue [1]. Les infections biologiques et l'intensité du processus de détérioration sont fortement influencées par la disponibilité en eau [3]. Pour la colonisation et le développement d'une communauté microbienne sur un matériau organique ou inorganique, 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 en surface (détérioration esthétique), et/ou jusqu'à des couches plus profondes (détérioration physique/mécanique et chimique) [4].

Généralement, la colonisation microbienne des matériaux de construction commence avec le développement du biofilm et des bactéries. Les biofilms microbiens sont des assemblages de cellules microbiennes encastrées dans une matrice complexe de substances polymériques complexes : les exo polysaccharides (EPS). En fait, les EPS constituent un véritable ciment qui permet le développement microbien et l'adhésion des micro-organismes au substrat. Elles 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 [5]. Ensuite peuvent se développer les algues et cyanobactéries, ainsi que les champignons. Les premiers sont responsables principalement d'une détérioration esthétique, alors que les champignons peuvent être à l'origine d'une détérioration chimique et physique, en plus de la détérioration esthétique.

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 type 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 [6].

Nous nous intéressons dans cette étude, plus particulièrement à la biodétérioration intervenant bien après la formation du biofilm bactérien, nous ne parlerons donc pas de biodétérioration causée par les bactéries.

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 nutriment après avoir été réduits par diverses enzymes extracellulaires qui facilitent la pénétration des hyphes dans le matériau [8]. 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 [3, 7, 8]. Outre l'action directe de ces acides, leur production favorise la croissance d'espèces fongiques acidophiles qui pourront poursuivre la dégradation du support [9].

La biodétérioration physique résulte de la pression qu'exercent les micro-organismes sur le matériau pendant leur croissance. C'est le cas des hyphes pour les champignons, ou des racines pour des systèmes plus complexes comme les mousses ou les lichens [3, 8].

Les travaux antérieurs portent essentiellement sur la biodétérioration esthétique, très peu s'intéressent aux mécanismes. Ainsi, les champignons permettent d'étudier les différents aspects de la biodétérioration : esthétique, chimique et physique. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous mettons au point un test accéléré de laboratoire, qui nous permette de décrire les mécanismes de la biodétérioration d'une matrice cimentaire par les champignons.

La première souche sélectionnée est *Alternaria alternata*, choisie pour plusieurs raisons: (i) Tout d'abord elle a été fréquemment isolée lors de prélèvements sur sites. (ii) Elle a la particularité de synthétiser de la mélanine. Leur pigmentation sombre (mélanine et mycosporines) les protège des irradiations, des températures extrêmes et d'une possible dessiccation [10]. Ces pigments contribuent considérablement à la survie de ces champignons aux conditions extrêmes [11]. (iii) Son mécanisme d'action est essentiellement physique par la pénétration en profondeur des hyphes [12]. De plus, c'est un champignon très difficile à enlever du support après colonisation.

La seconde souche retenue dans le cadre de notre étude est *Aspergillus niger*. (i) Elle est également mentionnée à plusieurs reprises dans les travaux de la littérature. (ii) C'est un champignon acidogénique, c'est à dire qu'il produit divers acides organiques et aura donc un mode d'action essentiellement chimique.

Ces deux souches sont intéressantes dans la mesure où elles vont nous permettre d'étudier deux modes d'action différents (physique et chimique) de la biodétérioration.

Cependant, il faut souligner un point important : ces deux souches ont été sélectionnées parmi les souches isolées et identifiées à partir de prélèvements sur sites. (i) Leur présence n'implique pas qu'elles soient responsables de la biodétérioration (outre esthétique). (ii) Sur site, les souches vont être prélevées stérilement pour être cultivées en laboratoire afin de les isoler et de les identifier. En laboratoire, seules les souches cultivables et à croissance rapide vont être isolées et identifiées, au détriment des souches à croissance lente ou non cultivables.

Il est reconnu que probablement plus de 90% des micro-organismes présents sur les matériaux des biens culturels dégradés ne sont pas identifiés. Ceci a une importance majeure, car la plupart des travaux de restauration utilisent les biocides conventionnels qui ne conviennent probablement pas aux communautés microbiennes complexes et inconnues qui se développent sur et sous les surfaces [13].

Concernant le choix de la matrice support, nous travaillons avec une pâte de ciment. En effet, le ciment constitue le matériau d'enrobage de nombreux matériaux de construction (mortier technique, béton...), il joue donc un rôle important dans l'intégrité structurale de ces matériaux. Le ciment est un matériau basique (pH~13) ; ce qui n'est pas favorable à la croissance des champignons. Pour favoriser le développement fongique, il faut diminuer l'alcalinité de notre support, donc le vieillir artificiellement. Nous avons choisi d'étudier deux modes de vieillissement accéléré dans cette étude : la carbonatation et la carbonatation couplée à la lixiviation.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matrice d'étude

Nous utilisons des éprouvettes en ciment blanc CEM I 52,5 R, élaborées avec un rapport massique eau/ciment de 0,55. Les éprouvettes sont de forme parallélépipédique : 1 x 2,5 x 8,5 cm³. Les éprouvettes sont démoulées après 24h et conservées 28 jours à 100% d'humidité relative à température ambiante.

Les éprouvettes sont stérilisées par rayonnements ionisants (rayon Gamma) au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Cadarache, après 28 jours de conservation ou après carbonatation ou lixiviation.

2.2. Vieillessement accéléré de la matrice

2.2.1. Essai de carbonatation accéléré

L'essai de carbonatation est réalisé dans une enceinte avec un balayage de CO₂ pur. L'humidité relative est maintenue à 65±5% par une solution saline de K₂CO₃ (RP Normapur). Afin de suivre l'évolution de la profondeur de carbonatation, des échantillons sont cassés à intervalles de temps réguliers, et caractérisés à l'aide d'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 [14]. Certaines éprouvettes sont séchées 24h à 40°C avant carbonatation.

2.2.2. Lixiviation

La lixiviation des éprouvettes carbonatées est réalisée dans des bacs de 10 litres. La solution lixiviante (eau déminéralisée) est remplacée en continu. Le débit est de 7 ml/min. Trois éprouvettes carbonatées sont placées dans le réacteur. Le pH est suivi en continu.

Par soucis de simplicité, nous appellerons par la suite « éprouvettes non vieilles » les éprouvettes obtenues après 28 jours de conservation à 100% d'humidité relative, « éprouvettes carbonatées » les éprouvettes ayant subies une carbonatation après 28 jours de conservations, « éprouvettes carbonatées puis lixiviées » les éprouvettes qui ont été carbonatées après 28 jours de conservation puis lixiviées.

2.2.3. Diffraction des Rayons X

La diffractométrie des rayons X est réalisée sur un appareil Bruker D8 advance. On utilise la raie K α 1 du cuivre ($\lambda=0.15406$ nm). Le dispositif comprend une anticathode de cuivre et un détecteur ponctuel. Le temps de comptage est de 5 secondes et le pas du goniomètre de 0.04°. L'analyse se fait sur une plage en 2 θ allant de 5 à 59°.

2.3. Champignons

2.3.1. Milieux de culture

Alternaria alternata Fries von keissler est une souche de collection DSMZ. Les cultures sont réalisées sur milieu V₈ agar (CaCO₃ 3g/l, Agar 20g/l, jus V₈ 200ml/l), et sur Czapeck-Dox modifié pour favoriser la sporulation (poudre de cellulose 30g/l, KNO₃ 3 g/l, MgSO₄·7 H₂O 500 mg/l, KCl 500 mg/l, FeSO₄·7 H₂O 10 mg/l, K₂HPO₄ 1 g/l, agar 20 g/l).

La souche *Aspergillus niger* DSM n°823 est issue de la collection DSMZ. La souche est cultivée sur le milieu Potatoes Dextrose Agar (Potatoes Dextrose Agar broth 39 g/l).

Le pH est ajusté à 7,2 par ajout de NaOH ou HCl 0,1M. Les milieux sont autoclavés 20 minutes à 121°C.

2.3.2. Conditions de culture

La souche *Alternaria alternata* est cultivée à $24\pm 1^\circ\text{C}$, et à une humidité relative de $90\pm 5\%$. Certaines cultures sont exposées à la lumière de néons horticoles 10h/j pour favoriser la sporulation.

La souche *Aspergillus niger* est cultivée à $24\pm 1^\circ\text{C}$, et une humidité relative de $75\pm 5\%$.

2.4. Inoculation

Deux méthodes d'inoculation sont testées. Les éprouvettes sont disposées dans des boîtes stériles (Fig 1). Dans la première méthode, les éprouvettes sont recouvertes d'un fin film de milieu nutritif solide (milieu gélosé) ; Dans la seconde méthode, les éprouvettes sont imbibées de milieu nutritif liquide. Des éprouvettes non vieilles, carbonatées et carbonatées puis lixiviées sont inoculées par une suspension de spores. Les boîtes sont incubées dans une chambre de culture à $24\pm 1^\circ\text{C}$, et $90\pm 5\%$ ou $75\pm 5\%$ HR, respectivement pour *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger*.

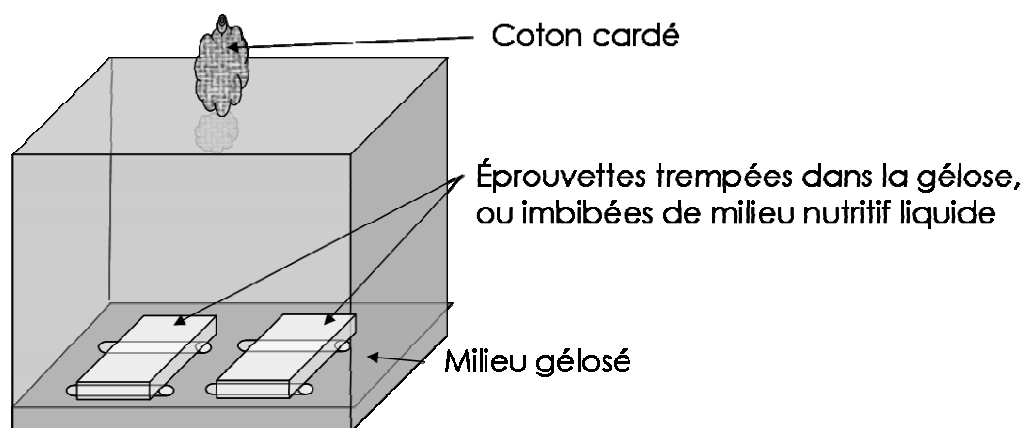


Figure 1 : Dispositif expérimental de l'inoculation des éprouvettes

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation de la matrice après vieillissement

3.1.1. Test à la phénolphthaléine – essai de carbonatation accéléré

Durant l'essai de carbonatation, l'humidité relative est maintenue à $60\pm 5\%$ par une solution saline de K_2CO_3 , ce qui permet une carbonatation optimale. En effet, la vitesse de carbonatation est maximale pour des humidités relatives comprises entre 50 et 65% [15].

Après 48 heures de carbonatation, le test à la phénolphthaléine révèle une zone carbonatée de moins de 1 millimètre pour les éprouvettes non séchées. En revanche, les éprouvettes séchées au préalable à l'étuve, ont été carbonatées sur une épaisseur de 2-3 millimètres (Fig. 2).

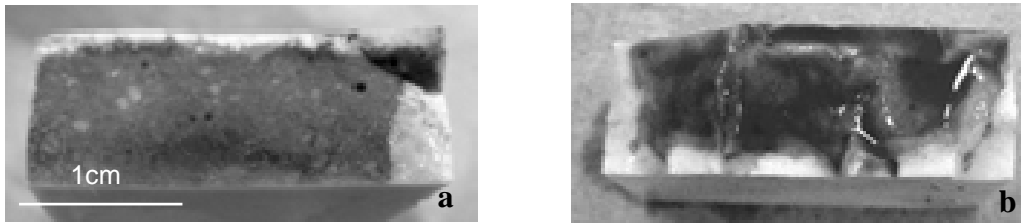


Figure 2 : Révélation de la zone carbonatée (en blanc) par le test à la phénolphthaléine. (a) éprouvette non séchée. (b) éprouvette séchée

3.1.2. Observation des éprouvettes

Nous constatons que le vieillissement accéléré entraîne des modifications de l'aspect externe de nos éprouvettes. Tout d'abord, l'étape de séchage à 40°C pour l'essai de carbonatation induit un léger faïençage (Fig. 3b). D'autre part, la lixiviation engendre des changements plus marqués de l'aspect des éprouvettes : apparition de nombreuses fissures (avec précipitation à l'intérieur de celles-ci) (Fig. 3c), rugosité également plus importante. Les analyses DRX réalisées indiquent que c'est carbonate de calcium, CaCO_3 , qui a précipité à l'intérieur des fissures (Fig 4c).

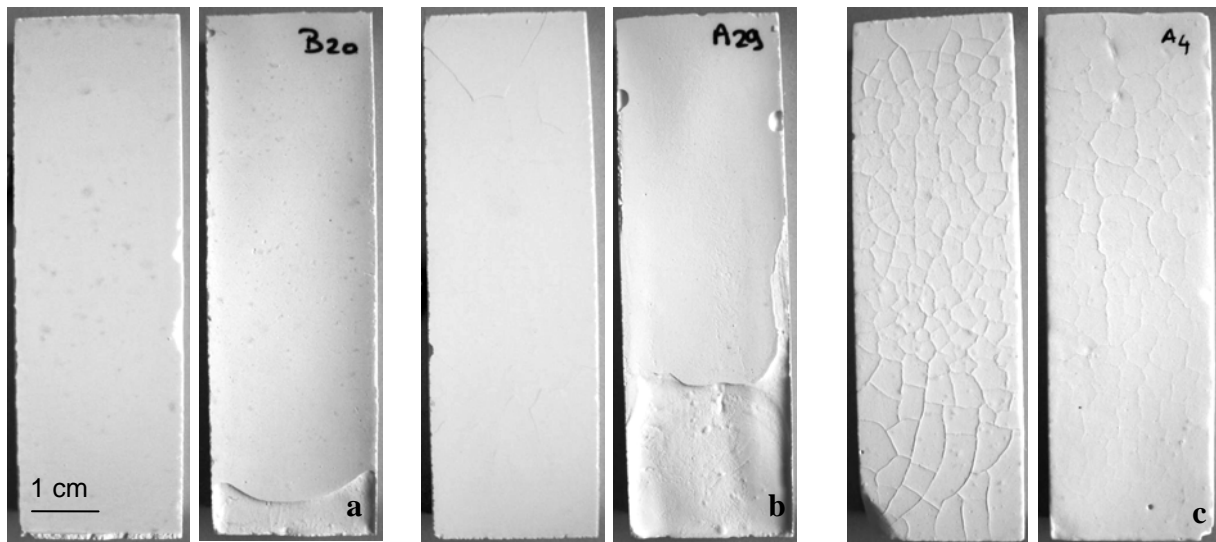


Figure 3 : Observation des éprouvettes (a) non vieilles, (b) carbonatées, (c) carbonatées puis lixiviées

3.1.3. Analyses en DRX

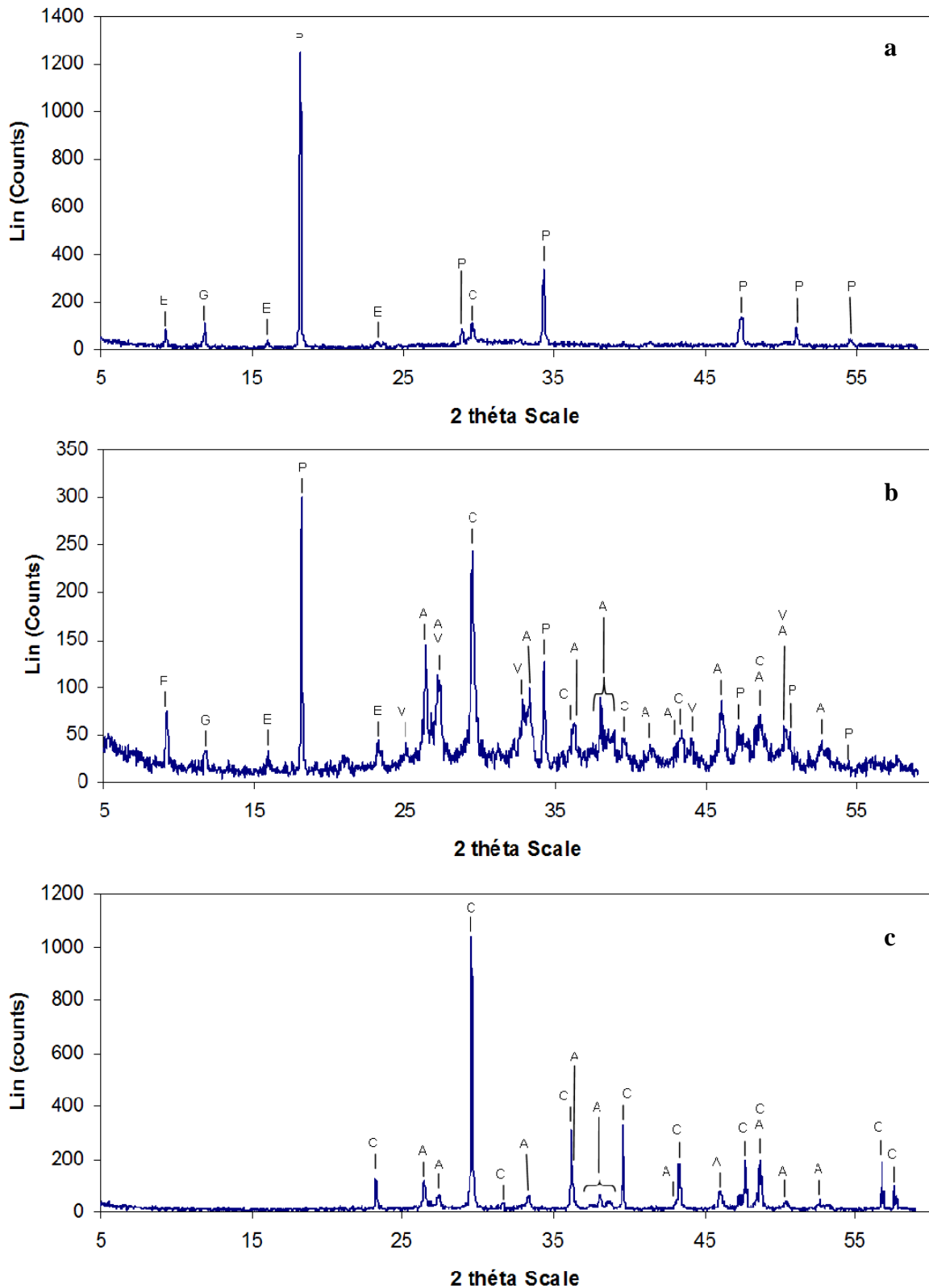


Figure 4 : Diffractogrammes des éprouvettes (a) non vieilles, (b) carbonatées, (c) carbonatées puis lixiviées : A=aragonite, C=calcite, E=ettringite, G=gypse, P=portlandite, V=vatérîte

Pour l'éprouvette non vieillie, nous identifions, essentiellement la portlandite, l'ettringite et du gypse en proportions moindres, et quelques traces de calcite (Fig 4a). En revanche le diffractogramme obtenu pour l'éprouvette carbonatée (Fig. 4b) est plus complexe. Nous

identifions toujours la portlandite et l'ettringite en proportions moins importantes que précédemment, et beaucoup plus de carbonate de calcium sous forme de calcite, aragonite et vaterite. Enfin, pour l'éprouvette carbonatée puis lixiviée (Fig. 4c), nous observons seulement les pics caractéristiques du carbonate de calcium sous forme de calcite et aragonite. De plus, le pH de la solution lixivante mesuré en fin de lixiviation est de l'ordre de 8,5. Ce pH est typique du pH des phases carbonatées.

3.1.4. Discussion

D'après ces résultats, il apparaît que sur les premiers millimètres, la matrice a profondément changé après vieillissement. On note une fissuration et une rugosité plus importante après lixiviation (Fig. 3). D'autre part, ces premiers millimètres après lixiviation sont constitués essentiellement de gels de silice et d'alumine (identification par ATD-TG, résultats non montrés), et de phases carbonatées (DRX), ce qui est très différent chimiquement du cœur de la matrice. Le réservoir d'alcalinité de la matrice sur ces premiers millimètres a considérablement diminué, ce qui se traduit par une diminution du pH, qui devrait offrir ainsi de meilleures conditions pour le développement fongique.

3.2. Inoculation - Incubation

3.2.1. Essai d'inoculation avec *Alternaria alternata*

Nous n'observons aucun développement de la souche pour toute la durée du test sur toutes les éprouvettes imbibées de milieu nutritif liquide. Concernant les éprouvettes recouvertes d'un film de gélose, aucun développement n'est observé sur les éprouvettes non vieilles et carbonatées. En revanche, après 10 jours d'incubation nous observons un développement sur les éprouvettes carbonatées puis lixiviées (Fig. 5). Après 3 mois d'incubation, nous n'observons pas de croissance supplémentaire sur les éprouvettes, la culture n'évolue plus. Ce test d'incubation sur une courte durée met en évidence 2 points importants : (i) tout d'abord, nous notons que le développement n'est possible que sur les éprouvettes carbonatées puis lixiviées, ce qui signifie que la quantité d'élément alcalin de la matrice est un paramètre clé pour la mise au point de notre test accéléré de biodétérioration. (ii) Ensuite, la méthode d'inoculation (sur éprouvettes imbibées ou recouvertes d'un film de gélose) est fondamentale pour amorcer le développement.

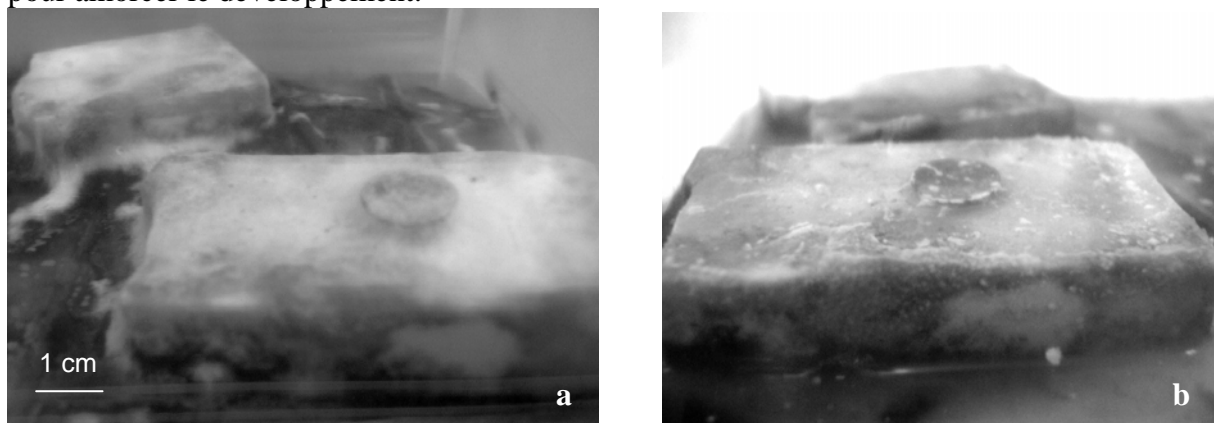


Figure 5 : Test d'inoculation d'éprouvettes carbonatées puis lixiviées recouvertes d'un film de gélose pour *Alternaria alternata* : (a) à 10 jours, (b) à 3 mois d'incubation

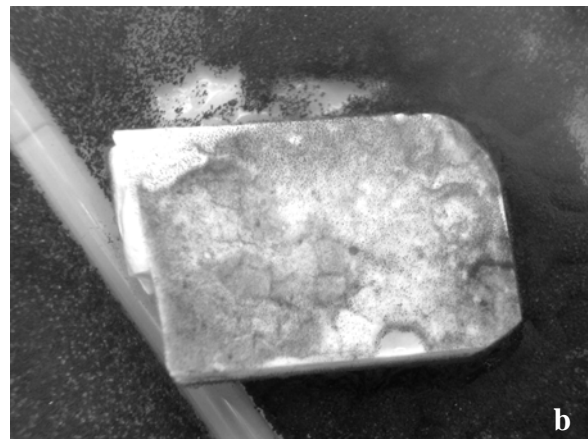
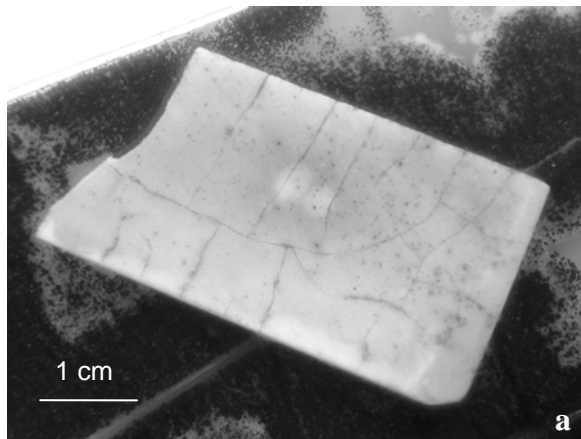


Figure 6 : Test d'inoculation sur des éprouvettes carbonatées puis lixiviées (a) imbibées de milieu liquide et (b) recouverte d'un film de gélose à 10 jours d'incubation pour *Aspergillus niger*

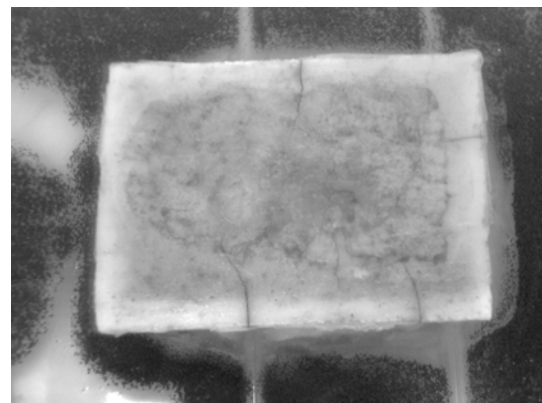
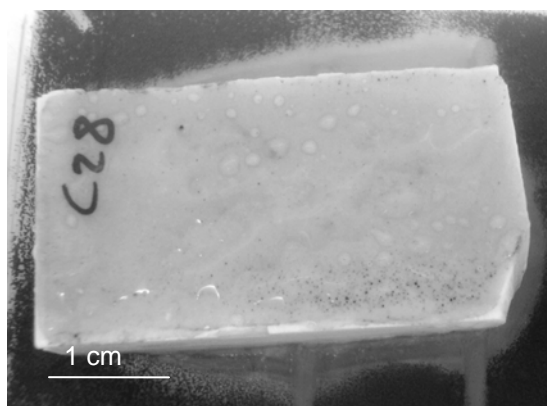


Figure 7 : Test d'inoculation sur des éprouvettes non vieillis (a) imbibées de milieu liquide et (b) recouverte d'un film de gélose à 10 jours d'incubation pour *Aspergillus niger*

3.2.2. Essai d'inoculation avec *Aspergillus niger*

Concernant les éprouvettes non vieillis, nous n'observons aucun développement, quel que soit le mode d'inoculation (Fig. 6). Pour les éprouvettes carbonatées, aucune croissance n'est observée sur les éprouvettes imbibées de milieu nutritif liquide, mais nous notons un développement de la souche dès 10 jours d'incubation sur 2/3 des éprouvettes recouvertes d'un film de gélose. Le résultat le plus intéressant est obtenu pour les éprouvettes carbonatées puis lixiviées. Nous notons un développement d'*Aspergillus niger* sur 1/3 des éprouvettes imbibées à 10 jours d'incubation. La croissance de la souche est bien amorcée sur toutes les éprouvettes recouvertes d'un film de gélose (Fig. 7). L'absence de croissance sur les échantillons non vieillis confirme que le réservoir d'alcalinité de la matrice est un paramètre clé pour la mise au point du test de biodétérioration. Ces résultats doivent être confirmés après 3 mois d'incubation.

3.2.3. Discussion

Ces résultats soulignent bien l'importance de l'étape d'inoculation. Nous voulons obtenir un développement rapide du champignon sur les éprouvettes, pour cela les conditions initiales de croissance sont primordiales. Nous constatons que le développement fongique est très bien amorcé lorsque les éprouvettes sont recouvertes d'un film de gélose, contrairement à celles imbibées de milieu nutritif liquide. Nous pouvons supposer qu'avec un film de gélose les nutriments nécessaires au bon développement des souches restent concentrés sur toute la

surface de l'éprouvette. En revanche, il faut s'assurer que le film de gélose ne constitue pas un artefact, et que le développement se poursuit une fois la gélose consommée.

Le test d'incubation avec deux souches différentes nous montre l'importance du pH de la matrice pour le test. Bien que des souches telles qu'*Aspergillus niger* sont moins sensibles au pH, elles ne peuvent pas se développer sur des surfaces très basiques (pH~13) tel que le ciment.

Nous pouvons supposer que la biodétérioration par *Aspergillus niger* sera plus rapide qu'avec *Alternaria alternata*, étant donné qu'il se développe plus rapidement, et que la détérioration chimique par la production d'acides organique nécessite moins de temps pour être observée que la détérioration physique.

4. Conclusion

L'objectif de cette étude est de mettre au point un essai accéléré de laboratoire en vue d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes de biodétérioration. L'étape la plus délicate est d'obtenir à l'échelle du laboratoire (quelques mois) les effets, en termes de vieillissement de la matrice et de développement fongique, observés au bout de plusieurs années en environnement naturel. Les tests d'incubation réalisés avec les éprouvettes vieilles et non vieilles (Fig. 6-7) soulignent bien l'importance du réservoir alcalin sur le développement fongique. Nous notons que plus le réservoir alcalin de la matrice s'appauvrit, plus le développement est important.

Concernant notre essai de laboratoire accéléré, dans nos conditions expérimentales, le protocole le plus adapté est donc le suivant :

- (i) vieillissement accéléré : conservation des éprouvettes en ciment 28 jours à 100% d'humidité relative. Concernant l'essai de carbonatation, les éprouvettes sont séchées 24h à 40°C, puis placées dans l'enceinte à 65% d'humidité relative, avec un balayage de CO₂ pur, pendant 48 heures. Les éprouvettes sont ensuite lixiviées à l'eau déminéralisée 28 jours. Trois éprouvettes sont immergées par bac de 10 litres, avec un renouvellement continu de l'eau à un débit de 7ml/min.
- (ii) inoculation : les éprouvettes sont recouvertes par un fin film de milieu nutritif gélosé, etensemencées par une suspension de spores.

5. Bibliographie

- [1] O. Guillitte, *Sci. Total Env.* **167** (1995) 215-220.
- [2] B. Prieto, B. Silva, O. Lantes, *Sci. Total Env.* **333** (2004) 1-7.
- [3] T. Warscheid, J. Braams, *Int.Biodeter. Biodegr.* **46** (2000) 343-368.
- [4] C. Urzi, F. De Leo, Biodeterioration of cultural heritage in Italy : State of art, *ADRIANE workshop*, 2000.
- [5] L. Tomaselli, 2002. Biodeterioration processes in inorganic substrata, In:*Special Issue: COALITION Advanced Course "Biological Problematics in Cultural Heritage"* (First part), 2002, pp. 5-8.
- [6] P. Tiano, Biodegradation of cultural heritage: Decay mechanisms and control methods. *ADRIANE workshop* 2001.
- [7] M. Boissier, Etude et compréhension des phénomènes environnementaux régissant la colonisation des produits de construction par les aérosols fongiques : Application à l'hygiène des environnements intérieurs, Université Paris XII – Val de Marne, 2003.
- [8] W. Sand, *Int.Biodeter. Biodegr.* **40** (1997) 183-190.

- [9] K.L. Garg, A.K. Mishra, A. Singh, K.K. Jain, 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 1995.
- [10] N.N. Zhdanova, V.D. Pokhodenko, *Microbiology* **42** (1973), 753-757.
- [11] A.A. Gorbushina, W.E. Krumbein, C.H. Hamman, L. Panina, S. Soukharjevski, U. Wollenzien, *Geomicrobio. J.* **11** (1993) 205-221.
- [12] E. Diakumaku, A.A. Gorbushina, W.E. Krumbein, L. Panina, S. Soukharjevski, *Sci. Total Env.* **167** (1995) 295-304.
- [13] C. Saiz-Jimenez, Presentation of COALITION. Newsletter 1 pp.2-4, 2000.
- [14] RILEM Recommendations CPC-18, Measurement of hardened concrete carbonation depth, 1989.
- [15] T. Chaussadent, *Laboratoire Central des Ponts et Chaussées Paris* **OA9** (1997) sujet 1.49.02.7