



**HAL**  
open science

# Etude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et recherche des facteurs favorisant leur implantation

Hélène Barberousse

► **To cite this version:**

Hélène Barberousse. Etude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et recherche des facteurs favorisant leur implantation. *Ecologie, Environnement*. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2006. Français. NNT: . tel-00188566

**HAL Id: tel-00188566**

**<https://theses.hal.science/tel-00188566>**

Submitted on 18 Nov 2007

**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.

**THÈSE DE DOCTORAT DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

Discipline : **Phycologie appliquée**

présentée par :

**HÉLÈNE BARBEROUSSE**

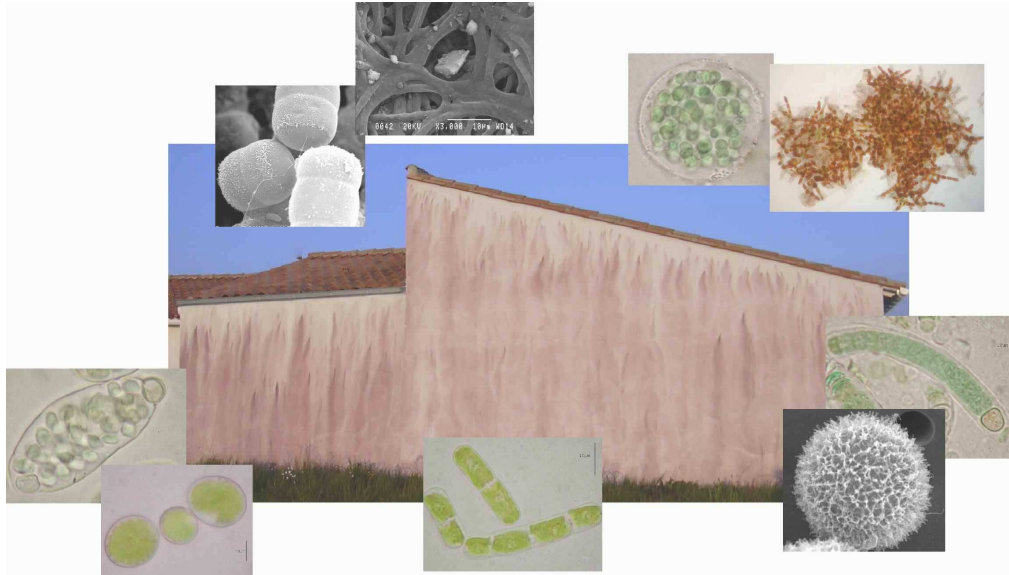
pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

---

**ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ DES ALGUES ET DES CYANOBACTÉRIES COLONISANT  
LES REVÊTEMENTS DE FAÇADE EN FRANCE  
ET RECHERCHE DES FACTEURS FAVORISANT LEUR IMPLANTATION**

---



Thèse soutenue le 18 septembre 2006, devant le jury composé de :

Alain COUTÉ  
Guillermo TELL  
Vincent GLOAGUEN  
Philippe LEJEUNE  
Patricia BEURDELEY  
Bertrand RUOT

Professeur  
Professeur  
Maître de Conférence - HDR  
Professeur  
Ingénieure  
Ingénieur

Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinatrice  
Examinateur

*Est-il nécessaire de rappeler que le travail qui va être présenté est le fruit de collaborations et de soutiens de tous bords, à la fois scientifiques et humains?*

### **Mes plus sincères remerciements vont donc à...**

... l'Association Nationale de la Recherche et Technique, au Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), à Rhodia, à Hexion Specialty Chemicals et au Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), pour s'être associés sous forme d'une convention CIFRE à l'élaboration de ce sujet de thèse, puis à son financement et à son encadrement. Je m'estime extrêmement chanceuse d'avoir pu travailler sur le développement biologique en façade, thématique passionnante et enrichissante de part sa pluridisciplinarité. J'ai en outre bénéficié d'un encadrement formateur et de qualité, à la fois industriel et académique. Je vous remercie donc pour la confiance qui m'a été accordée tout au long de ces trois années,

... Jean Oudot, professeur et directeur de l'USM 505 "Écosystèmes et interactions toxiques" du MNHN, pour m'avoir accueillie au sein de son unité,

... Alain Couté, professeur à l'USM 505 et directeur de cette thèse, pour avoir encadré mes travaux au MNHN,

... Guillermo Tell, professeur au Laboratoire de Limnologie de l'Université de Buenos Aires, pour sa contribution scientifique à l'avancement de ce projet, pour l'accueil dans son laboratoire, puis pour avoir finalement accepté d'être rapporteur de ce travail,

... Vincent Gloaguen, maître de conférence-HDR au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges, pour avoir accepté de collaborer à ce projet en m'invitant au sein du LCSN pour extraire et identifier les polymères algaux, mais aussi en acceptant d'être rapporteur afin de juger l'ensemble de ces travaux,

... Philippe Lejeune, professeur à l'Unité de Microbiologie et Génétique de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, pour avoir accepté de juger ce travail,

... Bertrand Ruot et Nadège Blanchard pour leur encadrement, leur aide et leur grande disponibilité; la division Revêtements de Façade du CSTB qui m'a accueillie ces trois années, ainsi que toutes les personnes ayant collaboré à cette thèse, dont plus particulièrement Jean-Baptiste et Agathe,

... Patricia Beurdeley-Saudou, Jean-François Colombet, Jean-Christophe Castaing, Catherine Hédouin et Emmanuel Bousseau, pour leur accueil au sein des locaux du centre de recherche d'Aubervilliers de Rhodia, pour leur encadrement et leur aide apportée au cours de cette thèse; je tiens également à saluer la disponibilité et la curiosité des chercheurs du CRA, notamment Patrick Lasnet de Lanty et Véronique Geoffroy,

... Claude Yéprémian, pour avoir pris tant de temps pour me former aux techniques d'isolement et de cultures d'algues; Gérard Mascarell et Chakib Djediat pour leur aide en microscopie électronique; Marie-Lise Bourguet pour le prêt de matériel de chimie,

... Gaël Ruiz, pour sa collaboration au travail de caractérisation des polymères algaux, et plus généralement, à toute l'équipe du LCSN pour leur accueil en septembre 2004,

... Ruben Lombardo, por su excelente trabajo en las estadísticas sobre las algas de muros, y a todo el laboratorio de Limnologia pour su acogida en junio 2005,

... Roberta Brayner et Miryana Hemadi, du Laboratoire Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes de l'Université Paris 7, pour leur aide logistique à la mise en place de certaines analyses; Thibaud Coradin, du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée, de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris 6, pour avoir mis un zétamètre à ma disposition; Mireille Turmine, du Laboratoire d'Électrochimie et Chimie Analytique, Énergétique et Réactivité aux Interfaces de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris 6, pour avoir mis un polarimètre et un tensiomètre à ma disposition, ainsi que pour ses discussions fructueuses,

... Marie-Claude Mercier, pour sa disponibilité, son aide et son soutien pendant les quelques passages difficiles traversés,

... Aurélie, Céline, Enora, Cécile, Catherine, Murielle, les "filles du 4<sup>ème</sup>", pour leur accueil et leur aide à mon intégration au sein de l'USM 505, sans oublier les deux garçons courageux qui s'imposent dans ce monde de filles : Karim et Arnaud!

... Dominique Dreyfuss et Françoise Le Floc'h pour avoir corrigé l'anglais des articles produits.

À mes parents,  
À Cédric et Patrick,  
À Thomas



---

## Sommaire

---

<b>GLOSSAIRE</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES ESPÈCES CITÉES</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>20</b>
<b>I.1. Le développement biologique en façade</b>	<b>20</b>
I.1.1. Successions et impacts	20
I.1.2. Facteurs favorisant le développement biologique	22
I.1.3. Moyens de lutte contre le développement biologique	25
<b>I.2. Les algues et les cyanobactéries en façade</b>	<b>28</b>
I.2.1. Espèces observées en France	28
I.2.2. Métabolisme	29
I.2.3. Ultra-structure générale	30
<b>I.3. L'adhésion de micro-organismes</b>	<b>31</b>
I.3.1. Formation d'un biofilm	31
I.3.2. Modèles de prédiction de l'adhésion	33
I.3.3. Paramètres influençant l'adhésion	35
I.3.4. Méthodes d'évaluation	36
<b>I.4. Contexte dans lequel se place l'étude</b>	<b>46</b>
<b>II. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>48</b>
<b>II.1. Techniques de microbiologie</b>	<b>48</b>
II.1.1. Milieux de culture	48
II.1.2. Isolement et repiquages	49
II.1.3. Conditions de culture	49
II.1.4. Dosage des algues et des cyanobactéries	50
<b>II.2. Taxinomie des algues et des cyanobactéries</b>	<b>50</b>

<b>II.3. Écologie des algues et des cyanobactéries</b>	<b>51</b>
II.3.1. Prélèvements	51
II.3.2. Analyses statistiques	52
<b>II.4. Étude des matériaux</b>	<b>52</b>
II.4.1. Préparation des matériaux	52
II.4.2. Carbonatation des mortiers	53
II.4.3. Test à la phénolphtaléine	54
II.4.4. Spectrométrie d'énergie dispersive (SED)	54
II.4.5. Coefficient d'absorption d'eau par capillarité	54
II.4.6. Porosimétrie par intrusion au mercure (PIM)	55
II.4.7. Rugosimétrie laser	55
II.4.8. Banc d'essai par ruissellement d'eau	56
II.4.9. Analyse d'images	57
<b>II.5. Étude de l'adhésion des algues</b>	<b>58</b>
II.5.1. Affinité des algues pour des solvants (MATS)	58
II.5.2. Mesures d'angles de contact	58
II.5.3. Calcul des tensions de surface, du degré d'hydrophobie et des énergies libres d'adhésion	59
II.5.4. Surfaces modèles	60
II.5.5. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	61
II.5.6. Cellule à flux laminaire	62
<b>II.6. Étude des polymères sécrétés par les algues et les cyanobactéries</b>	<b>63</b>
II.6.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)	63
II.6.2. Microscopie électronique à transmission (MET)	63
II.6.3. Protocole d'extraction des polymères	64
II.6.4. Analyse chromatographique	65
II.6.5. Dosage des sucres	65
II.6.6. Dosage des sulfates	67
II.6.7. Zêtamétrie	67
II.6.8. Tensiométrie	68
II.6.9. Adsorption de polymères par réflectométrie	68
II.6.10. Protocole de dégradation enzymatique	69
<b>III. DIVERSITÉ DES ALGUES ET DES CYANOBACTÉRIES COLONISATRICES DE FAÇADES EN FRANCE</b>	<b>70</b>
<b>III.1. Article 1: Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France</b>	<b>70</b>
<b>III.2. Synthèse et commentaires de l'article 1</b>	<b>93</b>
<b>III.3. Conclusion du chapitre III</b>	<b>95</b>

<b>IV. ÉVALUATION DES FACTEURS FAVORISANT L'APPARITION DE BIOFILMS ALGAUX EN FAÇADE</b>	<b>96</b>
<b>IV.1. Facteurs environnementaux et architecturaux</b>	<b>96</b>
IV.1.1. Article 2 : Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France	96
IV.1.2. Synthèse et commentaires de l'article 2	109
<b>IV.2. Facteurs liés au revêtement</b>	<b>111</b>
IV.2.1. Article 3 : An assessment of façade coatings against colonisation by aerial algae and cyanobacteria	111
IV.2.2. Effet de la carbonatation	121
IV.2.3. Synthèse et commentaires de l'article 3 et du paragraphe IV.2.2.	123
<b>IV.3. Facteurs liés à l'étape d'adhésion</b>	<b>123</b>
IV.3.1. Article 4 : Adhesion of façade coatings colonisers, as mediated by physicochemical properties	124
IV.3.2. Synthèse et commentaires de l'article 4	139
<b>IV.4. Conclusion du chapitre IV</b>	<b>140</b>
<b>V. ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DE POLYMÈRES ALGAUX A L'ÉTAPE D'ADHÉSION</b>	<b>141</b>
<b>V.1. Article 5 : Capsular polysaccharides secreted by building façade colonisers: characterization and adsorption to surfaces</b>	<b>141</b>
<b>V.2. Synthèse et commentaires de l'article 5</b>	<b>158</b>
<b>V.3. Dégradation enzymatique des polymères</b>	<b>159</b>
V.3.1. Protocole	159
V.3.2. Résultats	160
V.3.3. Synthèse et commentaires	163
<b>V.4. Conclusion du chapitre V</b>	<b>165</b>
<b>SYNTHÈSE GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>166</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>171</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>183</b>

---

## Glossaire

---

**Akinète** : spore de résistance aux parois épaissies, chargée de réserves, pouvant apparaître dans des populations algales.

**Agoniste** : se dit d'une molécule activant une réaction.

**Antagoniste** : se dit d'une molécule bloquant une réaction.

**Autotrophe** : capacité d'organismes à produire de la matière organique à partir de composés inorganiques (dioxyde de carbone atmosphérique ou dissous, sels minéraux...) ; s'oppose à hétérotrophe.

**Axénique** : désigne ici une culture de micro-organismes dans un milieu ne contenant aucune autre espèce vivante.

**Balane** : crustacé marin vivant fixé sur des rochers près de la surface.

**Bande de rive** : ruban de tôle en parement externe d'un solin de rive, constituant son égout en surplomb d'un mur pignon recouvert.

**Bande de solin** : bande à encastrer par engravure dans la maçonnerie des solins et des relevés d'étanchéité des toitures-terrasses.

**Bandeau** : bande horizontale saillante, unie ou moulurée, qui règne sur le pourtour d'un bâtiment. Disposés en général au droit des planchers, les bandeaux marquent visuellement la division des étages. Ils ont aussi une fonction de protection des façades contre le ruissellement des eaux, lorsqu'ils sont suffisamment saillants et munis d'un larmier.

**Bavette** : bande ou feuille étroite de métal rapportée sur un ouvrage ou une jonction d'ouvrages pour les abriter du ruissellement de l'eau de pluie; souvent disposée à la base d'une lucarne, en recouvrement d'un appui de baie, au-dessus de bandeaux, corniches...

**Biofilm** : ensemble d'une communauté de micro-organismes immobilisés sur une surface et des sécrétions associées à leur développement.

**Bioréceptivité** : ensemble des caractéristiques d'un substrat qui déterminent un potentiel de colonisation biologique.

**Cantilever** : pointe d'un microscope à force atomique permettant de mesurer des forces à l'échelle du nanoNewton et pouvant être fonctionnalisée afin d'initier des interactions spécifiques.

**Carbonatation** : transformation de l'oxyde de calcium (CaO) ou chaux en carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>), ou calcite, sous l'action acide du gaz carbonique de l'air. Cette réaction accompagne la prise de tous les liants hydrauliques et a pour conséquence la diminution de l'alcalinité du matériau.

**Coccoïde** : se dit d'un organisme unicellulaire non mobile.

**Corniche** : forte moulure en saillie qui couronne et protège une façade.

**Couvertine** : couronnement métallique placé sur la partie supérieure d'un mur et destiné à le protéger de l'eau.

**Diatomée** : algue microscopique marine ou lacustre à enveloppe siliceuse.

**Dulçaquicole** : se dit d'un organisme qui vit en eau douce.

**Enzyme** : catalyseur biologique de nature protéique qui accélère le déroulement des réactions chimiques du métabolisme.

**Épilithique** : se dit d'un organisme qui croît sur des pierres ou des roches.

**Éprouvette** : échantillon d'un matériau quelconque, prélevé sur un lot ou moulé dans un format normalisé, et destiné à subir des essais de résistance ou diverses mesures de caractéristiques.

**Eucaryote** : se dit d'un organisme dont les cellules possèdent un noyau, des organites, un cytosquelette et un ADN compacté en chromosomes lors de la division cellulaire ; s'oppose à procaryote.

**Flagelle** : filament mobile de certains micro-organismes, qui leur sert d'organe locomoteur.

**Fonctionnaliser** : modifier une surface par voie chimique.

**Gâchée** : pâte plus ou moins fluide obtenue par malaxage d'un composé hydraulique en poudre mélangé avec de l'eau.

**Gaine** : enveloppe périphérique de nature polysaccharidique, ayant la forme de l'organisme qu'elle protège.

**Goutte d'eau** (ou larmier) : petit canal à la sous-face d'un élément saillant exposé à la pluie; la goutte d'eau interrompt le cheminement de l'eau et la contraint à tomber au lieu de ruisseler sur la façade.

**Hétérocyte** : cellule à paroi épaisse et contenu apparemment vide, spécialisée dans la fixation de l'azote atmosphérique, présente chez certaines cyanobactéries (dites hétérocytées).

**Hétérotrophe** : se dit d'organismes qui ont besoin de matière organique préexistante dans le monde animal ou végétal pour fabriquer leur propre matière organique ; s'oppose à autotrophe.

**Hydrophile** : se dit d'un composé ou d'une surface à forte polarité qui a de l'affinité pour l'eau, c'est-à-dire qui a la capacité de créer des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau ; s'oppose à hydrophobe.

**Hydrophobe** : caractère d'un composé ou d'une surface apolaire ou de faible polarité, dont les interactions avec l'eau sont donc défavorisées ; s'oppose à hydrophile.

**Hyphe** : nom donné à chacun des filaments microscopiques dont l'ensemble constitue l'appareil végétatif d'un champignon.

**Interactions acide-base de Lewis** : interactions par échange d'électrons entre un acide de Lewis (espèce chimique possédant au moins une orbitale vacante) et une base de Lewis (espèce chimique possédant au moins une paire libre d'électrons).

**Interactions électrostatiques** (ou coulombiennes) : interactions résultant de l'attraction ou de la répulsion de charges électriques entre des ions ou des groupements chargés de molécules.

**Interactions de Lifshitz-van der Waals** : interactions faiblement attractives entre des groupements présentant des dipôles permanents ou induits.

**Lugol** : réactif composé d'iode et d'iodure de potassium dans de l'eau distillée.

**Maître d'œuvre** : personne physique ou morale qui est chargée par le maître d'ouvrage de la conception de l'œuvre à venir. La fonction de maître d'œuvre est notamment exercée par les architectes.

**Maître d'ouvrage** : personne physique ou morale à qui appartient l'ouvrage existant ou à construire, qui paie et qui passe commande au maître d'œuvre pour la conception, et aux entreprises pour la réalisation.

**Métabolisme** : ensemble des réactions se produisant dans les cellules d'un organisme, permettant d'extraire l'énergie des nutriments et de synthétiser les constituants nécessaires à la structure et au bon fonctionnement des cellules.

**Mise en œuvre de matériaux** : désigne au sens large à la fois la préparation sur chantier et la mise en place définitive de matériaux.

**Monocouche** : enduit d'imperméabilisation et de parement des façades, à base de liants hydrauliques, prêt à gâcher pour une application en une ou deux passes successives à quelques heures d'intervalle.

**Mortier** : mélange d'un ou de plusieurs liants organiques ou minéraux, agrégats, charges, additifs et/ou adjuvants.

**Mouvement brownien** : mouvement aléatoire d'entités présentes dans un fluide.

**Mucilage** : substance sécrétée au niveau de la paroi chez beaucoup de végétaux, constituée de polysaccharides se gonflant au contact de l'eau.

**Öse d'inoculation** : fil de laiton à l'extrémité arrondie ou formant une boucle, monté sur un manche et permettant de prélever un échantillon de culture de micro-organismes afin d'ensemencer un nouveau milieu de culture.

**Parasite** : se dit d'un organisme qui vit aux dépens d'un autre.

**Paroi** : structure recouvrant la membrane plasmique et conférant rigidité et protection à la cellule ; elle est parfois recouverte d'une gaine.

**Phénotype** : ensemble des caractères anatomiques, morphologiques et physiologiques caractérisant un individu.

**Phylogénie** : science qui s'intéresse aux liens de parenté entre les organismes, à leur généalogie (classification, méthode de reconstruction phylogénétique), ou au cours de l'évolution d'un groupe.

**Physiologie** : étude du fonctionnement des êtres vivants et de leurs organes.

**Pilus** (*pl. pili*) : appendice se situant à la surface de la paroi de certaines bactéries, plus court et plus fin que des flagelles et n'intervenant pas dans la mobilité.

**Pissette** : tuyau permettant l'évacuation des eaux pluviales d'un balcon.

**Porosité** : volume occupé par les pores, en pourcentage du volume total du matériau.

**Potentiel zêta** : grandeur évaluant le potentiel d'attraction ou de répulsion entre deux particules.

**Procaryote** : se dit d'un organisme dont la structure cellulaire ne possède ni noyau défini par une membrane ni organite ; s'oppose à eucaryote.

**Rhizine** : filament jouant le rôle de racine et permettant la fixation des lichens.

**Rugosité** : ensemble des irrégularités d'une surface.

**Salissures** : elles concernent ici le développement biologique en façade, à l'origine de coulées colorées altérant l'esthétisme de l'enveloppe du bâtiment.

**Saprophyte** : se dit d'un organisme qui se nourrit de matière organique morte.

**Sénescence** : processus de vieillissement biologique.

**Soubassement** : partie inférieure d'un mur.

**Souche** : en biologie, origine d'une lignée de micro-organismes.

**Spore** : forme de résistance unicellulaire ou pluricellulaire produite et disséminée, entre autres, par les végétaux, pouvant donner un nouvel individu sans fécondation.

**Substrat** : surface sur laquelle se développent des organismes.

**Symbiose** : association étroite, à bénéfice réciproque, de deux organismes d'espèce ou de genre différent.

**Taloche** : planchette, munie d'un manche, utilisée pour appliquer ou surfacer les enduits sur une surface.

**Taxinomie** (ou taxonomie) : science de la biologie visant à établir une classification systématique des êtres vivants.

**Taxon** : groupe à un niveau quelconque de catégorie dans une classification hiérarchique (ex : espèce, genre, famille, ordre...).

**Tension de surface** (ou tension superficielle, ou énergie interfaciale) : force par unité de surface résultant des interactions intermoléculaires à l'interface de deux milieux.

**Tirer à la règle** : appliquer un enduit à l'aide d'une longue règle métallique rigide, avec un mouvement de va-et-vient en zigzag, afin de répartir ou égaliser l'enduit avant talochage.

**Ultra-structure** : structure fine de cellules, observable en microscopie électronique.

**Vortexer** : appliquer à un fluide un mouvement en forme de tourbillon, qui assure un mélange homogène et rapide.

**Wafer de silice** : surface très fine de silicium monocristallin.



---

## Liste des abréviations

---

APS	aminopropyltriéthoxysilane
Ara	arabinose
AU / UA	acides uroniques / uronic acids
BBM	Bold's basal medium / milieu Bold de base
BSTFA	<i>N,O</i> -bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CFL	cellule à flux laminaire /parallel plate flow chamber
CPS	capsular polysaccharides / polysaccharides capsulaires (liés aux parois)
DO	densité optique
EDS	energy dispersive spectrometry / spectrométrie d'énergie dispersive
ETICS	exterior thermal insulation composite systems
FID	flamme induction detector / détecteur à induction de flamme
Fuc	fucose
Gal	galactose
GalA	acide galacturonique
Glc	glucose
GlcA	acide glucuronique
HMDZ	hexaméthylidisilazane
Man	mannose
MATS	microbial adhesion to solvents / adhésion microbienne à des solvants
MEB / SEM	microscope électronique à balayage / scanning electron microscope
MET / TEM	microscope électronique à transmission / transmission electron microscope
PIM / MIP	porosimétrie d'intrusion au mercure / mercury intrusion porosimetry
ON	oses neutres
OTS	octadécyltrichlorosilane
PPF	photosynthetic photon flux / flux de photons photosynthétiques
Rha	rhamnose
RPE	revêtement plastique épais
RPS	released polysaccharides / polysaccharides libérés
SAM	self-assembled monolayers / couches auto-assemblées
TA	tensioactif / tensioactive
Xyl	xylose

---

## Liste des figures

---

### Texte

- Figure 1.** Exemples de développement biologique en façade..... 17
- Figure 2.** Exemples de salissures de façade issues de points singuliers et protections pouvant être mises en œuvre. A : pignon non protégé par un débord de toiture (A1) ou une bande de rive (A2); B : baie circulaire démunie de débord (B1); C : baie rectangulaire pouvant être protégée par une bavette (C1) munie d'une goutte d'eau (C2); D : salissures à la jonction de deux revêtements, démunie de bande de solin (D1) - noter l'effet protecteur des débords de fenêtres; E : balcons munis de pissettes - modèles fermé (E1) et ouvert (E2); F : élément de toiture terrasse muni d'une couvertine (F1), mettant en évidence l'élément décoratif non protégé (photos CSTB, GENEL 2005)..... 26
- Figure 3.** Représentation schématique des étapes de la formation d'un biofilm (BOS et al. 1999); ● : particules, ions ou molécules organiques; ○, ◯ : micro-organismes .... 32
- Figure 4.** Représentation schématique des énergies libres d'interface  $\gamma_{sm}$ ,  $\gamma_{sl}$  et  $\gamma_{ml}$  intervenant dans l'adhésion d'un micro-organisme (M) à une surface solide (S) au sein d'un milieu liquide (L) (BOS et al. 1999)..... 34
- Figure 5.** Formation d'interactions spécifiques entre le cantilever d'un microscope à force atomique, fonctionnalisé avec des ligands, et une surface fonctionnalisée avec des récepteurs spécifiques (MOY et al. 1994)..... 38
- Figure 6.** Représentation schématique d'un système annulaire rotatif; les surfaces à étudier au sein du réacteur sont symbolisées par les traits noirs (RASMUSSEN & OSTGAARD 2003) ..... 39
- Figure 7.** Représentations schématiques de cellules à point de stagnation. A : ADAMCZYK et al. (1999), B : haut = vue en coupe, bas = vue de dessus (YANG et al. 1999)..... 39
- Figure 8.** Représentations schématiques de cellules à flux radial. A : TEGOULIA & COOPER (2002), B : BECKER (1998)..... 40
- Figure 9.** Représentation schématique d'une cellule à flux turbulent. A : dispositif complet, B : principe d'exposition de la lame au flux (SCHULTZ et al. 2000)..... 41
- Figure 10.** Représentation schématique d'une cellule à flux laminaire : haut = vue en coupe, bas = vue de dessus (YANG et al. 1999)..... 41
- Figure 11.** Essai de colonisation de matériaux par des algues, en boîte de Pétri..... 42
- Figure 12.** Essai de colonisation de peintures humidifiées par condensation (SKINNER 1972) ..... 43
- Figure 13.** Essai de colonisation de matériaux de construction humidifiés par capillarité, sur lit de vermiculite (DUBOSC 2000)..... 43

<b>Figure 14.</b> Essai de colonisation de matériaux de construction placés dans un caisson à humidité saturée (OHSHIMA et al. 1999).....	<b>44</b>
<b>Figure 15.</b> Essai de colonisation de matériaux de construction par brumisation (DUBOSC 2000).....	<b>45</b>
<b>Figure 16.</b> Dispositif d'évaluation de la colonisation de matériaux de construction, par ruissellement d'eau (GUILLITTE 1993).....	<b>45</b>
<b>Figure 17.</b> Banc d'essai par ruissellement d'eau en cours de fonctionnement (CSTB).....	<b>46</b>
<b>Figure 18.</b> Souches d'algues et de cyanobactéries. A : culture liquide de la souche <i>Klebsormidium flaccidum</i> 749B sous bullage d'air et agitation magnétique; B : cultures liquides en fioles d'Erlenmeyer; C : développement d'algues et de cyanobactéries à partir de fragments de revêtements; D et E : ensemencement d'une souche d'algue (D) et de cyanobactérie (E) sur milieu solide.....	<b>49</b>
<b>Figure 19.</b> Paramètres définissant une rugosité de surface. $R_a$ : écart moyen arithmétique du profil, $R_p$ : hauteur de saillie maximale, $R_v$ : profondeur de creux maximal, $m$ : médiane ( <a href="http://www.maitrise-orthop.com/corpusmaitri/orthopaedic/mo78_zircone/index_vf.shtml">http://www.maitrise-orthop.com/corpusmaitri/orthopaedic/mo78_zircone/index_vf.shtml</a> )...	<b>56</b>
<b>Figure 20.</b> Dispositif d'évaluation de la colonisation de matériaux de construction par ruissellement d'eau; (a) : vue de côté, (b) : vue de face .....	<b>56</b>
<b>Figure 21.</b> Angle $\theta$ formé par une goutte de liquide en contact avec une surface.....	<b>59</b>
<b>Figure 22.</b> Schémas de la cellule à flux laminaire; haut : vue de côté, bas : vue de dessus ...	<b>63</b>
<b>Figure 23.</b> Protocole d'extraction des RPS et CPS, dérivé de BERTOCCHI et al. (1990) .....	<b>64</b>
<b>Figure 24.</b> Éprouvettes de mortier modèle en fin de cure (A1 et B1), après 1 jour d'expérience (A2 et B2) et après 33 jours d'expérience (A3 et B3), montrant des zones inhibant la colonisation de <i>Chroococcidiopsis fissurarum</i> .....	<b>121</b>
<b>Figure 25.</b> Volume de pores cumulé en fonction de la pression de mercure appliquée sur des éprouvettes de mortier modèle carbonatées et non carbonatées.....	<b>122</b>
<b>Figure 26.</b> Images MEB des cultures de <i>Klebsormidium flaccidum</i> 749B incubées en présence d'enzymes. A : culture témoin; B et C : $\alpha$ -mannosidase à C1 et C2, resp.; D et E : $\beta$ -mannosidase à C1 et C2; F et G : $\alpha$ -L-fucosidase à C1 et C2; H et I : $\alpha$ -glucosidase à C1 et C2; J et K : $\beta$ -glucosidase à C1 et C2; L et M : hespéridinase à C1 et C2; N et O : laminarinase à C1 et C2.....	<b>161</b>
<b>Figure 27.</b> Comparaison de l'adhésion de la souche <i>Klebsormidium flaccidum</i> 749B, en culture témoin et en culture incubée en présence de $\beta$ -glucosidase, après 10 min de contact sur deux surfaces modèles (○ : témoin sur verre; ● : témoin sur HMDZ; □ : enzyme sur verre; ■ : enzyme sur HMDZ) .....	<b>163</b>
<b>Figure 28.</b> Clichés réalisés au MEB. A : cellule de <i>Chlorosarcinopsis minor</i> colonisant un film de peinture; B : filament de <i>Trentepohlia iolithus</i> incrusté dans un enduit monocouche (cellules difficilement visibles indiquées par des flèches).....	<b>168</b>
 <i>Article 1</i>	
<b>Map 1.</b> Map of France showing the location of the samples, the numbering representing the zip code of the department.....	<b>72</b>

- Plate 1.** Fig 1. *Bracteacoccus* sp., Fig. 2. *Chlorella ellipsoidea*, Fig. 3. *Chlorella homosphaera*, Fig. 4. *Chlorella minutissima*, Fig. 5. *Chlorella* cf. *mirabilis*, Fig. 6. *Choricystis minor*, Fig. 7. *Choricystis chodatii*, Fig. 8. *Keratococcus bicaudatus*, Fig. 9. *Trebouxia* spp. .... **78**
- Plate 2.** Fig. 10. *Coccomyxa olivacea*, Fig. 11. *Hormotila mucinega*, Fig. 12. *Palmellopsis gelatinosa* Fig. 13. *Chlorosarcinopsis eremi*, Fig. 14. *Chlorosarcinopsis minor*, Fig. 15. *Apatococcus lobatus*, Fig. 16. *Coccobotrys verrucariae*, Fig. 17. *Desmococcus olivaceus* ..... **79**
- Plate 3.** Fig. 18. *Geminella terricola*, Fig. 19. *Klebsormidium flaccidum*, Fig. 20. *Klebsormidium pseudostichococcus*, Fig. 21. *Stichococcus bacillaris*, Fig. 22. *Trentepohlia iolithus* ..... **80**
- Plate 4.** *Aphanocapsa fusco-lutea*, Fig. 24. *Aphanothece saxicola*, Fig. 25. *Chroococcus limneticus*, Fig. 26. *Chroococcus lithophilus*, Fig. 27. *Cyanosarcina parthenonensis*, Fig. 28. *Gloeocapsa aeruginosa*, Fig. 29. *Gloeocapsa atrata*, Fig. 30. *Gloeocapsa bififormis*, Fig. 31. *Gloeocapsa decortican* ..... **83**
- Plate 5.** Fig. 32. *Gloeocapsa kuetzingiana*, Fig. 33. *Gloeocapsa sanguinea*, Fig. 34. *Gloeocapsa violascea*, Fig. 35. *Gloeothece* cf. *incerta*, Fig. 36. *Gloeothece palea*, Fig. 37. *Leptolyngbya foveolarum*, Fig. 38. *Leptolyngbya tenuis* ..... **84**
- Plate 6.** Fig. 39. *Microcoleus vaginatus*, Fig. 40. *Phormidium ambiguum*, Fig. 41. *Phormidium corium* Fig. 42. *Phormidium molle*, Fig. 43. *Phormidium* cf. *usteri*, Fig. 44. *Calothrix pulvinata*, Fig. 45. *Nostoc commune*, Fig. 46. *Nostoc microscopicum*, Fig. 47. *Scytonema mirabile* ..... **85**
- Plate 7.** Fig. 48. *Bracteacoccus* sp., Fig. 49. *Chlorella ellipsoidea*, Fig. 50. *Chlorella* cf. *mirabilis*, Fig. 51. *Choricystis minor*, Fig. 52. *Keratococcus bicaudatus*, Fig. 53. *Trebouxia* sp., Fig. 54. *Palmellopsis gelatinosa*, Fig. 55. *Chlorosarcinopsis eremi*, Fig. 56. *Chlorosarcinopsis minor*, Fig. 57. *Desmococcus olivaceus*, Fig. 58-59. *Geminella terricola*, mucilage visible with india ink (59), Fig. 60-61. *Klebsormidium flaccidum*, Fig. 62. *Klebsormidium pseudostichococcus*, Fig. 63. *Stichococcus bacillaris*, Fig. 64-65. *Trentepohlia iolithus*. Scale bar = 10  $\mu$ m ..... **88**
- Plate 8.** Fig. 66. *Chroococcus limneticus*, Fig. 67. *Chroococcus lithophilus*, Fig. 68. *Cyanosarcina parthenonensis*, Fig. 69. *Gloeocapsa atrata*, Fig. 70. *Gloeocapsa decorticans*, Fig. 71. *Gloeocapsa kuetzingiana*, Fig. 72. *Gloeocapsa sanguinea*, Fig. 73. *Gloeocapsa violascea*, Fig. 74. *Leptolyngbya foveolarum*, Fig. 75. *Microcoleus vaginatus*, Fig. 76. *Phormidium ambiguum*, Fig. 77. *Phormidium* cf. *usteri*, Fig. 78. *Phormidium corium*, Fig. 79. *Calothrix pulvinata*, Fig. 80. *Nostoc commune*, Fig. 81-82. *Nostoc microscopicum*: a colony (81) and a trichome (82). Scale bar = 10  $\mu$ m ..... **89**

## Article 2

**Figure 1.** Map of France showing the location of the samples, the numbering representing the zip code of the department ..... **98**

**Figure 2.** Some of the biofilms collected: (a) extensive red colonization by *Trentepohlia iolithus* on one-coat rendering mortar, along the Atlantic coast; (b) highly diversified green biofilm of algae and cyanobacteria developing on an organic finish beneath vegetation, and phenomenon of micro-humidity on the base of the wall, favouring

extensive colonization (arrow); (c) green stains, dominated by <i>Chlorosarcinopsis minor</i> , developing on paint; (d-e) black stains, composed of algae and cyanobacteria, appearing in zones of high micro-humidity, beneath joints of tiles (d) or beneath an evacuation of balcony (e).....	100
<b>Figure 3.</b> Percentage of occurrence of the exposure aspect of the 71 colonised buildings sampled .....	103
<b>Figure 4.</b> Ordination obtained by canonical correspondence analysis based on algae and cyanobacteria species presence .....	105

### Article 3

<b>Figure 1.</b> Laboratory set-up used to assess the colonisation of façade materials by algae and cyanobacteria: (a) side view; (b) front view; (c) working device; (d) and (e) converted grey tone image of one-coat mortar A before testing (d) and at 47 days of testing (e) .....	114
<b>Figure 2.</b> Porosity of the three mortars evaluated by MIP .....	116
<b>Figure 3.</b> <i>Ra</i> roughness parameter of the set of materials evaluated by a laser roughness meter .....	116
<b>Figure 4.</b> Examples of algal growth developing as streaks following the water path: (a), (b) and (c) façades of individual houses; (d) parapet wall; (e) wall beneath window lacking a sill; (f) wall beneath unprotected joints of tiles .....	117
<b>Figure 5.</b> Evolution of surface growth of <i>K. flaccidum</i> on materials with time, assessed by image analysis. The surface growth values indicated are the average for six specimens of each material (except for the laboratory-made mortar, two specimens), evaluated during two different experiments (initial concentrations: $4.5 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ dry mass).....	118
<b>Figure 6.</b> Evolution of surface growth of <i>S. bacillaris</i> (initial concentration: $3.6 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ dry mass) and <i>K. flaccidum</i> (contaminant) on materials with time, assessed by image analysis. The surface growth values indicated are the average for three specimens of each material (except for the laboratory-made mortar, two specimens).....	118
<b>Figure 7.</b> Evolution of surface growth of <i>C. fissurarum</i> and <i>C. cf. mirabilis</i> (initial concentrations respectively $8.7 \pm 0.2$ and $1.8 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ dry mass) on materials with time, assessed by image analysis. The surface growth values indicated are the average for three specimens of each material (except for the laboratory-made mortar, one specimen).....	119

### Article 4

<b>Figure 1.</b> Schematic representation of the parallel plate flow chamber, not about to scale..	129
<b>Figure 2.</b> Adhesion of the three algal strains to various solvent-water interfaces.....	129
<b>Figure 3.</b> Adhering algal cells as observed in the parallel plate flow chamber: (A) <i>Klebsormidium flaccidum</i> , (B) <i>Stichococcus bacillaris</i> , (C) <i>Chlorella cf. mirabilis</i> ....	132

<b>Figure 4.</b> Adhesion of <i>Klebsormidium flaccidum</i> (strain 749B) depending on the contact time on surfaces (●: HMDZ, 15 min; ○: HMDZ, 5 min; ■: glass, 95 min; □: glass, 15 min)	133
.....	
<b>Figure 5.</b> Adhesion of <i>Klebsormidium flaccidum</i> (strain 749B) and <i>Stichococcus bacillaris</i> (strain 772B) as a function of the culture age (●: 772B, 45 days; ○: 772B, 73 days; ■: 749B, 30 days; □: 749B, 120 days)	133
.....	
<b>Figure 6.</b> Effect of surface free energies of model surfaces on algal cells adhesion	134
.....	

### *Article 5*

<b>Figure 1.</b> SEM images (A: <i>Klebsormidium flaccidum</i> , strain 749B; B: <i>Geminella terricola</i> , strain 7713G) and TEM images (C: <i>Klebsormidium flaccidum</i> , strain 748A; D: <i>Stichococcus bacillaris</i> , strain 772B; E: <i>Chlorella ellipsoidea</i> , strain 776A) of CPS investigated in this work, indicated with arrows	147
.....	
<b>Figure 2.</b> Adsorption kinetic of the CPS 749B to surface modified silica wafers, assayed by reflectometry; $\Gamma$ ( $\text{mg m}^{-2}$ ) represents the amount of polymer adsorbed on the wafers	153
.....	

---

## Liste des tableaux

---

### *Texte*

<b>Tableau 1.</b> Récapitulatif des espèces d'algues et de cyanobactéries identifiées sur des matériaux de construction en France .....	<b>29</b>
<b>Tableau 2.</b> Composition des solutions mères du milieu Bold de base .....	<b>48</b>
<b>Tableau 3.</b> Propriétés des tensions de surface des solvants utilisés pour les essais MATS ( $\gamma^{LW}$ , $\gamma^+$ et $\gamma^-$ : composantes de Lifshitz-van der Waals, électron-donneur et électron-accepteur) .....	<b>58</b>
<b>Tableau 4.</b> Propriétés des tensions de surface des liquides utilisés pour les mesures d'angles de contact .....	<b>59</b>
<b>Tableau 5.</b> Analyse EDS de prélèvements surfaciques des zones colonisée et non colonisée d'une éprouvette de mortier .....	<b>122</b>
<b>Tableau 6.</b> Sélection d'enzymes et concentrations C1 et C2 (U mL <sup>-1</sup> ) auxquelles elles ont été utilisées (hespéridinase : $\alpha$ -L-rhamnosidase + $\beta$ -D-glucosidase; laminarinase : $\beta$ -(1→3)-endoglucanase) .....	<b>160</b>
<b>Tableau 7.</b> Concentration ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> ) des sucres libérés en solution chez une culture témoin de <i>Klebsormidium flaccidum</i> 749B et chez la même souche incubée en présence de $\beta$ -glucosidase .....	<b>162</b>

### *Article 1*

<b>Table 1.</b> Presence/absence of algae and cyanobacteria on the buildings sampled. Taxa are presented in alphabetical order .....	<b>73</b>
<b>Table 2.</b> Morphological classification and occurrence of the 47 identified taxa .....	<b>77</b>
<b>Table 3.</b> Occurrences (%) of main algae and cyanobacteria from a total of 71 samples .....	<b>90</b>

### *Article 2*

<b>Table 1.</b> Algae and cyanobacteria species, codes used for the multivariate analysis and percentage of occurrence (Occ. %) of each species in the 71 sites sampled .....	<b>101</b>
<b>Table 2.</b> Mean number of algae and cyanobacteria species related to the presence or absence of a dominant species in the biofilms .....	<b>101</b>
<b>Table 3.</b> Mean number of algae and cyanobacteria species related to the abundance of cyanobacteria in the biofilms .....	<b>101</b>

<b>Table 4.</b> Values of the environmental variables available for the 18 departments sampled ('-' stands for unknown data; climate: 1 = oceanic, 2 = continental, 3 = mediterranean, 4 = mountainous) .....	<b>102</b>
<b>Table 5.</b> Occurrence of the different kinds of substrates in the 71 colonised buildings sampled, and mean number of species per substrate .....	<b>103</b>
<b>Table 6.</b> Mean number of algae and cyanobacteria species, and number of samples related to the nature of the substrate (mineral or organic), the climate (maritime, continental or mountainous) and the micro-humidity (low or high) .....	<b>104</b>

### *Article 3*

<b>Table 1.</b> Total porosity, density and water absorption coefficient of the three mortars .....	<b>115</b>
---	------------

### *Article 4*

<b>Table 1.</b> Surface tension properties of MATS solvents and contact angle liquids used in this study .....	<b>127</b>
<b>Table 2.</b> Contact angles derived surface tension components and hydrophobic degrees of algal strains and model surfaces investigated .....	<b>130</b>
<b>Table 3.</b> Peak positions ( $\pm 0.2$ eV) and assignments deduced from XPS analysis of model surfaces .....	<b>131</b>
<b>Table 4.</b> Surface chemical composition of model surfaces (atomic %) as determined by XPS analysis .....	<b>131</b>
<b>Table 5.</b> Lifshitz-van der Waals ( $\Delta G^{LW}$ ), acid-base ( $\Delta G^{AB}$ ), and total ( $\Delta G^{Total}$ ) interaction free energies of adhesion between algal strains and model surfaces, when immersed in water ( $\text{mJ m}^{-2}$ ) .....	<b>132</b>
<b>Table 6.</b> Adhesion percentage of the three algal strains on model surfaces at shear stress $\sigma = 200 \text{ s}^{-1}$ , as an average of three measurements .....	<b>134</b>

### *Article 5*

<b>Table 1.</b> Origin of the biofilms from which algal and cyanobacterial strains were isolated (in between brackets, zip code of the department), nature of the colonised coating and exposure of the façade sampled .....	<b>143</b>
<b>Table 2.</b> Yield of RPS and CPS in % of total dry weight of cyanobacteria and algae extracted (nd = not determined) .....	<b>148</b>
<b>Table 3.</b> Monosaccharide composition (% mol.), uronic acids (UA) content (% wt.) and sulphation rate (% wt.) of cyanobacteria RPS and CPS extracts (t = traces; nd = not determined) .....	<b>149</b>
<b>Table 4.</b> Monosaccharide composition (% mol.), uronic acids (UA) content (% wt.) and	



sulphation rate (% wt.) of algae RPS and CPS extracts (t = traces; nd = not determined)	150
<b>Table 5.</b> Significant correlation coefficients between CPS and RPS compositions evaluated for strains of cyanobacteria and algae ( <i>r</i> : Pearson correlation coefficient)	151
<b>Table 6.</b> Zeta potential $\zeta$ (mV) and surface tension $\gamma$ (mJ m <sup>-2</sup> ) values of CPS extracted from cyanobacteria and algae	152
<b>Table 7.</b> Water contact angle values $\theta_w$ (°) of silica wafers, amount of CPS 749B adsorbed on silica wafers after 8 min, $\Gamma_{\text{adsorbed}}$ (mg m <sup>-2</sup> ), and amount of CPS 749B desorbed under water flux, $\Gamma_{\text{desorbed}}$ (mg m <sup>-2</sup> )	152

---

## Liste des espèces citées

---

### *Algues*

<i>Apatococcus lobatus</i> (Chodat) J.B. Petersen .....	77
<i>Bracteacoccus</i> sp. ....	77
<i>Chlorella ellipsoidea</i> Gerneck .....	77
<i>Chlorella homosphaera</i> Skuja .....	77
<i>Chlorella minutissima</i> Fott et Nováková .....	77
<i>Chlorella</i> cf. <i>mirabilis</i> Andreeva .....	77
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> Chantanachat et Bold .....	77
<i>Chlorosarcinopsis minor</i> (Gerneck) Herndon .....	81
<i>Choricystis chodatii</i> (Jaag) Fott .....	81
<i>Choricystis minor</i> (Skuja) Fott .....	81
<i>Coccobotrys verrucariae</i> Chodat em. Vischer .....	81
<i>Coccomyxa olivacea</i> Petersen .....	81
<i>Desmococcus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) Laundon .....	81
<i>Geminella terricola</i> Petersen .....	81
<i>Hormotila mucigena</i> Borzı .....	81
<i>Keratococcus bicaudatus</i> (A. Braun) Petersen .....	81
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kützing) P.C. Silva, Mattox et W.H. Blackwell .....	81
<i>Klebsormidium pseudostichococcus</i> (Heering) nov. comb. ....	82
<i>Palmellopsis gelatinosa</i> Korschikoff .....	82
<i>Stichococcus bacillaris</i> Nägeli .....	82
<i>Trebouxia</i> spp. ....	82
<i>Trentepohlia iolithus</i> (Linnaeus) Wallroth .....	82

### *Cyanobactéries*

<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i> Hansgirg .....	82
<i>Aphanothece saxicola</i> Nägeli .....	82
<i>Calothrix pulvinata</i> (C. Agardh) Bornet et Flahault .....	82

<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmermann .....	82
<i>Chroococcus lithophilus</i> Ercegovíc .....	82
<i>Cyanosarcina parthenonensis</i> Anagnostidis in Anagnostidis et Pantazidou .....	86
<i>Gloeocapsa aeruginosa</i> Kützing .....	86
<i>Gloeocapsa atrata</i> Kützing .....	86
<i>Gloeocapsa biformis</i> Ercegovíc .....	86
<i>Gloeocapsa decorticans</i> (A. Braun) Richter in Wille .....	86
<i>Gloeocapsa kuetzingiana</i> Nägeli .....	86
<i>Gloeocapsa sanguinea</i> (Agardh) Kützing .....	86
<i>Gloeocapsa violascea</i> (Corda) Rabenhorst .....	86
<i>Gloeothece</i> cf. <i>incerta</i> Skuja .....	86
<i>Gloeothece palea</i> (Kützing) Rabenhorst .....	86
<i>Leptolyngbya foveolarum</i> (Montagne ex Gomont) Anagnostidis et Komárek .....	86
<i>Leptolyngbya tenuis</i> (Gomont) Anagnostidis et Komárek .....	86
<i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont .....	87
<i>Nostoc commune</i> (Vaucher) Bornet et Flahault .....	87
<i>Nostoc microscopicum</i> (Carmichael in Hooker) Bornet et Flahault .....	87
<i>Phormidium ambiguum</i> Gomont ex Gomont .....	87
<i>Phormidium corium</i> Gomont .....	87
<i>Phormidium molle</i> Gomont .....	87
<i>Phormidium</i> cf. <i>usteri</i> Schmidle .....	87
<i>Scytonema mirabile</i> (Dillwyn) Bornet .....	87

---

## Introduction

---

L'encrassement d'un revêtement de façade est parfois observé quelques années seulement après sa mise en œuvre\*. Les salissures\* peuvent être d'origine atmosphérique ou biologique. Les premières se développent lorsque le bâtiment est exposé aux poussières urbaines ou industrielles : l'encrassement, généralement homogène sur la façade, est souvent mis en évidence par contraste lors du ravalement d'un bâtiment voisin. Les salissures d'origine biologique sont, par contre, plus visibles car elles ne concernent que des zones très localisées de la façade. En effet, le développement biologique est initié à partir de points singuliers de l'enveloppe du bâtiment, soumis à une humidité importante. La formation de coulées verdâtres, rougeâtres ou noirâtres, est perçue comme un désagrément car elles rompent l'harmonie de la façade (Figure 1).



Figure 1. Exemples de développement biologique en façade.

### *Impact économique des salissures de façade*

La durabilité de l'aspect de l'enveloppe du bâtiment est un concept qui gagne de l'importance et revêt un caractère économique croissant. Ainsi, selon l'article L132-1 du Code de la Construction et de l'Habitation, les propriétaires sont tenus de faire ravalement les façades de leur immeuble au moins tous les 10 ans lorsque leur état de propreté n'est pas satisfaisant. Pour la

---

\* voir glossaire

seule région d'Île-de-France, les dépenses induites par les ravalements de façade étaient évaluées entre 229 millions et 1,1 milliard d'€ par an en 1999, soit 21 à 100 € par an et par habitant<sup>1</sup>. Le coût du ravalement d'un immeuble parisien de six étages est ainsi compris entre 80 et 150 € par m<sup>2</sup>, en fonction de la nature du revêtement et du diagnostic. Cependant, l'impact des salissures de nature biologique n'est pas directement quantifiable d'un point de vue financier. En outre, bien que la conservation de l'aspect des façades soit une préoccupation pour les maîtres d'ouvrage\*, la durabilité esthétique n'est actuellement pas prise en compte dans les garanties liées à l'achèvement de la construction d'un bâtiment.

Toutefois, les fabricants de revêtements de façade recherchent des solutions pour réaliser des ouvrages plus résistants à l'encrassement. En effet, pour les fabricants qui fourniront un revêtement à efficacité durable contre le développement biologique, le marché de la façade représente un enjeu financier important. Ainsi, en France pour les seuls mortiers\* industriels, plus de 100 millions de m<sup>2</sup> de façades ont été enduits en 2005, correspondant à une production de 2,15 millions de tonnes<sup>2</sup>. Plus de 90 % des travaux d'enduit sur maçonnerie individuelle neuve se font selon la technique monocouche\*. Leur part de marché diminue en logement collectif neuf au profit des revêtements organiques, tels que les revêtements plastiques épais et les peintures, représentant respectivement 28 % et 8 % des surfaces traitées. Enfin, en entretien et rénovation, les mortiers industriels représentent 50 % des surfaces traitées et les revêtements organiques, 40 %.

### ***Partenaires de ce projet***

L'idée à l'origine de ce projet de thèse était d'étudier les mécanismes selon lesquels les micro-organismes adhèrent au revêtement de la façade, en vue de développer des matériaux inhibant ce système de fixation.

Ce projet a été initié par le Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), dont les missions consistent en l'évaluation de la conformité de produits et systèmes utilisés dans le domaine de la construction, mais également en l'expertise des diverses problématiques liées au bâtiment. C'est dans ce cadre que le département Enveloppe et Revêtements a acquis au fil des ans une expérience importante dans le domaine des salissures de façade, par l'observation et le suivi de chantiers. À travers cette étude, le CSTB a souhaité approfondir ses connaissances sur le processus de colonisation biologique d'une façade et sur les facteurs qui

---

<sup>1</sup> Plan Régional de la Qualité de l'Air, DRIRE Île-de-France, juin 1999.

<sup>2</sup> Syndicat National des Mortiers Industriels.

influencent ce développement. Ce travail de thèse devait également permettre l'optimisation d'un banc d'évaluation du développement biologique sur des matériaux.

Les laboratoires Application Peintures et Mortiers, appartenant initialement à la société Rhodia puis rachetés début 2006 par le groupe Hexion Specialty Chemicals, ont également financé une partie de ce travail et mis à disposition le parc analytique du site de recherche d'Aubervilliers. Développant et commercialisant des matières premières entrant dans la composition de revêtements de façade, ces laboratoires souhaitaient, d'une part, évaluer la durabilité de leurs revêtements, et d'autre part, savoir par quels mécanismes les micro-organismes incriminés adhèrent à une surface, afin de faire évoluer les performances de leurs produits.

Enfin, le Muséum National d'Histoire Naturelle, à travers l'unité 505 "Systématique et écotoxicologie des micro-algues" s'est associé au projet afin d'apporter l'expertise nécessaire à l'identification de micro-algues et de cyanobactéries, leur isolement et leur mise en culture.

### ***Approche de l'étude***

Ce projet, qui a pris la forme d'un contrat CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la REcherche), a nécessité une étude préalable des travaux publiés concernant la thématique des salissures de façade. Ce travail a été orienté selon les trois interrogations suivantes :

- ↳ quels sont les micro-organismes qui se développent en façade ?
- ↳ quels sont les facteurs qui influencent leur implantation ?
- ↳ comment colonisent-ils le revêtement ?

Des débuts de réponses sont ainsi proposés dans la revue bibliographique. Cette étude a mis en évidence certaines lacunes que nous avons décidé de tenter de combler. Elle a par ailleurs permis de dégager les orientations scientifiques et les méthodes analytiques nécessaires pour traiter ce sujet. La mise en place de ce projet est donc présentée dans le chapitre I.

---

## I. Revue bibliographique

---

La consultation des travaux publiés concernant le processus de colonisation biologique d'une façade a été abordée selon deux approches : l'échelle macroscopique du bâtiment et des salissures qui peuvent s'y développer, et l'échelle microscopique des interactions entre les micro-organismes et les matériaux. Afin de préciser l'intérêt d'aborder ce travail sous ces différents angles, l'état des connaissances concernant la succession de micro-organismes et leurs impacts sur la façade, ainsi que les éléments favorisant cette colonisation, sont décrits ci-après. Les connaissances disponibles sur les algues et les cyanobactéries se développant en façade sont ensuite résumées. Finalement, les mécanismes probables d'adhésion mis en jeu et les tests permettant d'évaluer la colonisation de surfaces par des micro-organismes sont présentés.

### I.1. Le développement biologique en façade

#### I.1.1. Successions et impacts

La colonisation des matériaux de façade par une communauté de micro-organismes présente un aspect dynamique. En effet, des bactéries colonisent généralement rapidement les façades et sont suivies par l'établissement d'algues et de cyanobactéries. Ce biofilm\* primaire permet ensuite la colonisation successive de champignons, lichens et mousses, pouvant aller jusqu'au développement de végétaux supérieurs si rien n'est fait pour stopper la colonisation de la façade.

#### *Les bactéries*

Ces micro-organismes sont unicellulaires, de taille variant de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ . Les bactéries se développent sur tout type de substrat\* et sont généralement pionnières dans le processus de colonisation. Au bout de quelques mois seulement, toute une variété de bactéries colonise les revêtements de façade, une sélection des espèces s'effectuant au cours du temps. Il existe ainsi plusieurs catégories de bactéries agissant à la surface des matériaux, telles que les bactéries ammonifiantes, nitreuses, nitriques ou encore sulfatoréductrices (LOUTZ & DINNE 2000).

Elles produisent, de par leur métabolisme, des acides intervenant dans la dégradation des matériaux. Elles peuvent ainsi entraîner une perte de cohésion du matériau par dissolution d'éléments calcaires, l'apparition de fissures suite à la transformation de composés cimentaires ou encore la corrosion d'armatures présentes dans le béton et l'alvéolisation de pierres (PERRICHET 1991, LOUTZ & DINNE 2000). Par ailleurs, si les colonies bactériennes sont invisibles à l'œil nu, ces micro-organismes modifient, de par leur développement et la création de biofilms, la bioréceptivité\* originale des revêtements de façade (GUILLITTE 1995) et favorisent ainsi l'établissement d'autres micro-organismes.

### ***Les algues et les cyanobactéries***

Les algues microscopiques et les cyanobactéries désignent une série d'espèces variées de végétaux unicellulaires ou pluricellulaires, de taille généralement comprise entre 0,5 µm et 1 mm. Elles colonisent toutes les surfaces soumises à une humidité abondante, se développant ainsi en milieu marin ou dulçaquicole\*, mais également sur divers substrats terrestres tels que des plantes, des roches, le sol ou encore... des bâtiments! C'est la présence d'algues vertes (Chlorophycées) et de cyanobactéries, ou algues bleues-vertes (Cyanophytes), qui se traduit par des salissures du revêtement de façade, de teintes caractéristiques verdâtres, rougeâtres ou noirâtres selon la composition du biofilm.

Les algues et les cyanobactéries sont des organismes autotrophes\*, qui ne tirent donc pas leur matière nutritive du substrat. Cependant, selon certains auteurs, la sécrétion d'acides organiques concomitante au métabolisme\* des algues et des cyanobactéries pourrait dissoudre le carbonate de calcium des pierres calcaires, bétons et mortiers (PERRICHET 1991). Outre cet effet chimique, les algues et les cyanobactéries pénètrent le réseau poreux des matériaux, induisant ainsi par gonflement ou rétraction de leur mucilage\*, une influence mécanique sur leur environnement pouvant conduire à une fissuration du support (ORTEGA-CALVO et al. 1991). Ces mucilages hygroscopiques retiennent l'eau et entraînent également une élévation du taux d'humidité du matériau sous-jacent, propice à l'accélération du processus de colonisation par d'autres organismes. En outre, la croissance d'algues et de cyanobactéries s'accompagne de la production de déchets cellulaires nécessaires au développement de communautés hétérotrophes\*, telles que des champignons.

### ***Les champignons***

Ce sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires hétérotrophes qui nécessitent une forte humidité pour croître. Ils peuvent se développer de manière saprophytique\*, parasitaire\*



ou symbiotique\*, ou encore tirer les éléments nécessaires à leur développement par dégradation du matériau sous-jacent. Pour ce faire, ils sécrètent des acides organiques qui attaquent le support, ou produisent des enzymes pouvant dégrader les chaînes carbonées des molécules constituant les revêtements organiques (peintures et RPE).

### ***Les lichens***

Ces organismes résultent d'une symbiose entre une algue et un champignon. Dans cette association, les champignons protègent les algues des prédateurs, les approvisionnent en eau et se nourrissent des substances qu'elles sécrètent. Deux types de lichens se développent en façade sous forme d'encroûtements nettement visibles : les lichens de surface, qui altèrent peu le matériau, et les lichens encroûtants. Les hyphes\* ou rhizines\* de ces derniers pénètrent dans le support par des fractures existantes ou en créent de nouvelles par sécrétion d'acides. Ces mécanismes érodent, alvéolisent le matériau et altèrent sa résistance (LOUTZ & DINNE 2000).

### ***Les mousses***

Les mousses colonisent de préférence les surfaces préalablement dégradées par des agents climatiques ou biologiques. Leur croissance est, par ailleurs, liée à la présence d'un microsol. Bien qu'elles produisent des substances qui peuvent contribuer à l'altération du matériau, la présence de mousses est surtout nocive car elles préparent un substrat favorable au développement de végétaux nettement plus dommageables pour le revêtement (PERRICHET 1991). Cependant, il est rare que les propriétaires de bâtiments attendent ce stade de végétalisation de la façade pour la rénover.

## **I.1.2. Facteurs favorisant le développement biologique**

Les algues et les cyanobactéries se développent sur des surfaces très variées. L'ensemencement de toute nouvelle surface se fait par arrachement à un substrat colonisé, puis transport par le vent de spores\*, cellules ou fragments de filaments (BROWN et al. 1964). Les algues et cyanobactéries sont ainsi déposées sur des surfaces faiblement inclinées du bâtiment (toiture, rebord de fenêtre ou de balcon...) et, entraînées par l'eau de pluie, vont rapidement se développer et devenir visibles. Ce développement biologique est lié à des facteurs environnementaux, mais également à des éléments omniprésents dans le bâtiment (LOUTZ & DINNE 2000).

### *L'environnement géographique*

Deux facteurs sont prépondérants pour la croissance des algues et des cyanobactéries : la **lumière** et l'**humidité**. Les façades de bâtiment, soumises à une exposition lumineuse et une humidification régulières, présentent ainsi une surface favorable à leur implantation. En outre, d'autres facteurs environnementaux peuvent avoir un impact sur la colonisation des façades. Leur combinaison peut mener à l'apparition de biofilms algaux une ou deux années seulement après l'application du revêtement :

- la **pluie**, facteur le plus évident, puisque les micro-organismes se développent en façade en suivant le cheminement de l'eau,
- l'**humidité relative de l'air**, source d'humidification du revêtement par condensation,
- la **température** extérieure, qui permet une évaporation plus ou moins rapide de l'eau,
- l'**environnement végétal**, qui est une source potentielle de contamination de la façade par les micro-organismes. En outre, la présence d'arbres et de buissons maintient une certaine humidité à proximité du bâtiment,
- le **vent**, qui peut avoir un impact ambivalent, puisqu'il intervient dans le transport et la dispersion des micro-organismes et des particules minérales et organiques, mais possède également une action desséchante sur les façades,
- la **pollution** atmosphérique liée à l'urbanisation, qui produit des particules qui sont déposées sur les revêtements de façade, favorisant l'accroche puis le développement biologique.

### *L'architecture du bâtiment*

Outre l'environnement géographique, l'architecture même du bâtiment peut favoriser la colonisation de la façade. En effet, certaines parties de l'enveloppe du bâtiment vont induire localement une augmentation de l'humidité (GENEL 2005). À titre d'exemple, voici les cas les plus communément observés :

- colonisation préférentielle des façades exposées au nord et à l'ouest, soumises à une plus longue rémanence de l'humidité,
- exposition à la pluie des éléments en saillie (corniches\*, bandeaux\*, balcons...),
- remontées capillaires d'humidité et rejaillissement de la pluie aux soubassements\*,
- ruissellement préférentiel de l'eau à la jonction de différents revêtements,
- stagnation des eaux pluviales en terrasse ou en balcon,
- humidité générée à l'intérieur du bâtiment (cuisine, salle de bain) et qui se condense en façade.

Certaines protections architecturales ont été développées pour traiter ces points singuliers, dont quelques exemples seront présentés par la suite.

### *Les caractéristiques des revêtements de façade*

Un revêtement, lorsqu'il est appliqué en façade, possède des caractéristiques qui déterminent sa bioréceptivité (GUILLITTE 1995). Celles-ci influencent le développement biologique. Il s'agit de :

- la **porosité\***, qui détermine l'aptitude du matériau à conserver l'humidité, mais également à abriter et permettre la fixation des micro-organismes. À la porosité d'un matériau sont liées les notions d'absorption capillaire de l'eau (capacité d'un matériau à capter des écoulements d'eau), et de potentiel de rétention d'eau (capacité d'un matériau à retenir l'eau après humidification),
- l'**hygroscopie**, qui détermine la capacité du matériau à capter l'humidité de l'air,
- la **rugosité\***, qui est déterminée par la texture du matériau, mais également par son mode d'application. La rugosité est un des paramètres les plus importants concernant le développement biologique, puisqu'elle influe à la fois sur l'écoulement de l'eau et

son temps de rétention à la surface du revêtement, et sur l'accrochage des matières organiques et des micro-organismes sur le support,

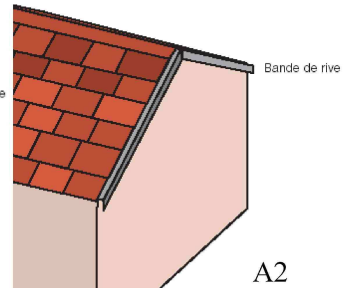
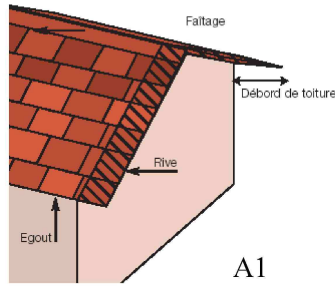
- la **composition chimique du support**, qui influe sur le type de micro-organismes colonisateurs et sur la vitesse de colonisation. En effet, chaque espèce a des préférences écologiques et alors que certaines supportent la présence de certains ions ou de pH de surface élevés, ces mêmes facteurs retardent l'implantation d'autres espèces.

La bioréceptivité d'un matériau évolue donc avec le temps, au gré des altérations qu'il subit sous l'effet de facteurs climatiques ou biotiques. Dans un cas extrême, une fois le revêtement colonisé par un biofilm dense, les caractéristiques du matériau n'interviennent plus dans le processus de colonisation : ce sont dorénavant les micro-organismes présents à la surface du matériau qui conditionnent l'implantation d'autres espèces.

### **I.1.3. Moyens de lutte contre le développement biologique**

#### ***Dispositions constructives***

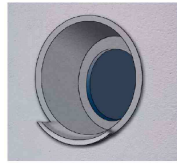
Des éléments de protection peuvent être ajoutés au bâtiment afin d'éviter à l'eau de ruisseler ou de s'accumuler à certains endroits (Figure 2). Ainsi, les éléments en saillie peuvent être munis de gouttes d'eau\* et de bavettes\*. Des débords de toiture permettent d'éviter les coulures sur le pignon du bâtiment, ou, en cas d'incompatibilité avec le style régional, des bandes de rives\* peuvent être installées. Des bandes de solin\* permettent de décoller l'eau de ruissellement à la jonction entre différents revêtements. Par ailleurs, les eaux pluviales, qui ont tendance à s'accumuler sur un balcon, peuvent être évacuées à l'aide d'une pissette\*. Dans le cas des soubassements, il est préconisé l'installation de lits de gravillons en pente ou des assises de rejaillissement en pierre. Enfin, l'application d'enduits de faible capillarité lorsque la façade destinée à être enduite est abondamment exposée à la pluie (façades exposées au nord et à l'ouest), ou encore dans les zones de soubassements, permet également de limiter les risques de développement biologique (GENEL 2005). Cependant, bien que ces solutions architecturales soient préconisées dans le cadre des textes technico-réglementaires, elles ne sont pas toujours mises en oeuvre pour des raisons financières ou d'harmonisation régionale de l'aspect des bâtiments.



A

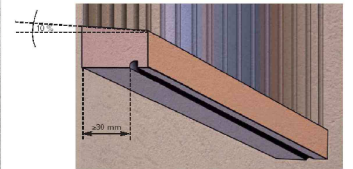
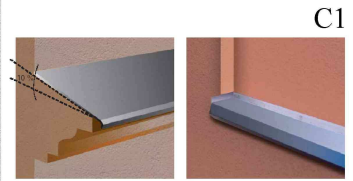
A1

A2



B1

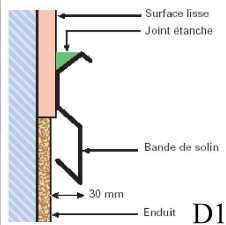
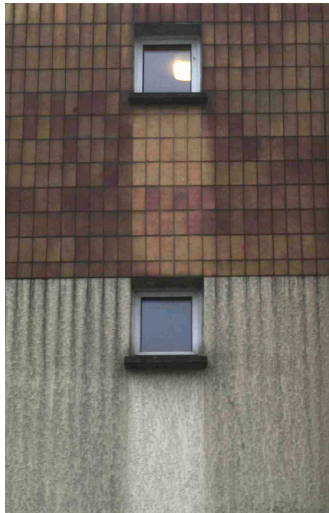
B



C1

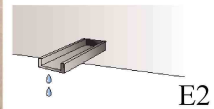
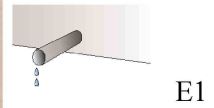
C2

C



D1

D



E1

E2

E



F



F1

← Figure 2. Exemples de salissures de façade issues de points singuliers et protections pouvant être mises en œuvre. A : pignon non protégé par un débord de toiture (A1) ou une bande de rive (A2); B : baie circulaire démunie de débord (B1); C : baie rectangulaire pouvant être protégée par une bavette (C1) munie d'une goutte d'eau (C2); D : salissures à la jonction de deux revêtements, démunie de bande de solin (D1) - noter l'effet protecteur des débords de fenêtres; E : balcons munis de pissettes - modèles fermé (E1) et ouvert (E2); F : élément de toiture terrasse muni d'une couvertine\* (F1), mettant en évidence l'élément décoratif non protégé (photos CSTB, GENEL 2005).

### ***Traitements préventifs des revêtements***

Actuellement, la lutte contre le développement biologique en façade est principalement axée sur l'utilisation de substances chimiques capables de détruire les micro-organismes. Ces substances sont nommées algicides lorsqu'elles agissent sur les algues, fongicides lorsqu'elles agissent sur les champignons, ou biocides lorsque leur spectre d'activité est plus large. Elles sont ajoutées au matériau lors de sa fabrication ou lors de sa mise en œuvre. Les produits à activité biocide communément utilisés sont des composés organométalliques, des ammoniums quaternaires, des dithiocarbamates, des sels de cuivre, des halogènes, des phénols, des quinones, des triazines et des composés d'urée (KASTIEN 1999, LOUTZ & DINNE 2000). Ce principe s'applique aussi bien aux enduits monocouches et enduits traditionnels, qu'aux revêtements plastiques et peintures. Bien que ces produits soient les plus efficaces, leur activité ne dure pas plus de deux ou trois ans (WHITELEY & BRAVERY 1982). En outre, les biocides, généralement hydrosolubles, peuvent être relargués par lessivage des revêtements et être entraînés par les eaux de ruissellement dans les nappes phréatiques, induisant ainsi une nuisance environnementale.

Les hydrofuges de surface sont également très employés. Ils sont destinés à limiter la pénétration de l'eau par obturation de la porosité ou par modification de l'état capillaire de la surface. À base de résines de silicone, ils sont pulvérisés ou appliqués au rouleau ou à la brosse, en revêtement du matériau. L'eau perle et ne stagne pas sur les surfaces ainsi traitées, ce qui a pour effet de limiter la croissance de micro-organismes.

Des revêtements dit "à effet lotus" sont par ailleurs proposés sur le marché. Le principe de "l'effet lotus", basé sur l'étude des feuilles de la plante qui porte ce nom, reproduit des motifs répétitifs micro-topographiques qui rendent la surface super-hydrophobe (NEINHUIS & BARTHLOTT 1997). L'eau, en ruisselant sur une telle surface, entraîne les particules déposées, d'où l'aspect immaculé des fleurs de Lotus qui intrigua les chercheurs.

Enfin, depuis quelques années, des recherches sont menées pour mettre au point des revêtements de façade autonettoyants et dépolluants, notamment dans le cadre du programme de recherche européen Picada<sup>3</sup> (Photocatalytic Innovative Coverings Applications for Depollution Assessment). L'action photocatalytique du dioxyde de titane incorporé dans le matériau permettrait ainsi de désolidariser les particules minérales ou les micro-organismes adhérent, qui seraient ensuite éliminés avec l'eau de pluie ou par arrosage. De nombreuses entreprises européennes proposent déjà des produits basés sur cette technique, tels que des bétons et ciments, des vitrages, des peintures de façade ou encore des vernis, d'autres produits devant être mis sur le marché courant 2006 (DUFFAURE-GALLAIS 2006).

Citons également le développement de peintures qui empêcheraient le refroidissement trop rapide des parois extérieures du bâtiment. Le revêtement contiendrait des pigments capables de réfléchir les rayonnements solaires infra-rouge, évitant ainsi la condensation de l'humidité de l'air en façade, ce qui limiterait les risques de développement biologique (KUENZEL & SEDLBAUER 2001).

Il existe également des traitements curatifs pour nettoyer les façades colonisées. Ils ne seront pas abordés ici puisque ce travail s'intéresse, en amont, au processus de colonisation des micro-organismes. Cependant, le lecteur désirant plus d'informations pourra se référer aux articles de ESTOUP (1997) et de JOUAN (2004).

## **I.2. Les algues et les cyanobactéries en façade**

Une bonne connaissance des algues et des cyanobactéries qui colonisent les façades, en terme de métabolisme et de caractéristique de surface, est nécessaire à la compréhension des mécanismes d'adhésion à une surface et de formation de biofilms.

### **I.2.1. Espèces observées en France**

Peu de travaux ont été publiés concernant l'identification des algues et des cyanobactéries colonisant les matériaux de construction en France. Pendant longtemps, les efforts de recherche ont porté sur l'étude des monuments historiques et des matériaux traditionnels (TROTET et al. 1973, GROSSIN & DUPUY 1978). Cependant, avec la mise sur le marché de revêtements de façade plus performants, mais se salissant aussi plus vite, les industriels

---

<sup>3</sup> [www.picada-project.com](http://www.picada-project.com)

concernés ont initié des études du développement biologique et des moyens d'évaluer la durabilité esthétique des matériaux de construction (GUILLITTE 1993, DUBOSC 2000). En outre, quelques équipes de chercheurs étrangers se sont intéressées aux façades françaises (RINDI et al. 2003, RINDI & GUIRY 2004, GAYLARDE & GAYLARDE 2005). Les espèces ainsi identifiées sont regroupées dans le tableau 1.

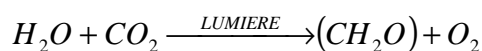
Tableau 1. Récapitulatif des espèces d'algues et de cyanobactéries identifiées sur des matériaux de construction en France.

	Espèces identifiées	Lieu	Référence
Algues	<i>cf. Apatococcus lobatus</i>	Marseille	Rindi & Guiry, 2004
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Bordeaux	Rindi & Guiry, 2004
	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Marseille	Rindi & Guiry, 2004
	<i>Klebsormidium</i> spp.	Bordeaux, Toulouse	Dubosc, 2000; Rindi & Guiry, 2004
	<i>Microspora</i> sp.	Toulouse	Dubosc, 2000
	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Bordeaux	Rindi & Guiry, 2004
	<i>Trebouxia</i> spp.	Marseille	Rindi & Guiry, 2004
	<i>Trentepohlia iolithus</i>	Normandie, Lot	Rindi et al., 2003
	<i>Trentepohlia cf. umbrina</i>	Bretagne, Normandie	Rindi et al., 2003
	<i>Trentepohlia</i> sp.	Toulouse	Dubosc, 2000
Cyanobactéries	<i>Chroococcus</i> sp.	Marseille, Toulouse	Dubosc, 2000; Rindi & Guiry, 2004
	<i>Gloeocapsa</i> sp.	Toulouse	Dubosc, 2000
	<i>Phormidium autumnale</i>	Bordeaux, Marseille	Rindi & Guiry, 2004

Ces études, ainsi que d'autres recherches menées dans le reste du monde, mettent souvent en évidence l'association des espèces observées avec un type de revêtement particulier (SCHLICHTING 1975, WEE & LEE 1980, WRIGHT 1984, JOHN 1988, WEE 1988, ORTEGA-CALVO et al. 1991, TRIPATHI et al. 1991, JOSHI & MUKUNDAN 1997, GAYLARDE & GAYLARDE 1999, 2000, RINDI & GUIRY 2003).

### I.2.2. Métabolisme

Les algues et les cyanobactéries sont généralement capables d'occuper tous les types de milieux, à condition qu'éclairement et humectation y soient disponibles. En effet, l'eau et la lumière sont indispensables au développement de la plupart des systèmes biologiques, puisqu'ils interviennent dans le processus de photosynthèse, dont l'équation basique peut être exprimée ainsi :





Ainsi, certains pigments, qui confèrent leur teinte caractéristique aux algues et aux cyanobactéries, collectent les photons lumineux qui seront utilisés pour construire des molécules énergétiques. L'oxygène est en même temps produit à partir de l'eau. Durant la nuit, l'énergie emmagasinée sert à incorporer le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), pour le transformer en hydrates de carbone (CH<sub>2</sub>O). Toutes les molécules composant les systèmes biologiques proviennent ensuite de la transformation de ces hydrates de carbone.

Les algues et les cyanobactéries sont donc photo-autotrophes, même si elles sont parfois capables de tirer l'énergie dont elles ont besoin pour se développer à partir d'autres sources. Ainsi, certaines espèces sont capables de se développer à l'obscurité en utilisant une source de carbone organique, quand d'autres utilisent une source de carbone organique aussi bien qu'inorganique, mais en présence de lumière seulement. Par ailleurs, les cyanobactéries, qui utilisent principalement l'eau comme donneur d'électron lors du processus de photosynthèse, sont également capables d'assimiler du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), du dihydrogène (H<sub>2</sub>) ou des composés organiques (*in* DE REVIERS 2003). Enfin, outre de l'eau, de la lumière et du carbone inorganique, la croissance des algues et des cyanobactéries nécessite également des sels minéraux variés et, chez certaines espèces, des vitamines telles que la B12 ou la thiamine (MORVAN et al. 1997).

### **I.2.3. Ultra-structure générale**

Il est difficile de résumer l'ultra-structure\* des algues et cyanobactéries se développant en façade, du fait de leur grande diversité. Cependant, la paroi\* de la plupart des algues vertes, organismes eucaryotes\*, est souvent constituée d'une partie fibrillaire rigide et d'une partie mucilagineuse, la composition de l'une et l'autre parties variant beaucoup entre espèces et n'étant pas connue pour nombre de taxons\*. Chez les cyanobactéries, organismes procaryotes\*, la paroi est constituée de peptidoglycanes et de lipoprotéines. En outre, certaines espèces possèdent une gaine polysaccharidique ou sont formées de cellules réunies dans un mucilage (WECKESSER & JÜRGENS 1988, *in* DE REVIERS 2002).

La capsule mucilagineuse, recouvrant d'une couche plus ou moins épaisse la paroi de ces micro-organismes, posséderait diverses fonctions. Elle agirait ainsi comme une barrière protectrice contre le milieu environnant (dessiccation, ensoleillement, prédation, agents antibactériens, toxicité du milieu), comme un agent chélateur des cations nécessaires au développement cellulaire, ou encore comme interface d'adhésion à une surface solide (CHRISTENSEN 1989, BERTOCCHI et al. 1990, NEU & MARSHALL 1990, MORVAN et al. 1997).

En effet, ce sont typiquement les composés organiques les plus externes qui permettent aux micro-organismes d'interagir avec l'environnement et notamment avec une surface. ROBINS et al. (1986), CHRISTENSEN (1989), LIND et al. (1997), MORVAN et al. (1997), CALLOW et al. (2003) et TSUNEDA et al. (2003) ont ainsi montré que ces polymères interviennent dans le processus d'adhésion de cyanobactéries et de bactéries à des surfaces, au cours du contact initial avec la surface, puis lors de l'étape de consolidation de l'adhésion. Ce mucilage extracellulaire a été identifié chez de nombreuses cyanobactéries comme étant principalement constitué de polysaccharides anioniques composés d'oses neutres et d'acides uroniques et associés parfois à des entités protéiques et à des pigments (MORVAN et al. 1997).

### **I.3. L'adhésion de micro-organismes**

"Quelles sont donc les interactions mises en jeu lors de l'adhésion des algues et des cyanobactéries à une surface?", "Comment s'effectuent le contact et l'adhésion à une surface?", "Quels sont les paramètres qui influencent cette interaction?" et "Comment les évaluer?" sont autant de questions qui ont été prises en compte pour mettre en place l'étude de l'adhésion de ces micro-organismes. Peu de données concernant l'adhésion des algues et des cyanobactéries étant disponibles, les travaux concernant les bactéries étant à l'inverse abondants, la réflexion a été axée - par analogie - sur l'étude des biofilms bactériens et les mécanismes supposés d'adhésion microbienne.

#### **I.3.1. Formation d'un biofilm**

Étudier les interactions des algues et des cyanobactéries avec un matériau revient à considérer la formation de biofilms sur des surfaces inertes. Toutes les surfaces terrestres, aériennes et surtout aquatiques, supportent le développement de communautés de micro-organismes. Bien que la composition des biofilms soit fonction des écosystèmes où ils se développent, leur formation suit toujours le même processus (Figure 3) :

- formation d'un film organique - appelé film conditionnant - par adsorption d'ions et de molécules organiques sur la surface inerte (A),
- transport vers la surface inerte des micro-organismes et co-agrégation des micro-organismes entre eux (B),

- adhésion réversible des micro-organismes et co-agrégats (C et D),
- co-adhésion de micro-organismes entre eux (E),
- adhésion de manière irréversible des micro-organismes à la surface par sécrétion d'exopolymères ou initiation d'interactions spécifiques (F).

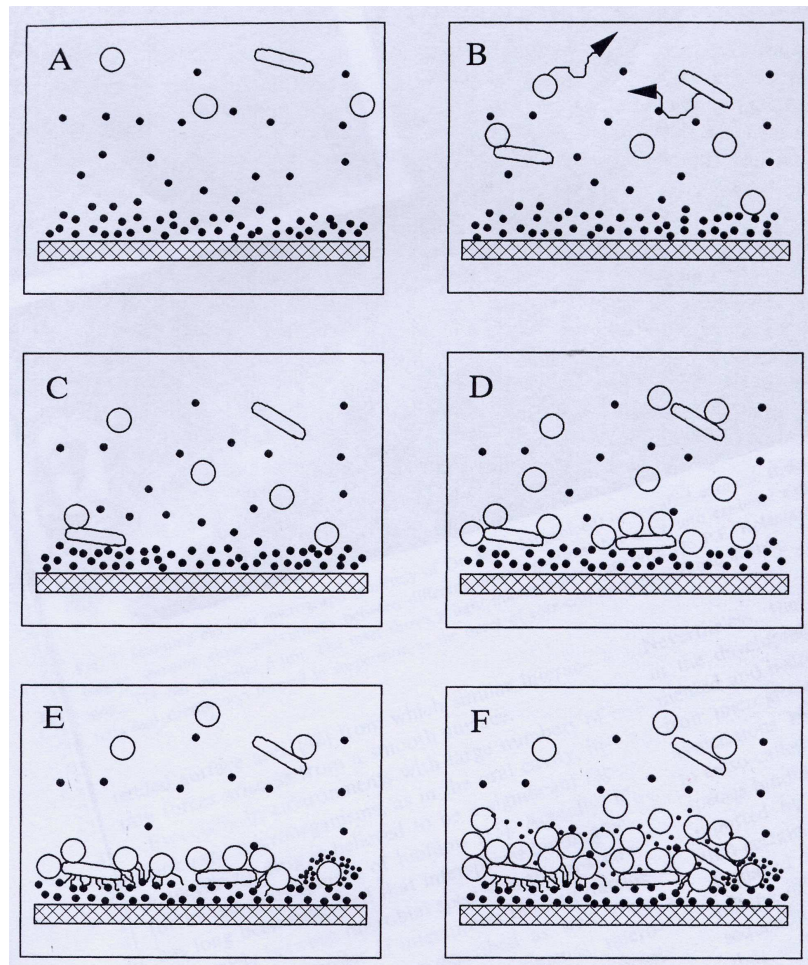


Figure 3. Représentation schématique des étapes de la formation d'un biofilm (BOS et al. 1999); ● : particules, ions ou molécules organiques; ○, ○ : micro-organismes.

En milieux aqueux, les surfaces inertes sont rapidement recouvertes d'un film conditionnant avec lequel les micro-organismes interagissent lorsqu'ils entrent en contact avec la surface (COSTERTON & LAPPIN-SCOTT 1995). Des études ont montré que la présence d'un tel film favorisait l'adhésion de bactéries (RUBIO 2002). Cependant, bien que les revêtements de façade soient régulièrement humidifiés par ruissellement d'eau de pluie, l'éventualité de la formation d'un film conditionnant en milieu aérien est incertaine.

Quand les micro-organismes approchent de la surface, ils établissent un contact primaire par le biais d'appendices, d'interactions spécifiques (interaction entre une molécule de la cellule et un groupement chimique de la surface) ou d'interactions non spécifiques (interactions indifférenciées de toutes les molécules de la cellule avec la surface) par sécrétion d'exopolymères (COSTERTON & LAPPIN-SCOTT 1995). Leur développement, lié à la production de polymères, favorise ensuite l'établissement d'autres communautés de micro-organismes. L'ensemble des organismes et des sécrétions qui accompagnent leur croissance est appelé un biofilm.

### I.3.2. Modèles de prédiction de l'adhésion

Deux approches dérivées de la physico-chimie des interfaces ont été adaptées à l'interprétation de l'adhésion microbienne : l'approche thermodynamique et la théorie DLVO (ainsi nommée d'après ses auteurs Deryaguin, Landau, Verwey et Overbeek), établie en 1948 pour décrire la stabilité de colloïdes chargés. Bien que les micro-organismes soient structurellement et chimiquement plus complexes que la plupart des surfaces inertes, l'utilisation de la combinaison de ces approches permet l'interprétation de tendances adhésives entre un micro-organisme et une surface.

#### *L'approche thermodynamique*

Selon cette approche, les surfaces qui entrent en contact sont supposées interagir l'une avec l'autre en conditions d'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire dans le cas d'une adhésion réversible. L'approche thermodynamique décrit l'adhésion d'un micro-organisme à une surface comme étant fonction des interactions attractives de Lifshitz-van der Waals\* et des interactions acide-base de Lewis\*, mais n'inclue pas de rôle spécifique pour les interactions électrostatiques\*.

Les énergies libres interfaciales sont comparées avant et après l'adhésion. La variation d'énergie libre d'adhésion  $\Delta G_{adh}$  est ainsi décrite par l'équation de Dupré (BOS et al. 1999) :

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sm} - \gamma_{sl} - \gamma_{ml},$$

où  $\gamma_{sm}$ ,  $\gamma_{sl}$  et  $\gamma_{ml}$  sont respectivement les énergies libres des interfaces surface/micro-organisme, surface/liquide et micro-organisme/liquide, schématisées par la figure 4. Selon cette approche, l'adhésion est favorable d'un point de vue énergétique quand  $\Delta G_{adh} < 0$ .

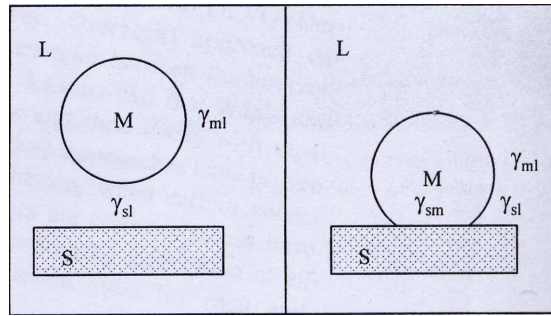


Figure 4. Représentation schématique des énergies libres d'interface  $\gamma_{sm}$ ,  $\gamma_{sl}$  et  $\gamma_{ml}$  intervenant dans l'adhésion d'un micro-organisme (M) à une surface solide (S) au sein d'un milieu liquide (L) (BOS et al. 1999).

Selon VAN OSS et al. (1988), la détermination approximative des énergies libres interfaciales (ou tensions de surfaces<sup>\*</sup>) nécessite de mesurer les angles de contact à la surface d'une couche de micro-organismes et de la surface solide sur laquelle ils vont interagir, à l'aide de trois solvants différents.

### ***La théorie DLVO***

Cette approche décrit les énergies d'interaction entre un micro-organisme et une surface, en fonction des interactions attractives de Lifshitz-van der Waals et des interactions électrostatiques, attractives ou répulsives en fonction des charges de surface des deux entités. Les effets de ces interactions diminuent en fonction de la distance et dépendent de la géométrie des micro-organismes (HERMANSSON 1999). En outre, les interactions électrostatiques découlant du recouvrement des doubles couches électroniques de la cellule et du substrat, leurs effets diminuent quand la force ionique de la solution augmente, suite au masquage des charges de surface. L'exploitation de cette théorie nécessite donc, en plus des mesures d'angles de contact, l'évaluation du potentiels zêta<sup>\*</sup> des entités interagissantes.

### ***La théorie X-DLVO***

Comme ni l'approche DLVO, ni l'approche thermodynamique ne pouvaient expliquer pleinement l'adhésion de micro-organismes, une extension de la théorie DLVO fut proposée par VAN OSS et al. (1986). Celle-ci prend notamment en compte les interactions hydrophobes qui sont très importantes dans les processus d'adhésion, et découlent des interactions polaires de Lewis. Nommée théorie X-DLVO, cette approche inclut donc, à l'interprétation DLVO classique, les interactions acide-base de Lewis et les forces de mouvement brownien<sup>\*</sup>. Cette approche est considérée comme une combinaison des approches thermodynamique et DLVO

(BOS et al. 1999) et est couramment utilisée pour décrire l'adhésion de micro-organismes à une surface (AZEREDO et al. 1999, HERMANSSON 1999, SHARMA & HANUMANTHA RAO 2003). Toutefois, les micro-organismes sont capables de produire des structures extracellulaires spécifiques, telles que des flagelles\* ou des substances polymères visibles au niveau de la paroi, qui favorisent leur adhésion à une surface et ne sont pourtant pas prises en compte par les théories précédemment décrites.

### **I.3.3. Paramètres influençant l'adhésion**

Si quelques articles traitent du comportement adhésif de spores de macro-algues, la majorité des résultats obtenus est basée sur l'étude de bactéries et de levures. Différents paramètres semblent ainsi influencer l'adhésion de ces micro-organismes à un substrat :

#### ***La topographie du substrat***

Ainsi, CALLOW et al. (2002) ont montré que l'adhésion de spores d'*Enteromorpha* pouvait être contrôlée par la topographie de la surface. Des clichés en microscopie électronique montrent en effet clairement les spores adhérant dans les sillons créés par la surface microtexturée, les abritant ainsi du flux d'eau. Selon BOS et al. (1999), GALLARDO-MORENO et al. (2004) et TERADA et al. (2005), l'adhésion de levures et de bactéries est également favorisée par la rugosité du support.

#### ***La composition chimique du substrat***

Pour de nombreux auteurs, la tension de surface est un paramètre fondamental dans beaucoup de processus d'adhésion. Généralement, l'adhésion est plus forte sur les surfaces à faible énergie (BUSSCHER et al. 1989, BECKER 1998, EVERAERT et al. 1998, ROOSJEN et al. 2005, TERADA et al. 2005), bien que l'inverse ait également été observé, notamment en milieu marin (CALLOW & FLETCHER 1994, TSIBOUKLIS et al. 1999, YOUNGBLOOD et al. 2003). BERGLIN & GATENHOLM (2003) ont également noté que la composition du polymère adhésif sécrété par les balanes\* pouvait être adaptée à la tension de surface du substrat.

Plus particulièrement, l'adhésion des micro-organismes est souvent plus forte sur des surfaces hydrophobes\* (STENSTRÖM 1989, BOS et al. 2000, GRIVET et al. 2000, FINLAY et al. 2002a, FINLAY et al. 2002b, TEGOULIA & COOPER 2002, GALLARDO-MORENO et al. 2004, CERCA et al. 2005, TEIXEIRA et al. 2005) et sur des surface ioniques (RASMUSSEN & OSTGAARD 2003,

LEE et al. 2005), suggérant l'intervention d'interactions hydrophobes et électrostatiques dans le contact adhésif (TERADA et al. 2005).

### ***Les caractéristiques de surface des micro-organismes***

L'adhésion des micro-organismes dépend des propriétés physico-chimiques de surface qui leur sont propres. Ainsi, GRIVET et al. (2000) ont montré que la modification des caractéristiques énergétiques de surface de certaines bactéries modifiait leur adhésion. STENSTRÖM (1989), GRIVET et al. (2000), BRUINSMA et al. (2001) et TEIXEIRA et al. (2005) ont par ailleurs observé que les bactéries à caractère hydrophobe adhéraient plus que les bactéries hydrophiles\*, et que leur adhésion était favorisée sur surface hydrophobe.

Outre les caractéristiques énergétiques de surface, les micro-organismes produisent des structures extracellulaires qui favorisent l'adhésion. Ainsi, si les bactéries possèdent des appendices tels que des flagelles et des pili\*, connus pour intervenir dans le processus d'adhésion, la majorité des algues et des cyanobactéries n'en possèdent, *a priori*, pas. En revanche, selon COSTERTON & LAPPIN-SCOTT (1995), l'adhésion d'un micro-organisme à une surface entraîne l'expression d'enzymes qui provoquent la production d'exopolysaccharides nécessaires à la consolidation de l'adhésion et à la formation d'un biofilm.

### ***La composition du milieu d'étude***

La qualité du milieu dans lequel vont s'effectuer les essais d'adhésion *in vitro* peut également affecter le comportement des micro-organismes. Ainsi, des facteurs tels que la composition ionique, la viscosité, le pH, la tension de surface, l'osmolarité ou encore la présence de composés chimiques antagonistes\* ou agonistes\* dans la solution peuvent influencer la capacité du micro-organisme à adhérer à une surface. En outre, le milieu ne doit pas induire une modification de surface de l'organisme ou du substrat au cours de l'essai (HAZEN & GLEE 1995). Le milieu d'étude doit donc être choisi de façon à reproduire le milieu naturel dans lequel s'effectue l'adhésion étudiée.

## **I.3.4. Méthodes d'évaluation**

Plusieurs systèmes expérimentaux permettent d'étudier l'adhésion de micro-organismes à des surfaces. La sélection d'une méthode particulière dépend donc de son aptitude à modéliser les conditions environnementales réelles du processus. Cette sélection dépend également du coût

du matériel et de la facilité de mise en œuvre des expériences. Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont les suivantes.

### ***MATS (Microbial Adhesion To Solvents)***

Cette méthode, développée par BELLON-FONTAINE et al. (1996), dérive de la méthode 'Microbial Adhesion To Hydrocarbons' (MATH) mise au point par ROSENBERG et al. (1983). L'essai MATH permet l'étude des caractéristiques de surface de micro-organismes en évaluant leur extraction de l'eau par des hydrocarbures. Cette méthode modélise ainsi l'adhésion des micro-organismes à une surface hydrophobe. L'essai MATS permet en outre l'évaluation de l'importance d'interactions acide-base dans le processus d'adhésion, en étudiant l'extraction des micro-organismes par des solvants organiques de propriétés physico-chimiques connues. Selon le principe de l'essai MATS, une suspension de micro-organismes est vortexée\* en présence d'une faible quantité de solvants polaires et apolaires. Les gouttelettes de solvant ainsi créées servent de milieu d'extraction des micro-organismes, ce qui permet d'évaluer leur affinité pour ces solvants. Les phases aqueuses et organiques sont ensuite laissées au repos et la mesure de leur turbidité permet d'évaluer la quantité de micro-organismes extraits dans les différentes phases organiques. Cette méthode rapide et peu coûteuse est intéressante car elle permet une évaluation directe des caractéristiques de surface des micro-organismes.

### ***Microscopie à force atomique***

La microscopie à force atomique rend possible l'étude de l'adhésion de micro-organismes à une surface déterminée. Ainsi, le cantilever\* d'un microscope à force atomique peut être fonctionnalisé afin de modéliser le type de surface à étudier. À titre d'exemple, la figure 5 schématise un cantilever modifié afin de pouvoir établir une liaison ligand-récepteur spécifique. Son extrémité est approchée de la cellule du micro-organisme, et une fois le contact établi, le cantilever est éloigné. La force nécessaire à son retrait permet d'évaluer la force correspondant à la rupture des liaisons établies. Cette méthode assez récente a été notamment utilisée pour étudier le comportement de bactéries et de spores de macro-algues (CALLOW et al. 2000a, FANG et al. 2000, DUFRENE et al. 2001, VADILLO-RODRIGUEZ et al. 2004, VADILLO-RODRIGUEZ et al. 2005). Cependant, ces expériences sont assez sensibles et nécessitent de disposer d'un microscope à force atomique, très coûteux.



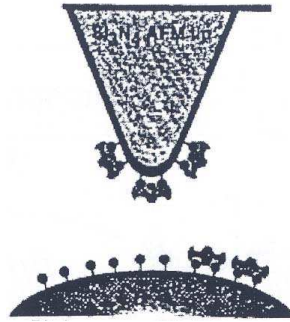


Figure 5. Formation d'interactions spécifiques entre le cantilever d'un microscope à force atomique, fonctionnalisé avec des ligands, et une surface fonctionnalisée avec des récepteurs spécifiques (MOY et al. 1994).

### *Adhésion sur surfaces plongées dans une culture*

Cette catégorie regroupe les essais au cours desquels une surface de verre (lame de microscope, billes) ou d'un autre matériau est plongée dans une culture de micro-organismes pendant un certain temps. Les surfaces sont généralement ensuite rincées sous un filet d'eau afin d'emporter les cellules faiblement attachées. Les organismes adhérant sont ensuite dénombrés par des techniques classiques d'analyse d'images, de marquage par fluorescence ou par radioactivité, ou encore par mesure de la demande chimique en oxygène (HAZEN & GLEE 1995, CALLOW et al. 1997, BOS et al. 1999, CALLOW et al. 2000b, CALLOW et al. 2002, SEKAR et al. 2004). Cette technique est intéressante car elle permet l'évaluation de nombreuses surfaces. Par ailleurs, les surfaces de verre peuvent être modifiées chimiquement ou être préalablement conditionnées par un film organique (BOS et al. 1999). Cette méthode est également rapide et peu coûteuse. Cependant, son défaut majeur est qu'elle ne permet pas l'étude de l'adhésion en conditions hydrodynamiques contrôlées.

### *Adhésion en cellules de flux*

Le principe des cellules de flux réside en l'étude de l'adhésion sur des surfaces en conditions hydrodynamiques et de transport de masse contrôlées, grâce à la maîtrise de paramètres tels que le cisaillement à la surface du substrat et le débit de fluide imposé. Ainsi, plusieurs types de cellules ont été mises au point :

- **le système annulaire rotatif** (Figure 6) : une culture de micro-organismes est introduite dans un réacteur annulaire rotatif, dans lequel sont placées les surfaces à étudier. Les surfaces sont ensuite extraites du réacteur après quelques heures d'expérience et les micro-organismes adhérant sont dénombrés (RASMUSSEN & OSTGAARD 2003).

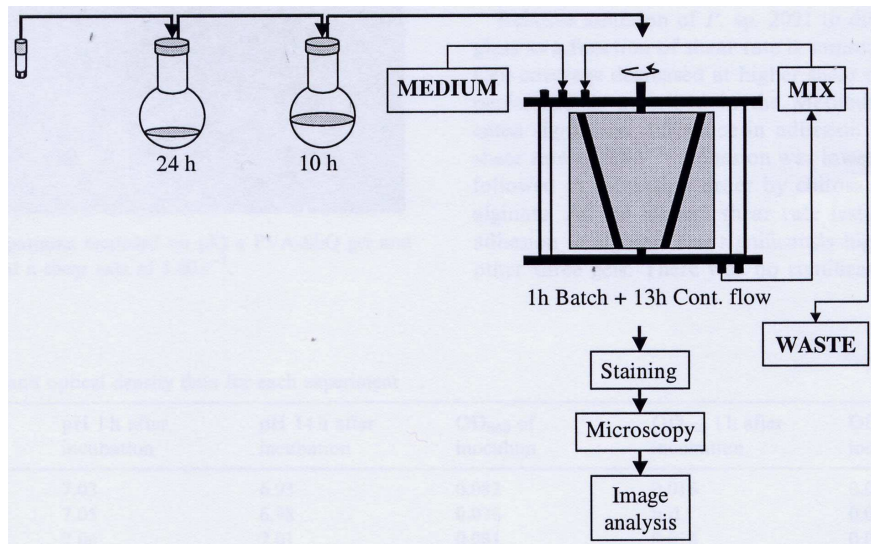


Fig 6. Représentation schématique d'un système annulaire rotatif; les surfaces à étudier au sein du réacteur sont symbolisées par les traits noirs (RASMUSSEN & OSTGAARD 2003).

- **la cellule à point de stagnation** : une suspension de micro-organismes est amenée *via* un conduit de section circulaire au contact de la surface à étudier, placée perpendiculairement à l'orifice du conduit. Le fluide s'écoule alors de part et d'autre du point de stagnation, situé en face du centre du conduit, zone où le débit est nul (Figure 7). Après circulation de la suspension de micro-organismes à un débit et pendant un temps donnés, les organismes adhérant dans la zone de stagnation sont dénombrés (ADAMCZYK et al. 1999, YANG et al. 1999, BAKKER et al. 2003).

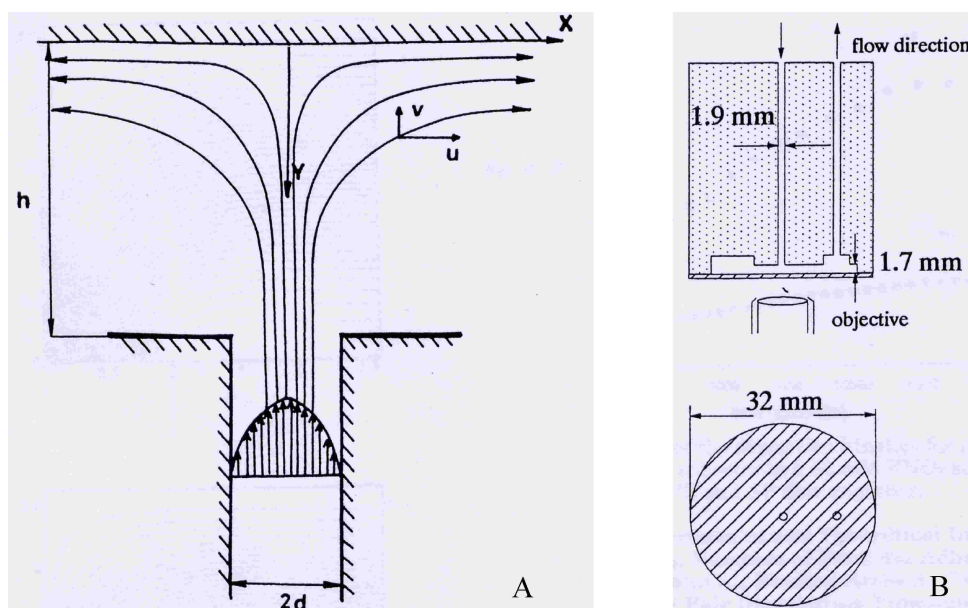


Figure 7. Représentations schématiques de cellules à point de stagnation. A : ADAMCZYK et al. (1999), B : haut = vue en coupe, bas = vue de dessus (YANG et al. 1999).

- **la cellule à flux radial** : ce système permet l'analyse de l'adhésion de micro-organismes en fonction de conditions variées de flux (et donc de cisaillement), ceci en une seule expérience (BAUMGARTNER et al. 1997, BECKER 1998, TEGOULIA & COOPER 2002). Ainsi, la suspension de micro-organismes est introduite au centre d'une cellule en anneau et circule radialement vers l'extérieur pour être évacuée. Le taux de cisaillement varie ainsi inversement avec la distance radiale de la cellule, le flux du liquide introduit diminuant au fur et à mesure qu'il s'éloigne du centre de la cellule. Selon le dispositif utilisé, l'adhésion d'organismes à une même surface peut être étudiée à des débits variés, sur une seule surface (Figure 8, A) ou sur différentes surfaces (Figure 8, B).

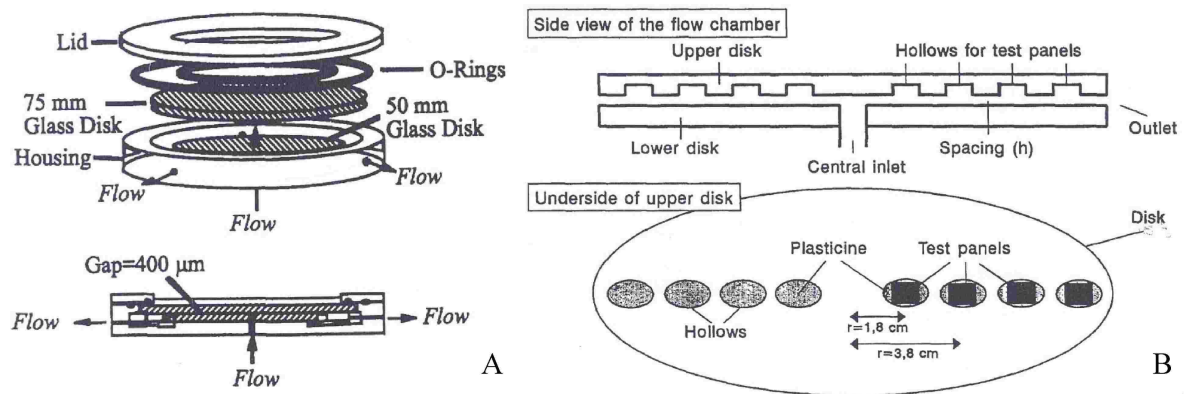


Figure 8. Représentations schématiques de cellules à flux radial. A : TEGOULIA & COOPER (2002), B : BECKER (1998).

- **la cellule à flux turbulent** : ce système, développé par SCHULTZ et al. (2000), permet l'étude de l'adhésion de micro-organismes dans des conditions de flux turbulent. Cette technique a d'ailleurs été utilisée pour évaluer l'adhésion de spores de macro-algues ou de diatomées sur diverses surfaces, sous un régime simulant le flux turbulent auxquelles sont assujetties les coques de bateaux (SCHULTZ et al. 2000, CALLOW et al. 2002, FINLAY et al. 2002a, FINLAY et al. 2002b, YOUNGBLOOD et al. 2003). Le dispositif détaillé en figure 9 permet d'atteindre des débits de l'ordre de  $0,4$  à  $3 \text{ m s}^{-1}$ , donnant des nombres de Reynolds d'environ 2800 à 27000, bien supérieurs à la limite du flux laminaire. Le principe est le suivant : un flux turbulent contenant les cellules de micro-organismes circule sur les surfaces à étudier; après un temps donné, les cellules qui adhèrent sont dénombrées.

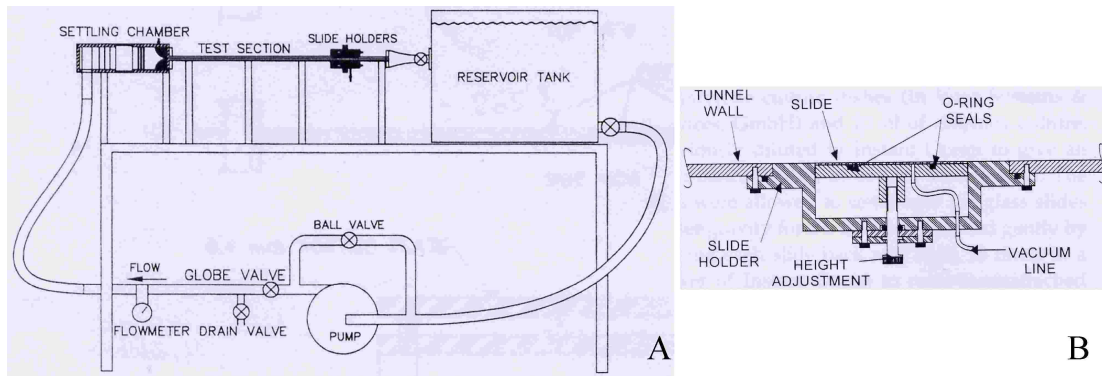
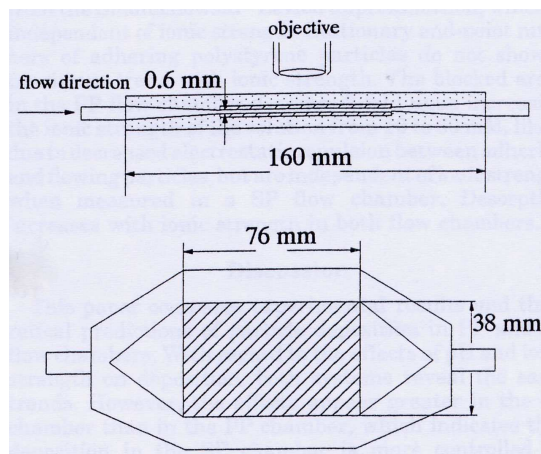


Figure 9. Représentation schématique d'une cellule à flux turbulent. A : dispositif complet, B : principe d'exposition de la lame au flux (SCHULTZ et al. 2000).

- **la cellule à flux laminaire** : ce dispositif est couramment utilisé pour étudier l'adhésion de micro-organismes (ADAMCZYK & VAN DE VEN 1981, SJOLLEMA et al. 1989, BUSSCHER et al. 1990, BROOKS & TOZEREN 1996, MORISAKI et al. 1996, LÜTHI & RICKA 1998, ADAMCZYK et al. 1999, MILLSAP et al. 1999, WIT et al. 1999, YANG et al. 1999, ZINN et al. 1999, MILLSAP et al. 2000, BRUINSMA et al. 2001, GÖRANSSON & TRÄGÅRDH 2002, BAKKER et al. 2003, MERCIER-BONIN et al. 2004, ROOSJEN et al. 2005). Les surfaces à étudier sont généralement des lames de microscope fonctionnalisées, c'est-à-dire dont la surface a été modifiée par voie chimique. Les lames sont placées au niveau inférieur d'une cavité rectangulaire (Figure 10), puis les expériences peuvent être réalisées de deux façons. Selon le mode le plus étudié, un certain volume de suspension de micro-organismes est introduit dans la cavité, et les organismes sont laissés à sédimenter et à adhérer sur les lames pendant un certain temps. Un flux d'eau est ensuite appliqué afin de les décrocher. On peut également étudier l'attachement des micro-organismes. Dans ce cas, une suspension de micro-organismes soumise à un régime d'écoulement laminaire, vient circuler à la surface des lames pendant un temps donné, puis les organismes adhérant sont dénombrés.



← Figure 10. Représentation schématique d'une cellule à flux laminaire : haut = vue en coupe, bas = vue de dessus (YANG et al. 1999).

L'inconvénient des évaluations d'adhésion de micro-organismes en cellules de flux est lié à la nécessité de mettre au point l'appareillage, puis de confier sa fabrication à un atelier spécialisé, ce qui est souvent coûteux. Cependant, une fois que le laboratoire dispose de l'appareillage, les essais peuvent être menés dans des conditions contrôlées, de manière rapide et reproductible.

D'autres méthodes ont également été développées pour évaluer la croissance de micro-organismes sur des matériaux de construction. L'humidité étant le facteur prépondérant pour le développement biologique, les méthodes suivantes diffèrent principalement par le mode d'humidification des matériaux.

### ***Essai en boîte de Pétri***

Cette méthode consiste à placer la surface à évaluer sur un milieu de culture additionné d'agar, puis àensemencer le tout par une culture de micro-organismes. On évalue ensuite le développement des organismes, sur la gélose et sur la surface à évaluer (Figure 11). Cette méthode, développée par HUECK & ADEMA (1967) et RUSCH et al. (1977) est encore communément utilisée pour l'évaluation rapide de matériaux ou de substances actives. Par ailleurs, les essais en boîte de Pétri sont bons marché et faciles à mettre en œuvre.

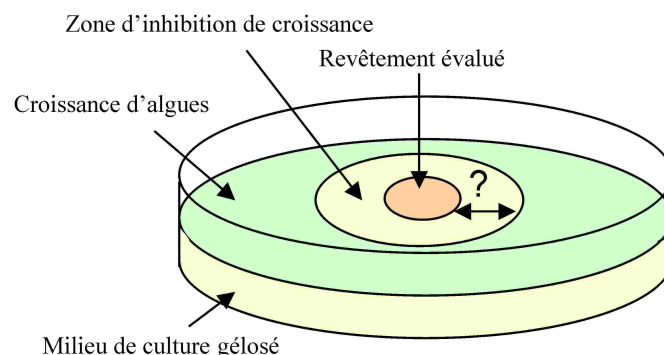


Figure 11. Essai de colonisation de matériaux par des algues, en boîte de Pétri.

### ***Essai d' humidification par condensation***

Cette méthode a été développée par SKINNER (1972) et par SPRINGLE (1975) pour évaluer la colonisation par des micro-organismes de films de peinture contenant des biocides. Les peintures sont ainsi appliquées sur des tubes de verre puis inoculées par pulvérisation d'une



culture de micro-organismes (Figure 12). Les conditions de l'essai sont propices au développement biologique et un gradient de température est appliqué de part et d'autre de la paroi des tubes, afin d'assurer une condensation sur les revêtements étudiés. Le recouvrement biologique des matériaux est évalué visuellement. Puisque les revêtements à évaluer doivent être appliqués sur des tubes de verre, l'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle n'est pas transposable à l'étude de matériaux plus épais, comme des mortiers.

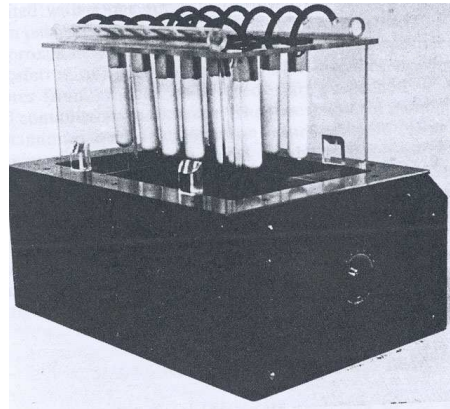


Figure 12. Essai de colonisation de peintures humidifiées par condensation (SKINNER 1972).

#### ***Essai d' humidification par capillarité***

Cette méthode, également nommée "lit de vermiculite", consiste à placer des éprouvettes de matériaux sur une couche de vermiculite humidifiée contenue dans une boîte étanche (Figure 13). Les matériaux s'humidifient ainsi par capillarité. Un inoculum d'algues est ensuite répandu par spray à la surface des éprouvettes, puis le développement des micro-organismes est évalué visuellement ou par analyse d'image. Cette méthode, initialement développée par GRANT & BRAVERY (1985a, 1985b), a ensuite été appliquée à l'évaluation du comportement de peintures contenant des biocides (GILLATT 1991) mais également de mortiers (DUBOSC 2000). Ses avantages consistent en sa simplicité et son faible coût.



← Figure 13. Essai de colonisation de matériaux de construction humidifiés par capillarité, sur lit de vermiculite (DUBOSC 2000).

### ***Essai en chambre à humidité saturée***

Selon cette méthode, les matériaux à évaluer sont placés dans un caisson étanche dont l'atmosphère est saturée en humidité (Figure 14). Les éprouvettes sont inoculées par spray ou par dépôt de quelques gouttes d'une culture de micro-organismes. Placées dans le caisson, les éprouvettes s'humidifient uniquement par absorption de l'humidité de l'air. Le développement biologique est généralement évalué visuellement ou par analyse d'image après un à deux mois d'expérience (OHSHIMA et al. 1999).

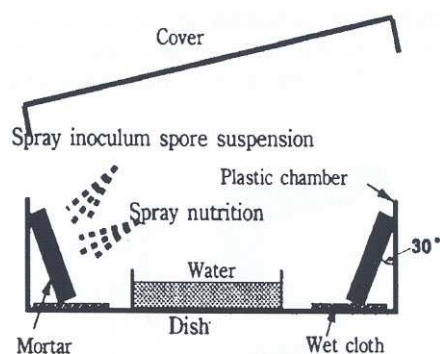


Figure 14. Essai de colonisation de matériaux de construction placés dans un caisson à humidité saturée (OHSHIMA et al. 1999).

### ***Essai d'humidification intermittente par brumisation***

Cette méthode, développée par DUBOSC (2000), permet l'humidification d'éprouvettes de matériaux de construction par brumisation d'eau liquide. Les éprouvettes, préalablement inoculées par dépôt d'une culture de micro-organismes à leur surface, sont ainsi placées dans une enceinte étanche, où elles subissent des cycles de brumisation d'eau (Figure 15). L'essai dure un à deux mois et le développement biologique peut être évalué visuellement ou par analyse d'image. Le principe de brumisation intermittente sur les éprouvettes, qui induit un ruissellement d'eau à leur surface, s'apparente déjà plus à l'humidification d'une façade par ruissellement d'eau de pluie.



Figure 15. Essai de colonisation de matériaux de construction par brumisation (DUBOSC 2000).

### *Essai d'humidification par ruissellement d'eau*

Cette dernière méthode est basée sur le principe d'humidification de matériaux par ruissellement d'eau à leur surface, ce mode d'humidification étant identique à celui de façades lorsqu'il pleut. Dans le dispositif développé par GUILLITTE (1993) et par GUILLITTE & DREESEN (1995), les éprouvettes de matériaux sont placées verticalement sur un support et une culture de micro-organismes vient ruisseler à leur surface à intervalle régulier, avant d'être récupérée dans un bac externe. Le dispositif ainsi développé est imposant (plusieurs m<sup>2</sup>) et n'est pas placé dans une enceinte close. Les conditions de stérilité des cultures ne sont donc pas assurées et l'humidité relative régnant à proximité des éprouvettes est assez faible d'où une durée d'essai pouvant aller jusqu'à six mois (Figure 16).

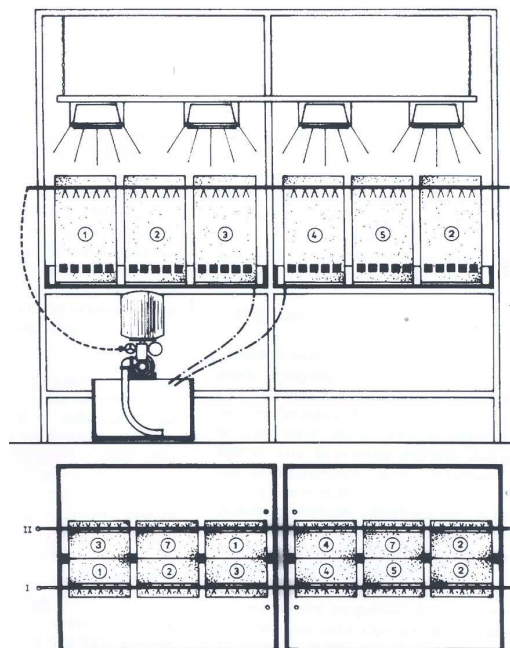


Figure 16. Dispositif d'évaluation de la colonisation de matériaux de construction par ruissellement d'eau (GUILLITTE 1993).



Un dispositif moins encombrant a ensuite été mis au point par BOULON (ITECH, Lyon) puis repris par DUBOSC (2000) et par DUBOSC et al. (2001). Dans cet équipement, les éprouvettes de matériaux sont inclinées à 45° afin d'accélérer le processus de colonisation. Le bâti est placé dans un caisson clos permettant le maintien d'une humidité relative élevée, favorable au développement biologique. Une culture de micro-organismes, contenue dans le fond du caisson, vient arroser les éprouvettes à intervalle régulier (Figure 17). Après un à deux mois d'expérience, le développement biologique est évalué par analyse d'image. Bien que ne permettant pas d'effectuer les essais en conditions stériles, ce dispositif permet d'évaluer simultanément une vingtaine d'éprouvettes de matériaux de construction selon le processus de colonisation naturel observé en façades. Cependant, l'acquisition du matériel est coûteuse.

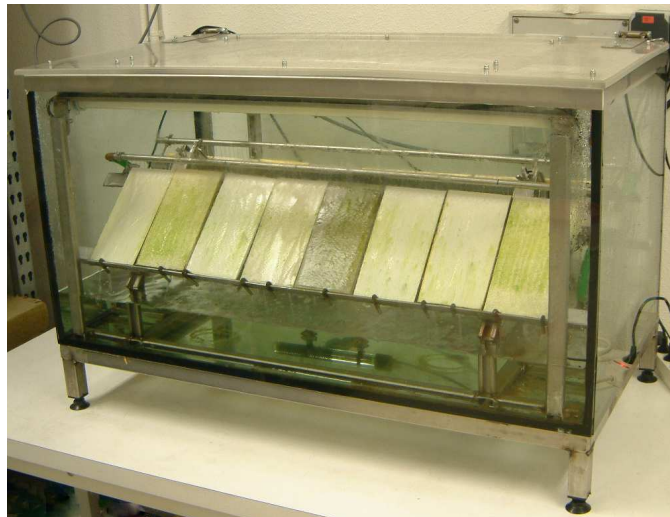


Figure 17. Banc d'essai par ruissellement d'eau en cours de fonctionnement (CSTB).

#### **I.4. Contexte dans lequel se place l'étude**

L'implantation de micro-organismes sur le revêtement de façade d'un bâtiment induit donc assez rapidement une dégradation de son aspect et, à plus long terme, une dégradation mécanique du revêtement colonisé. Si les bactéries sont les organismes pionniers de cette colonisation, ce sont véritablement les algues et les cyanobactéries qui sont responsables de l'aspect visuel des salissures. Par ailleurs, ces micro-organismes provoquent en s'établissant l'implantation d'une communauté nocive pour le matériau. Cet établissement peut être limité par l'ajout de substances biocides aux revêtements. Cependant, les biocides n'ont pas une activité pérenne. Par ailleurs, l'utilisation de tels produits doit répondre à des critères strictes

vis-à-vis de leur toxicité et de leur écotoxicité. Depuis la "Directive Produit Biocide" (DPB)<sup>4</sup>, qui soumet à réglementation la mise sur le marché Européen des produits biocides, de nombreuses substances risquent prochainement de ne plus pouvoir être incorporées aux revêtements de façade. Il importe donc de développer de nouveaux revêtements respectueux de l'environnement qui permettraient de lutter efficacement et de façon durable contre l'implantation de micro-organismes. Une connaissance plus approfondie des micro-organismes concernés, des facteurs qui favorisent leur implantation et de leurs mécanismes d'adhésion à une surface devrait donc permettre d'orienter le développement de matériaux vers de nouvelles voies de recherche cherchant à inhiber le système de fixation des micro-organismes.

Les matériels et les méthodes utilisés pour traiter cette étude sont tout d'abord présentés dans le **chapitre II**.

Disposant de peu de données sur la nature des colonisateurs de façade en France, un échantillonnage de revêtements colonisés a tout d'abord permis d'identifier les micro-organismes s'y développant. Les résultats de ce travail sont présentés dans le **chapitre III**.

Par ailleurs, l'exploitation statistique des données environnementales relevées au cours des prélèvements a permis de confirmer l'importance des paramètres géographiques et architecturaux sur l'implantation des algues et des cyanobactéries. L'évaluation de la colonisation d'une sélection de matériaux de façade par quelques souches d'algues et de cyanobactéries a, par ailleurs, pu être réalisée grâce à un banc d'essai par ruissellement d'eau, optimisé au CSTB. Enfin, l'adhésion de trois souches d'algues sur des surfaces modèles a été étudiée à l'aide d'une cellule à flux laminaire, mise à disposition par la société Rhodia. Ces résultats font l'objet du **chapitre IV**.

Enfin, le **chapitre V** tente d'éclaircir le rôle joué par les polymères sécrétés par les micro-organismes, lors de l'étape d'adhésion à une surface.

La majorité des résultats sont communiqués sous forme d'articles qui constituent le corps des chapitres III, IV et V.

---

<sup>4</sup> Directive n° 98/8/CE du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne du 16/02/98.

---

## II. Matériels et méthodes

---

### II.1. Techniques de microbiologie

#### II.1.1. Milieux de culture

Pour plus de commodité, les souches d'algues et de cyanobactéries sont cultivées sur un milieu unique, le milieu Bold de base. La recette utilisée au laboratoire est simplifiée car elle nécessite uniquement la préparation de trois solutions mères (Tableau 2). Ces solutions, une fois stérilisées à 120 °C pendant 20 min, peuvent être conservées quelques mois à 4°C. Pour préparer 1 L de milieu de culture liquide, 10 mL de solutions A et B et 1 mL de solution trace sont ajoutés à 1 L d'eau désionisée. La solution est ensuite stérilisée en autoclave à 120 °C pendant 20 min. Pour préparer 1 L de milieu de culture "solide", 10 mL de solutions A et B, 1 mL de solution trace et 12 g d'agar (Agar washed, Sigma) sont ajoutés à 1 L d'eau désionisée. La solution est ensuite stérilisée à 120 °C pendant 20 min. Une fois refroidie, environ 20 mL de milieu encore liquide sont coulés dans des boîtes de Pétri, au voisinage immédiat de la flamme d'un bec Bunsen, afin de conserver un environnement stérile. Une fois la gélose refroidie, les boîtes peuvent être utilisées immédiatement ou entreposées pour une courte période afin d'éviter toute contamination.

Tableau 2. Composition des solutions mères du milieu Bold de base.

	Produit	Concentration (g L <sup>-1</sup> )
Solution A	NaNO <sub>3</sub>	25
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,5
	Fe EDTA	2
Solution B	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5
	NaCl	2
Solution trace	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,4
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,8
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,02
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08
	CoNO <sub>3</sub>	0,09
	VO <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,43

### II.1.2. Isolement et repiquages

Les isolements des algues et des cyanobactéries sont effectués à partir de fragments de prélèvement placés sur du milieu de culture "solide". Quand les micro-organismes commencent à se développer, ils sont isolés par la "méthode de la plaque striée" pour obtenir des cultures uni-algales, ou par prélèvement d'une portion de gélose et ensemencement d'une nouvelle boîte, dans le cas de cyanobactéries (Figure 18). L'ensemencement d'une souche en milieu liquide est réalisé par prélèvement d'un échantillon de micro-organismes à la pointe d'une «ose d'inoculation\*», qui est ensuite plongée dans le milieu liquide. Toutes ces manipulations s'effectuent au voisinage immédiat d'une flamme de bec Bunsen afin d'éviter les risques de contamination.

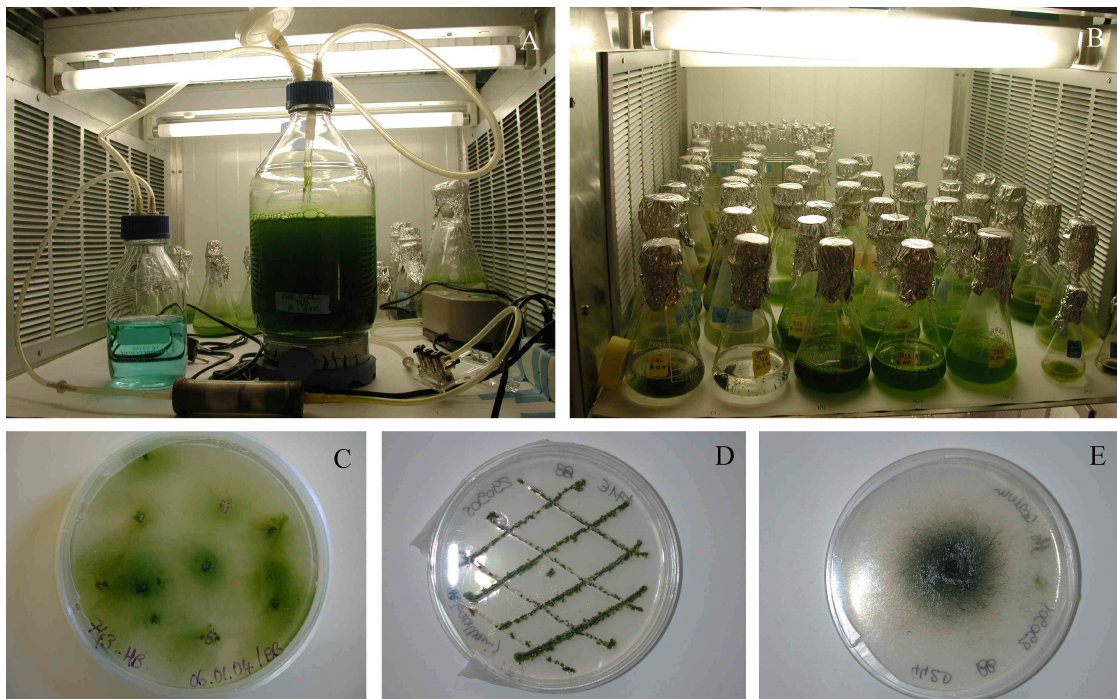


Figure 18. Souches d'algues et de cyanobactéries. A : culture liquide de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B sous bullage d'air et agitation magnétique; B : cultures liquides en fioles d'Erlenmeyer; C : développement d'algues et de cyanobactéries à partir de fragments de revêtements; D et E : ensemencement d'une souche d'algue (D) et de cyanobactérie (E) sur milieu solide.

### II.1.3. Conditions de culture

Les souches d'algues et de cyanobactéries utilisées pour le fonctionnement du banc d'essai par ruissellement d'eau sont cultivées dans des flacons de 2 L soumis à un bullage d'air, sous

agitation magnétique : l'air ambiant pompé circule dans une solution de  $\text{CuSO}_4$   $15 \text{ g L}^{-1}$  afin d'en éliminer les spores éventuellement présentes, puis est injecté dans la culture *via* un fritté en verre. Les souches utilisées pour les autres analyses, conservées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 mL munies de bouchons en coton cardé, sont agitées manuellement plusieurs fois par semaine (Figure 18). Ces cultures sont placées dans une chambre de culture (Setric Genie Industriel) climatisée à  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  où elles sont soumises à une intensité lumineuse (lumière blanche de qualité Cool White, tubes fluorescents OSRAM 18 W) de  $15 \pm 3 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPF (Photosynthetic Photon Flux) selon une photopériode de 16 h/8 h éclairage/obscurité. Les souches conservées sur du milieu "solide" sont entreposées dans l'algothèque, soumises à une intensité lumineuse d'environ  $30 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPF selon une photopériode de 16 h/8 h éclairage/obscurité. Les intensités lumineuses sont évaluées à l'aide d'un quantamètre LI-250 (LI-COR) muni d'un capteur plat.

#### **II.1.4. Dosage des algues et des cyanobactéries**

La concentration des souches étudiées dans le banc d'essai par ruissellement d'eau est évaluée par mesure de la masse sèche et par turbidité, des corrélations étant ensuite effectuées entre ces deux méthodes. En routine, l'évaluation de la turbidité d'une culture permet ainsi aisément d'obtenir son équivalence en poids sec.

##### ***Masse sèche***

Un volume connu de culture d'algues ou de cyanobactéries est filtré sur des membranes en microfibre de verre de porosité  $1,2 \text{ } \mu\text{m}$  (Whatman GF/C). Ces filtres sont ensuite séchés à  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 3 h, et la masse correspondant aux micro-organismes secs est ensuite déterminée et rapportée au volume filtré. La masse sèche est exprimée en  $\text{mg mL}^{-1}$ .

##### ***Turbidité***

La turbidité d'une culture est évaluée en mesurant sa densité optique à  $\lambda = 750 \text{ nm}$ , au moyen d'un spectrophotomètre (Cary 50 Scan, Varian).

#### **II.2. Taxinomie\* des algues et des cyanobactéries**

L'identification des algues et des cyanobactéries est établie par observation de leurs caractères morphologiques à l'aide d'un microscope photonique. Un fragment de prélèvement est placé

dans de l'eau pendant 1 à 2 h afin de faciliter le détachement des micro-organismes, en vue d'effectuer une observation primaire des populations dans leur état naturel. Les observations sont ensuite effectuées sur des cultures obtenues par isolement des algues et des cyanobactéries. Des solutions de lugol\* et d'encre de Chine sont communément utilisées pour mettre en évidence des caractères utiles à l'identification. Les algues ou cyanobactéries observées sont dessinées à l'aide d'une chambre claire montée sur un microscope photonique (Optiphot-2, Nikon), ce qui permet en outre de mesurer leurs dimensions. Les identifications sont basées sur des critères taxinomiques établis par GEITLER (1932), BOURRELLY (1966, 1985), KOMAREK & FOTT (1983), Ettl & GÄRTNER (1995), KOMAREK & ANAGNOSTIDIS (1999, 2005) et JOHN et al. (2002).

## **II.3. Écologie des algues et des cyanobactéries**

### **II.3.1. Prélèvements**

L'échantillonnage de biofilms se développant en façades est effectué par prélèvement d'une portion de revêtement d'environ 1 cm<sup>2</sup>, à l'aide d'un scalpel stérilisé à la flamme d'un briquet. Les échantillons sont ensuite stockés dans des flacons stériles en polyéthylène jusqu'à leur analyse. À chaque prélèvement correspond un code, attribué d'après le numéro du département puis le numéro de série des prélèvements : ainsi, le troisième prélèvement réalisé en Côtes d'Armor porte le code 223.

Des données telles que la date et le lieu du prélèvement, l'orientation de la façade, la présence de végétation à proximité, le type de revêtement colonisé et éventuellement le type de défaut architectural ayant pu favoriser l'établissement des micro-organismes sont relevées sur site. D'autres données sont ensuite collectées, telles que l'altitude et la distance du lieu de prélèvement à la plus proche façade maritime. Les données climatiques obtenues auprès de Météo France pour les départements étudiés concernent les températures minimales et maximales, les précipitations, l'hygrométrie, l'insolation, la vitesse du vent, ainsi que le nombre de jours de neige auxquels sont soumis les lieux de prélèvement. Les valeurs disponibles représentent une moyenne des valeurs relevées mensuellement sur une durée de 30 ans. Enfin, les valeurs de mouillabilité des façades en fonction de leur localisation géographique ont été extraites d'un rapport (BEGUIN 1986).

### **II.3.2. Analyses statistiques**

Des analyses factorielles de la variance ont été effectuées afin de comparer les différences entre les moyennes d'espèces d'algues, de cyanobactéries et d'espèces totales identifiées, en fonction des deux types de substrat (organique ou minéral), du type de micro-humidité (faible ou élevée) et des trois classes de climats : continental, montagnard et maritime (regroupant les climats océanique et Méditerranéen). La méthode de Tukey a été utilisée pour la comparaison de chaque paire de moyennes. La normalité et l'homocédasticité des données ont également été évaluées (ZAR 1996).

L'analyse de la correspondance canonique partielle basée sur des données de présence/absence des espèces a été utilisée afin d'obtenir une interprétation environnementale de la composition des espèces. Le type de substrat, la micro-humidité et le climat ont été spécifiés comme co-variables. La signification des axes canoniques a été testée en utilisant la permutation de Monte Carlo des échantillons restreints par les co-variables (TER BRAAK & SMILAUER 1988).

## **II.4. Étude des matériaux**

### **II.4.1. Préparation des matériaux**

Trois types de revêtements de façades, représentatifs des matériaux disponibles sur le marché français, ont été sélectionnés pour conduire cette étude : les enduits monocouches, les revêtements plastiques épais (RPE) et les peintures. À cette sélection est ajouté un mortier, dit "modèle", de composition et de propriétés connues.

#### ***Mortier modèle***

Ce mortier est composé d'environ 65 % de sable, 30 % de ciment Portland (CEM I 52,5 CP2), et 5 % de charges calcaires, auxquels ont été ajoutés 0,5 % d'éther de cellulose pour une meilleure maniabilité et une meilleure rétention d'eau. Le mortier a été préparé avec un rapport eau/ciment de 1. Ainsi, la gâchée\* est préparée par ajout de l'eau aux trois ingrédients. Après un mélange manuel puis un malaxage 30 s à vitesse lente (malaxeur Interco), les parois du récipient sont raclées afin d'en détacher des résidus non accessibles, puis la gâchée est malaxée pendant 1 min supplémentaire à vitesse lente. Une fois la préparation coulée dans des moules en polystyrène de dimensions 100 × 50 × 1 cm, le mortier modèle est tiré à la règle\*.

Après avoir recouvert les moules d'un film plastique pendant 48 h pour retarder l'évaporation de l'eau du mortier, ceux-ci sont conditionnés 26 jours dans une ambiance à  $23 \pm 2$  °C et  $50 \pm 5$  % d'humidité relative. Une fois débarrassés du moule, les mortiers sont découpés en éprouvettes\* de dimensions  $20 \times 8 \times 1$  cm et sont utilisés tels quels ou après avoir subi des cycles de carbonatation\*.

### ***Enduits monocouches A et B***

Ces mortiers se présentent sous la forme de poudres prêtes à gâcher. La quantité d'eau nécessaire, spécifiée par les fournisseurs, est ajoutée à la poudre puis la gâchée est préparée comme décrit pour le mortier modèle. Les préparations sont ensuite coulées dans des moules en polystyrène de dimensions  $100 \times 50 \times 1$  cm. Le mortier A est tiré à la règle puis texturé à la taloche\* plastique. Le mortier B a seulement été tiré à la règle ce qui lui confère ainsi une rugosité de surface plus importante que celle du mortier A. Les moules sont ensuite conditionnés 26 jours dans une ambiance à  $23 \pm 2$  °C et  $50 \pm 5$  % d'humidité relative. Une fois débarrassés du moule, les enduits monocouches sont découpés en éprouvettes de dimensions  $20 \times 8 \times 1$  cm et sont utilisés tels quels ou après avoir subi des cycles de carbonatation.

### ***Peinture et RPE***

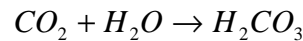
Les deux revêtements organiques testés sont des produits prêts à l'emploi mis à notre disposition par des fournisseurs. Le RPE est réparti sur des plaques de fibre-ciment à la taloche plastique, et le grain est finalement fermé à la lisseuse. Les peintures sont appliquées à la brosse sur des plaques de fibre-ciment. Les revêtements organiques, conditionnés dans une ambiance à  $23 \pm 2$  °C et  $50 \pm 5$  % d'humidité relative, sont secs en quelques heures. Des éprouvettes de dimensions  $20 \times 8 \times 1$  cm sont ensuite découpées dans les plaques et testées tels quelles.

## **II.4.2. Carbonatation des mortiers**

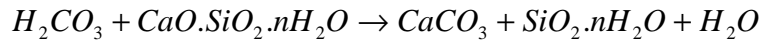
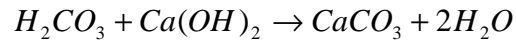
Un mortier fraîchement préparé présente une alcalinité élevée, connue pour défavoriser la croissance des micro-organismes (GRANT 1982). Lorsque les mortiers sont au contact de l'air, le dioxyde de carbone atmosphérique pénètre dans la matrice cimentaire et réagit avec des hydrates pour former du carbonate de calcium. Ce processus se compose de deux étapes :



- la dissolution du dioxyde de carbone :



- la formation de carbonates à partir des hydrates :



Cette réaction de carbonatation, qui abaisse le pH de surface des mortiers, est favorisée au contact de l'eau. Les éprouvettes de mortiers sont donc partiellement carbonatées par immersion dans des bacs d'eau pendant 5 jours, suivie d'un séchage de 5 jours dans une ambiance à  $23 \pm 2$  °C et  $50 \pm 5$  % d'humidité relative. Ce cycle est répété trois fois.

#### **II.4.3. Test à la phénolphthaléine**

Le test à la phénolphthaléine est couramment employé pour visualiser des fronts de carbonatation : le pH de surface des mortiers est évalué par dépôt de quelques gouttes de phénolphthaléine à la surface ou sur la tranche des mortiers. Quand le pH est supérieur à 10, l'indicateur coloré est rose, tandis qu'il devient incolore pour des pH inférieurs à 10.

#### **II.4.4. Spectrométrie d'énergie dispersive (SED)**

L'analyse en spectrométrie d'énergie dispersive permet l'identification et la quantification des éléments composant la surface d'un matériau. Un échantillon de matériau est bombardé par un faisceau d'électrons au moyen d'un microscope électronique à balayage (LEO 1525), ce qui provoque l'émission de rayons X caractéristiques des éléments constituant l'échantillon. Un détecteur SED (Inca Energy 300) collecte ces photons X pour constituer un spectre d'émission qui permet ainsi d'identifier et de quantifier les éléments constitutifs de l'échantillon.

#### **II.4.5. Coefficient d'absorption d'eau par capillarité**

Pour chaque mortier, trois éprouvettes de dimensions  $16 \times 4 \times 4$  cm sont préparées en coulant une gâchée dans des moules métalliques. Les éprouvettes sont démoulées au bout de 24 h, puis conditionnées 28 jours dans une ambiance à  $23 \pm 2$  °C et  $50 \pm 5$  % d'humidité relative. Les éprouvettes sont ensuite placées dans une chambre conditionnée à  $20 \pm 2$  °C et  $90 \pm 5$  %

d'humidité relative et sont immergées dans 5 mm d'eau, la plus grande dimension (16 cm) étant placée en position verticale. La section immergée ( $S$ ) correspond alors à  $4 \times 4$  cm. La prise de poids ( $m$ ) due à l'absorption d'eau par capillarité est suivie pendant 24 h. Le coefficient d'absorption d'eau, ou coefficient de capillarité ( $\text{g dm}^{-2} \text{ min}^{-1/2}$ ), est finalement défini comme étant égal à la pente de la droite reliant les points des mesures effectuées aux temps  $t = 10$  min et  $t = 90$  min, selon la représentation graphique :  $m/S = f(\sqrt{t})$ . Cette détermination est effectuée sur trois éprouvettes.

#### II.4.6. Porosimétrie par intrusion au mercure (PIM)

La porosité des mortiers est déterminée par porosimétrie d'intrusion au mercure. Cette technique permet d'évaluer la distribution en taille des pores, en forçant du mercure liquide à pénétrer dans le réseau poreux du matériau. Une pression externe croissante est appliquée afin de provoquer la pénétration du liquide dans des pores de taille décroissante. La connaissance du volume de mercure utilisé et de la pression appliquée permet ainsi d'estimer la distribution des pores. Les mesures ont été réalisées sur un porosimètre Micromeritics Autopore IV 9400. La porosité totale des mortiers est calculée à partir de la valeur maximale du volume de pores cumulés ( $VPC_{max}$ ) et de la masse volumique des matériaux ( $\rho$ ), comme suit :

$$\text{Porosité totale} = VPC_{max} \times \rho$$

#### II.4.7. Rugosimétrie laser

La rugosité de surface des matériaux est évaluée en utilisant un capteur laser LM10-50S (Matsushita). Les matériaux sont placés horizontalement sur un banc équipé du capteur laser qui se déplace en balayant la surface de l'éprouvette tous les 0,5 mm en longueur et en largeur. Les mesures sont réalisées par triangulation optique : la lumière laser ( $\lambda = 685$  nm) est émise normalement sur la surface de l'éprouvette et la lumière réfléchie passe à travers un capteur de position. Le capteur mesure ainsi la hauteur de chaque point, avec une résolution de 1  $\mu\text{m}$ . De telles mesures permettent l'obtention d'un profil topographique qui est analysé pour en extraire le paramètre  $Ra$  de la rugosité (Figure 19; EN ISO 4287).

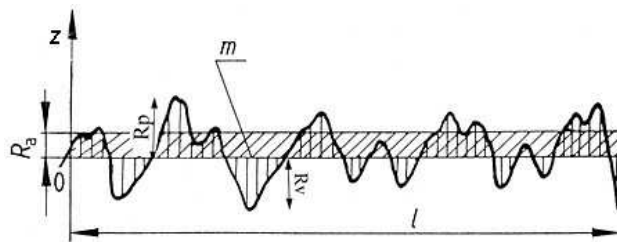


Figure 19. Représentation des paramètres définissant une rugosité de surface.  $Ra$  : écart moyen arithmétique du profil,  $Rp$  : hauteur de saillie maximale,  $Rv$  : profondeur de creux maximal,  $m$  : médiane ([http://www.maitrise-orthop.com/corpusmaitri/orthopaedic/mo78\\_zircone/index\\_vf.shtml](http://www.maitrise-orthop.com/corpusmaitri/orthopaedic/mo78_zircone/index_vf.shtml)).

#### II.4.8. Banc d'essai par ruissellement d'eau

La résistance à la colonisation par des micro-organismes d'éprouvettes de matériaux a pu être évaluée à l'aide d'un banc d'essai par ruissellement d'eau.

##### *Description*

Le système consiste en un caisson de verre de dimensions  $100 \times 50 \times 50$  cm, dans lequel sont installés deux supports en acier inoxydable inclinés à  $45^\circ$  (Figure 20). Les supports sont placés dos à dos afin de permettre l'évaluation de deux rangées de matériaux dans les mêmes conditions. Le principe du banc d'essai par ruissellement d'eau est le suivant : le caisson est rempli d'une culture de micro-organismes qui est pompée et vient ruisseler sur le haut des éprouvettes. L'arrosage est effectué par le biais d'une rampe percée de trous de 2 mm de diamètre, tous les 1 cm. Le ruissellement de la culture à la surface des matériaux reproduit le phénomène de colonisation d'un revêtement de façade : les micro-organismes, transportés par la solution, ont la possibilité de s'accrocher et d'adhérer au revêtement en fonction des caractéristiques du matériau.

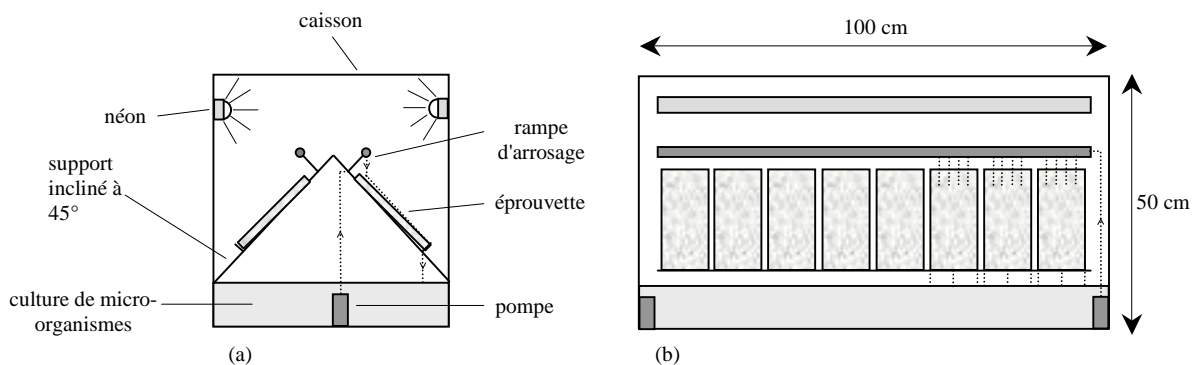


Figure 20. Dispositif d'évaluation de la colonisation de matériaux de construction par ruissellement d'eau; (a) : vue de côté, (b) : vue de face.

### ***Mode opératoire***

Les expériences sont réalisées dans les conditions suivantes : le caisson est tout d'abord rempli de 50 L d'eau désionisée auxquels sont ajoutées les solutions mères de milieu Bold de base (500 mL de solution A, 500 mL de solution B et 50 mL de solution trace). Un certain volume de culture d'algues ou de cyanobactéries est ajouté au milieu de culture, de façon à obtenir des concentrations en début d'expérience variant de 1,8 à 8,7 mg L<sup>-1</sup> (masse sèche) en fonction des souches étudiées. Cette suspension est maintenue sous agitation et à 24 °C au moyen d'un thermo-régulateur. Les cycles d'arrosage sont déclenchés toutes les 12 h et ont une durée de 90 min, le volume de culture ruisselant à la surface des éprouvettes étant ainsi égal à 20 ± 2 L h<sup>-1</sup>. Les éprouvettes sont éclairées par deux lampes néons (tubes fluorescents 30 W) selon une photopériode de 12 h réglée pour commencer en même temps que le premier cycle d'arrosage. L'intensité lumineuse reçue, évaluée à l'aide d'un quantamètre LI-250 (LI-COR) muni d'un capteur plat, est de 25 ± 5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPF. Le banc d'essai est placé dans une pièce obscure conditionnée à 23 ± 2 °C et 50 ± 5 % d'humidité relative.

### **II.4.9. Analyse d'images**

La cinétique de colonisation des matériaux est évaluée par analyse d'images. Pour ce faire, la surface des éprouvettes placées dans le banc d'essai par ruissellement d'eau est digitalisée chaque semaine à l'aide d'un scanner de bureautique C7716 (Hewlett Packard). Les images numériques obtenues sont converties en images de 256 niveaux de gris et sont traitées afin d'établir un histogramme représentant le nombre de pixels en fonction de leur intensité. Dans un tel traitement, l'intensité 0 est attribuée aux pixels noirs, alors qu'un pixel blanc correspond à l'intensité 255. Les zones correspondant à la colonisation des micro-organismes sont facilement décelées par rapport à l'image d'origine. Le pourcentage d'éprouvette colonisée est obtenu en effectuant le rapport des pixels correspondant aux micro-organismes sur le nombre total de pixels. L'analyse d'images peut être effectuée manuellement en utilisant un logiciel gratuit tel qu'IRIS<sup>5</sup>, mais peut également être automatisée en utilisant un logiciel comme Aphélon™.

---

<sup>5</sup> <http://www.astrosurf.com/buil/iris/iris.htm>

## II.5. Étude de l'adhésion des algues

### II.5.1. Affinité des algues pour des solvants (MATS)

Cette méthode, développée par BELLON-FONTAINE et al. (1996), est basée sur la comparaison de l'affinité de cellules de micro-organismes pour des solvants polaires et apolaires, de tensions de surface connues (Tableau 3). Ces différences d'affinité permettent d'évaluer les caractères électron-donneur ou électron-accepteur des micro-organismes et révéler ainsi des propriétés hydrophiles ou hydrophobes.

Tableau 3. Propriétés des tensions de surface des solvants utilisés pour les essais MATS ( $\gamma^{LW}$ ,  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$  : composantes de Lifshitz-van der Waals, électron-donneur et électron-accepteur).

Solvants	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
Décane	23,9	0	0
Hexadécane	27,7	0	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Chloroforme	27,2	3,8	0

0,4 mL du solvant approprié (chloroforme, hexadécane, acétate d'éthyle ou décane) sont ajoutés à 2,4 mL d'une culture d'algues. Après mélange au vortex pendant 60 s, la solution est laissée au repos pendant 15 min afin de permettre la séparation des phases aqueuse et organique. La densité optique, ou absorbance, de 1 mL de phase aqueuse est alors déterminée à  $\lambda = 750$  nm. Le pourcentage d'affinité des algues est calculé selon l'équation :

$$\% \text{ adhésion} = 100 \times \frac{(A_0 - A)}{A_0},$$

où  $A_0$  représente l'absorbance de la culture d'algues avant mélange avec le solvant et  $A$  l'absorbance après mélange. Chaque essai est réalisé en trois exemplaires.

### II.5.2. Mesures d'angles de contact

Des mesures d'angles de contact sont réalisées sur les surfaces modèles d'adhésion et sur des algues. Les couches d'algues sont préparées en faisant sécher des gouttes de culture sur des lames de verre, jusqu'à obtenir une couche assez épaisse pour masquer le support sous-jacent. Les angles de contact  $\theta$  sont alors déterminés par la méthode de la goutte posée, en utilisant de l'eau, du formamide et du 1-bromonaphtalène (Figure 21). Les mesures sont répétées

quatre fois sur deux exemplaires différents de chaque surface et sont réalisées à l'aide d'un polarimètre Krüss PT 100, à une température fixée à 25 °C.

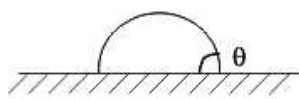


Figure 21. Angle  $\theta$  formé par une goutte de liquide en contact avec une surface.

### II.5.3. Calcul des tensions de surface, du degré d'hydrophobie et des énergies libres d'adhésion

La détermination des angles de contact à l'aide de trois solvants permet de calculer les composantes des tensions de surface des algues et des surfaces modèles, puis d'évaluer le degré d'hydrophobie d'une surface ainsi que les énergies libres d'adhésion des algues à une surface.

#### *Tensions de surface*

Une tension de surface  $\gamma$  est fonction de ses composantes de Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ) et acide-base de Lewis ( $\gamma^{AB}$ ) selon la formule :

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB}$$

où  $\gamma^{AB}$  peut être exprimée selon ses composantes électron-donneur ( $\gamma^-$ ) et électron-accepteur ( $\gamma^+$ ) :

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-}$$

Les composantes des tensions de surface des algues et des surfaces modèles ( $S$ ) peuvent alors être calculées d'après l'équation développée par VAN OSS et al. (1988) :

$$\cos \theta_L = -1 + 2\left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}\right) / \gamma_L,$$

où  $\theta_L$  représente la valeur d'angle de contact,  $L$  étant le liquide utilisé (Tableau 4).

Tableau 4. Propriétés des tensions de surface des liquides utilisés pour les mesures d'angles de contact.

Liquides	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
Eau	21,8	25,5	25,5
Formamide	39	2,3	39,6
1-bromonaphtalène	44,4	0	0

### ***Degré d'hydrophobie***

Le degré d'hydrophobie d'une surface, exprimé comme l'énergie libre d'interaction entre deux entités de cette surface ( $S$ ) quand elles sont placées dans l'eau ( $W$ ), est calculé grâce aux composantes des tensions de surface de cette entité :

$$\Delta G_{SWS} = -2\left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}}\right)^2 + 4\left(\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_W^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_W^+} - \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_W^+ \gamma_W^-}\right).$$

La surface peut être considérée comme hydrophobe si l'interaction entre ces deux entités est plus forte que l'interaction de chaque entité avec l'eau, soit si  $\Delta G_{SWS} < 0$ . À l'inverse, si  $\Delta G_{SWS} > 0$ , la surface est considérée comme hydrophile.

### ***Énergies libres d'adhésion***

VAN OSS (1994) a décrit l'énergie libre totale d'adhésion de micro-organismes, ici des algues ( $A$ ) sur une surface modèle ( $S$ ) dans l'eau ( $W$ ), par la somme des interactions de Lifshitz-van der Waals ( $LW$ ) et acide-base ( $AB$ ) comme :

$$\Delta G^{Total} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB},$$

où

$$\Delta G^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_A^{LW}} - \sqrt{\gamma_S^{LW}}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_A^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}}\right)^2$$

et

$$\Delta G^{AB} = 2\left[\sqrt{\gamma_W^+}\left(\sqrt{\gamma_A^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_W^-}\right) + \sqrt{\gamma_W^-}\left(\sqrt{\gamma_A^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_W^+}\right) - \sqrt{\gamma_A^- \gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_A^+ \gamma_S^-}\right].$$

## **II.5.4. Surfaces modèles**

Les surfaces modèles utilisées lors des expériences d'adhésion dans la chambre à flux laminaire sont des lames de microscope en verre, fonctionnalisées\* par organisation de couches auto-assemblées (SAM).

Les lames de verre sont nettoyées avant une modification de surface, en les plongeant 10 min dans une solution Piranha (3:1 (v:v)  $H_2SO_4/H_2O_2$ ) fraîchement préparée. Les lames sont ensuite rincées abondamment par de l'eau désionisée et séchées sous un flux d'azote.

Les lames de verre sont fonctionnalisées avec des SAM terminées par des groupements  $-CH_3$  et  $-NH_2$ . Les surfaces fonctionnalisées par  $-CH_3$  sont obtenues en une seule étape en plaçant pendant 2 h les lames dans un compartiment étanche contenant quelques gouttes d'hexaméthylsilazane (HMDZ), ou en plongeant les lames 30 min dans une solution à 1 % d' octadécyltrichlorosilane (OTS) dans du dicyclohexyl, puis en les rinçant avec du

chloroforme (VACHEETHASANEE & MARCHANT 2000). Les surfaces fonctionnalisées par -NH<sub>2</sub> sont préparées en plongeant les lames de verre dans une solution à 0,1 % d'aminopropyltriéthoxysilane (APS) dans de l'éthanol, pendant 30 min. Les lames modifiées sont ensuite rincées à l'éthanol, séchées et passées à l'étuve à 120 °C pendant 2 h (CAO et al. 2005).

### II.5.6. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

L'efficacité du traitement des lames de verre a été vérifiée par analyse de leur surface en spectroscopie de photoélectrons X ou XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy). Cette technique majeure d'analyse des solides permet notamment la détection et la quantification de tous les éléments (sauf l'hydrogène et le deutérium), sur une épaisseur de quelques nm. Son principe est basé sur le bombardement de l'échantillon à analyser par un faisceau de photons X d'énergie  $h\nu$ . Après l'impact, les électrons des niveaux énergétiques atomiques des différents éléments sont émis avec une énergie cinétique  $E_c$ , ce qui permet d'avoir accès à l'énergie de liaison  $E_l$  de l'élément considéré, d'après le principe de conservation de l'énergie :

$$h\nu = E_c + E_l + \Phi_{sp}$$

où  $\Phi_{sp}$  est l'énergie d'extraction du spectrophotomètre (la calibration du spectrophotomètre étant effectuée en mesurant l'énergie du niveau de cœur Au 4f<sub>7/2</sub> = 84 eV).

La modification de l'environnement chimique d'un élément va ainsi se traduire par un déplacement chimique des niveaux de cœur, ce qui permet d'obtenir des informations sur la nature des éléments présents (déplacement chimique et intensité des pics) et sur leur quantité (intensité des pics).

Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre XSAM800 (KRATOS) en transmission (FAT) avec une énergie passante de 20 eV. La source de rayons X utilisée a été la raie Al K $\alpha$  (1486,6 eV), avec un faisceau de puissance 120 W (10 mA x 12 kV). Les échantillons ont été analysés dans une chambre sous ultra-vide (UHV) à  $\sim 10^{-7}$  Pa à température ambiante. Les spectres ont été enregistrés avec un serveur Sun SPARC 4 avec le logiciel Vision (KRATOS) en utilisant un pas de 0,1 eV. Les pics ont été décomposés en utilisant une équation Gaussienne - Lorentzienne. Aucune compensation de charge (flood-gun) n'a été utilisée. Le carbone a été utilisé comme référence (énergie de liaison du C1s = 285 eV).



### II.5.7. Cellule à flux laminaire

Les expériences d'adhésion ont été réalisées à l'aide d'une cellule à flux laminaire (CFL), qui permet l'observation de l'arrachement de micro-organismes, adhérant sur la surface inférieure de la cellule, en fonction d'un flux d'eau appliqué.

#### *Description*

La CFL est formée d'une cavité rectangulaire de dimensions  $26 \times 76 \times 1$  mm, composée d'une lame de verre fixe sur la partie supérieure et d'une lame de verre amovible sur la partie inférieure, séparées par un joint en caoutchouc de 1 mm d'épaisseur. Le liquide d'arrachement est introduit dans la CFL par un conduit de 1 mm de diamètre percé à une extrémité de la cellule et ressort par un conduit de 1 mm de diamètre percé à l'autre extrémité de la cellule (Figure 22). Dans ce système, le flux est laminaire et le cisaillement  $\sigma$  ( $s^{-1}$ ) auquel sont soumis les micro-organismes au niveau de la paroi inférieure, au centre de la cavité, est calculé selon la formule :

$$\sigma = \frac{6Q}{le^2}$$

où  $Q$  est le débit ( $mm^3 s^{-1}$ ) et  $l$  et  $e$  représentent respectivement la largeur et l'épaisseur de la cavité (mm).

Le débit est imposé par une pompe péristaltique 504 U (Watson Marlow). Afin de dénombrer les cellules adhérant au centre de la cavité, la CFL est placée sous l'objectif  $\times 20$  d'un microscope photonique (Olympus BH-2). Des images de la fenêtre d'observation sont enregistrées à l'aide d'une caméra (IVC 800 BC) et les cellules adhérant à la lame de verre inférieure sont comptées manuellement.

#### *Mode opératoire*

La lame de verre amovible est remplacée par les surfaces modèles sur lesquelles l'adhésion des algues va être évaluée. 2 mL de culture d'algues sont introduits dans la cavité et les cellules sont laissées à sédimenter (et éventuellement adhérer) aux surfaces modèles durant 10 min. Des débits croissants d'eau désionisée sont ensuite imposés pendant 2 min; à chaque palier, une prise de vue de la fenêtre d'observation est effectuée afin de compter le nombre d'algues adhérentes. Pour évaluer l'effet éventuel d'interactions ioniques ou hydrophobes lors du processus d'adhésion,  $15 g L^{-1}$  de  $Na_2SO_4$  ou  $12 mL L^{-1}$  d'un tensioactif (TA) sont ajoutés à l'eau désionisée lors de certaines expériences. Chaque essai est répété au moins trois fois.

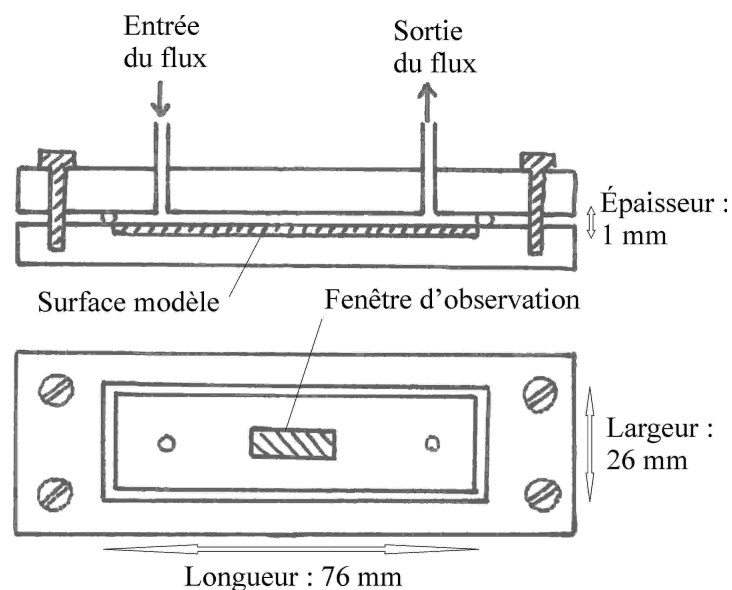


Figure 22. Schémas de la cellule à flux laminaire; haut : vue de côté, bas : vue de dessus.

## II.6. Étude des polymères sécrétés par les algues et les cyanobactéries

### II.6.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les cultures à examiner sont filtrées sur une membrane de vide de maille 1,2  $\mu\text{m}$  (Millipore). Après les avoir déshydratées dans des bains successifs à teneur en éthanol croissante, l'éthanol est vaporisé par la technique du point critique (EMITECH K850), puis les échantillons sont recouverts d'une fine couche de particules d'or (JEOL JFC-1200). Les observations ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage JEOL JSM-840A.

### II.6.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les cultures d'algues sont fixées pendant 1 h dans une solution à 1 % d'acroleïne / 2,5 % de glutaraldéhyde, tamponnée à pH 7,4 dans une solution cacodylate de sodium 0,1 M. Les algues sont ensuite lavées à trois reprises dans du tampon cacodylate de sodium 0,4 M enrichi de 0,2 % de rouge de ruthénium, puis déshydratées dans des bains successifs à teneur en éthanol croissante. Les culots d'algues sont inclus dans de la résine époxy Spurr, qui est laissée à polymériser à 47 °C pendant deux jours. Les blocs de résine sont ensuite tranchés selon une épaisseur de 700 Å à l'aide d'un Microtome (Ultracut E, Reichert-Jung), puis ces lamelles sont déposées sur une grille d'observation en carbone et colorées avec une solution

d'acétate d'uranyle dans 50 % d'éthanol ou dans du bismuth. Les observations ont été réalisées sur un microscope électronique à transmission Hitachi H-7400.

### II.6.3. Protocole d'extraction des polymères

Les polymères, de nature polysaccharidique, sont extraits selon le protocole mis au point par BERTOCCHI et al. (1990). Les algues et les cyanobactéries sont isolées de leur milieu de culture par centrifugation de la culture à 4000 tr min<sup>-1</sup> pendant 10 min quand les organismes sédimentent, ou bien par filtration sous vide sur filtre Whatman 42 (Figure 23). Les polymères adhérant à la paroi des micro-organismes (CPS) et les polymères libérés en solution (RPS) sont ensuite extraits pour être analysés séparément :

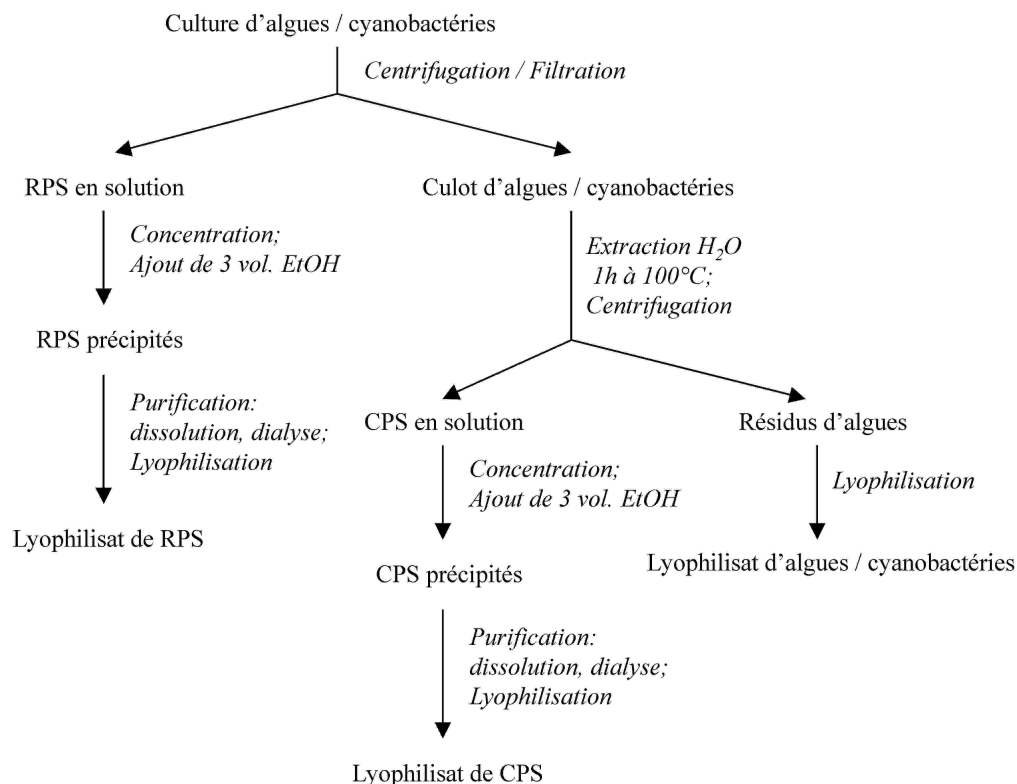


Figure 23. Protocole d'extraction des RPS et CPS, dérivé de BERTOCCHI et al. (1990).

- le culot, composé de cellules ou de filaments d'algues ou de cyanobactéries, est extrait dans 300 mL d'eau désionisée, à 100 °C durant 1 h. Après refroidissement et centrifugation du bouillon, le culot est lyophilisé afin de déterminer la masse sèche de micro-organismes extraits. Le surnageant, contenant les CPS, est concentré sous vide, puis les CPS sont précipités par ajout de trois volumes d'éthanol absolu et placés à 4 °C pendant une nuit.

Le lendemain, les précipités sont récupérés par centrifugation à 4000 tr min<sup>-1</sup> pendant 10 min, puis dissous dans un minimum d'eau désionisée. La solution obtenue est ensuite dialysée contre de l'eau désionisée (membrane Spectrapor MWCO 6000-8000Da), puis lyophilisée.

- le filtrat, composé de milieu de culture contenant les RPS est concentré sous vide, puis les RPS sont précipités sélectivement par ajout de trois volumes d'éthanol absolu, et placés à 4 °C pendant une nuit. Le lendemain, le culot est récupéré par centrifugation à 4000 tr min<sup>-1</sup> pendant 10 min, puis dissous dans un minimum d'eau désionisée. La solution obtenue est ensuite dialysée contre de l'eau désionisée (membrane Spectrapor MWCO 6000-8000Da), puis lyophilisée.

#### **II.6.4. Analyse chromatographique**

La composition monosaccharidique des extraits de CPS et RPS a été obtenue par analyse chromatographique. 1 mL de solution de RPS ou CPS dialysée est ajouté à 20 µg d'étalon interne, du myo-Inositol, dans des tubes en verre étanches. Les polymères sont hydrolysés en présence de 1 mL de solution de chlorure d'acétyle 1 M dans du méthanol anhydre (Instant methanolic HCl; Alltech), à 80 °C pendant 24 h. Les hydrolysats sont ensuite séchés sous flux d'azote, puis ils subissent une réaction de triméthylsilylation pendant 2 h à température ambiante par ajout de 80 µL d'un mélange v:v de pyridine et *N,O*-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) dans 1 % de triméthylchlorosilane (TMCS). Les extraits sont finalement analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Perichrom PR-2100 équipée d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire (longueur : 50 m, diamètre interne : 0,32 mm) CP-SIL-5CB (Chrompack). Le gaz vecteur utilisé est de l'azote et l'évolution de température du four est imposée selon ce gradient : 130 → 210 °C à 2 °C min<sup>-1</sup>, avec un arrêt de 5 min à 190 °C, puis 210 → 260 °C à 5 °C min<sup>-1</sup>. Les données ont été analysées à l'aide du programme Winilab v.3 (Perichrom), des mélanges de sucres ayant été utilisés pour calibrer la méthode.

#### **II.6.5. Dosage des sucres**

##### ***Dosage des oses neutres***

Le dosage des oses neutres s'effectue selon la méthode de DUBOIS et al. (1956). Des gammes étalon de glucose (Glc) et d'acide glucuronique (GlcA) sont préparées aux concentrations de

25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . À 200  $\mu\text{L}$  de solution à doser ou de solution étalon, introduits dans des tubes à hémolyse, sont ajoutés 200  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de phénol à 5 % puis 1 mL d'acide sulfurique 96 %. Après homogénéisation au vortex, le mélange est porté à 100 °C pendant 5 min à l'aide d'un bain-marie. Les tubes sont ensuite refroidis et placés 30 min à l'obscurité. Après développement d'une coloration jaune, la lecture de l'absorbance est réalisée à 492 nm (spectrophotomètre Cary 50 Scan, Varian).

### ***Dosage des acides uroniques***

Le dosage des acides uroniques est réalisé selon la méthode de BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973), à partir des gammes étalon de glucose et d'acide glucuronique préparées pour le dosage des oses neutres. À 200  $\mu\text{L}$  de solution à doser ou de solution étalon, introduits dans des tubes à hémolyse, sont ajoutés 1,2 mL de solution de tétraborate de sodium 0,0125 M dans de l'acide sulfurique concentré. Les tubes sont agités au vortex et réfrigérés dans la glace. Ils sont ensuite portés à 100 °C au bain-marie durant 5 min. Après refroidissement dans un bain de glace, 20  $\mu\text{L}$  de solution de 3-phényl-phénol 0,15 % dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 % sont ajoutés. Après homogénéisation, une coloration rose se développe durant 5 min. La lecture de l'absorbance peut alors être effectuée à 520 nm.

### ***Calcul***

En raison de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres, il est nécessaire de corriger les calculs selon la méthode établie par MONTREUIL & SPIK (1963). Les pentes des droites obtenues à partir des gammes étalon sont codées comme suit :

- dosage d'oses neutres : pente (Glc) =  $\alpha$  ; pente (GlcA) =  $\beta$
- dosage d'acides uroniques : pente (Glc) =  $\alpha'$  ; pente (GlcA) =  $\beta'$

À partir de ces pentes et en fonction des absorbances ( $A$ ) obtenues selon les dosages, les concentrations en acide uroniques ( $AU$ ) et oses neutres ( $ON$ ) sont déterminées grâce aux formules suivantes :

$$[AU] = \alpha \frac{A_{(AU)} - \alpha' A_{(ON)}}{\alpha\beta' - \alpha'\beta}$$

$$[ON] = \frac{A_{(ON)} - \beta[AU]}{\alpha}$$

### II.6.6. Dosage des sulfates

La détermination du taux de sulfates est effectuée par turbidimétrie selon la méthode développée par DODGSON & PRICE (1962). Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution de  $K_2SO_4$ , afin d'obtenir des solutions à teneur en  $SO_4^{2-}$  comprises entre 50 et  $600 \mu g mL^{-1}$ . Par ailleurs, 4 g de gélatine sont dissous dans 800 mL d'eau à  $\sim 70^\circ C$ , puis cette solution est laissée au repos à  $4^\circ C$  pendant 12 h (solution de gélatine). 2 g de  $BaCl_2$  sont ensuite ajoutés à 400 mL de cette préparation, qui est placée 3 h à  $4^\circ C$  avant utilisation (solution de gélatine- $BaCl_2$ ).

10 mg de polymères lyophilisés sont hydrolysés par 1 mL d'une solution de HCl 2 M, à  $110^\circ C$  pendant 12 h. Deux séries de dosages sont alors réalisées :

- à 0,2 mL de solution à doser sont ajoutés 3,8 mL d'acide trichloroacétique 3 % et 1 mL de solution de gélatine- $BaCl_2$ . Le mélange est homogénéisé au vortex, puis placé 20 min à température ambiante durant lesquelles un précipité blanc de  $BaSO_4$  se forme. La turbidité de la solution est déterminée par lecture de l'absorbance  $A$  à  $\lambda = 360$  nm contre un blanc approprié (spectrophotomètre Cary 50 Scan, Varian).

- à 0,2 mL de solution à doser sont ajoutés 3,8 mL d'acide trichloroacétique 3 % et 1 mL de solution de gélatine. Le mélange est homogénéisé au vortex, puis placé 20 min à température ambiante. La turbidité de la solution est également déterminée par lecture de la densité optique  $A_0$  à  $\lambda = 360$  nm contre un blanc approprié. Cette seconde mesure permet de soustraire la turbidité due aux interactions des solutions à doser avec tout autre matériel que le  $BaCl_2$ .

L'absorbance correspondant finalement aux groupements sulfate ayant réagi avec le  $BaCl_2$  équivaut donc à :  $A_{\text{corrigée}} = A - A_0$ .

### II.6.7. Zétamétrie

Le potentiel zêta des CPS ( $\zeta$ , mV) est évalué à l'aide d'un zétamètre Zeta Plus (BTC). Les solutions analysées sont préparées en dissolvant environ 2 mg de CPS lyophilisés dans 3 mL d'eau désionisée. Les valeurs exprimées des potentiels zêta représentent la moyenne de 10 mesures.

### II.6.8. Tensiométrie

Les tensions de surface ( $\gamma$ ,  $\text{mJ m}^{-2}$ ) sont mesurées à l'aide d'un tensiomètre Krüss K10 équipé d'un bain thermostaté permettant d'effectuer les analyses à 25 °C. Les solutions utilisées sont préparées en dissolvant environ 2 mg de CPS lyophilisés dans 3 mL d'eau désionisée. Les mesures sont effectuées au moins trois fois, afin d'obtenir une valeur stable, en plongeant une plaque de platine dans les solutions.

### II.6.9. Adsorption de polymères par réflectométrie

L'évaluation de l'adsorption de polymères a nécessité la préparation de wafers de silice\* fonctionnalisés. Des wafers de silice (Silicon Inc.) ont donc été nettoyés par immersion 10 min dans une solution Piranha (3:1 (v:v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  /  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), puis ont été rincés à l'eau désionisée et séchés sous flux d'azote. Une partie de ces wafers a ensuite été fonctionnalisée en plaçant pendant 2 h les surfaces dans un compartiment étanche contenant quelques gouttes de HMDZ. La caractérisation de ces surfaces est réalisée en mesurant les angles de contact à l'eau par la méthode de la goutte posée, à l'aide d'un polarimètre Krüss PT 100. Les mesures d'adsorption sur ces surfaces modèles ont été évaluées à l'aide d'un réflectomètre, dispositif développé au sein d'un des laboratoires de Rhodia et placé dans une pièce conditionnée à 25 °C. Le principe est le suivant : le wafer est placé dans une cellule dans laquelle circule un liquide. Un rayonnement laser ( $\lambda = 632 \text{ nm}$ ) est émis à sa surface, et la composante réfléchie du rayonnement est mesurée. Une première mesure est effectuée quand la cellule est soumise à un flux d'eau désionisée, qui donne la valeur  $S_0$ . Une solution de polymère à 50 ppm dans de l'eau désionisée circule ensuite dans la cellule, permettant ainsi aux polymères de s'adsorber à la surface du wafer. L'évolution en fonction du temps des variations de la composante réfléchie du rayonnement est enregistrée. La valeur  $S$  correspond alors à la valeur de la composante réfléchie quand l'adsorption du polymère atteint un plateau. La quantité de polymère adsorbée par unité de surface ( $\Gamma$ ,  $\text{mg m}^{-2}$ ) est alors évaluée par l'équation :

$$\Gamma = \frac{(S - S_0)}{S_0 \times A_s}$$

où  $A_s$ , le facteur de sensibilité ( $\text{m}^2 \text{ mg}^{-1}$ ), est obtenu par correspondance de la valeur du rapport  $dn/dC$  du polymère par lecture sur un abaque. La valeur  $dn/dC$  représente la pente des

indices de réfraction ( $n$ ) d'une solution du polymère à différentes concentrations ( $C$ ), évaluée à l'aide d'un réfractomètre.

#### **II.6.10. Protocole de dégradation enzymatique**

Les solutions enzymatiques sont préparées dans de l'eau désionisée et ajoutées immédiatement et séparément aux cultures d'algues. Un témoin est réalisé en ajoutant un volume d'eau désionisée équivalent au volume de solution enzymatique ajouté aux autres cultures. Les cultures, en phase exponentielle de croissance, sont incubées pendant trois jours dans une enceinte climatisée à  $20,0 \pm 0,5$  °C et soumise à une intensité lumineuse de  $15 \pm 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF selon la photopériode 16 h/8 h éclairage/obscurité.



---

### III. Diversité des algues et des cyanobactéries colonisatrices de façades en France

---

Peu de documentation portant sur la connaissance des micro-organismes colonisant des bâtiments en France est disponible. Le premier objectif de ce travail a donc été d'évaluer la diversité d'algues et de cyanobactéries constituant des salissures de façade en France. Dans ce but, une campagne d'échantillonnage a été menée à travers le pays afin d'identifier les espèces communément observées, au moyen de techniques microscopiques. Cet inventaire est présenté dans l'article 1.

#### III.1. Article 1: Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France

Hélène Barberousse<sup>a, b</sup>, Guillermo Tell<sup>c</sup>, Claude Yéprémian<sup>b</sup>, Alain Couté<sup>b</sup>  
*Algological Studies*, 120: 83-110, 2006

<sup>a</sup> Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), Département Enveloppe et Revêtements, 84, avenue Jean Jaurès - Champs-sur-Marne - 77447 Marne-la-Vallée Cedex 2 - France

<sup>b</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Département RDDM, USM 505 Écosystèmes et Interactions Toxiques, 57, rue Cuvier / case 39 - 75005 Paris - France

<sup>c</sup> Laboratorio Limnología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Buenos Aires - Argentina

#### Abstract

Algae and cyanobacteria in biofilms cause discolouration of the building surfaces they colonise. In France, no comprehensive study of the diversity of the species involved in this phenomenon has up to now been undertaken. 71 samples were therefore collected all over France and analysed for their micro-organisms composition. Green algae were the most frequent organisms encountered, with *Klebsormidium flaccidum* (55 %), *Trebouxia* spp. (49 %), *Stichococcus bacillaris* (46 %), *Chlorosarcinopsis minor* (28 %) and *Chlorella* cf. *mirabilis* (27 %) being the most abundant ones. Colonial cyanobacteria were then mainly represented by *Cyanosarcina parthenonensis* (28 %), *Chroococcus lithophilus* (21 %), *Gloeocapsa sanguinea* (15 %) and filamentous cyanobacteria by *Calothrix pulvinata* (21 %), *Leptolyngbya foveolarum* (18 %) and *Phormidium corium* (13 %).

**Keywords:** Algae; Cyanobacteria; Biofilms; Building façades; Materials.

## **Introduction**

Algae and cyanobacteria are able to adapt their morphology and their physiology to colonize different habitats, as long as illumination, humidity and nutrients are provided. Some of these organisms may grow in extreme conditions, such as deserts, stones or walls. They are notably found on building façades where architectural defaults like exposed frontages, leaking gutters, air-conditioning vents or water rejection on bases of walls fulfil the necessary conditions of dampness. Associated with other micro-organisms, they will form a biofilm causing primarily discolouration of the façade, and then possible physico-chemical deterioration of the substrate (SAND 1997).

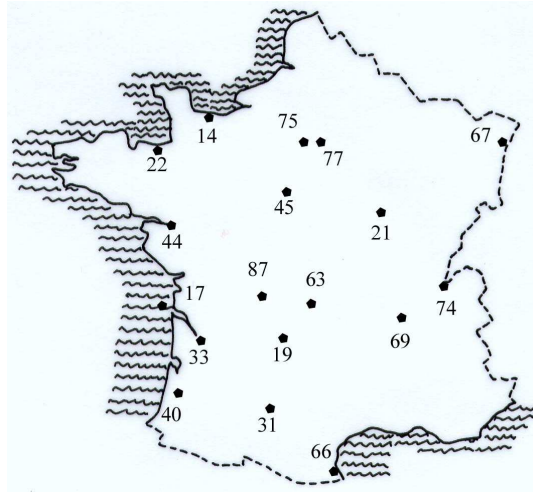
Some literature has been published concerning the identification of epilithic algae and cyanobacteria in South America (GAYLARDE & GAYLARDE 1999, 2000, VIDELA et al. 2000, CRISPIM et al. 2004, GAYLARDE & GAYLARDE 2005), Asia (WEE & LEE 1980, WEE 1988, TRIPATHI et al. 1991, JOSHI & MUKUNDAN 1997), and Europe (SCHLICHTING 1975, ANAGNOSTIDIS et al. 1983, PALMER & HIRSCH 1991, ORTEGA-CALVO et al. 1993, GÓMEZ-ALARCÓN et al. 1995, FLORES et al. 1997, NOGUEROL-SEOANE & RIFÓN-LASTRA 1997, TOMASELLI et al. 2000, RIFÓN-LASTRA & NOGUEROL-SEOANE 2001, BELLINZONI et al. 2003, RINDI & GUIRY 2003, RINDI & GUIRY 2004, GAYLARDE & GAYLARDE 2005), but most of them deal with historic monument colonisation. In France, a few studies are known (GROSSIN & DUPUY 1978, DUBOSC et al. 2001, RINDI et al. 2003, RINDI & GUIRY 2004), but no comprehensive study at the scale of the country has been published yet.

Therefore, we intended to carry out a more complete investigation of algae and cyanobacteria established on building façades in diverse regions of France, in relation with the materials they were growing on.

## **Materials and methods**

### *Sampling sites and methods*

In 2004 and 2005, 71 samples of biofilms were collected from building façades in 18 departments of France. The code attributed to each sample is composed of the zip code of the department (two numbers) followed by the number of sample. In order to clarify, the number of sample is figured as on map 1. The colonized surfaces, composed of diverse substrates (mortar, concrete, paint, organic finish) showed green, red or blackish discolouration. Local information (such as geographical exposition, nature of the substrate) were noted for further statistical treatment. These samples were collected by scraping the surface with a sterile scalpel, ensuring to remove a portion of the substrate to take up an exhaustive study of the biofilm. They were stored as is in polyethylene containers until identification.



Map 1. Map of France showing the location of the samples, the numbering representing the zip code of the department.

### *Microbiological analysis*

Identification of algae and cyanobacteria was achieved according to their morphological characteristics. A portion of the material was placed for 1-2 h in water to ease the removal of the biofilm, thus enabling a primary study of the populations in their natural state. Another portion of material was placed into Petri dishes with agar Bold Basal medium to enhance culture growth. Cultures were grown in a chamber with a photoperiod of 16 h/8 h light/dark, light intensity of  $15 \pm 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF (Photosynthetic Photon Flux) and a temperature of  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Primary cultures were used to obtain unialgal replicates using the streaking plate method. This culture state favoured the observation of relevant characters, often not detectable in field material, leading to the definitive identification of the strain. In order to highlight some of the traits used in taxonomy, lugol's solution and India ink were employed. Identifications were based on taxonomic criteria established by GEITLER (1932), BOURRELLY (1966, 1985), KOMÁREK & FOTT (1983), Ettl & GÄRTNER (1995), KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1999) and JOHN et al. (2002). Drawings were realised using a drawing tube and photographs were taken using a digital camera, fitted to an optical microscope (Optiphot-2, Nikon).

### **Results**

The samples investigated were generally composed by bacteria, algae, cyanobacteria, fungi, mosses and some grazers such as rotifers. We focus this paper on green algae and cyanobacteria specimens, as they are primary colonisers after the ubiquitous bacteria. In rare cases, diatoms were present but not identified.

A total of 22 species of algae and 25 species of cyanobacteria were identified among the 71 samples, which emphasizes the low diversity of the communities developing on buildings (Table 1). Indeed, the mean specific richness for each sample was quite low, as we identified an average of 5.2 species per sample, the composition of samples varying between 1 and 11 species. Solitary (41 %) and filamentous (36 %) forms of algae were the most abundant, whereas cyanobacteria were found to be predominant under the colonial form (56 %) (Table 2).

Table 1. Presence/absence of algae and cyanobacteria on the buildings sampled. Taxa are presented in alphabetical order.

Species	141	171	172	191	211	221	222	223	224	225	226	227	311	331	332	333	401	402	403	441
<b>Algae</b>																				
<i>Apatococcus lobatus</i>																				
<i>Bracteacoccus</i> sp.							x							x				x	x	
<i>Chlorella ellipsoidea</i>																		x		
<i>C. homosphaera</i>																				
<i>C. minutissima</i>					x	x									x			x	x	
<i>C. cf. mirabilis</i>	x	x		x		x	x	x	x											
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>									x		x							x	x	
<i>C. minor</i>						x				x										x
<i>Choricystis minor</i>																x				
<i>C. chodatii</i>																				x
<i>Coccobotrys verrucariae</i>																				
<i>Coccomyxa olivacea</i>					x															
<i>Desmococcus olivaceus</i>																x				
<i>Geminella terricola</i>							x	x					x	x				x	x	
<i>Hormotila mucigena</i>																				
<i>Keratococcus bicaudatus</i>																				
<i>Klebsormidium flaccidum</i>			x		x			x					x				x	x	x	x
<i>K. pseudostichococcus</i>										x	x	x								x
<i>Palmellopsis gelatinosa</i>																				
<i>Stichococcus bacillaris</i>	x	x	x	x			x		x			x	x	x	x	x	x	x		
<i>Trebouxia</i> spp.					x							x				x				
<i>Trentepohlia iolithus</i>	x	x		x			x		x	x		x		x						
<b>Cyanobacteria</b>																				
<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i>								x												
<i>Aphanothece saxicola</i>																				
<i>Calothrix pulvinata</i>								x					x		x					x
<i>Chroococcus limneticus</i>								x												
<i>C. lithophilus</i>													x		x	x				
<i>Cyanosarcina parthenonensis</i>								x								x	x			x
<i>Gloeocapsa aeruginosa</i>																				
<i>G. atrata</i>								x												
<i>G. biformis</i>																				
<i>G. decorticans</i>								x												
<i>G. kuetzingiana</i>								x					x	x		x				
<i>G. sanguinea</i>																				
<i>G. violascea</i>														x		x				
<i>Gloeothece cf. incerta</i>																				x
<i>G. palea</i>																				
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>				x								x			x					
<i>L. tenuis</i>																				
<i>Microcoleus vaginatus</i>																				
<i>Nostoc commune</i>													x			x				
<i>N. microscopicum</i>																				x
<i>Phormidium ambiguum</i>																				
<i>P. corium</i>																				
<i>P. molle</i>																				x
<i>P. cf. usteri</i>																x				
<i>Scytonema mirabile</i>																				
Total	3	3	3	3	4	3	5	10	4	3	4	3	7	7	3	12	7	6	8	2

Table 1. Continued.

Species	442	443	444	446	451	631	632	661	662	663	665	671	672	673	674	676	677	678	679	691
<b>Algae</b>																				
<i>Apatococcus lobatus</i>		x																		
<i>Bracteacoccus</i> sp.										x									x	x
<i>Chlorella ellipsoidea</i>														x					x	x
<i>C. homosphaera</i>																				x
<i>C. minutissima</i>																				x
<i>C. cf. mirabilis</i>					x	x											x	x		
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>					x		x	x												
<i>C. minor</i>						x	x			x					x	x				x
<i>Choricystis minor</i>																				
<i>C. chodatii</i>																				x
<i>Coccobotrys verrucariae</i>				x																
<i>Coccomyxa olivacea</i>																				
<i>Desmococcus olivaceus</i>										x		x								
<i>Geminella terricola</i>																				
<i>Hormotila mucigena</i>																				x
<i>Keratococcus bicaudatus</i>		x																		x
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	x	x	x	x				x	x	x	x		x	x	x					x
<i>K. pseudostichococcus</i>																				
<i>Palmellopsis gelatinosa</i>	x			x																
<i>Stichococcus bacillaris</i>	x	x	x		x							x			x					x
<i>Trebouxia</i> spp.		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
<i>Trentepohlia iolithus</i>					x															
<b>Cyanobacteria</b>																				
<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i>							x													x
<i>Aphanothece saxicola</i>				x																
<i>Calothrix pulvinata</i>	x		x					x	x		x									
<i>Chroococcus limneticus</i>	x																			
<i>C. lithophilus</i>				x			x	x				x					x	x		
<i>Cyanosarcina parthenonensis</i>				x	x			x	x	x	x									
<i>Gloeocapsa aeruginosa</i>																				
<i>G. atrata</i>							x					x								x
<i>G. biformis</i>																				
<i>G. decorticans</i>																				
<i>G. kuetzingiana</i>	x						x	x												
<i>G. sanguinea</i>				x					x											x
<i>G. violascea</i>																				x
<i>Gloeothece cf. incerta</i>																				
<i>G. palea</i>																				
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>				x			x			x		x								x
<i>L. tenuis</i>																				x
<i>Microcoleus vaginatus</i>									x		x									
<i>Nostoc commune</i>																				
<i>N. microscopicum</i>	x								x											
<i>Phormidium ambiguuum</i>														x						
<i>P. corium</i>	x		x				x			x		x				x				
<i>P. molle</i>																				
<i>P. cf. usteri</i>									x		x									
<i>Scytonema mirabile</i>																				
Total	8	5	10	5	5	3	9	8	7	6	8	7	2	3	5	4	9	4	7	4

Table 1. Continued.

Species	692	693	694	743	744	745	746	747	748	749	7410	751	771	772	774	776	777	778	7711
<b>Algae</b>																			
<i>Apatococcus lobatus</i>						x													
<i>Bracteacoccus</i> sp.									x										
<i>Chlorella ellipsoidea</i>													x			x			
<i>C. homosphaera</i>																			
<i>C. minutissima</i>								x											
<i>C. cf. mirabilis</i>								x	x				x						
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>																			
<i>C. minor</i>					x								x	x	x	x	x	x	
<i>Choricystis minor</i>																			
<i>C. chodatii</i>																			
<i>Coccobotrys verrucariae</i>																			
<i>Coccomyxa olivacea</i>																			
<i>Desmococcus olivaceus</i>																			
<i>Geminella terricola</i>																			
<i>Hormotila mucigena</i>																			
<i>Keratococcus bicaudatus</i>																			
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	x	x	x	x			x		x	x	x				x		x	x	
<i>K. pseudostichococcus</i>																			
<i>Palmellopsis gelatinosa</i>						x													
<i>Stichococcus bacillaris</i>						x	x	x	x		x		x	x	x		x		x
<i>Trebouxia</i> spp.	x	x				x		x		x					x	x	x	x	x
<i>Trentepohlia iolithus</i>						x													x
<b>Cyanobacteria</b>																			
<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i>						x													
<i>Aphanothece saxicola</i>									x										
<i>Calothrix pulvinata</i>				x	x	x													
<i>Chroococcus limneticus</i>									x										
<i>C. lithophilus</i>						x												x	x
<i>Cyanosarcina parthenonensis</i>				x	x	x	x		x	x	x								
<i>Gloeocapsa aeruginosa</i>																			
<i>G. atrata</i>																			
<i>G. biformis</i>									x										
<i>G. decorticans</i>																			
<i>G. kuetzingiana</i>						x													
<i>G. sanguinea</i>				x	x				x		x								
<i>G. violascea</i>																			
<i>Gloeothece</i> cf. <i>incerta</i>																			
<i>G. palea</i>																			
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>				x					x										
<i>L. tenuis</i>																			
<i>Microcoleus vaginatus</i>				x															
<i>Nostoc commune</i>																			
<i>N. microscopicum</i>																			
<i>Phormidium ambiguum</i>																			
<i>P. corium</i>			x		x				x										
<i>P. molle</i>																			
<i>P. cf. usteri</i>																			
<i>Scytonema mirabile</i>									x		x								
Total	2	3	7	5	1	10	4	4	10	4	5	2	3	2	4	3	5	3	3

Table 1. Continued.

Species	7712	7713	7714	7715	7716	7717	871	872	873	874	875	876	Total
<b>Algae</b>													
<i>Apatococcus lobatus</i>													2
<i>Bracteacoccus</i> sp.							x						9
<i>Chlorella ellipsoidea</i>		x	x				x						9
<i>C. homosphaera</i>													1
<i>C. minutissima</i>			x									x	9
<i>C. cf. mirabilis</i>					x		x	x		x	x		19
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>													7
<i>C. minor</i>						x			x		x	x	20
<i>Choricystis minor</i>				x	x								3
<i>C. chodatii</i>													2
<i>Coccobotrys verrucariae</i>													1
<i>Coccomyxa olivacea</i>													1
<i>Desmococcus olivaceus</i>		x											4
<i>Geminella terricola</i>		x						x			x		9
<i>Hormotila mucigena</i>													1
<i>Keratococcus bicaudatus</i>													2
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	x	x	x	x			x	x			x		39
<i>K. pseudostichococcus</i>													4
<i>Palmellopsis gelatinosa</i>	x							x					5
<i>Stichococcus bacillaris</i>		x	x		x		x						33
<i>Trebouxia</i> spp.	x				x		x		x				35
<i>Trentepohlia iolithus</i>		x		x					x				14
<b>Cyanobacteria</b>													
<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i>													4
<i>Aphanothece saxicola</i>													2
<i>Calothrix pulvinata</i>		x						x			x		15
<i>Chroococcus limneticus</i>							x				x		5
<i>C. lithophilus</i>	x										x		15
<i>Cyanosarcina parthenonensis</i>							x	x			x		20
<i>Gloeocapsa aeruginosa</i>	x												1
<i>G. atrata</i>													4
<i>G. biformis</i>													1
<i>G. decorticans</i>													1
<i>G. kuetzingiana</i>	x												9
<i>G. sanguinea</i>	x	x					x	x					11
<i>G. violascea</i>							x	x			x		6
<i>Gloeothece</i> cf. <i>incerta</i>													1
<i>G. palea</i>			x										1
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>						x	x				x		13
<i>L. tenuis</i>					x								2
<i>Microcoleus vaginatus</i>													3
<i>Nostoc commune</i>													2
<i>N. microscopicum</i>								x					4
<i>Phormidium ambiguuum</i>													1
<i>P. corium</i>													9
<i>P. molle</i>													1
<i>P. cf. usteri</i>	x												4
<i>Scytonema mirabile</i>													2
Total	8	8	5	3	5	2	11	9	3	1	10	2	

Table 2. Morphological classification and occurrence of the 47 identified taxa.

Algae	%	Cyanobacteria	%
Solitary	41	Colonial	56
Filamentous	36	Filamentous	44
Colonial	14		
Sarcinoidal	9		

For each specimen identified, a short description and a drawing (Figures 1-47 in Plates 1-6) will be provided, as well as a photograph when it completes the data (Figures 48-82 in Plates 7-8).

### Algae

The taxa will now be described following an alphabetical order, but their drawings will be classified as a function of their degree of organisation. Otherwise stated, the colour of those algae is green.

#### *Apatococcus lobatus* (Chodat) J.B. Petersen (Fig. 15)

Cells spherical to somewhat compressed, grouped in irregular clusters, up to 50  $\mu\text{m}$  in diameter; one parietal chloroplast, sometimes observed as bilobed, without pyrenoid 5-7  $\mu\text{m}$  in diameter.

#### *Bracteacoccus* sp. (Figs. 1 and 48)

Cells spherical; many polygonal parietal chloroplasts, without pyrenoid; 5-9  $\mu\text{m}$  in diameter. We could not identify the specimens to the species level as it requires the observation of zoospores.

#### *Chlorella ellipsoidea* Gerneck (Figs. 2 and 49)

Cells ellipsoidal; one parietal, cup- to band-shaped chloroplast, with one pyrenoid; autospores ellipsoidal, usually a big one with the others smaller; L=4-12  $\mu\text{m}$ , w=2-8  $\mu\text{m}$ .

#### *Chlorella homosphaera* Skuja (Fig. 3)

Cells spherical; one parietal and cup-shaped chloroplast without pyrenoid; 4-7  $\mu\text{m}$  in diameter.

#### *Chlorella minutissima* Fott et Nováková (Fig. 4)

Cells spherical; one parietal and cup-shaped chloroplast without pyrenoid; 3-4  $\mu\text{m}$  in diameter.

#### *Chlorella* cf. *mirabilis* Andreeva (Figs. 5 and 50)

Cells spherical; one parietal and cup-shaped chloroplast with one pyrenoid; 3-4.5  $\mu\text{m}$  in diameter. Differs from *C. vulgaris* Beijerinck in the diameter of cells (7.5-10  $\mu\text{m}$ ).

#### *Chlorosarcinopsis eremi* Chantanachat et Bold (Figs. 13 and 55)

Cubical packs with subspherical cells; one parietal and cup-shaped chloroplast, covering approximately  $\frac{1}{2}$  of the cells, with one pyrenoid; 3-5  $\mu\text{m}$  in diameter.



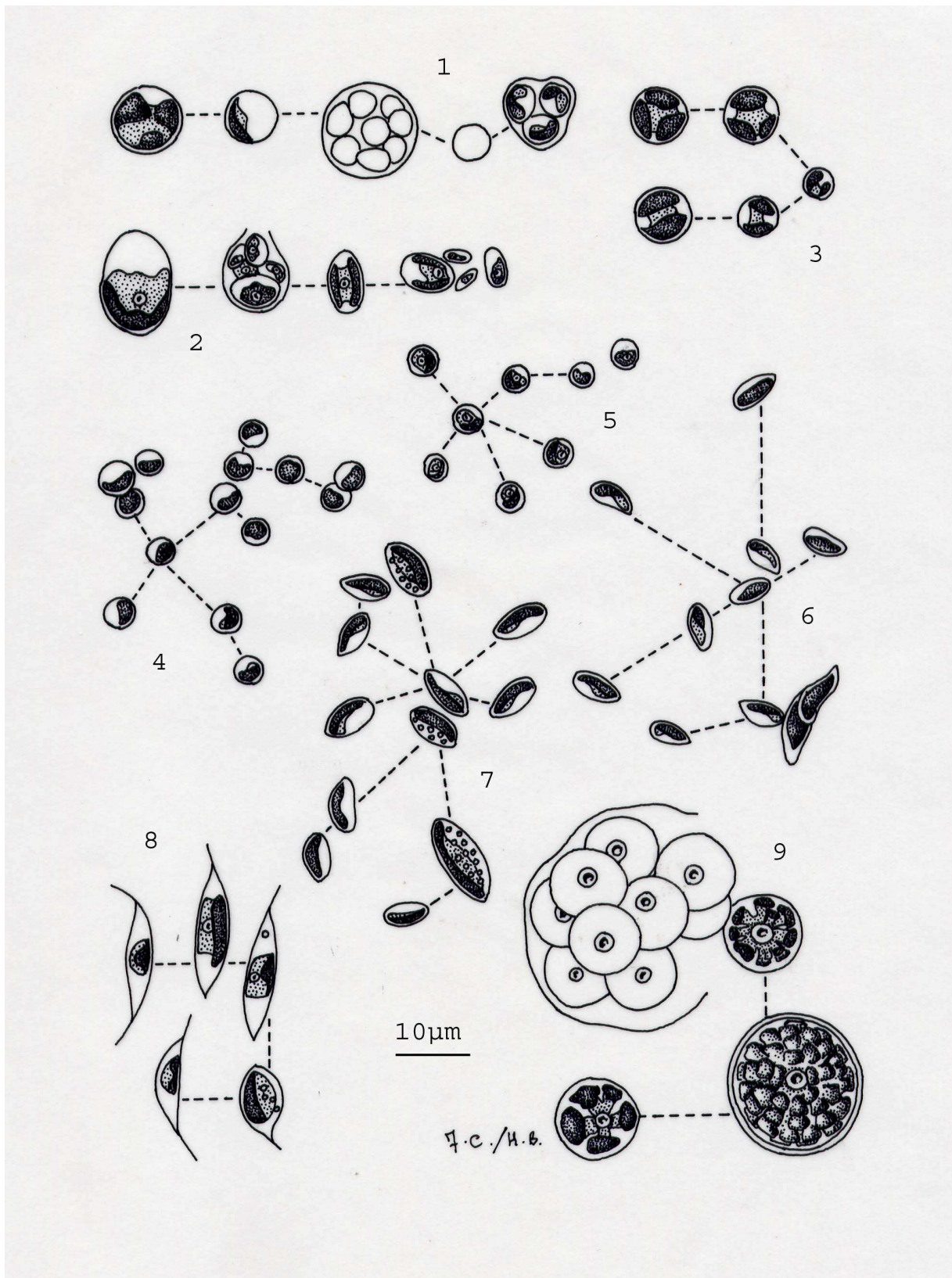


Plate 1. Fig. 1. *Bracteacoccus* sp., Fig. 2. *Chlorella ellipsoidea*, Fig. 3. *Chlorella homosphaera*, Fig. 4. *Chlorella minutissima*, Fig. 5. *Chlorella* cf. *mirabilis*, Fig. 6. *Choricystis minor*, Fig. 7. *Choricystis chodatii*, Fig. 8. *Keratococcus bicaudatus*, Fig. 9. *Trebouxia* spp.

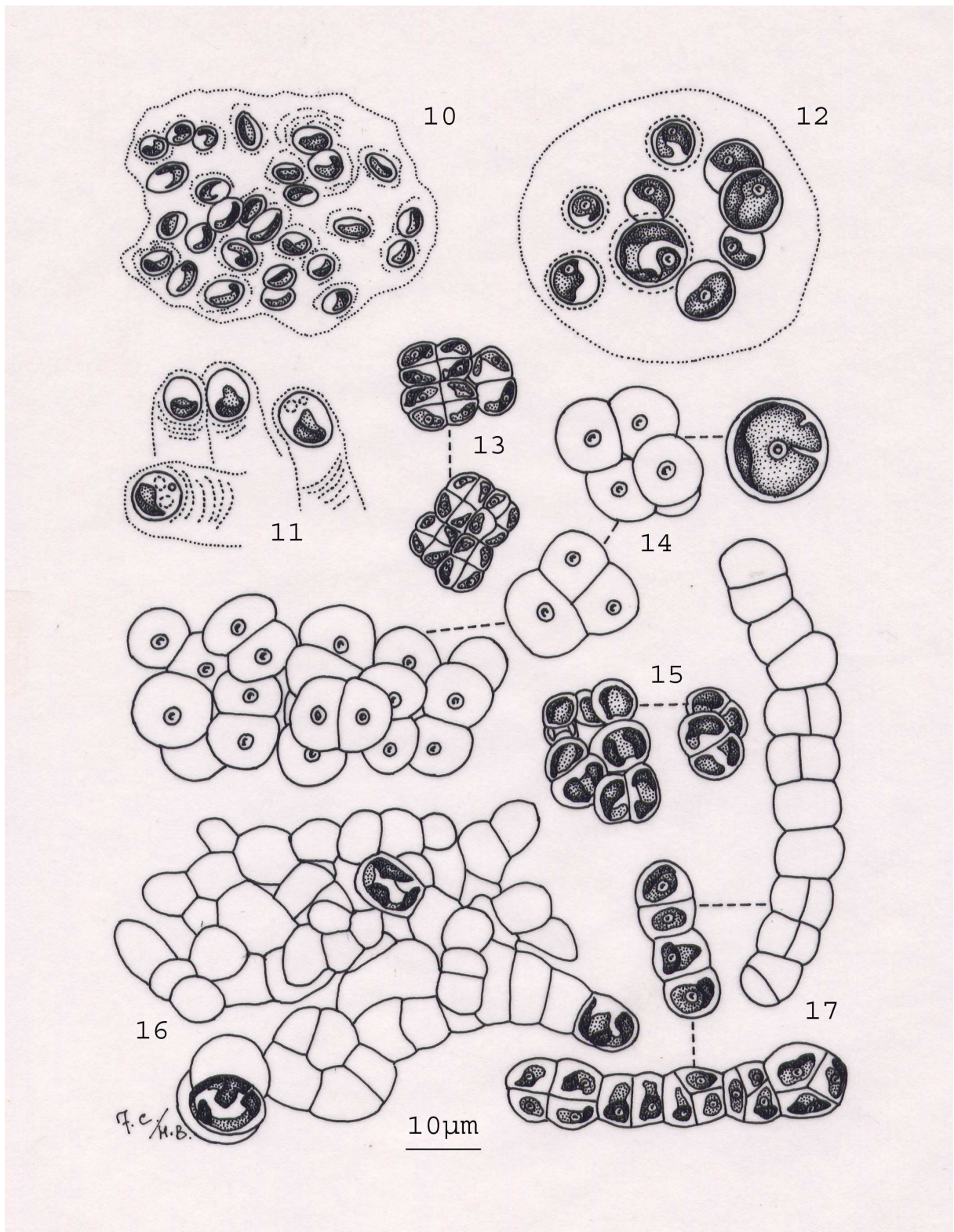


Plate 2. Fig. 10. *Coccomyxa olivacea*, Fig. 11. *Hormotila mucigena*, Fig. 12. *Palmellopsis gelatinosa*  
 Fig. 13. *Chlorosarcinopsis eremi*, Fig. 14. *Chlorosarcinopsis minor*, Fig. 15. *Apatococcus lobatus*,  
 Fig. 16. *Coccobotrys verrucariae*, Fig. 17. *Desmococcus olivaceus*.



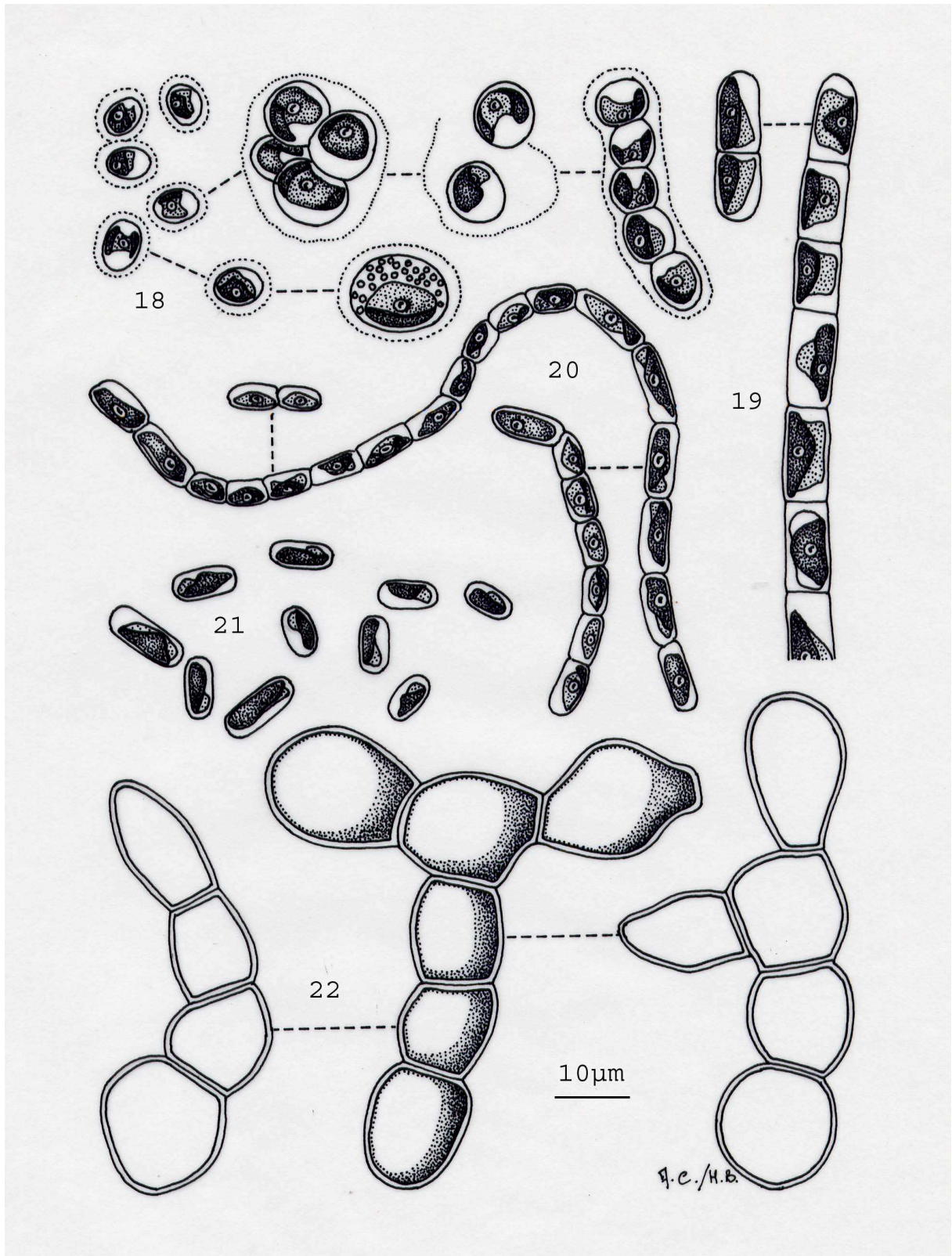


Plate 3. Fig. 18. *Geminella terricola*, Fig. 19. *Klebsormidium flaccidum*, Fig. 20. *Klebsormidium pseudostichococcus*, Fig. 21. *Stichococcus bacillaris*, Fig. 22. *Trentepohlia iolithus*.

*Chlorosarcinopsis minor* (Gerneck) Herndon (Figs. 14 and 56)

Cubical packs with subspherical cells; one parietal and cup-shaped chloroplast, covering approximately  $\frac{1}{2}$  of the cells, with one pyrenoid; cell walls becoming thicker in old specimens; 9-13  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Choricystis chodatii* (Jaag) Fott (Fig. 7)

Cells ellipsoidal; one rounded end, the other pointed; one parietal and cup-shaped chloroplast without pyrenoid; L=5-12  $\mu\text{m}$ , w=2-4.5  $\mu\text{m}$ .

*Choricystis minor* (Skuja) Fott (Figs. 6 and 51)

Differs from *C. chodatii* in the dimensions of cells; L=4-6  $\mu\text{m}$ , w=2-3.5  $\mu\text{m}$ .

*Coccobotrys verrucariae* Chodat em. Vischer (Fig. 16)

Cells globulous, grouped in cubical packs or in short filaments; one parietal chloroplast without pyrenoid; 5-10  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Coccomyxa olivacea* Petersen (Fig. 10)

Cells ovoid to ellipsoidal, grouped within a mucilaginous envelope with concentric striations surrounding cells, forming colonies up to 50  $\mu\text{m}$  in diameter; one parietal and cup-shaped chloroplast without pyrenoid; 3-5  $\mu\text{m}$  in diameter. The dimensions are close to those of *Coccomyxa subglobosa* Pascher, but the shape of the chloroplasts and the aspect of the colony led us to think of *C. olivacea*.

*Desmococcus olivaceus* (Persoon ex Acharius) Laundon (Figs. 17 and 57)

Cells subspherical forming short filaments; one parietal and cup-shaped chloroplast with one pyrenoid; 5-9  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Geminella terricola* Petersen (Figs. 18 and 58-59)

Cells subspherical to cylindrical, solitary in cultures or forming short filaments, enclosed within a mucilage; one parietal and cup-shaped chloroplast with one pyrenoid; 5-12  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Hormotila mucigena* Borzı (Fig. 11)

Cells spherical to oval, solitary along mucilaginous branches and at branch apices, forming colonies up to 50  $\mu\text{m}$  in diameter; one chloroplast with a pyrenoid, hardly visible in our sample; 5-8  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Keratococcus bicaudatus* (A. Braun) Petersen (Figs. 8 and 52)

Cells solitary, ellipsoidal to crescent-shaped, sometimes asymmetrical, with apices acute and sometimes prolonged into a spine; one parietal and cup-shaped chloroplast with one pyrenoid; L=8-16  $\mu\text{m}$ , w=3-5.5  $\mu\text{m}$ .

*Klebsormidium flaccidum* (Kutzling) P.C. Silva, Mattox et W.H. Blackwell (Figs. 19 and 60-61)

Cells cylindrical to barrel-shaped, forming long filaments slightly constricted at cross-walls; one parietal and cup-shaped chloroplast, covering approximately  $\frac{2}{3}$  of the cells, with one clearly visible pyrenoid; L=5-20 (25)  $\mu\text{m}$ , w=4-9 (12)  $\mu\text{m}$ .

*Klebsormidium pseudostichococcus* (Heering) nov. comb. (Figs. 20 and 62)

Cells cylindrical, solitary or arranged in short filaments composed of up to 20 cells; one parietal chloroplast with one pyrenoid; L=5-10  $\mu\text{m}$ , w=3.5  $\mu\text{m}$ .

*Palmellopsis gelatinosa* Korschikoff (Figs. 12 and 54)

Cells spherical to ellipsoidal, grouped within a mucilaginous envelope, forming colonies of up to 100  $\mu\text{m}$  in diameter; one parietal and cup-shaped chloroplast with one pyrenoid; 5-9  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Stichococcus bacillaris* Nägeli (Figs. 21 and 63)

Cells cylindrical, always observed solitary; one parietal and cup-shaped chloroplast without pyrenoid; L=5-10  $\mu\text{m}$ , w=2-4.5  $\mu\text{m}$ .

*Trebouxia* spp. (Figs. 9 and 53)

Cells spherical, usually solitary but sometimes observed in groups; one axile chloroplast, massive, star-shaped, with numerous short outgrowths and one central pyrenoid; 9-23  $\mu\text{m}$  in diameter. We could not identify the specimens to the species level, as it requires the observation of zoospores, but we think that our samples include different species.

*Trentepohlia iolithus* (Linnaeus) Wallroth (Figs. 22 and 64-65)

Cells cylindrical, becoming globular or swollen with age, with thick cell wall, and forming red to orange irregularly branched filaments; L=15-30  $\mu\text{m}$ , w=14-25  $\mu\text{m}$ .

## **Cyanobacteria**

Otherwise stated, the colour of cyanobacterial cells is blue-green.

*Aphanocapsa fusco-lutea* Hansgirg (Fig. 23)

Cells spherical, sparsely distributed in a formless mucilage, forming colonies up to 30  $\mu\text{m}$  in diameter; 1-2  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Aphanothece saxicola* Nägeli (Fig. 24)

Cells ovoid to cylindrical; sparsely distributed in a translucent and formless mucilage, forming colonies up to 50  $\mu\text{m}$  in diameter; L=2-2.5  $\mu\text{m}$ , w=1  $\mu\text{m}$ .

*Calothrix pulvinata* (C. Agardh) Bornet et Flahault (Figs. 44 and 79)

Cells cylindrical, forming trichomes deeply constricted at cross-walls, swollen at the base and slightly attenuated at the end, surrounded by a firm sheath, colourless to yellowish; heterocyst basal, apart from the sheath; filament 7-12  $\mu\text{m}$  wide, up to 1 mm long; L=3-6  $\mu\text{m}$ , w=5-10  $\mu\text{m}$ .

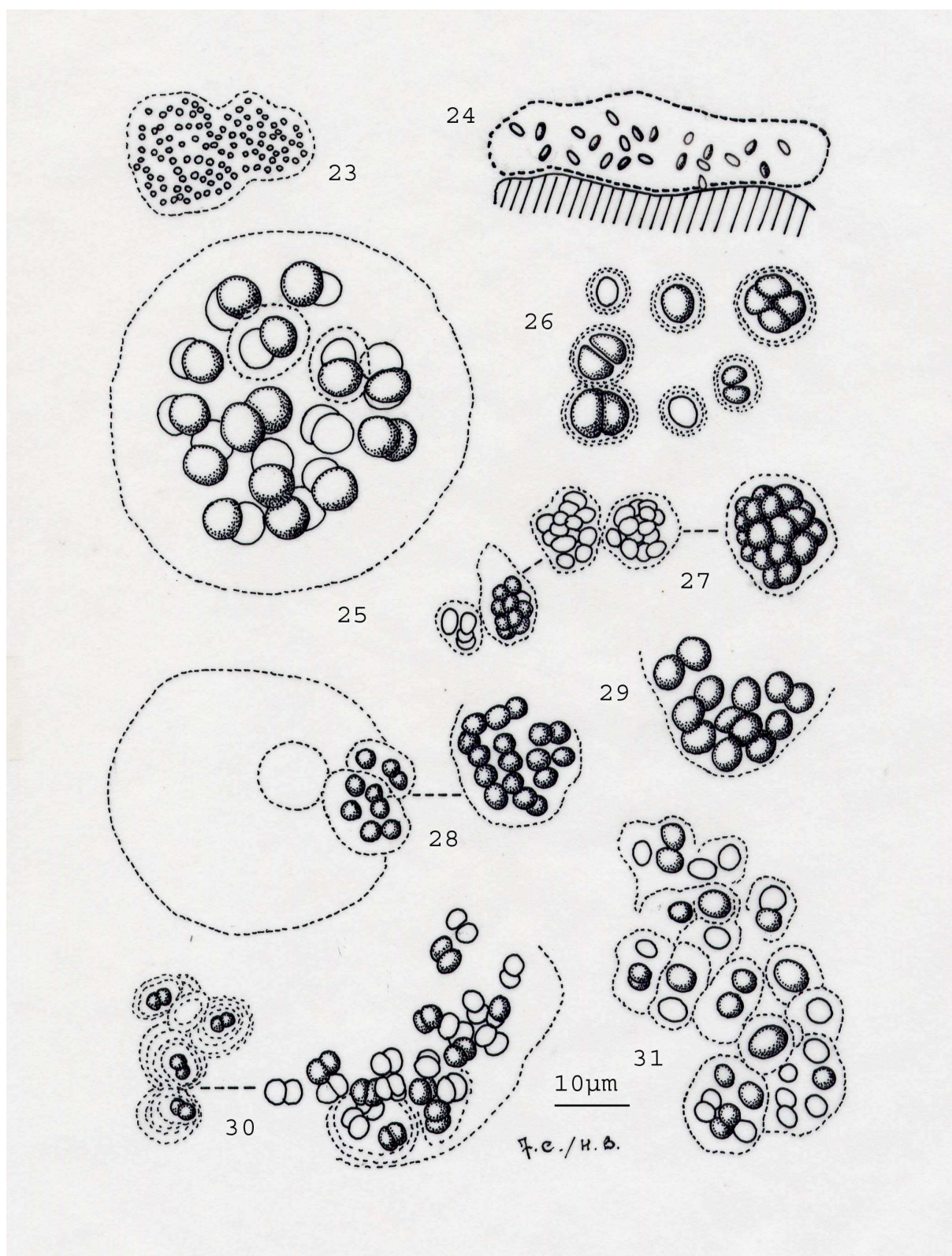
*Chroococcus limneticus* Lemmermann (Figs. 25 and 66)

Cells spherical, surrounded by individual mucilaginous envelopes, distributed in a colourless and spherical gelatinous slime; 4.5-5.5  $\mu\text{m}$  in diameter. Although being commonly described as a planktic species, *C. limneticus* was previously identified on stones walls (SCHLICHTING 1975), which led us to this identification.

*Chroococcus lithophilus* Ercegović (Figs. 26 and 67)

Cells spherical, hemispherical after division, surrounded by a thin, colourless to yellowish brown, mucilage; 4-8  $\mu\text{m}$  in diameter.





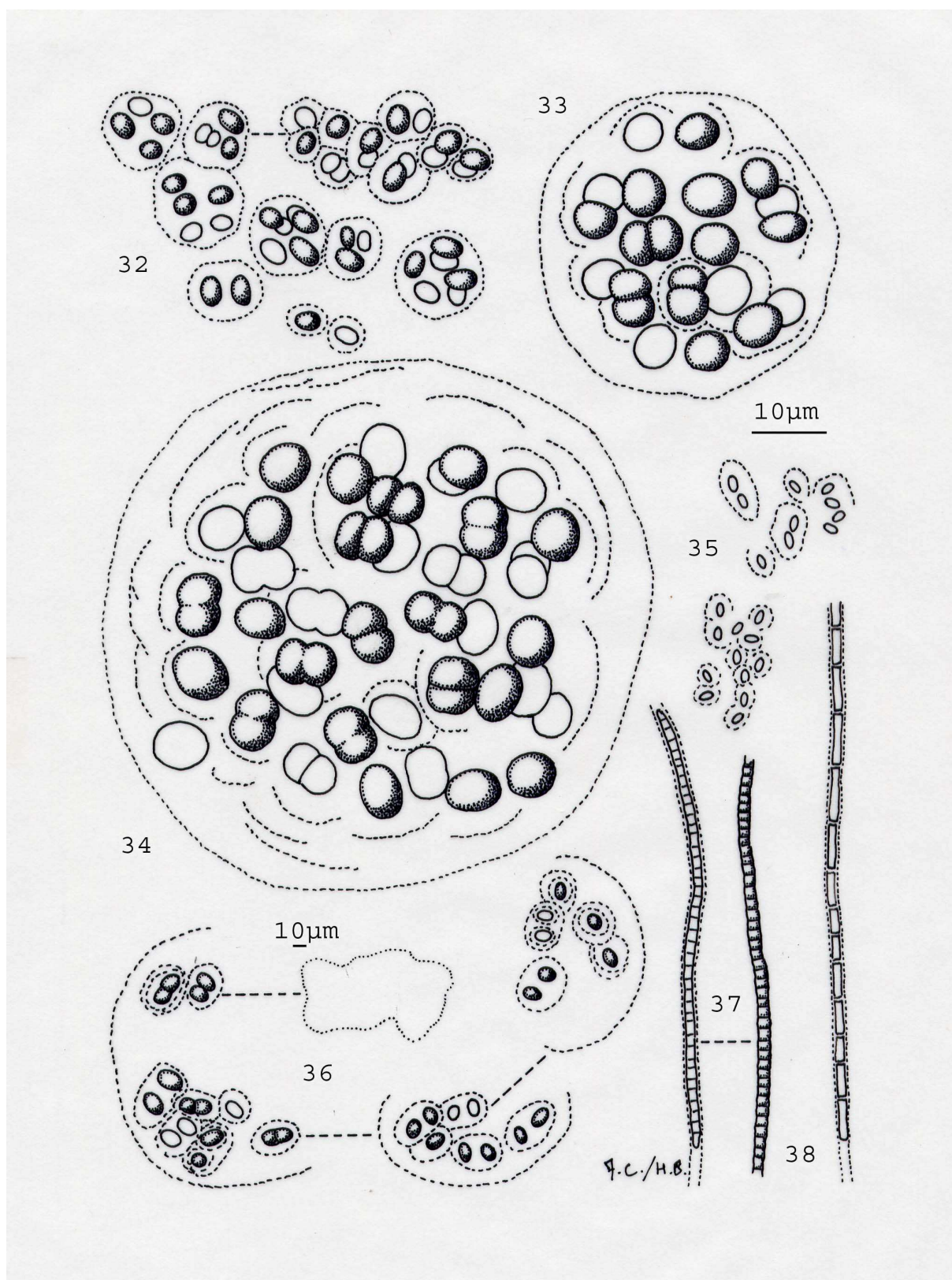


Plate 5. Fig. 32. *Gloeocapsa kuetzingiana*, Fig. 33. *Gloeocapsa sanguinea*, Fig. 34. *Gloeocapsa violascea*, Fig. 35. *Gloeothece* cf. *incerta*, Fig. 36. *Gloeothece palea*, Fig. 37. *Leptolyngbya foveolarum*, Fig. 38. *Leptolyngbya tenuis*.



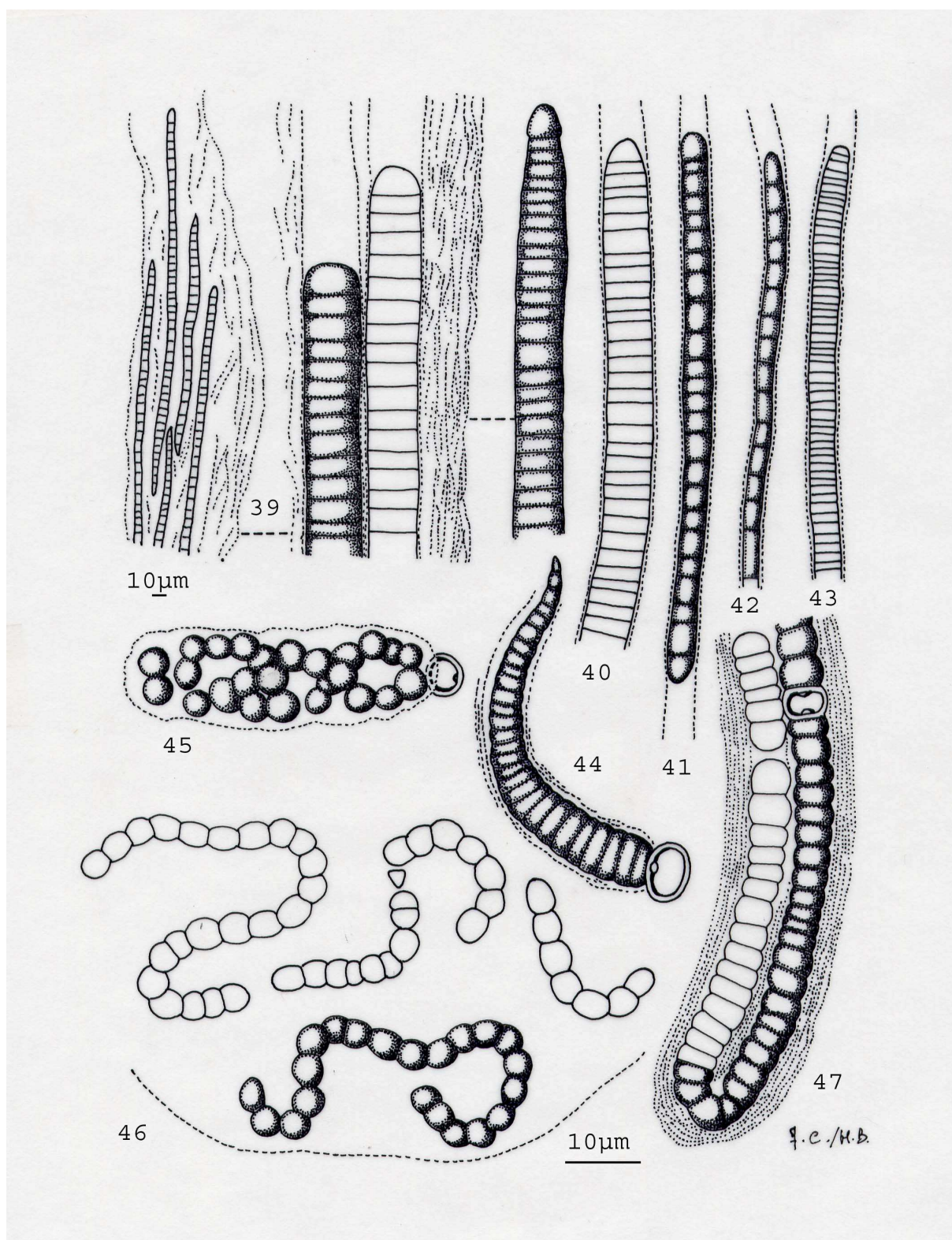


Plate 6. Fig. 39. *Microcoleus vaginatus*, Fig. 40. *Phormidium ambiguum*, Fig. 41. *Phormidium corium*, Fig. 42. *Phormidium molle*, Fig. 43. *Phormidium* cf. *usteri*, Fig. 44. *Calothrix pulvinata*, Fig. 45. *Nostoc commune*, Fig. 46. *Nostoc microscopicum*, Fig. 47. *Scytonema mirabile*.



*Cyanosarcina parthenonensis* Anagnostidis in Anagnostidis et Pantazidou (Figs. 27 and 68)  
Cells subspherical, olive-green, arranged in more or less cubic and dense aggregates up to 20 µm in diameter; 2-4 µm in diameter.

*Gloeocapsa aeruginosa* Kützing (Fig. 28)  
Cells spherical, surrounded with colourless mucilaginous envelopes, more or less spherical; many subcolonies assembled to form an amorphous colony up to 50 µm in diameter; 2.5-3 µm in diameter.

*Gloeocapsa atrata* Kützing (Figs. 29 and 69)  
Cells spherical, densely distributed in colourless mucilaginous subcolonies, hardly visible in our samples; 4-5 µm in diameter.

*Gloeocapsa biformis* Ercegović (Fig. 30)  
Cells spherical, distributed in yellow-brown, lamellated mucilaginous subcolonies; 2-3 µm in diameter.

*Gloeocapsa decorticans* (A. Braun) Richter in Wille (Figs. 31 and 70)  
Cells spherical to slightly oval, forming subcolonies enveloped by yellow-brown mucilage; 3-5 µm in diameter.

*Gloeocapsa kuetzingiana* Nägeli (Figs. 32 and 71)  
Cells spherical, forming subspherical subcolonies enveloped by a colourless mucilage; 3-5 µm in diameter.

*Gloeocapsa sanguinea* (Agardh) Kützing (Figs. 33 and 72)  
Cells spherical to oval, surrounded by distinctly stratified envelopes and distributed in intensely red, spherical mucilaginous colonies; 3-6 µm in diameter.

*Gloeocapsa violascea* (Corda) Rabenhorst (Figs. 34 and 73)  
Cells spherical to oval, surrounded by distinctly stratified envelopes and distributed in violet to blackish, spherical mucilaginous colonies; 5-7 µm in diameter.

*Gloeothece* cf. *incerta* Skuja (Fig. 35)  
Cells oval-cylindrical, surrounded by individual envelope, and sparsely distributed within a yellow mucilage; L=2-3 µm, w=2 µm.

*Gloeothece palea* (Kützing) Rabenhorst (Fig. 36)  
Cells oval to cylindrical, surrounded by individual envelopes, and sparsely distributed in a yellow mucilage; L=2-2.5 µm, w=1 µm.

*Leptolyngbya foveolarum* (Montagne ex Gomont) Anagnostidis et Komárek (Figs. 37 and 74)  
Filament straight; sheath not lamellated; trichomes constricted at the cell wall; rounded end; L=1-3 µm, w=1.5-2 µm.

*Leptolyngbya tenuis* (Gomont) Anagnostidis et Komárek (Fig. 38)  
Filament straight; sheath not lamellated; trichomes constricted at the cell wall; rounded end; L=3-6 µm, w=1-1.5 µm.

*Microcoleus vaginatus* Gomont ex Gomont (Figs. 39 and 75)

Filaments formed by a mat of interwoven trichomes surrounded by a sheath, not constricted at the cross-walls and provided with a calyptra; L=2.5-4.5  $\mu\text{m}$ , w=5-7  $\mu\text{m}$ .

*Nostoc commune* (Vaucher) Bornet et Flahault (Figs. 45 and 80)

Trichomes composed by short barrel-shaped cells, deeply constricted at the cross-walls, surrounded by an amorphous and colourless mucilage; an heterocyt often observed outside the colony in culture; cells 3.5-4  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Nostoc microscopicum* (Carmichael in Hooker) Bornet et Flahault (Figs. 46 and 81-82)

Trichomes composed by short barrel-shaped cells, deeply constricted at the cross-walls, surrounded by a spherical, firm yellow mucilage; heterocyt subspherical, intercalated with the trichomes; colonies up to 200  $\mu\text{m}$  in diameter; cells 4-5  $\mu\text{m}$  in diameter.

*Phormidium ambiguum* Gomont ex Gomont (Figs. 40 and 76)

Filament straight; cell wall not constricted; rounded end, not attenuated; L=1.5-3  $\mu\text{m}$ , w=4-6  $\mu\text{m}$ .

*Phormidium corium* Gomont (Figs. 41 and 78)

Filament straight; cell wall not constricted; rounded end; L=2-5  $\mu\text{m}$ , w=3-7  $\mu\text{m}$ .

*Phormidium molle* Gomont (Fig. 42)

Filament straight; cell wall not constricted; L=3-6  $\mu\text{m}$ , w=2-3  $\mu\text{m}$ .

*Phormidium cf. usteri* Schmidle (Figs. 43 and 77)

Filament straight; cell wall not constricted; rounded end; L=1-2.5  $\mu\text{m}$ , w=3-4  $\mu\text{m}$ .

*Scytonema mirabile* (Dillwyn) Bornet (Fig. 47)

Cells cylindrical forming entangled, mostly false-branched filaments; heterocyts spherical intercalated; filaments surrounded with yellow-brown sheaths, strongly lamellated; L=2.5-6.5  $\mu\text{m}$ , w=7-8  $\mu\text{m}$ .

Most of the species found here are widespread subaerial algae and cyanobacteria, reported from many geographical areas. The predominant green algae were *Klebsormidium flaccidum* (55 %), *Trebouxia* spp. (49 %), *Stichococcus bacillaris* (46 %), *Chlorosarcinopsis minor* (28 %) and *Chlorella cf. mirabilis* (27 %). Among cyanobacteria, colonial forms were the most frequently observed with *Cyanosarcina parthenonensis* (28 %), *Chroococcus lithophilus* (21 %), *Gloeocapsa sanguinea* (15 %) and *G. violascea* (8 %). They were always identified directly from the samples, as they did not grow in culture. Some filamentous cyanobacteria were also identified commonly as *Calothrix pulvinata* (21 %), *Leptolyngbya foveolarum* (18 %) and *Phormidium corium* (13 %) (Table 3). In contrary to the colonial forms, they were observed as short filaments in the samples but they developed abundantly in culture, which made their identification easier. A dominance of algal species was observed in 77 % of the samples, whereas cyanobacteria were only found to be dominant in 23 % of the samples. Moreover, in 49 % of the samples, the biofilm was composed of a dominant species, representing more than 50 % of the biomass. Except in one sample, where the cyanobacteria *Gloeothece palea* was the main component of the biofilm, the dominant species were algae: *Chlorosarcinopsis minor* (18 %), *Trentepohlia iolithus* (14 %), *Klebsormidium flaccidum* (11 %), *Trebouxia* spp. (4 %) and *Keratococcus bicaudatus* (1 %).

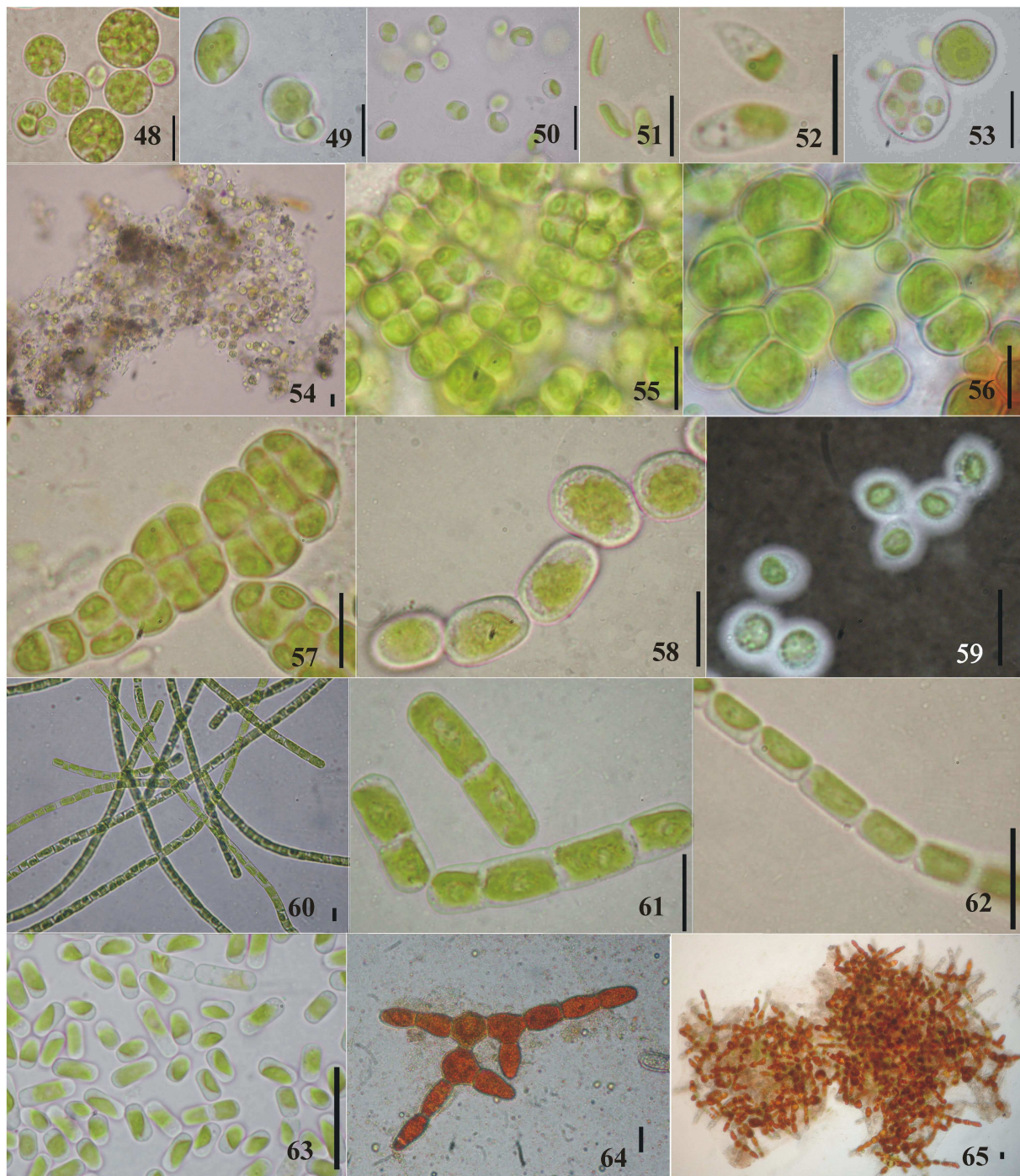


Plate 7. Fig. 48. *Bracteacoccus* sp., Fig. 49. *Chlorella ellipsoidea*, Fig. 50. *Chlorella* cf. *mirabilis*, Fig. 51. *Choricystis minor*, Fig. 52. *Keratococcus bicaudatus*, Fig. 53. *Trebouxia* sp., Fig. 54. *Palmellopsis gelatinosa*, Fig. 55. *Chlorosarcinopsis eremi*, Fig. 56. *Chlorosarcinopsis minor*, Fig. 57. *Desmococcus olivaceus*, Fig. 58-59. *Geminella terricola*, mucilage visible with india ink (59), Fig. 60-61. *Klebsormidium flaccidum*, Fig. 62. *Klebsormidium pseudostichococcus*, Fig. 63. *Stichococcus bacillaris*, Fig. 64-65. *Trentepohlia iolithus*. Scale bar = 10  $\mu$ m.



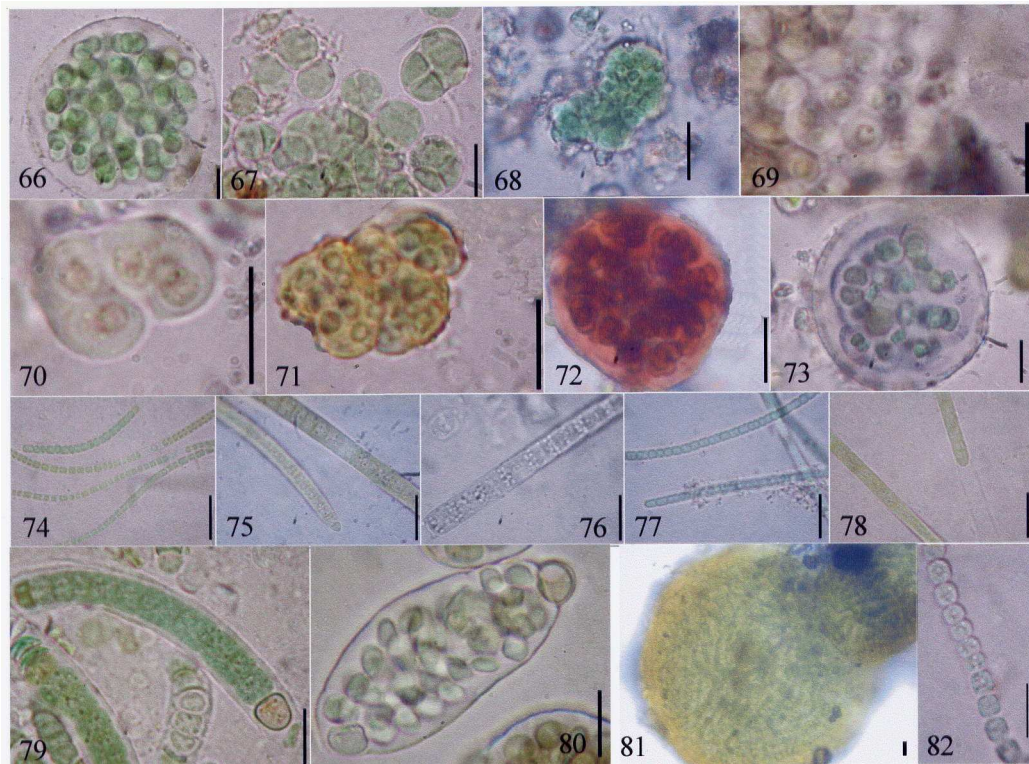


Plate 8. Fig. 66. *Chroococcus limneticus*, Fig. 67. *Chroococcus lithophilus*, Fig. 68. *Cyanosarcina parthenonensis*, Fig. 69. *Gloeocapsa atrata*, Fig. 70. *Gloeocapsa decorticans*, Fig. 71. *Gloeocapsa kuetzingiana*, Fig. 72. *Gloeocapsa sanguinea*, Fig. 73. *Gloeocapsa violascea*, Fig. 74. *Leptolyngbya foveolarum*, Fig. 75. *Microcoleus vaginatus*, Fig. 76. *Phormidium ambiguum*, Fig. 77. *Phormidium* cf. *usteri*, Fig. 78. *Phormidium corium*, Fig. 79. *Calothrix pulvinata*, Fig. 80. *Nostoc commune*, Fig. 81-82. *Nostoc microscopicum*: a colony (81) and a trichome (82). Scale bar = 10 µm.

## Discussion

All along our study, three kinds of discolorations were observed on building façades: the green ones, mainly composed of green algae; the blackish ones, composed of green algae and cyanobacteria; and the red ones, due to the green alga *Trentepohlia iolithus*.

Among the green algae, *Klebsormidium flaccidum* is of first importance, due to its frequent occurrence, and because it was often present as the dominant alga in the investigated biofilms. This filamentous green alga is a common coloniser of various substrates, and it knows a widespread distribution in temperate regions (JOHN 1988, ORTEGA-CALVO et al. 1991, ORTEGA-CALVO et al. 1993, RIFÓN-LASTRA & NOGUEROL-SEOANE 2001, RINDI & GUIRY 2004, GAYLARDE & GAYLARDE 2005) and in tropical ones (GAYLARDE & GAYLARDE 1999, 2000, CRISPIM et al. 2004). This occurrence can be attributed to the capacity of *Klebsormidium* species to survive in highly dehydrated state (RINDI & GUIRY 2004), even if they generally grow in places of high humidity. The algae *Trebouxia* spp. were frequently identified in our samples and were also found in 4 % of them as the main component of the biofilm. As fungi were often observed together with this alga, it could mean that a lichen was being formed. Two of our original samples were discarded from the set of data exploited here, as they appeared to be lichens of *Trebouxia* sp. and a fungi. *Stichococcus bacillaris* and *Chlorella* cf. *mirabilis* are also common subaerial algae but were never encountered as dominant specimens of the biofilms. They were identified on all kinds of substrates. This was

Table 3. Occurrences (%) of main algae and cyanobacteria from a total of 71 samples.

Algae	%	Cyanobacteria	%
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	55	<i>Cyanosarcina parthenonensis</i>	28
<i>Trebouxia</i> spp.	49	<i>Chroococcus lithophilus</i>	21
<i>Stichococcus bacillaris</i>	46	<i>Calothrix pulvinata</i>	21
<i>Chlorosarcinopsis minor</i>	28	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	18
<i>Chlorella</i> cf. <i>mirabilis</i>	27	<i>Gloeocapsa sanguinea</i>	15
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	13	<i>Phormidium corium</i>	13
<i>Chlorella minutissima</i>	13	<i>Gloeocapsa violascea</i>	8
<i>Geminella terricola</i>	13	<i>Chroococcus limneticus</i>	7
<i>Bracteacoccus</i> sp.	13		

not the case for *Chlorosarcinopsis minor* which was quite exclusively identified on painted substrates, where this alga was always the dominant one. This ecology has apparently never been noted.

The extensive and conspicuous red stainings observed on buildings could be attributed to the green alga *Trentepohlia iolithus*. The red colour was due to  $\beta$ -carotene pigments contained in lipid droplets, their characteristic orange colour being brought out when a finger was rubbed on the algae mat. When encountered, this alga was often dominant and associated with a few other green algae, in most samples *Stichococcus bacillaris*, *Chlorella* cf. *mirabilis* and fungi. It was never observed in our samples together with cyanobacteria. The colonised substrates were found to be one-coat rendering mortars, classical mortars and concrete, which appears to be in line with the ecology of specimens observed previously in France and in western Ireland (RINDI & GUIRY 2002, RINDI et al. 2003). *Trentepohlia iolithus* is known to be widespread in Europe, especially in humid places (RINDI et al. 2003). After our observations, *T. iolithus* was very common in Brittany, where it was the main alga source of discolorations on buildings in the countryside, and along the Manche and Atlantic coast. Indeed, these regions subjected to the oceanic climate experience high humidity. However, red colonisations attributed to *T. iolithus* were also sometimes encountered in places hundred kilometres away from the sea (samples 7711, 7715, 451, 191 and observations in Grenoble), under drier climates. Species of the genus *Trentepohlia* are widespread under tropical climates where they are ones of the predominant algae together with cyanobacteria (WEE & LEE 1980, JOHN 1988, GAYLARDE & GAYLARDE 1999, 2000, 2005, CHEW & PING 2003, CRISPIM et al. 2004).

Most papers dealing with cyanobacteria growing on buildings present identifications at the generic level, so we lack information to compare those data to our results. Thus, although being ones of the most abundant cyanobacteria in our samples, two of our specimens were apparently never described on buildings substrates: *Cyanosarcina parthenonensis*, which was only mentioned from marbles of the Parthenon (ANAGNOSTIDIS et al. 1983), and *Calothrix pulvinata*, which was never described as a subaerial specimen, even if some descriptions of the genus *Calothrix* were already published (WEE & LEE 1980, JOHN 1988, CRISPIM et al. 2004).

Finally, it can be noted that green algae were more frequently present in our samples than cyanobacteria. This observation is in good line with previous studies, as green algae are known to be usually dominant in temperate regions, as they need humidity and moderate light to develop, whereas cyanobacteria dominate in tropical ones (JOHN 1988, GAYLARDE & GAYLARDE 2005). Indeed, due to their ability to withstand high temperatures and dessication thanks to their sheaths or mucilage, cyanobacteria are often the main components of biofilms

under tropical regions. They can also protect themselves from ultraviolet irradiation with protective pigments. That was the case in our samples with the sheath of *Calothrix pulvinata* being sometimes shaded in orange, or the slime of *Gloeocapsa sanguinea*, *G. violascea*, *Chroococcus lithophilus* or *Nostoc microscopicum* coloured in red, violet or yellow-orange, those colours otherwise being often a cause for the blackish aspect of some samples.

### Concluding remarks

Most of algae and cyanobacteria species described here are widespread and well-known from building façades substrates. To complete this work, a statistical treatment of this set of data has been led to show which factors influence the colonization of buildings by those micro-organisms.

### Acknowledgements

The study was funded by Rhodia PPMC and by grant n° 294/2003 from ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique).

### Bibliography

- ANAGNOSTIDIS, K., ECONOMOU-AMILI, A., & ROUSSOMOUSTAKAKI, M. (1983): Epilithic and chasmolithic microflora (Cyanophyta, Bacillariophyta) from marbles of the Parthenon (Acropolis-Athens, Greece) - *Nova Hedwigia*. **38**: 227-287.
- BELLINZONI, A. M., CANEVA, G., & RICCI, S. (2003): Ecological trends in travertine colonisation by pioneer algae and plant communities - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **51**: 203-210.
- BOURRELLY, P. (1966): *Les algues d'eau douce*. 1. Algues vertes, N. Boubée & Cie, Paris.
- BOURRELLY, P. (1985): *Les algues d'eau douce*. 3. Algues bleues et rouges, N. Boubée & Cie, Paris.
- CHEW, M. Y. L. & PING, T. P. (2003): *Staining of facades*, World Scientific Publishing, Singapore.
- CRISPIM, C. A., GAYLARDE, C. C., & GAYLARDE, P. M. (2004): Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **54**: 121-124.
- CRISPIM, C. A., GAYLARDE, P. M., & GAYLARDE, C. C. (2003): Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings - *Current Microbiology*. **46**: 79-82.
- DUBOSC, A., ESCADEILLAS, G., & BLANC, P. J. (2001): Characterization of biological stains on external concrete walls and influence of concrete as underlying material - *Cement and Concrete Research*. **31**: 1613-1617.
- ETTL, H. & GÄRTNER, G. (1995): *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New-York.
- FLORES, M., LORENZO, J., & GOMEZ-ALARCON, G. (1997): Algae and bacteria on historic monuments at Alcala de Henares, Spain - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **40**: 241-246.
- GAYLARDE, P. M. & GAYLARDE, C. C. (1999): Algae and cyanobacteria on painted surfaces in Southern Brazil - *Revista de Microbiologia*. **30**: 209-213.

- GAYLARDE, P. M. & GAYLARDE, C. C. (2000): Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **46**: 93-97.
- GAYLARDE, C. C., GAYLARDE, P. M., COPP, J., & NEILAN, B. (2004): Polyphasic detection of cyanobacteria in terrestrial biofilms - *Biofouling*. **20**.
- GAYLARDE, C. C. & GAYLARDE, P. M. (2005): A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **55**: 131-139.
- GEITLER, L. (1932): *Cyanophyceae*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- GÓMEZ-ALARCÓN, G., MUÑOZ, M., ARIÑO, X., & ORTEGA-CALVO, J. J. (1995): Microbial communities in weathered sandstones: the case of Carrasosa del Campo church, Spain - *The Science of Total Environment*. **167**: 249-254.
- GROSSIN, F. & DUPUY, P. (1978): Méthode simplifiée de détermination des constituants des salissures - In "Deterioration and protection of stone monuments", pp. 41, Paris.
- JOHN, D. M. (1988): Algal growths on buildings: a general review and methods of treatment - *Biodeterioration Abstracts*. **2**: 81-102.
- JOHN, D. M., WHITTON, B. A., & BROOK, A. J. (2002): *The freshwater algal flora of the British isles - an identification guide to freshwater and terrestrial algae*, Cambridge University Press, Cambridge.
- JOSHI, C. D. & MUKUNDAN, U. (1997): Algal disfigurement and degradation of architectural paints in India - *Paintindia*. **47**: 27-32.
- KOMÁREK, J. & FOTT, B. (1983): *Das Phytoplankton des Süßwassers - 7. Teil, 1. Hälfte*, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1999): *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprocaryota 1. Chroococcales*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New-York.
- NOGUEROL-SEOANE, A. & RIFÓN-LASTRA, A. (1997): Epilithic phycoflora on monuments. A survey of San Esteban de Ribas de Sil Monastery (Ourense, NW Spain) - *Cryptogamie Algologie*. **18**: 351-361.
- ORTEGA-CALVO, J. J., HERNANDEZ-MARINE, M., & SAIZ-JIMENEZ, C. (1991): Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae - *International Biodeterioration*. **28**: 165-185.
- ORTEGA-CALVO, J. J., SANCHEZ-CASTILLO, P. M., HERNANDEZ-MARINE, M., & SAIZ-JIMENEZ, C. (1993): Isolation and characterization of epilithic chlorophytes and cyanobacteria from two Spanish cathedrals (Salamanca and Toledo) - *Nova Hedwigia*. **57**: 239-253.
- PALMER, R. J. & HIRSCH, P. (1991): Photosynthesis-based microbial communities on two churches in Northern Germany: weathering of granite and glazed brick - *Geomicrobiology Journal*. **9**: 103-118.
- RIFÓN-LASTRA, A. & NOGUEROL-SEOANE, A. (2001): Green algae associated with the granite walls of monuments in Galicia (NW Spain) - *Cryptogamie-Algologie*. **22**: 305-326.
- RINDI, F. & GUIRY, M. D. (2002): Diversity, life history, and ecology of *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta) in urban habitats in western Ireland - *Journal of Phycology*. **38**: 39-54.
- RINDI, F. & GUIRY, M. D. (2003): Composition and distribution of subaerial algal assemblages in Galway city, western Ireland - *Cryptogamie-Algologie*. **24**: 245-267.
- RINDI, F., GUIRY, M. D., CRITCHLEY, A. T., & AR GALL, E. (2003): The distribution of some species of Trentepohliaceae (Trentepohliales, Chlorophyta) in France - *Cryptogamie-Algologie*. **24**: 133-144.
- RINDI, F. & GUIRY, M. D. (2004): Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe - *Phycologia*. **43**: 225-235.

- SAND, W. (1997): Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates - a general mechanistic overview - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **40**: 183-190.
- SCHLICHTING, H. E. (1975): Some subaerial algae from Ireland - *British Phycological Journal*. **10**: 257-261.
- TOMASELLI, L., LAMENTI, G., BOSCO, M., & TIANO, P. (2000): Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **46**: 251-258.
- TRIPATHI, S. N., TIWARI, B. S., & TALPASAYI, E. R. S. (1991): Growth of cyanobacteria (blue-green algae) on urban buildings - *Energy and Buildings*. **15-16**: 499-505.
- VIDELA, H. A., GUIAMET, P. S., & GOMEZ DE SARAIVA, S. (2000): Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico - *International Biodeterioration and Biodegradation*. **46**: 335-341.
- WEE, Y. C. & LEE, K. B. (1980): Proliferation of algae on surfaces of buildings in Singapore - *International Biodeterioration Bulletin*. **16**: 113-117.
- WEE, Y. C. (1988): Growth of algae on exterior painted masonry surfaces - *International Biodeterioration*. **24**: 368-371.

### III.2. Synthèse et commentaires de l'article 1

#### *Outils d'identification*

Les identifications des algues et des cyanobactéries composant les biofilms prélevés ont été réalisées par observation au microscope photonique des caractères phénotypiques\* des individus, outil communément utilisé en taxinomie. Cette méthode peut cependant être soumise à quelques critiques. En effet, la physiologie\* des micro-organismes évolue en fonction de l'environnement dans lequel ils se développent. Ainsi, une espèce colonisant un mur est exposée, en fonction des différentes périodes de l'année, à des températures pouvant varier de -10 °C à +50 °C et à des apports hydriques fluctuants. Les micro-organismes présentent donc des morphologies adaptées à ces conditions extrêmes et peuvent ainsi se développer sous forme de filaments courts, en sécrétant une coque protectrice mucilagineuse ou encore en formant de nombreux akinètes\*. Cependant, une fois cultivés dans des conditions plus favorables, en milieu nutritif liquide ou solide par exemple, les générations d'individus nouvellement formés peuvent aussi perdre des caractéristiques morphologiques nécessaires à leur identification (gaine\*, mucilage, hétérocytes\*, akinètes) ou évoluer de forme ou de dimensions. Afin de pallier d'éventuelles évolutions morphologiques, les micro-organismes ont donc été observés à la fois dans leur état naturel à partir des biofilms prélevés et, si possible, à partir de cultures. Il faut toutefois savoir que l'identification à l'espèce par taxinomie doit parfois être considérée comme indicative, en raison de ce qui vient d'être



évoqué. L'utilisation d'outils phylogénétiques\* permet alors souvent de vérifier la plupart des identifications.

Par ailleurs, GAYLARDE et al. (2004) soulignent que ces deux outils sont également complémentaires pour une autre raison. Ainsi, alors que de nombreuses cyanobactéries de morphotype coccoïde\* constituent les biofilms en façade, les travaux de taxinomie publiés indiquent fréquemment une prépondérance d'organismes filamenteux (ORTEGA-CALVO et al. 1991, JOSHI & MUKUNDAN 1997, GAYLARDE & GAYLARDE 2000, CRISPIM et al. 2003, 2004). En effet, les techniques traditionnelles de culture favorisent le développement de cyanobactéries filamenteuses, qui sont donc souvent identifiées comme majoritaires alors qu'une observation visuelle du prélèvement révèle souvent la présence en grands nombres de morphotypes coccoïdes. Ces observations s'appliquent également à des espèces d'algues observées minoritairement et qui sont difficilement isolables en culture. Ainsi, selon GAYLARDE et al. (2004), une détection polyphasique des micro-organismes constituant des biofilms en façade, basée sur la sélection de micro-organismes morphologiquement distincts puis leur analyse phylogénétique, permet l'identification d'un plus grand nombre d'espèces.

L'utilisation d'outils phylogénétiques, qui permettent donc à la fois de préciser et de compléter le travail d'identification, a toutefois été écartée en raison du peu de temps dont nous disposions pour traiter ce travail.

### ***Conservation des souches\****

La plupart des souches isolées pour identification ont été conservées pour servir de modèles d'étude. Afin de conserver les caractéristiques morphologiques et physiologiques des isolats, il est apparu judicieux de les conserver sur un milieu proche de leur écologie épilithique\*. Le choix s'est porté sur un milieu gélosé à 12 g L<sup>-1</sup> d'agar. Nos études nécessitant des cultures liquides, des réplicats ont donc régulièrement été réalisés à partir de souches conservées sur milieu solide. Par ailleurs, la plupart des souches d'algues et de cyanobactéries isolées sont conservées, en milieu liquide et solide, dans la collection du Muséum National d'Histoire Naturelle (Annexe).

### ***Sélection des modèles d'étude***

De l'inventaire effectué, il est apparu que les algues vertes composent majoritairement la plupart des biofilms sur les revêtements de façade étudiés en France. Les espèces d'algues vertes les plus représentées ont donc été sélectionnées comme modèles pour les études menées ultérieurement. Le choix s'est porté sur les espèces de *Klebsormidium flaccidum*,

*Stichococcus bacillaris* et *Chlorella* cf. *mirabilis*, identifiées respectivement dans 55 %, 46 % et 27 % des prélèvements. Les comportements des espèces de *Trebouxia* ou *Cholorosarcinopsis minor*, espèces identifiées dans 49 % et 28 % des échantillons, et de *Trentepohlia iolithus*, espèce colonisant beaucoup de façades maritimes, n'ont pu être étudiés car leur isolement s'est avéré difficile.

### III.3. Conclusion du chapitre III

L'inventaire des algues et des cyanobactéries colonisant divers revêtements de façade en France nous a permis :

- ↳ d'identifier les espèces les plus communément observées,
- ↳ d'obtenir des souches d'algues et de cyanobactéries en cultures solide et liquide, nécessaires à l'étude de leur comportement,
- ↳ de sélectionner quelques espèces comme modèles d'étude,
- ↳ de mettre en collection toutes les souches isolées.

---

## **IV. Évaluation des facteurs favorisant l'apparition de biofilms algaux en façade**

---

Ce chapitre regroupe les études menées pour identifier les facteurs favorisant l'implantation des algues et des cyanobactéries sur un revêtement. Les recherches ont été effectuées à différentes échelles. Ainsi, l'article 2 présente les facteurs environnementaux et architecturaux entraînant une forte colonisation des revêtements échantillonnés dans l'article 1. L'article 3 et le paragraphe IV.2.2 associé, présentent l'importance des facteurs physiques liés au revêtement même. Enfin, l'article 4 traite des paramètres physico-chimiques des micro-organismes et du substrat pouvant mener à l'adhésion.

### **IV.1. Facteurs environnementaux et architecturaux**

La France étant un pays caractérisé par des climats assez variés, une attention particulière a été portée à effectuer un échantillonnage couvrant des zones géographiques assez distinctes. En plus des données météorologiques obtenues auprès de Météo France, des paramètres tels qu'une éventuelle proximité de végétation, l'orientation de la façade colonisée ou encore la localisation des biofilms vis-à-vis d'un éventuel défaut architectural ont été relevés pour chaque échantillon. Les prélèvements réalisés respectent par ailleurs la diversité des revêtements généralement appliqués sur façades. Ces données environnementales ont été traitées statistiquement afin de mettre en évidence leur importance dans l'apparition des colonisations de façades étudiées. Ce travail fait l'objet de l'article 2.

#### **IV.1.1. Article 2 : Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France**

Hélène Barberousse<sup>a, b</sup>, Ruben J. Lombardo<sup>c</sup>, Guillermo Tell<sup>c</sup>, Alain Couté<sup>b</sup>  
*Biofouling*, 22(2): 69-77, 2006

<sup>a</sup> Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), Département Enveloppe et Revêtements, 84, avenue Jean Jaurès - Champs-sur-Marne - 77447 Marne-la-Vallée Cedex 2 - France

<sup>b</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Département RDDM, USM 505 Écosystèmes et Interactions Toxiques, 57, rue Cuvier / case 39 - 75005 Paris - France

<sup>c</sup> Laboratorio Limnología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires -  
Buenos Aires - Argentina

## **Abstract**

Algae and cyanobacteria are colonisers of building façades. A multivariate analysis of data gathered during a sampling campaign around France proved that precipitation, hygrometry, thermal amplitude, distance from the sea and proximity to vegetation were environmental parameters influencing this colonization. Other influencing factors could be attributed to the nature of the façade coating, mineral substrates being more frequently colonised, and to the architecture, favouring in some cases the formation of damp conditions and thus the colonization of the building envelope.

*Keywords:* Algae, Cyanobacteria, Biofilms, Building façades, Materials.

## **Introduction**

Biofouling of surfaces is a phenomenon which takes place in a large range of ecosystems, either aquatic or terrestrial. The biofilm formed by micro-organisms colonization will be more or less complex depending on the characteristics of the substrate, and the way it protects itself or is protected. This work focuses on the phenomenon of biofouling on building façades.

Algae and cyanobacteria are amongst the first colonisers of the building envelope, after ubiquitous bacteria. These micro-organisms are present in the air as spores, cells or fragments of filaments (BROWN et al. 1964, SCHLICHTING 1975), and are deposited on exposed surfaces, such as roofs or balconies. They will develop if local conditions of light, temperature and humidity are suitable. Stains are thus observed along the rainfall drainways, or on surfaces kept almost continuously moist, e.g. beneath a leaking gutter or an air-conditioner evacuation (JOHN 1988). The presence of an algal and cyanobacterial mat will pave the way for the establishment of other organisms such as fungi, lichen or mosses, and at a final stage if nothing is done to interrupt the colonization, ferns and higher plants. These biofilms create disfiguring stains and subsequent degradation of the building envelope, thus leading to regular high renovation costs of the edifice.

Little is known about the ecology of subaerial algae and cyanobacteria growing on buildings. John (1988) published a complete bibliographical work discussing the nature of algae and cyanobacteria encountered on buildings around the world, and the parameters favouring their establishment: environmental factors such as the degree of dampness of the surface, but also the nature, the roughness and the porosity of the substrate were often quoted. The nature of the colonised substrate was also found to be a factor of segregation of algae in Galway City, Ireland (RINDI & GUIRY 2003), whereas climatic factors were considered to be the most important parameter for determining the distribution of algae colonising the bases of walls in Europe (RINDI & GUIRY 2004). Recently, a comparison of biofilms in Europe and in Latin America showed that the climate had a strong impact on the biodiversity encountered (GAYLARDE & GAYLARDE 2005), cyanobacteria being dominant in Latin America, and algae in Europe. Moreover, in Europe, cyanobacteria were found dominant on mineral substrates and algae on paints. In Spain, a study was carried out to investigate environmental factors such as pH, availability of nitrogen and moisture, structural complexity and human presence, in their ability to affect the distribution of lichens (PRIETO et al. 1999).

Although an understanding of the factors influencing algae and cyanobacteria colonization appears to be fundamental in preventing this situation, there has been no complete work based on statistical analysis of colonised buildings in France. In a precedent paper, algae and cyanobacteria involved in the biofouling of those buildings were identified (Barberousse et al., in press). It was the goal of the present study to identify certain key parameters that may favour biofilm formation on buildings using multivariate analysis.

## Material and Methods

### *Sampling of the biofilms*

A collection of biofilms around France was carried out, intending to be representative of the great diversity of occurring stains, in terms of colour (by hypothesis, the variety of colours observed were due to different algal and cyanobacterial composition), distribution on the envelope of the building and nature of colonised substrates. One sample from each of 71 buildings around France, in 18 departments and diverse climates, was collected by removing a portion of the colonised substrate (Figure 1).

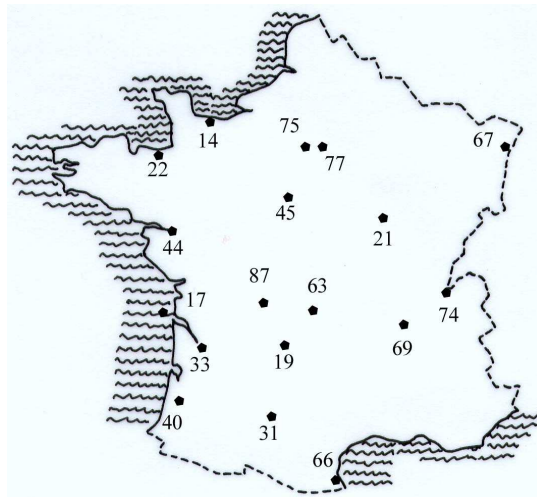


Figure 1. Map of France showing the location of the samples, the numbering representing the zip code of the department.

### *Identification of algal and cyanobacterial species*

In order to analyse the algal and cyanobacterial composition of the samples, a portion of the material was placed for 1-2 h in water to ease the removal of the biofilm, thus enabling a primary study of the populations in their natural state. Another portion of material was placed into Petri dishes with agar Bold Basal medium to enhance culture growth. Cultures were grown in a chamber with a photoperiod of 16 h/8 h light/dark, light intensity of  $15 \pm 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF (Photosynthetic Photon Flux) and a temperature of  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Primary cultures were used to obtain unialgal replicates using the streaking plate method. In order to highlight some of the traits used in taxonomy, lugol solution and India ink were employed. Identifications were based on taxonomic criteria established by GEITLER (1932), BOURRELLY (1966, 1985), KOMÁREK & FOTT (1983), Ettl & GÄRTNER (1995), KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1999) and JOHN et al. (2002). While identifying the specimens composing the

sampled biofilms, a species was noted as dominant when it represented more than 50 % of the total biomass.

### *Collection of environmental and climate parameters*

Environmental parameters were collected for each sample: the altitude and distance from the sea, the presence of vegetation close to the building, the geographical exposition of the colonised substrate, and the nature of the substrate. Substrates sampled included minerals (one-coat rendering mortar, classical mortar, concrete, cement, stone) and organics (paint, organic finish, plastic). A parameter of micro-humidity was also defined to differentiate zones of the building supporting local higher moisture (beneath a leaking gutter, zone of water rejection on bases of walls...) than the others (façade only subjected to rainfalls).

The following climate data were obtained from Météo France for each one of the 18 sampled departments: minimal and maximal temperature, precipitation, relative hygrometry, insolation, snow and speed of wind. Taking into account that building's colonization may take several years, and in order to avoid inter-year fluctuation, the selected set of data consisted of an average of data recorded each month, for 30 years. The 'wetness' was also included in our set of environmental parameters; being the time for which external building surfaces remain wet. The data were extracted from a report (BEGUIN 1986). Finally, in order to evaluate the global influence of the climate on algae and cyanobacteria colonization, the sampled sites were classified in to one of the four climates occurring in France: oceanic, Mediterranean, continental and mountainous.

### *Statistical analyses*

Factorial analyses of variance were performed to test for differences in the number of species among algae and cyanobacteria, and in the total number of species, between the two types of substrates (organic, mineral), low and high micro-humidity and the three classes of climates: continental, mountainous and maritime (oceanic and Mediterranean). The Tukey test was used for multiple pairwise comparisons and data were tested for departures from normality and homocedasticity (ZAR 1996).

Partial canonical correspondence analysis based on species presence/absence data was used to obtain an environmental interpretation of species composition. The type of substrate, the micro-humidity and the climate were specified as co-variables and coded using dummy variables. Forward selection of the environmental variables was done to extract synthetic gradients not correlated with the co-variables. Significance of the canonical axes was tested using Monte Carlo permutation of samples restricted by the conditioning co-variables (TER BRAAK & SMILAUER 1988). For the multivariate analyses, rare species occurring in less than 3 % of samples were removed to improve the species-environment correlation, without affecting the model.

## **Results**

### *Composition of the biofilms*

Generally, the biofilms encountered on buildings façades were mainly green and black stains in the continental part of the country, red staining being more common along the coast. Some examples of building colonisation are shown in Figure 2.



Figure 2. Some of the biofilms collected: (a) extensive red colonization by *Trentepohlia iolithus* on one-coat rendering mortar, along the Atlantic coast; (b) highly diversified green biofilm of algae and cyanobacteria developing on an organic finish beneath vegetation, and phenomenon of micro-humidity on the base of the wall, favouring extensive colonization (arrow); (c) green stains, dominated by *Chlorosarcinopsis minor*, developing on paint; (d-e) black stains, composed of algae and cyanobacteria, appearing in zones of high micro-humidity, beneath joints of tiles (d) or beneath an evacuation of balcony (e).

The main organisms identified were green algae and cyanobacteria, sometimes accompanied by fungi and mosses, more rarely by diatoms and grazers such as rotifers. Table 1 indicates the list of the identified algae and cyanobacteria, as well as their percentage of occurrence in the 71 samples. For a more detailed description of the algal and cyanobacterial composition of the samples, see Barberousse et al. (in press).

In 49 % of the samples, we could identify a dominant species, being an alga in 97 % of them. We observed that in the presence of a dominant species, the mean number of species of cyanobacteria in the biofilms was lower than in absence of dominance (Table 2). In biofilms with number of cyanobacteria species less than that of algae (77 % of the samples) this mean number of species was quite low (Table 3). However, in biofilms with number of cyanobacteria species greater than that of algae (23 % of the samples) they were almost twice more abundant than algae. Moreover, the mean number of algae species was almost constant in all kinds of biofilms (Tables 2 and 3).

Table 1. Algae and cyanobacteria species, codes used for the multivariate analysis and percentage of occurrence (Occ. %) of each species in the 71 sites sampled.

Algae	Code	Occ. (%)	Cyanobacteria	Code	Occ. (%)
<i>Apatococcus lobatus</i>		3	<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i>	Apha_fus	6
<i>Bracteacoccus</i> sp.	Bractec	13	<i>Aphanothece saxicola</i>		3
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Chlo_eli	13	<i>Calothrix pulvinata</i>	Calo_pul	21
<i>C. homosphaera</i>		1	<i>Chroococcus limneticus</i>	Chro_lim	7
<i>C. minutissima</i>	Chlo_min	13	<i>C. lithophilus</i>	Chro_lit	21
<i>C. cf. mirabilis</i>	Chlo_cfM	27	<i>Cyanosarcina parthenonensis</i>	Cyan_par	28
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	Clsa_ere	10	<i>Gloeocapsa aeruginosa</i>		1
<i>C. minor</i>	Clsa_min	28	<i>G. atrata</i>	Gloe_atr	6
<i>Choricystis minor</i>	ChR_min	4	<i>G. biformis</i>		1
<i>C. chodatii</i>		3	<i>G. decorticans</i>		1
<i>Coccobotrys verrucariae</i>		1	<i>G. kuetzingiana</i>	Gloe_ku	13
<i>Coccomyxa olivacea</i>		1	<i>G. sanguinea</i>	Gloe_san	15
<i>Desmococcus olivaceus</i>	Desm_oli	6	<i>G. violascea</i>	Gloe_vio	8
<i>Geminella terricola</i>	Gemi_ter	13	<i>Gloeothece cf. incerta</i>		1
<i>Hormotila mucigena</i>		1	<i>G. palea</i>		1
<i>Keratococcus bicaudatus</i>		3	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	Lept_fov	18
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Kleb_fla	55	<i>L. tenuis</i>		3
<i>K. pseudostichococcus</i>	Kleb_pse	6	<i>Microcoleus vaginatus</i>	Micr_vag	4
<i>Palmellopsis gelatinosa</i>	Palm_gel	7	<i>Nostoc commune</i>		3
<i>Stichococcus bacillaris</i>	Stic_bac	46	<i>N. microscopicum</i>	Nost_mic	6
<i>Trebouxia</i> spp.	Tre_spp	49	<i>Phormidium ambiguum</i>		1
<i>Trentepohlia iolithus</i>	Tren_iol	20	<i>P. corium</i>	Phor_cor	13
			<i>P. molle</i>		1
			<i>P. cf. usteri</i>	Phor_ust	6
			<i>Scytonema mirabile</i>		3

Table 2. Mean number of algae and cyanobacteria species related to the presence or absence of a dominant species in the biofilms.

Dominant species	Biofilms concerned (%)	Mean number of species	
		Algae	Cyanobacteria
Presence	49	3.0	0.5
Absence	51	3.5	3.4

Table 3. Mean number of algae and cyanobacteria species related to the abundance of cyanobacteria in the biofilms.

Abundance of cyanobacteria	Occurrence in biofilms (%)	Mean number of species	
		Algae	Cyanobacteria
≤ 50%	77	3.3	0.9
> 50%	23	2.9	5.4

### ***Influence of environmental and climate parameters***

Colonization of buildings by algae and cyanobacteria was observed everywhere in the country. Table 4 indicates the variations of environmental factors in the 18 departments where biofilms were collected.



Table 4. Values of the environmental variables available for the 18 departments sampled ('-' stands for unknown data; climate: 1 = oceanic, 2 = continental, 3 = mediterranean, 4 = mountainous).

Department	Temperature (°C)	Precipitation (mm)	Hygroscoy (%)	Time of wetness (d 10yr <sup>-1</sup> )	Wind (km h <sup>-1</sup> )	Insolation (h)	Snow (d yr <sup>-1</sup> )	Altitude (m)	Distance from the sea (km)	Climate
14	7.3-14.8	734	82.4	5	17	1704	12	13	10	1
17	9.7-16.7	775	81.1	6.5	14.4	2146	3	5	1	1
19	3.8-13.1	1409	77.3	5.5	-	-	-	250	230	2
21	6.5-15.2	761	78.7	4.5	12.3	1835	21	245	380	2
22	8.9-14.6	671	86.6	5	17.3	1512	2	76	17	1
31	8.8-18.3	657	77.3	4	12.9	2031	5	157	140	2
33	8.8-18.2	968	79.4	5.5	11.6	2050	3	26	100	1
40	7.8-18.9	957	80.3	6	8.5	1909	3	10	35	1
44	8.1-16.5	812	81.2	7	13.8	1855	5	8	45	1
45	6.6-15.5	659	80.2	3.5	15.4	1786	12	100	205	2
63	6.3-16.5	582	73.5	4.5	10.2	1911	19	400	251	4
66	11.2-19.9	553	66.8	2.5	17.1	2451	2	0	1	3
67	6.3-15.0	651	78.2	4.5	10.4	1653	24	143	430	2
69	7.8-16.6	850	75	3.5	11.3	1957	14	211	250	3
74	1.2-12.9	1289	80.3	3.5	7.2	-	90	535	280	4
75	8.7-15.7	650	75.5	3.5	11.8	1703	12	32	140	2
77	6.5-15.5	684	75.5	3.5	14.5	1728	14	100	160	2
87	7.5-15.0	1046	77.7	5.5	11.6	1926	16	639	180	2

Figure 3 shows the occurrence of geographical expositions of each wall sampled for colonization study. Parts of the buildings exposed to the north and west were more frequently subjected to algae and cyanobacteria colonization, in agreement with literature (JOUAN 2004).

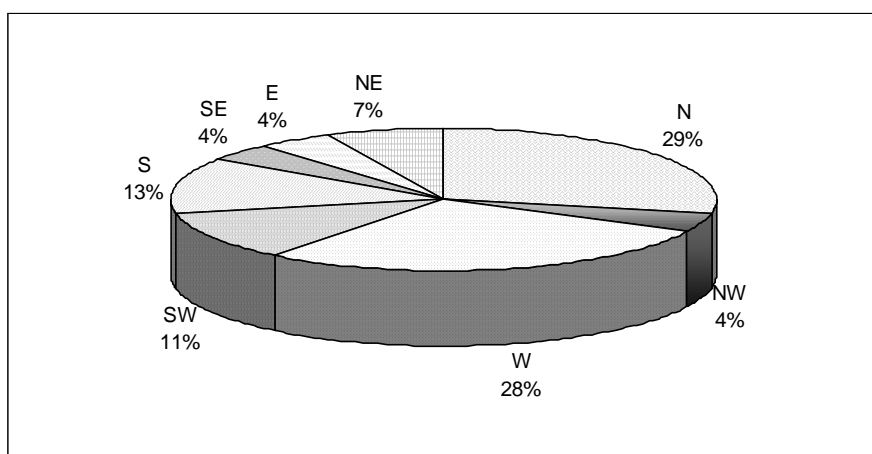


Figure 3. Percentage of occurrence of the exposure aspect of the 71 colonised buildings sampled.

Different kinds of colonised substrates were sampled in order to evaluate an eventual influence of their composition on algae and cyanobacteria establishment. The diversity of the biofilms effectively showed to be influenced by the nature of the substrate (Table 5). The number of colonisers was significantly higher on mineral substrates than on organic ones, independently from the effect of the micro-humidity and the climate ( $p = 0.02$ ). Moreover, the number of colonisers appeared to be higher on traditional mortars than on organic finishes ( $p = 0.042$ ).

Table 5. Occurrence of the different kinds of substrates in the 71 colonised buildings sampled and mean number of species per substrate.

Substrate	Occurrence in biofilms (%)	Mean number of species	Average	
Mineral	One-coat rendering mortar	44	5.5	
	Traditional mortar	15	6.7	
	Concrete	1	9.0	5.7
	Cement	4	4.3	
	Stone	6	3.0	
Organic	Paint	17	5.0	
	Organic finish	8	3.0	3.7
	Plastic	4	3.2	

The micro-humidity did not influence algal colonization, the mean number of species of algae remaining almost constant in biofilms developing in zones of low or high micro-humidity (Table 6). However, the mean number of cyanobacteria species was found to be significantly higher in biofilms growing under high micro-humidity ( $p = 0.026$ ).

Table 6. Mean number of algae and cyanobacteria species, and number of samples related to the nature of the substrate (mineral or organic), the climate (maritime, continental or mountainous) and the micro-humidity (low or high).

Micro-humidity		Algae		Cyanobacteria		Nb of samples	
		Low	High	Low	High	Low	High
Mineral	Maritime	3.2	3.5	2.1	2.7	17	6
	Continental	3.4	3.6	1.4	2.4	14	5
	Mountainous	3.2	2.0	3.0	5.0	6	2
Organic	Maritime	3.4	2.0	1.4	5.0	5	1
	Continental	3.5	2.8	0.8	1.6	8	5
	Mountainous	2.0	-	0	-	2	-

Partial canonical correspondence ordination shows the relationships between algae and cyanobacteria species and environmental variables (Figure 4). Among the environmental variables analysed, only five were included in the model by forward selection: precipitation, hygrometry, thermal amplitude, distance from the sea and presence of vegetation close to the building. The first two axis account for 68.7 % of the species-environment relation (axis 1: 45 %, axis 2: 26.9 %). The species-environment correlation with the first axis was 0.75. The model was not improved by adding the other environmental variables. A Monte Carlo restricted permutation test on the first eigenvalue indicated that the abiotic factors were significantly correlated with the first axis ( $p < 0.005$ ). The environmental centroids obtained for the co-variables classes are identified on Figure 4 as Organic or Mineral for type of substrate, as Low or High for micro-humidity and as Continental, Mountain or Maritime for climate.

The canonical ordination obtained shows that the filamentous algae *Trentepohlia iolithus* (one of the dominant species) and *Klebsormidium pseudostichococcus* (group A) colonise places with high hygrometry and precipitations, low thermal amplitude, and located rather close to the sea. The other often dominant species, a sarcinoide type algae *Chlorosarcinopsis minor*, appears associated with organic substrates in zones of low micro-humidity, far from the sea, under continental climate, and with low precipitation and high hygrometry. The group labelled B is composed of algae and cyanobacteria species which colonize mineral substrates in zones of high hygrometry, closer to the sea and undergoing low micro-humidity. A cluster of mucilaginous algae and cyanobacteria species is related to high precipitation conditions. A group of nude small unicellular algae identified as B1 results associated with lower levels of precipitation and low micro-humidity. The group C clusters mucilaginous cyanobacteria species associated with mineral substrates, low hygrometry and maritime climate. Some species are related to high precipitation and thermal amplitude (*Nostoc microscopicum*, *Phormidium* cf. *usteri*, *Cyanosarcina parthenonensis*, *Gloeocapsa sanguinea*). In zones of low precipitation, species are associated with high micro-humidity (*Leptolyngbya foveolarum*, *Calothrix pulvinata*). On the other hand, three species of cyanobacteria surrounded by rich mucilaginous envelopes and placed out of the clusters, are associated with rather low hygrometry and high thermal amplitude: *Gloeocapsa atrata* and *Aphanocapsa fusco-lutea* are located in places far from the sea and with low precipitations, otherwise *Microcoleus vaginatus* is associated with maritime climate with very low hygrometry. Finally, the group D shows algae and cyanobacteria species associated with mountainous climate, low hygrometry and precipitation, but high micro-humidity. The nude unicellular algal species (cluster D1), including *Choricystis minor*, *Chlorella ellipsoidea* and the dominant *Trebouxia* spp. are related to the proximity of terrestrial vegetation. On the other hand, the filamentous dominant *Klebsormidium flaccidum* appears associated with mineral substrate and higher thermal amplitude.

According to the results showed by the canonical ordination, the presence of each species of algae or cyanobacteria on buildings façades is related to different environmental variables. However, the variables related to humidity (precipitation, hygrometry, micro-humidity) appear to be of particular importance in the presence of most of species.

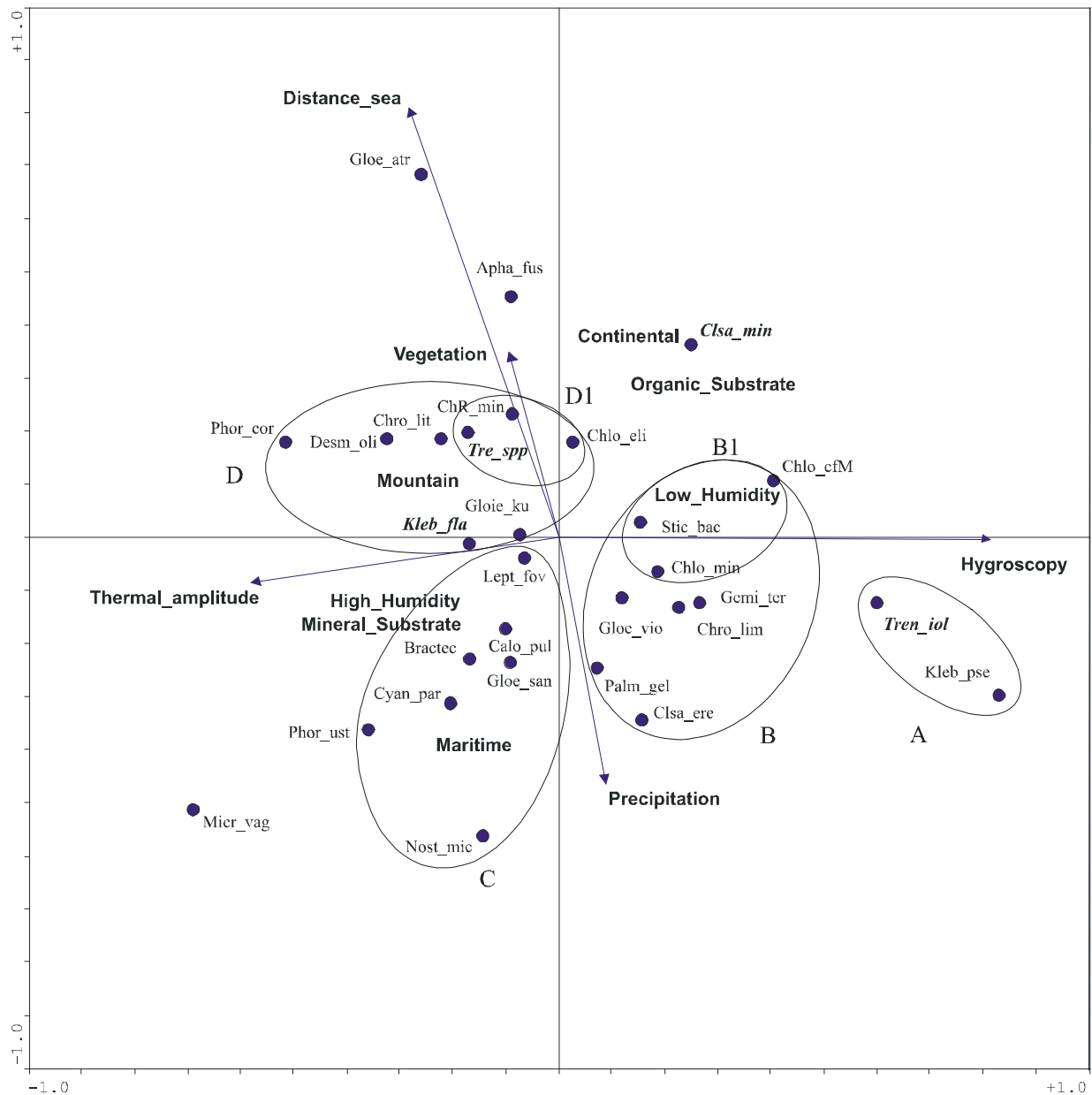


Figure 4. Ordination obtained by canonical correspondence analysis based on algae and cyanobacteria species presence.

## Discussion

### *Biofilm formation and composition*

Algae appeared to be constant components of the samples analysed, cyanobacteria being only present in some of them. Biofilms partly made up of cyanobacteria presented a higher number of specimens than biofilms composed exclusively by algae. Our hypothesis is that algae first colonise the bare surface of the coating (in some cases with one dominating species), which

modifies the surface of the substrate and paves the way for cyanobacteria's subsequent colonization. Once established, cyanobacteria could grow, diversify, and limit by competition the development of the algae, the mean algae number remaining constant. We do not investigate here the succession of organisms in the coating's colonization, as the age of the biofilms is unknown, but GAYLARDE & GAYLARDE (2000) also observed that primary colonisers of painted walls were algae, with cyanobacteria becoming predominant only in more established populations. However, such a succession of organisms had already been observed in Singapore (WEE & LEE 1980). These authors pointed out that *Trentepohlia odorata* was the first coloniser of concrete walls, its presence allowing the settlement of other algae and cyanobacteria. In some cases, *T. odorata* even succumbed to the subsequent prolific growth of cyanobacteria.

This mat of dead and living organisms entangled together would provide sufficient nutrients and humidity for other organisms to settle. We mention here the concept of bioreceptivity of materials (GUILLITTE 1995). When applied on a wall, the coating possesses an intrinsic bioreceptivity which is conferred by its composition, pH of surface, roughness and porosity. These parameters define the ability of the substrate to resist the establishment of micro-organisms. However, this bioreceptivity will evolve under the action of environmental parameters such as weathering, which will modify the sensibility of the substrate to biofouling. If ever some organisms succeed in colonizing the coating, it is no longer the substrate that will influence the fouling, but the new habitat created by the mat of settled organisms. Indeed, if this hypothesis is proved to be true, the inhibition of algae colonization could perhaps prevent cyanobacteria establishment.

### ***Influencing factors attributed to the environment***

Among the parameters favouring the establishment of micro-organisms on building façades, we could differentiate the environmental parameters, from the ones deriving from the building envelope. Climate, thermal amplitude, precipitations, hygrometry, distance from the sea and the presence or absence of vegetation were the environmental variables which proved to influence on algae and cyanobacteria establishment. This is not surprising as it is well known that the presence of those micro-organisms is triggered by water availability (GRANT 1982, JOHN 1988, ORTEGA-CALVO et al. 1995, BELLINZONI et al. 2003). Precipitations and hygrometry allow direct water availability to the façade coatings, mild climate and low temperatures will lead to low water evaporation, and the presence of the sea close to the building will induce higher atmospheric humidity, these parameters establishing favourable conditions for micro-organisms development. Indeed, humidity proved to be of the highest importance in determining the presence or absence of algae or cyanobacteria, being or no enveloped in a mucilage. Canonical ordination also showed that many cyanobacteria could develop in areas of high thermal amplitude: this property may be conferred by the ability of these organisms to resist desiccation thanks to their mucilaginous envelope. CRISPIM et al. (2003) and GAYLARDE & GAYLARDE (2005) showed that the number of algae and cyanobacteria species colonizing buildings was higher in Latin America than in Europe, due to differences in climate. BELLINZONI et al. (2003) also stated that solar irradiation had an ecological role. Moreover, buildings close to the coast generally undergo higher wind and salt sprays, which could be especially important factors for *Trentepohlia iolithus* red colonizations close to maritime façades (RINDI et al. 2003). The presence of vegetation close to the building will also favour rapid colonization of the substrate: the amount of spores of micro-organisms living on this vegetation will be more important in the air, thus increasing the probability of colonization of any substrates in its proximity. Finally, wind and water contact times of the coatings ('wetness') did not show any influence in our study, but they may play an important

role, as wind enables the transport of spores to the building, and the water contact times intervenes in the damping of the building envelope, thus in water availability for micro-organisms.

### *Influencing factors attributed to the building envelope*

Other parameters influencing algae and cyanobacteria settlement could also be attributed to the building exposition and the type of envelope. In France, the façades exposed to the north and west were more often subjected to biofouling. Indeed, in most of the country being influenced by the Atlantic ocean, rain follows dominant winds and comes from the west. Moreover, the façades directed to the north receive less sun, are shaded and thus remain wet for a longer time. Thus, special attention should be paid to the characteristics of the coatings applied on those sensitive expositions.

Physical and chemical characteristics of the substrate also play a determinant role in the establishment of algae or cyanobacteria (GRANT 1982, JOHN 1988, ORTEGA-CALVO et al. 1995). Freshly applied constructional materials are resistant to colonization due to their initial pH of surface as high as 12 (GRANT 1982). After carbonation by water and the atmosphere, the pH will decrease below 9 and establishment of micro-organisms thus becomes possible. The composition of the substrate may also lead to species segregation even between adjacent substrates. For example, SCHLICHTING (1975) identified in Ireland the genus *Chlorella* developing on bricks, whereas *Chroococcus* and *Schizothrix* cyanobacteria were confined to the mortar between them. ORTEGA-CALVO et al. (1993) showed that there was a higher number of species in the mortar than in the granite of the cathedral of Toledo, Spain. During their study of subaerial algae in Galway, Ireland, RINDI & GUIRY (2003) also identified several algal assemblages associated with different habitats. CRISPIM et al. (2003) showed that higher number of algae and cyanobacteria were found on cement and mortar sites than on limestones and in a review, TOMASELLI et al. (2000) showed a preference of several algae and cyanobacteria for calcareous or artificial substrates. Moreover, physical parameters such as roughness or porosity tend to encourage micro-organisms growth (JOHN 1988, ORTEGA-CALVO et al. 1995, TOMASELLI et al. 2000, BARBEROUSSE et al. submitted). In our study, the nature of the substrate is indeed an important parameter influencing colonization, as the number of algae and cyanobacteria species varied between the different substrates examined. More investigations should be carried out to determine which parameter really influences this result, either the composition of the material (e.g. presence of organic components), or other parameters such as roughness or porosity of the material.

This is of special interest, as one-coat rendering mortars dominated in 2000 the façade coating market in France, with almost 85 % of applied façade for individual houses and 50 % for flats. For maintenance and renovation of buildings, these products covered only 25 % of the market: in this area, paints and organic finishes represented 40 % of the market. If organic substrates presented a lower number of micro-organisms than mineral substrates, manufacturers should pay attention to the characteristics influencing the establishment of *Chlorosarcinopsis minor*, as it appeared to be the main coloniser of those substrates.

Finally, it appears that the wetness of façades influences greatly the creation of biofilms. Moreover, the architectural parameters inducing high micro-humidity are to be pointed, as they favour the establishment of cyanobacteria. Several architectural solutions are known to avoid the formation of humid zones on the building envelope. For example, a floor of gravels close to the façade will absorb the water and drive the droplets from the façade, thus avoiding the formation of water rejection on bases of walls. The addition of overhangs to vertical surfaces can force rain water to drain towards outside instead of streaming towards the frontage (e.g. roof overhangings). Metallic cover strips can also be added to cornices, dormers

or windows to shelter the subjacent envelope from the rain. GRANT (1982) also pointed out the details of buildings favouring shading of surfaces and thus duration of the period of wetness. Many solutions exist, and have to be adapted to the variety of configurations that can be encountered in buildings.

### **Concluding remarks**

The establishment of algae and cyanobacteria on buildings appears to be the consequence of a complex action of environmental factors, nature of the envelope and architecture of the buildings. If it is impossible to fight environmental factors, solutions can be considered during the construction of the building. On one side, special attention has to be paid to the selection of coatings to be applied. On another side, architects can rethink the envelope of the building in order to control the streaming path of water, and try to avoid damping of the façade. However, one has to keep in mind that these measures will only succeed in delaying the ineluctable colonization of any substrate by micro-organisms.

### **Acknowledgements**

Financial support was awarded by Rhodia PPMC and by grant n° 294/2003 from ANRT; they are greatly acknowledged.

### **Bibliography**

- Barberousse H, Ruot B, Yéprémian C, Boulon G. Submitted. A water-streaming test to assess the colonization of façade coatings by aerial algae and cyanobacteria. *Building and Environment*.
- Barberousse H, Tell G, Yéprémian C, Couté A. In press. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France. *Algological Studies*.
- Beguin D. 1986. Étude pour la France du risque de mouillage par la pluie des parois verticales des constructions. *Cahiers du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment*, Paris.
- Bellinzoni AM, Caneva G, Ricci S. 2003. Ecological trends in travertine colonisation by pioneer algae and plant communities. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51: 203-210.
- Bourrelly P. 1966. *Les algues d'eau douce*. 1. Algues vertes, N. Boubée & Cie, Paris.
- Bourrelly P. 1985. *Les algues d'eau douce*. 3. Algues bleues et rouges, N. Boubée & Cie, Paris.
- Brown RM, Larson DA, Bold HC. 1964. Airborne algae: their abundance and heterogeneity. *Science* 143: 583-585.
- Crispim CA, Gaylarde PM, Gaylarde CC. 2003. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. *Current Microbiology* 46: 79-82.
- Ettl H, Gärtner G. 1995. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New-York.
- Gaylarde CC, Gaylarde PM. 2005. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55: 131-139.
- Gaylarde PM, Gaylarde CC. 2000. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 93-97.

- Geitler L. 1932. Cyanophyceae, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Grant C. 1982. Fouling of terrestrial substrates by algae and implications for control - A review. *International Biodeterioration Bulletin* 18: 57-65.
- Guillitte O. 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *The Science of the Total Environment* 167: 215-220.
- John DM. 1988. Algal growths on buildings: a general review and methods of treatment. *Biodeterioration Abstracts* 2: 81-102.
- John DM, Whitton BA, Brook AJ. 2002. *The freshwater algal flora of the British isles - an identification guide to freshwater and terrestrial algae*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Jouan MP. 2004. Les micro-organismes en façade. *Qualité Construction* 82: 35-41.
- Komárek J, Anagnostidis K. 1999. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota 1. Chroococcales, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New-York.
- Komárek J, Fott B. 1983. *Das Phytoplankton des Süßwassers - 7. Teil, 1. Hälfte*, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
- Ortega-Calvo JJ, Ariño X, Hernandez-Marine M, Saiz-Jimenez C. 1995. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *The Science of Total Environment* 167: 329-341.
- Ortega-Calvo JJ, Sanchez-Castillo PM, Hernandez-Marine M, Saiz-Jimenez C. 1993. Isolation and characterization of epilithic Chlorophytes and cyanobacteria from two Spanish cathedrals (Salamanca and Toledo). *Nova Hedwigia* 57: 239-253.
- Prieto B, Rivas T, Silva B. 1999. Environmental factors affecting the distribution of lichens on granitic monuments in the Iberian peninsula. *The Lichenologist* 31: 291-305.
- Rindi F, Guiry MD. 2003. Composition and distribution of subaerial algal assemblages in Galway city, western Ireland. *Cryptogamie-Algologie* 24: 245-267.
- Rindi F, Guiry MD. 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43: 225-235.
- Rindi F, Guiry MD, Critchley AT, Ar Gall E. 2003. The distribution of some species of Trentepohliaceae (Trentepohliales, Chlorophyta) in France. *Cryptogamie-Algologie* 24: 133-144.
- Schlichting HE. 1975. Some subaerial algae from Ireland. *British Phycological Journal* 10: 257-261.
- ter Braak CJF, Smilauer P. 1988. *CANOCO reference manual and User's guide*, Microcomputer Power, New York.
- Tomaselli L, Lamenti G, Bosco M, Tiano P. 2000. Biodiversity of photosynthetic microorganisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 251-258.
- Wee YC, Lee KB. 1980. Proliferation of algae on surfaces of buildings in Singapore. *International Biodeterioration Bulletin* 16: 113-117.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*, Prentice Hall, Upper Saddle River.

#### IV.1.2. Synthèse et commentaires de l'article 2

##### *Facteurs environnementaux*

Les facteurs environnementaux qui ont statistiquement prouvé avoir un effet favorable sur la colonisation des façades sont quasiment tous liés à l'humidité, élément prépondérant pour le



développement des algues et des cyanobactéries. Il s'agit du climat, de l'amplitude thermique, des précipitations, de l'humidité relative de l'air et de la distance à la mer des façades. La proximité de végétation, véritable réservoir de micro-organismes, favorise également la colonisation d'une façade proche.

### ***Facteurs liés à l'architecture du bâtiment***

Il apparaît que le moindre défaut architectural menant à la formation de zones localement plus humides (nommées zones de micro-humidité dans l'article 2) favorise l'implantation de micro-organismes dans cette zone. Un moyen de défavoriser la colonisation serait donc de mettre en œuvre des solutions architecturales visant à dévier le ruissellement de l'eau des façades. Ces moyens de protection existent, tels l'utilisation de gouttières, de bavettes, de couvertines, ou encore de larges débords de toiture. Cependant ils ne sont pas toujours employés, pour des raisons de coût, d'esthétisme ou de culture (GENEL 2005).

### ***Succession dans la colonisation des façades***

Une étude plus approfondie des données recueillies au cours de la campagne d'échantillonnage nous a permis d'émettre une hypothèse quant à une possible succession dans la colonisation des façades. Ainsi, non seulement les algues vertes composent en majorité les biofilms étudiés, mais il semble également qu'elles colonisent le revêtement avant les cyanobactéries. Les algues vertes les plus fréquemment identifiées, notamment, présenteraient donc la capacité de surmonter les conditions extrêmes rencontrées lors de leur établissement sur le revêtement nu. De par leur développement, ces organismes pionniers retiennent l'humidité et créent de la matière organique. L'implantation d'autres organismes, comme notamment des champignons, organismes saprophytes, sera alors facilitée. Les caractéristiques du revêtement sous-jacent au biofilm, n'auront alors plus d'impact contre la colonisation. Ces observations confirment donc notre choix d'étudier principalement les capacités colonisatrices des algues vertes vis-à-vis des revêtements de façade.

### ***Écologie des algues et des cyanobactéries***

Des écologies variées chez les différentes espèces d'algues et de cyanobactéries ont été mises en évidence lors du traitement statistique par l'analyse de correspondance canonique. Ainsi, des groupes d'organismes ayant une même écologie se distinguent en fonction des conditions climatiques, mais également en fonction du substrat colonisé. Certains organismes colonisent ainsi préférentiellement certains types de revêtement. Bien que n'ayant pu relever, lors des

prélèvements, des données telles que la composition du revêtement ou encore sa rugosité ou sa porosité, ces paramètres physico-chimiques semblent avoir de l'importance quant à l'aptitude des revêtements à résister à la colonisation.

## **IV.2. Facteurs liés au revêtement**

L'étude des caractéristiques physiques des revêtements pouvant influencer l'implantation des algues et des cyanobactéries a pu être menée grâce à un banc d'essai mis en place au CSTB. Son principe reproduit le phénomène de colonisation de revêtements de façade en permettant le ruissellement d'une suspension de micro-organismes à la surface d'éprouvettes. Le comportement d'une sélection de revêtements de façade minéraux et organiques a ainsi pu être évalué simultanément vis-à-vis de leur colonisation par différentes souches d'algues et de cyanobactéries. Ces observations ont permis de mettre en évidence certains facteurs favorables à l'implantation de ces micro-organismes.

### **IV.2.1. Article 3 : An assessment of façade coatings against colonisation by aerial algae and cyanobacteria**

Hélène Barberousse<sup>a,b</sup>, Bertrand Ruot<sup>a</sup>, Claude Yéprémian<sup>b</sup>, Gilbert Boulon<sup>c</sup>  
In press in *Building and Environment*

<sup>a</sup> Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), Département Enveloppe et Revêtements, 84, avenue Jean Jaurès - Champs-sur-Marne - 77447 Marne-la-Vallée Cedex 2 - France

<sup>b</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Département RDDM, USM 505 Écosystèmes et Interactions Toxiques, 57, rue Cuvier / case 39 - 75005 Paris - France

<sup>c</sup> Institut Textile et Chimique de Lyon (ITECH), Laboratoire de Microbiologie Industrielle, 87, chemin des Mouilles - 69134 Écully Cedex - France

#### **Abstract**

An accelerated water-streaming test method was used to evaluate several types of façade coatings regarding their behaviour to colonisation by algae and cyanobacteria, by closely reproducing the phenomenon of natural biological soiling. A set of materials with defined physical characteristics was thus investigated *vs.* the colonisation by algal and cyanobacterial strains isolated from natural façade biofilms. Porosity and roughness of the materials showed to be factors of influence in the establishment of those micro-organisms.

*Keywords:* Test method; Algae; Cyanobacteria; Colonisation; Façade coatings.

## Introduction

Microscopic algae belonging to Chlorophytes (green algae) and Cyanophytes (cyanobacteria, also named blue-green algae) embranchments are common colonisers of the building envelope, on which they develop as coloured stainings in zones where humidity is available [1-4]. A great variety of species is observed, with specimens having different abilities to resist desiccation, but water availability is with light the parameter triggering their growth. In Germany, the final coats of external thermal insulation composite systems (ETICS) are known to be more prone to algal growth than monolithic walls [5]. Indeed, as a consequence of ETICS insulation thickness, façades cool below ambient conditions at night due to sky radiation and this small difference in surface temperature can result in condensation of atmospheric humidity, thus favouring biological growth. However in France, where there are 10 to 15 times less building façades coated with ETICS than in Germany, one-coat mortars are more representative of marketed façade coatings. As the isolation system is then generally placed inside buildings, there is few or no condensation on one-coat mortar surfaces. This is maybe why other moisture sources were observed to contribute to algae development in France [6]. In effect, if biological growth appeared to be conditioned by a set of environmental parameters, precipitation showed to be one of the main sources of humidity, especially on north and west-facing walls. The nature of façade coatings was also incriminated, as mineral materials showed to be more frequently colonised than organic ones. Coatings physical parameters such as roughness or porosity are strongly supposed to be factors of influence [7-11]. It is known especially that finish materials with high water absorption are prone to biological colonisation [5]. However, as such data could not be measured on façade coatings during our sampling campaign [6], this study was completed by the evaluation of the colonisation of a set of defined materials, achieved by the way of an accelerated water-streaming test.

Algae are thought to be transported by wind as spores, as fungi, pollens or many particles, which result in their dissemination on various surfaces. On the building envelope, micro-organisms may be deposited on façades or on plane surfaces of the structure. As coloured streaks are often observed on façades, it is deduced that, while raining, the water carries algae and streams along the façade. Different schemes may then be proposed to explain their settlement: they may settle down in the water, they may be retained in cavities created by material roughness or they also may be sucked by the material as water absorption occurs. Their development results in coloured stains which follow the streaming path of water, leading to a fingering aspect. The water-streaming test, originally designed at ITECH Lyon, mimics those conditions of façade materials colonisation by producing the streaming of a micro-organisms culture on top of materials. The device was previously used to investigate concrete materials [9] and since then has undergone some improvements presented here to investigate materials parameters favouring algal growth.

## Materials and methods

### *Origin and culture of the strains*

The experiments presented hereafter were conducted with algae isolated from biofilms developing on building façades in France. *Klebsormidium flaccidum* Silva, Mattox & Blackwell (strain ALCP 749B, MNHN culture collection) and *Chlorella* cf. *mirabilis* Andreeva (strain ALCP 171A) were isolated from one-coat rendering mortars, whereas *Stichococcus bacillaris* Nägeli (strain ALCP 774E) was isolated from an organic coating. These species were frequently identified microscopic algae in the biofilms investigated in our

study [1]. As cyanobacteria were also common colonisers of façades, the strain *Chroococciopsis fissurarum* (Ercegović) Komárek et Anagnostidis (IPPAS B445) was included in our set of tested micro-organisms. Unlike cyanobacteria strains isolated from our samples, this one was a good candidate as it grew rapidly and did not aggregate in culture.

A batch culture of each strain was grown in Bold's Basal medium (BBM) in a chamber with a photoperiod of 16 h/8 h light/dark, light intensity of  $15 \pm 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photosynthetic Photon Flux (PPF) and a temperature of  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### ***Set of materials***

The materials to be tested were a laboratory-made mortar and four manufactured products. The laboratory-made mortar was composed of 65 % wt. sand, 30 % wt. ordinary Portland cement and 5 % wt. calcareous filler, to which 0.5 % wt. of cellulose ether (hydroxyethylmethyl cellulose) was added for a better workability of the fresh material. The mortar was prepared with a water / cement ratio (wt. / wt.) of 1. The four manufactured products were two one-coat rendering mortars noted A and B, one organic finish and one paint; they were selected because they are representative of the façade coatings marketed in Europe. One-coat rendering mortars are mineral materials applied in one coat which fulfils all the functions of a multi-coat rendering system used externally and which is usually specifically coloured. Organic finishes and paints are very common products for outdoor applications and mainly used for decorative purposes. In particular, organic finishes are known to be widely used as final coats of ETICS. The mortars A and B were ready-mixed dry materials composed of sand, cement, lime, mineral pigments and specific admixtures, and were prepared according to the manufacturers' specifications. The organic finish and the paint were water-based and ready-to-use acrylic-based products, the organic finish also containing mineral aggregates. Furthermore, every selected product was known to be free of biocide.

The three mortars were cast into  $100 \times 50 \times 1 \text{ cm}$  moulds made of expanded polystyrene, and allowed to cure at  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 5 \%$  relative humidity for at least 28 days. After curing, they were partially carbonated in order to avoid a delay in micro-organisms colonisation due to their high alkalinity at early age: they were immersed into water for 5 days then allowed to dry at  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 5 \%$  relative humidity for 5 more days, this cycle being repeated three times. The mortars were tested as cast, whereas the organic finish and the paint were applied to a 1 cm-thick fibre-cement panel. Finally, all materials were cut into samples measuring  $20 \times 8 \times 1 \text{ cm}$  and were tested in triplicates, otherwise stated.

### ***Description and principle of the water-streaming test***

The system consisted of a  $100 \times 50 \times 50 \text{ cm}$  glass chamber containing stainless steel supports inclined at  $45^\circ$  onto which specimens of façade coatings were placed (Figure 1). The supports were positioned back-to-back so as to allow twice the number of specimens to be tested in the same conditions. The chamber was filled with 50 L of BBM enriched with algae or cyanobacteria cultures. Inoculation cultures were in the exponential phase of growth in order to minimise the latency time resulting from micro-organisms introduction in a new medium and thus to accelerate the test. This suspension was maintained at  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  by means of a thermo-regulator and was continuously agitated using magnetic stirrers.

The device was equipped with two sprinkling rails made of stainless steel tubes with 2 mm-diameter holes drilled every centimetre. The rails were supplied by pumps immersed in the suspension and connected to the rails by plastic hoses. Thus, the principle of the water-streaming test was as follows: the suspension circulating through the sprinkling rails was directed onto the top of the specimens and ran down their surface, allowing algal and

cyanobacterial cells to adhere to the surface of the specimens, depending on their surface characteristics, as they would in nature. The suspension was then recycled by the pumps and sprayed again onto the specimens. The sprinkling cycles were set to start every 12 h and to run for 90 min; the amount of suspension received by each specimen of material during a cycle was  $20 \pm 2 \text{ L h}^{-1}$ . The advantage of running the suspension on materials inclined at  $45^\circ$  was to increase the time of water runoff on surfaces [12] and thus the probability for algae to deposit and settle, in order to accelerate the colonisation process.

Furthermore, since algae and cyanobacteria need light to grow, the set-up also included two 30 W neon lamps placed at the same distance from the centre of the chamber: the illumination received by each specimen was  $25 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPF, with a day length of 12 h which was set to start with the beginning of a sprinkling cycle.

The glass chamber was covered with a non-hermetic lid and was placed in a dark room (to prevent entrance of natural light) conditioned at  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 5 \%$  relative humidity. Algal and cyanobacterial cultures were tested separately, or together in order to investigate the effect of competitiveness; they were introduced in the device at final concentrations varying from  $1.8$  to  $8.7 \text{ mg L}^{-1}$  (dry mass determination), depending on the strains.

The colonisation kinetics of materials was evaluated by image analysis. The surface of each specimen exposed to colonisation was digitised weekly using a C7716 office scanner (Hewlett Packard). The obtained numerical image was converted into a grey tone image and treated to establish a histogram of the number of pixels vs. their intensity (from 0: black, to 255: white) with the use of the free IRIS program. Such a figure usually presented two main populations, the darkest one corresponding to the surface of the specimen colonized by algae (Figure 1). The extent of colonisation was given by the number of pixels corresponding to zones colonised by micro-organisms divided by the total number of pixels. The surface growth values were the average of the three specimens tested.

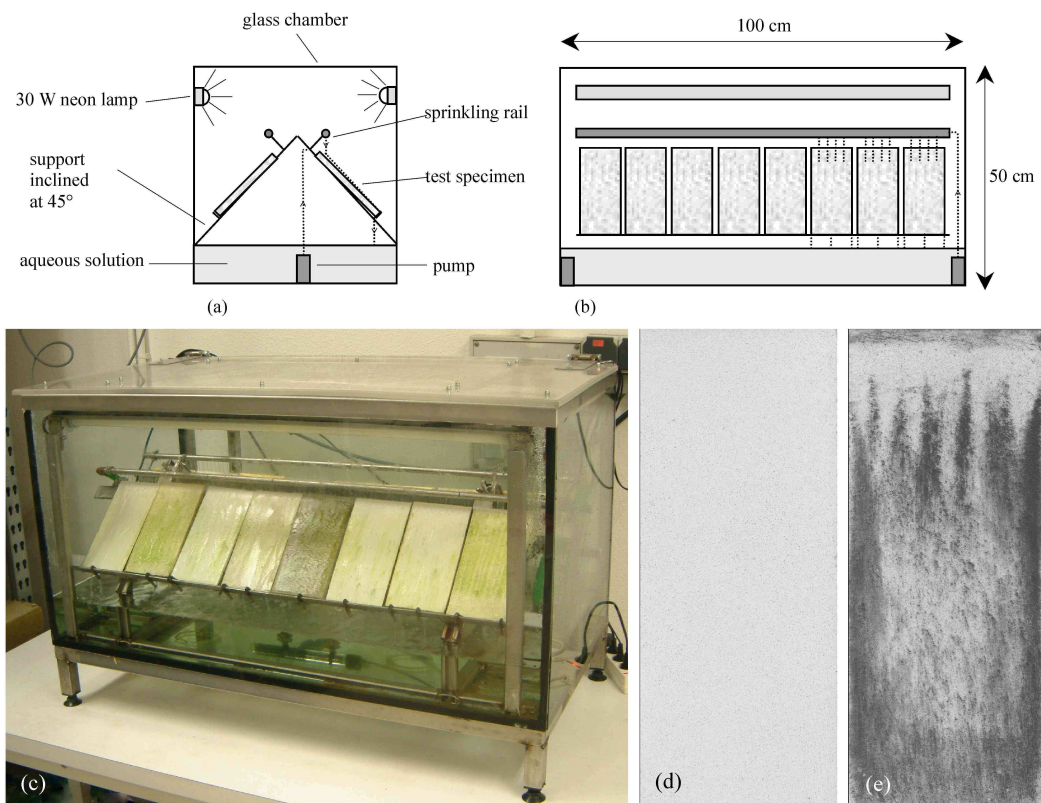


Figure 1. Laboratory set-up used to assess the colonisation of façade materials by algae and cyanobacteria: (a) side view; (b) front view; (c) working device; (d) and (e) converted grey tone image of one-coat mortar A before testing (d) and at 47 days of testing (e).

### *Characterization of materials*

Porosity of the mortars was determined by Mercury Intrusion Porosimetry (MIP). This method measured pore size distribution by forcing liquid mercury into the pore network of materials, and tracking the quantity needed for penetration. Increasing external pressure had to be applied to cause penetration of the liquid in progressively decreasing size pores. The total pore volume was thus equal to the volume of mercury that filled the pores. Measurements were realized on a Micromeritics Autopore IV 9400.

Density and water absorption coefficient of the mortars due to capillary action were also determined. For each mortar, three specimens with dimensions  $16 \times 4 \times 4$  cm were prepared by casting into a metallic mould and curing for 28 days at  $23 \pm 2$  °C and  $50 \pm 5$  % relative humidity. The apparent density of the hardened mortars was given by the weight of the specimens divided by their volume. Then the specimens were placed in a chamber conditioned at  $20 \pm 2$  °C and  $90 \pm 5$  % relative humidity, and immersed in water to a depth of 5 mm, the highest dimension (16 cm) being in vertical position. The weight gain caused by water absorption was followed during 24 h. The water absorption coefficient was equal to the slope of the straight line linking the measurement points at 10 min and 90 min, when  $w/S$  was plotted against  $\sqrt{t}$ ,  $w$  being the weight of the specimen at time  $t$  and  $S$  the section of the specimen ( $4 \times 4$  cm). Density and water absorption coefficient were the average of the three specimens tested.

Surface roughness of the materials was evaluated using a LM10-50S micro laser displacement sensor (Matsushita). A specimen was placed horizontally on a bench equipped with the laser sensor which could move step by step to cover its whole surface. The sensor was composed of a laser diode ( $\lambda = 685$  nm) as a light source, and a position sensing device (PSD) as a light receiver. The measurements were made by optical triangulation: laser light was emitted normally onto the surface of the specimens, and the reflected light passed through the PSD. During the scanning of the surface every 0.5 mm in length and width, the sensor measured the height position of each point with a resolution of 1  $\mu\text{m}$ . Such measurements led to the creation of a topographic profile of the studied surface. This profile was then analysed to extract the  $Ra$ -parameter, representing the arithmetic mean of the absolute height deviations values compared to an average line [13].

## **Results**

### *Characterization of materials*

The distribution of cumulative pore volume for the three mortars is shown in Figure 2; their total porosities are given in Table 1. The porosity was the least important for mortar A, and it increased for the laboratory-made mortar and then mortar B. Moreover, the porosity of organic coatings was low compared to that of mortars (data not shown).

Table 1. Total porosity, density and water absorption coefficient of the three mortars.

	Total porosity (%)	Density ( $\text{kg m}^{-3}$ )	Water absorption coefficient ( $\text{g dm}^{-2} \text{min}^{-1/2}$ )
Laboratory-made mortar	45.2	$1255 \pm 19$	$4.73 \pm 0.35$
One-coat mortar A	36.7	$1627 \pm 12$	$0.19 \pm 0.09$
One-coat mortar B	47.4	$1300 \pm 24$	$0.61 \pm 0.20$

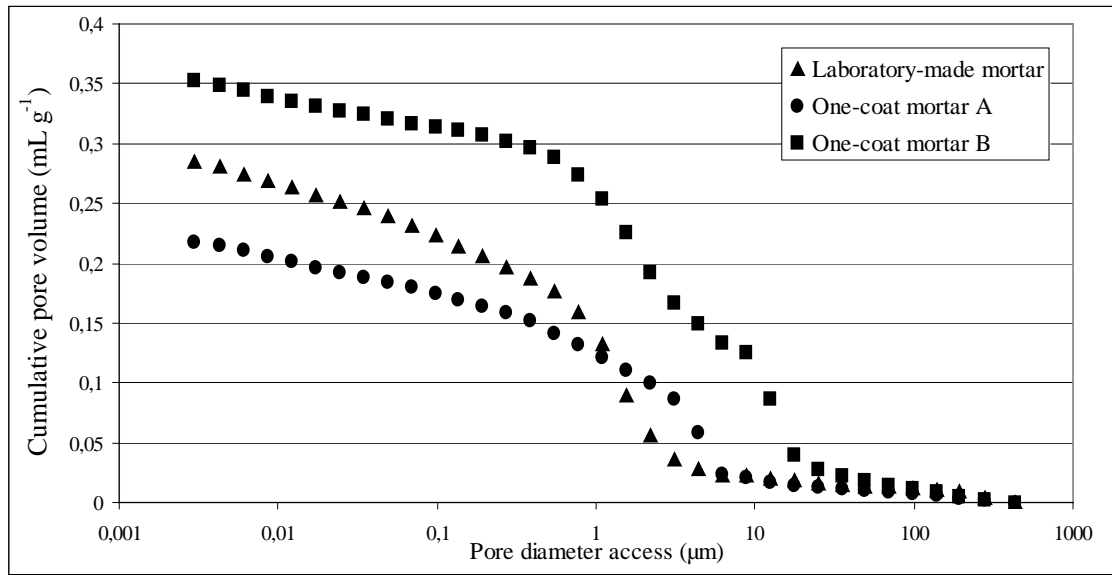


Figure 2. Porosity of the three mortars evaluated by MIP.

Densities and water absorption coefficients are given in Table 1. Since one-coat mortars are used to protect facades from weathering, their capillarity coefficients are usually small, typically below  $1.5 \text{ g dm}^{-2} \text{ min}^{-1/2}$ . Unlike manufactured products, the laboratory-made mortar did not contain any water-repellent additive and thereby was highly absorbent, with a capillarity coefficient 20 times greater than that of the manufactured mortars.

Our set of materials presented a certain range of roughness, according to  $Ra$  values (Figure 3). Amongst organic coatings, the organic finish was almost four times rougher than the paint. Amongst mortars, roughness increased slightly from mortar A, to the laboratory-made mortar and then mortar B.

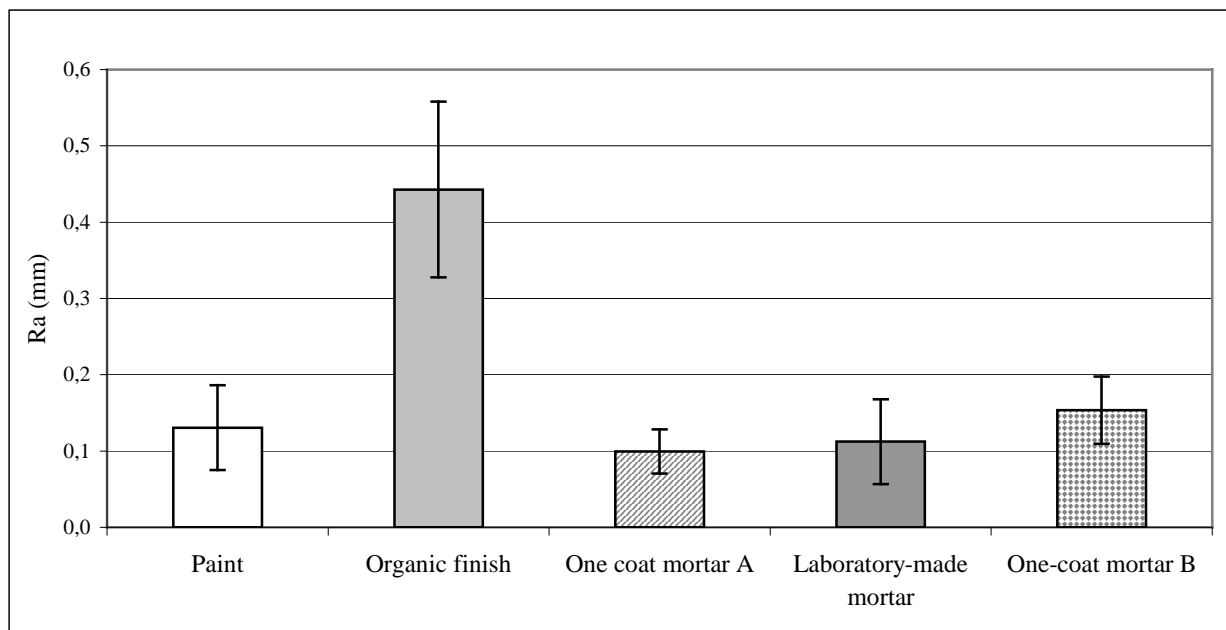


Figure 3.  $Ra$  roughness parameter of the set of materials evaluated by a laser roughness meter.



### *Colonisation of materials*

The materials colonisation appeared initially as long streaks which followed the path of water flow over the surface of the specimens, but as micro-organisms developed, the surface soiling appeared to be more even on the samples. This colonisation process thus reproduced algal growth often observed on building envelopes (Figure 4). Figures 5-7 show the development of the surface growth on specimens with time of testing, for our selection of micro-organisms. Depending of the strains and concentrations used, the experiments were carried out for one month to one month and a half, so as to obtain a proper distinction of the extent of colonisation between the materials.

The extent of colonisation of the materials was reproducible for each experiment and in between experiments (Figures 5-7). Organic coatings appeared to be more resistant to colonisation than mortars. On the one hand, if only mortars are considered, A was less colonised than the laboratory-made mortar and then B. On the other hand, if only organic coatings are considered, the paint was always less colonised than the organic finish. Those patterns of behaviour to colonisation were observed whatever the algal or cyanobacterial strain used. Moreover, these observations were independent of any phenomenon of competitiveness that could have occurred between micro-organisms. Thus, the contamination of *S. bacillaris* suspension by *K. flaccidum* (Figure 6) did not interfere in pattern of resistance of materials towards algae settlement, as was also observed during the experiment with an inoculum composed of *C. fissurarum* and *C. cf. mirabilis* (Figure 7).

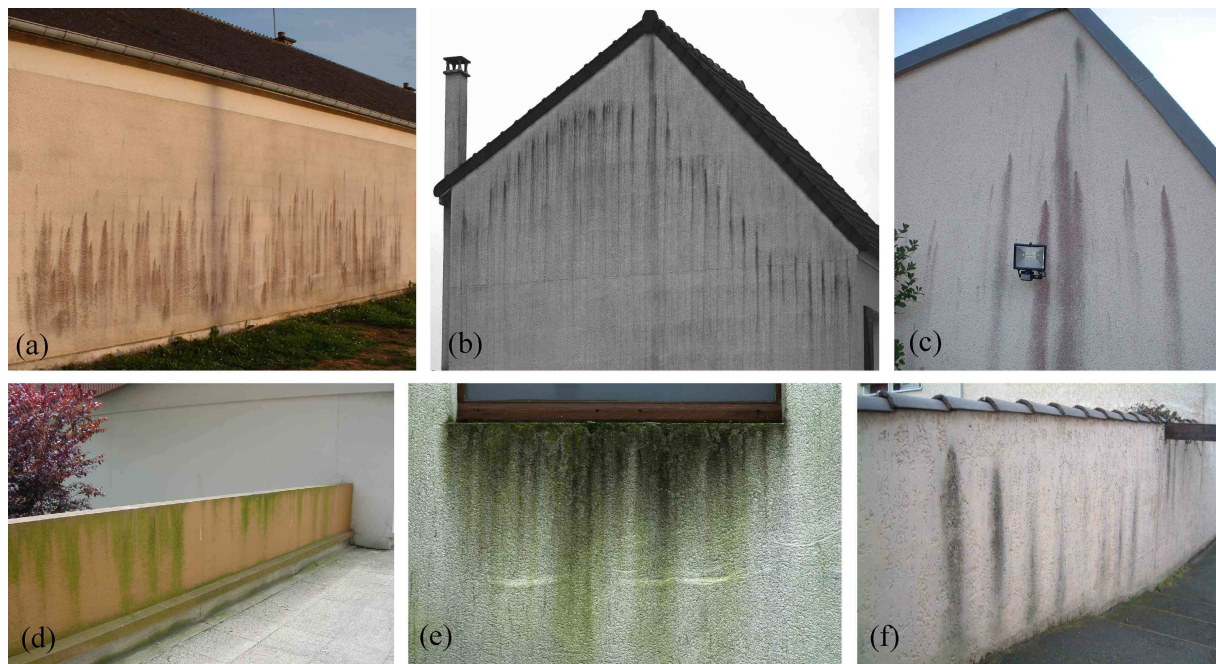


Figure 4. Examples of algal growth developing as streaks following the water path: (a), (b) and (c) façades of individual houses; (d) parapet wall; (e) wall beneath window lacking a sill; (f) wall beneath unprotected joints of tiles.



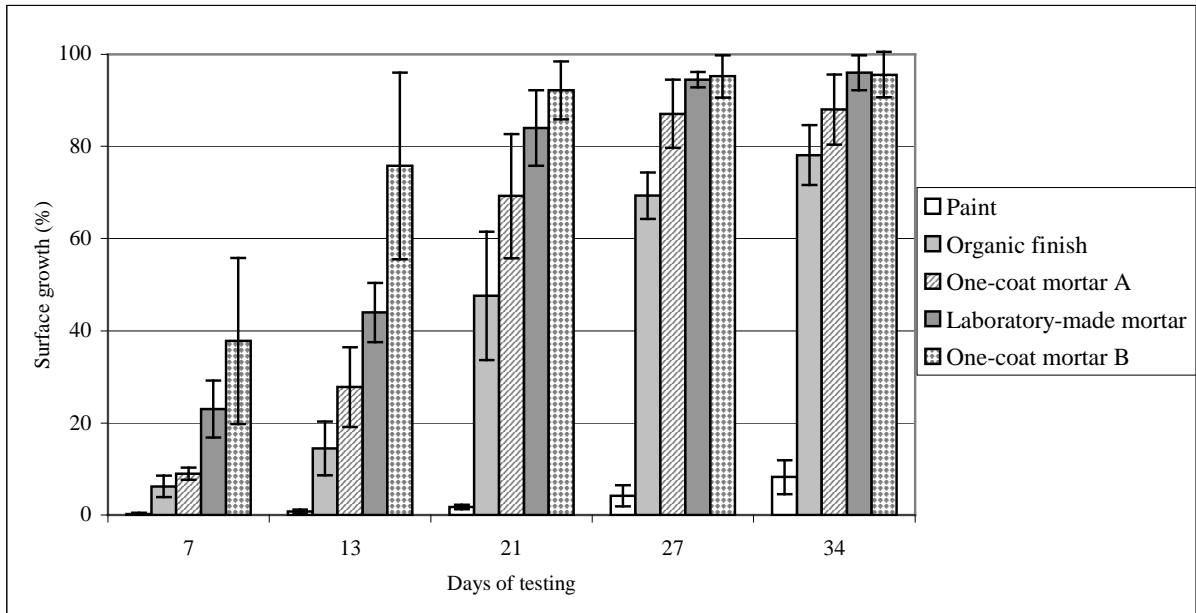


Figure 5. Evolution of surface growth of *K. flaccidum* on materials with time, assessed by image analysis. The surface growth values indicated are the average for six specimens of each material (except for the laboratory-made mortar, two specimens), evaluated during two different experiments (initial concentrations:  $4.5 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$  dry mass).

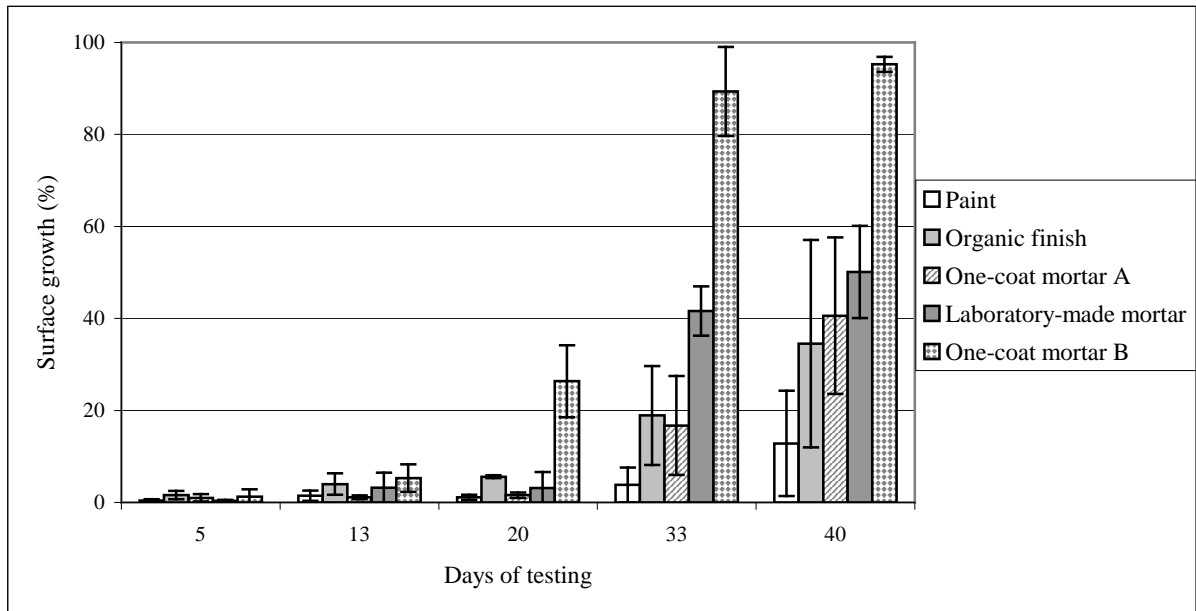


Figure 6. Evolution of surface growth of *S. bacillaris* (initial concentration:  $3.6 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$  dry mass) and *K. flaccidum* (contaminant) on materials with time, assessed by image analysis. The surface growth values indicated are the average for three specimens of each material (except for the laboratory-made mortar, two specimens).

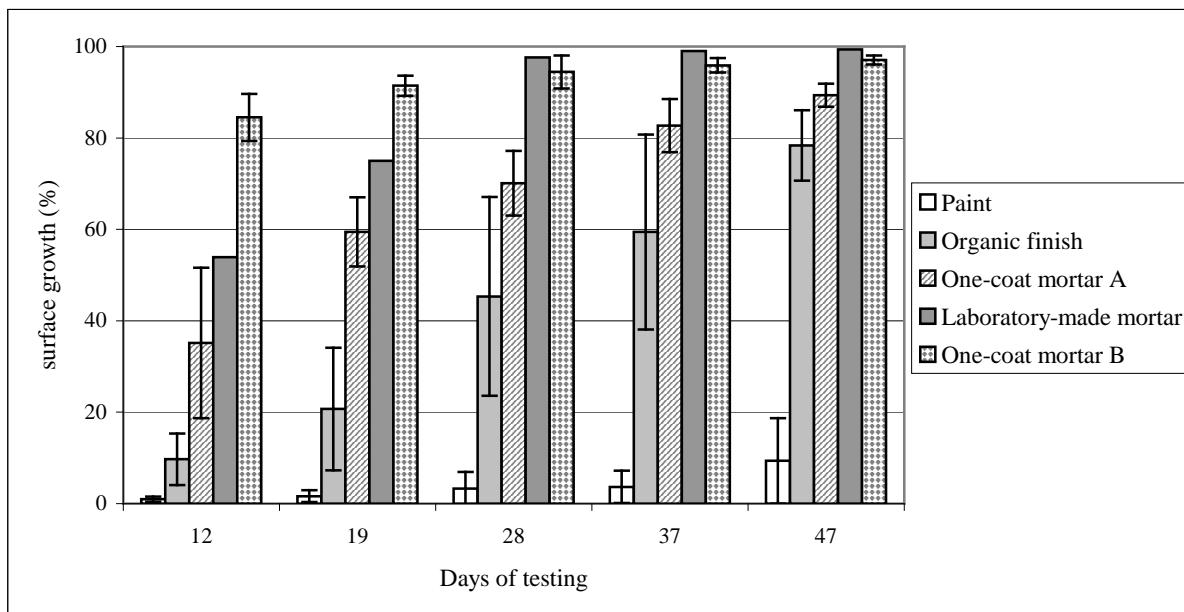


Figure 7. Evolution of surface growth of *C. fissurarum* and *C. cf. mirabilis* (initial concentrations respectively  $8.7 \pm 0.2$  and  $1.8 \pm 0.1$  mg L<sup>-1</sup> dry mass) on materials with time, assessed by image analysis. The surface growth values indicated are the average for three specimens of each material (except for the laboratory-made mortar, one specimen).

It can be deduced that the resistance of organic coatings to the establishment of micro-organisms may be attributed to their low porosity compared to mineral ones. Moreover, the organic finish was more colonised than the paint, which may be due to its higher roughness. Among the mineral coatings, the colonisation kinetics also seemed to be linked to roughness and porosity, as mortar B, which was the most rapidly colonised, was also the most porous and rough. It is difficult here to discuss the effects of capillarity coefficients of materials, as mortars remained always wet during the experiments. Indeed, capillarity coefficients of materials would rather contribute to differences in water availability for micro-organisms during drying phases.

## Discussion

Observations in colonisation pathway of the materials were consistent with the natural phenomenon of colonisation of façade coatings in that soiling often appears in the form of fine streaks which extend while developing. After Knight & Hammett [12], there are two ways in which water comes in contact with and wets masonry constructions. Firstly, rain, usually wind-driven, falls directly on vertical, horizontal and inclined surfaces. Secondly, rain water runs over and off these surfaces. In the latter case, the direction of water run-off depends on the inclination of the surface, on material's texture, absorption, degree of saturation and on surface configurations. In this case, water patterns have often a fingering aspect [14]. Thus, this confirms that the principle of the device, by wetting the sloped materials, mimicked the humidification of façades by liquid water, with the difference that here the materials were inclined and the sprinkling solution flow was high in order to accelerate the colonisation process.

Porosity and roughness of the materials showed to be parameters of influence on algae and cyanobacterial establishment. Indeed, these results were not surprising as the presence of micro-organisms on façades was shown to be strongly connected to the presence of humidity

[6]. The porosity of the materials allows water absorption and retention and thus availability for algae and Dubosc [9] already noted that algal developments increased with the porosity of the underlying material. Moreover, it can be assumed that high roughness makes the retention and adhesion of micro-organisms to the surface easier. This would be consistent with previous observations showing that rough mineral coatings were more colonised than smooth ones [6]. However, it was not possible, after these experiments to state whether porosity, roughness or capillarity coefficient was the most decisive factor as regards the establishment of micro-organisms. The effects of alkalinity and chemical composition of the surface of materials were not investigated here but are also supposed to be of importance in the colonisation process. A high pH, in particular, is known to delay micro-organisms colonisation, as can be observed on freshly applied mortars, the colonisation being possible once the carbonation process has lowered the alkalinity [15].

## Conclusions

These accelerated experiments using the water-streaming test confirmed the effect of the underlying material characteristics on algae and cyanobacteria settlement, roughness and porosity showing particular influence. Such parameters should then be taken into account when formulating and applying coatings on façades, in order to delay the apparition of deteriorating biofilms.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Pr. Alain Couté (MNHN) for his advice and remarks. Financial support was awarded by Rhodia PPMC, Hexion Specialty Chemicals and by grant No. 294/2003 from the Association Nationale de la Recherche Technique.

## Bibliography

- [1] Barberousse H, Tell G, Yéprémian C, Couté A. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France. *Algological Studies* In press.
- [2] Gaylarde PM, Gaylarde CC. 2000. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 93-97.
- [3] Gaylarde CC, Gaylarde PM. 2005. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55(2): 131-139.
- [4] Rindi F, Guiry M D. 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43(3): 225-235.
- [5] Kuenzel HM, Sedlbauer K. Biological growth on stucco. *Buildings VIII / Proceedings* Dec. 2001, ASHRAE Publications, Atlanta.
- [6] Barberousse H, Lombardo RJ, Tell G, Couté A. Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. *Biofouling* 2006; 22(2): 69-77.
- [7] John DM. Algal growths on buildings: a general review and methods of treatment. *Biodeterioration Abstracts* 1988; 2(2): 81-102.
- [8] Guillitte O, Dreesen R. Laboratory chamber studies and petrographical analysis as bioreceptivity assessment tools of building materials. *The Science of the Total Environment* 1995; 167: 365-374.

- [9] Dubosc A, Escadeillas G, Blanc PJ. Characterization of biological stains on external concrete walls and influence of concrete as underlying material. *Cement and Concrete Research* 2001; 31(11): 1613-1617.
- [10] Ortega-Calvo JJ, Ariño X, Hernandez-Marine M, Saiz-Jimenez C. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *The Science of Total Environment* 1995; 167: 329-341.
- [11] Tomaselli L, Lamenti G, Bosco M, Tiano P. Biodiversity of photosynthetic microorganisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2000; 46: 251-258.
- [12] Knight TL, Hammett M. The interaction of design and weathering on masonry constructions. *Masonry International* 1993; 7(1): 9-13.
- [13] EN ISO 4287. Geometrical Product Specifications (GPS). Surface texture: profile method. Terms, definitions and surface texture parameters 1998.
- [14] Küntz M, van Mier JGM. Field evidences and theoretical analysis of the gravity-driven wetting front instability of water runoffs on concrete structures. *Heron* 1997; 42(2): 231-244.
- [15] Grant C. Fouling of terrestrial substrates by algae and implications for control - A review. *International Biodeterioration Bulletin* 1982; 18(3): 57-65.

#### IV.2.2. Effet de la carbonatation

Lors d'une expérience portant sur la colonisation d'éprouvettes de mortier par une souche de *Chroococcidiopsis fissurarum*, des zones plus sombres inhibant toute colonisation ont été observées (Figure 24).

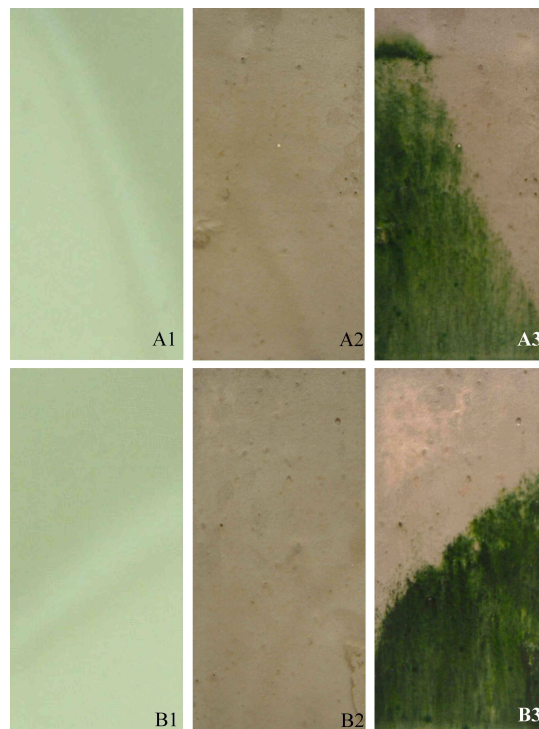


Figure 24. Éprouvettes de mortier modèle en fin de cure (A1 et B1), après 1 jour d'expérience (A2 et B2) et après 33 jours d'expérience (A3 et B3), montrant des zones inhibant la colonisation de *Chroococcidiopsis fissurarum*.

Des tests à la phénolphtaléine ont mis en évidence que les zones non colonisées ont un pH de surface  $> 10$ , alors que celles qui sont colonisées ont un pH de surface  $< 10$ . Par ailleurs, des analyses en spectrométrie d'énergie dispersive (Tableau 5) ont montré que la surface des zones plus claires colonisées possédait un taux de calcium (Ca) plus élevé et un taux de silicium (Si) moins élevé, signe d'une carbonatation de la surface par transformation de portlandite ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) en calcite ( $\text{CaCO}_3$ ).

Tableau 5. Analyse EDS de prélèvements de surface des zones colonisée et non colonisée d'une éprouvette de mortier.

Zone	Na	Mg	Al	Si	K	Ca	Fe
Colonisée	1,45	1,08	1,49	11,17	3,13	81,11	0,59
Non colonisée	1,40	1,60	2,92	21,81	4,78	66,41	1,10

Il est probable que cette carbonatation localisée du mortier modèle soit liée à un séchage plus rapide des zones externes du moule. Ainsi, les zones sombres ont séché plus vite ce qui a limité la réaction de carbonatation alors que les zones plus claires ont eu le temps d'être partiellement carbonatées et présentent donc une plus faible alcalinité de surface.

Par ailleurs, des analyses de porosimétrie au mercure sur des éprouvettes de ce même mortier, carbonatées et non carbonatées, ont montré que la carbonatation induit une diminution de porosité (Figure 25).

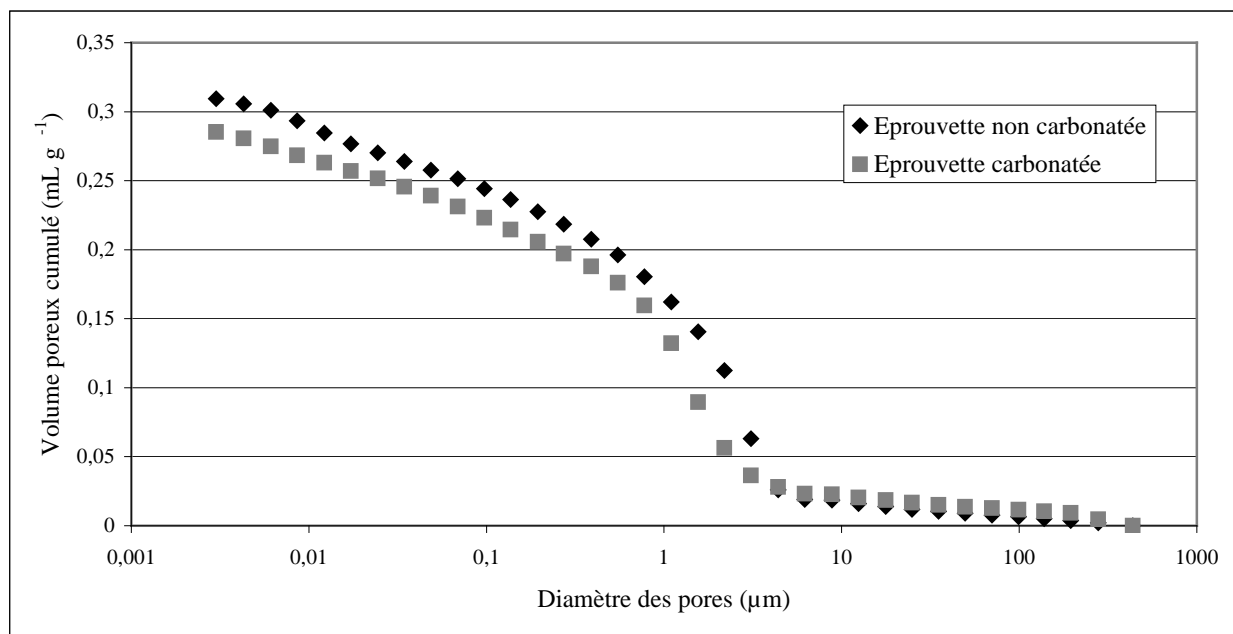


Figure 25. Volume de pores cumulé en fonction de la pression de mercure appliquée sur des éprouvettes de mortier modèle carbonatées et non carbonatées.

Ainsi, suite à la carbonatation localisée des éprouvettes de mortier, l'effet d'une diminution de porosité de la zone colonisée n'a pas pour autant défavorisé l'implantation des cyanobactéries en comparaison avec la zone non carbonatée. Il apparaîtrait donc que c'est le pH de surface alcalin qui a été responsable du fort pouvoir inhibiteur de l'implantation de cette souche cyanobactérienne.

#### **IV.2.3. Synthèse et commentaires de l'article 3 et du paragraphe IV.2.2.**

##### ***Comportement des matériaux***

Les expériences présentées dans l'article 3 ont montré que les matériaux organiques résistent généralement mieux à la colonisation par les algues et les cyanobactéries que les matériaux minéraux. De même, dans l'article 2 (Tableau 5), le nombre d'espèces moyen colonisant les matériaux organiques était moins élevé que sur les matériaux minéraux. Ces deux observations sont donc cohérentes et montrent l'influence des paramètres liés aux revêtements sur l'implantation des micro-algues.

##### ***Facteurs liés aux revêtements***

L'article 3 a montré que la rugosité et la porosité sont deux paramètres influant sur la colonisation des éprouvettes par les algues ou les cyanobactéries. Ceci n'a rien d'étonnant, puisque la disponibilité en eau pour les micro-organismes est liée à la porosité du substrat colonisé. En outre, plus la surface du matériau sera rugueuse, plus l'accroche des micro-organismes sera facilitée.

Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'un pH de surface alcalin peut totalement inhiber la colonisation d'un matériau par des micro-organismes, observation intéressante en vue de développer des revêtements plus résistants à leur implantation.

#### **IV.3. Facteurs liés à l'étape d'adhésion**

Afin de compléter ces observations, les facteurs intervenant lors de l'étape d'adhésion ont été plus particulièrement étudiés. Pour ce faire, trois souches d'algues ont été sélectionnées parmi les plus fréquemment identifiées (article 1) et leur adhésion a été évaluée sur des surfaces modèles à l'aide d'une cellule à flux laminaire. Ces résultats ont été exploités selon l'approche thermodynamique de l'adhésion microbienne et sont présentés dans l'article 4.

### IV.3.1. Article 4 : Adhesion of façade coatings colonisers, as mediated by physicochemical properties

Hélène Barberousse<sup>1, 2,\*</sup>, Roberta Brayner<sup>3</sup>, Ana Maria Botelho do Rego<sup>4</sup>, Jean-Christophe Castaing<sup>5</sup>, Patricia Beurdeley-Saudou<sup>6</sup>, Jean-François Colombet<sup>6</sup>  
Under revision in *Biofouling*

<sup>1</sup> Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), Département Enveloppe et Revêtements - 84, avenue Jean Jaurès - Champs-sur-Marne - 77447 Marne-la-Vallée Cedex 2 - France

<sup>2</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Département RDDM, USM 505 Écosystèmes et Interactions Toxiques - 57, rue Cuvier / case 39 - 75005 Paris - France

<sup>3</sup> Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), UMR-CNRS 7086 - Université Paris 7-Denis Diderot, case 709 - 2 place Jussieu - 75251 Paris Cedex 05 - France.

<sup>4</sup> Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Lisboa, CQFM-Complexo Interdisciplinar - Av. Rovisco Pais, P-1049-001 - Lisboa - Portugal

<sup>5</sup> Rhodia Recherches et Technologies - 52, rue de la Haie Coq - 93308 Aubervilliers Cedex - France

<sup>6</sup> Hexion Specialty Chemicals - 52, rue de la Haie Coq - 93308 Aubervilliers Cedex - France

#### Abstract

The adhesions of *Klebsormidium flaccidum*, *Stichococcus bacillaris* and *Chlorella* cf. *mirabilis*, three strains of green micro-algae isolated from façade coatings biofilms were investigated in a parallel plate flow chamber. The model surfaces tested were glass, -CH<sub>3</sub> (mediated by octadecyltrichlorosilane (OTS) and hexamethyldisilazane (HMDZ) modification) and -NH<sub>2</sub> (aminopropyltriethoxysilane (APS) modification) terminated self-assembled monolayers. Algae physicochemical properties were evaluated by the microbial adhesion to solvents assay and by contact angle measurements, and model surfaces were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy analysis and by contact angle measurements. Predicted adhesion trends were then compared to *in vitro* measurements. The adhesion strength for the three algal strains followed this trend : APS > OTS > HMDZ > glass. The adhesion process thus seemed to be mediated by hydrophobic and electrostatic interactions, and showed to be influenced by the algal culture age and the time of initial adhesive contact.

*Keywords:* Algae; Building; Adhesion; self-assembled monolayers

#### Introduction

Green micro-algae are the most encountered colonisers of building façades in France (Dubosc et al. 2001, Rindi & Guiry 2004, Barberousse et al. 2006a). The colonisation process is thought to be as follow: micro-organisms are detached from other substrata (trees, rocks...) and transported by wind to be deposited on plane surfaces of the building envelope, such as roofs,

balconies or windows ledges. While raining, the water then transports the cells or filament fragments by streaming on façade coatings surface, and the micro-organisms have thus the possibility to attach to the substratum (John 1988). This adhesion process is mediated by coatings properties such as roughness and porosity, but physico-chemical parameters of the algae and the substratum are also believed to intervene (Dubosc et al. 2001, Barberousse et al. 2006b, Barberousse et al. In press-a). By their establishment and the subsequent colonisation of other micro-organisms, algae induce the apparition of coloured disfiguring stains on the building envelope. This is of major concern, since owners of soiled buildings have to deal periodically with high renovation costs. The study of aerial algae adhesion is therefore motivated by economical interests.

Adhesion is a key-step in any surface biofouling, and its mechanisms are thus extensively studied. In this field, most of the researches are led on bacteria, because of their ability to colonise almost any surface, thus leading to biofilms contamination of industrial or medical equipments, and potential hazard for human health. However, some works are also available on algae adhesion, in the domains of aquatic fouling (Fattom and Shilo 1984, Aubert et al. 1989, Lind et al. 1997, Schultz et al. 2000, Guilbeau et al. 2003, Holland et al. 2004), of water distribution systems (Sekar et al. 2004) or of art monuments colonisation (Lamenti et al. 2000). The initial adhesion process was shown to be influenced by surface topography and roughness, or also by the physico-chemical properties of both interacting entities, such as hydrophobicity. This work intends to investigate aerial algae adhesion process from a physico-chemical point of view. Indeed, by the thermodynamic approach, micro-organisms adhesion to substrata is thought to be mediated by interfacial free energies driving forces (Bos et al. 1999). Thus, we characterized algal strains and model surfaces in terms of their interfacial free energies components by two complementary methods, the microbial adhesion to solvents (MATS) assay and contact angle measurements. These results allowed the prediction of the total free energy of adhesion of the different strains on the model surfaces. Finally, the *in vitro* adhesions were carried out on a parallel plate flow chamber, a system which has been used extensively to study antibody-antigen interactions (Pierres et al. 1996) and bacterial or yeast adhesion to model surfaces (Sjollema et al. 1989, Busscher et al. 1995, Everaert et al. 1998, Scheuerman et al. 1998, Millsap et al. 1999, Bos et al. 2000, Bruinsma et al. 2001, Gallardo-Moreno et al. 2004a, Roosjen et al. 2005).

## Materials and methods

### *Algal strains*

Experiments were performed with three algal strains isolated from building façade biofilms sampled in France. The strains *Klebsormidium flaccidum* Silva, Mattox & Blackwell (ALCP 749B), *Stichococcus bacillaris* Nägeli (ALCP 772B) and *Chlorella* cf. *mirabilis* Andreeva (ALCP 171A), deposited at the MNHN Culture Collection, were selected as they were frequently identified on building façades (Barberousse et al. 2006a). Batch cultures of each of these strains were maintained in Bold's Basal medium (BBM) in a chamber with a photoperiod of 16 h/8 h light/dark, light intensity of  $15 \pm 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photosynthetic Photon Flux and a temperature of  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### *Model surfaces*

The surfaces tested for adhesion experiments in the parallel plate flow chamber were glass microscope slides functionalised by self-assembled monolayers (SAM) organization. The



glass slides were carefully cleaned before surface modification by immersion 10 min in piranha solution (3:1 (v:v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The slides were then rinsed thoroughly in deionised water and dried under a nitrogen stream. Surfaces tested as is were noted as glass substrata.

The cleaned glass slides were then coated with SAM terminated by CH<sub>3</sub> and NH<sub>2</sub> groups. The CH<sub>3</sub>-terminated monolayers were obtained in one step by placing the glass plates in sealed compartments containing a few drops of hexamethyldisilazane (HMDZ) for 2 h, or by immersing the slides for 30 min in a 1 % (v/v) octadecyltrichlorosilane (OTS) solution in dicyclohexyl and rinsing them with chloroform (Vacheethasane & Marchant 2000). NH<sub>2</sub>-terminated monolayers were prepared by immersing the glass slides in 0,1 % (v/v) aminopropyltriethoxysilane (APS) solution in ethanol for 30 min. The modified slides were then rinsed with ethanol, dried and baked at 120 °C for 2 h (Cao et al. 2005).

The extent of glass slides modification was evaluated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The analysis were performed in a XSAM800 (KRATOS) operated in the fixed analyser transmission (FAT) mode, with a pass energy of 20 eV and the non-monochromatised AlK<sub>α</sub> X-radiation (hν = 1486.7 eV). A power of 120 W (10 mA × 12 kV) was used. Samples were analysed in an ultra-high-vacuum (UHV) chamber (~10<sup>-7</sup> Pa) at room temperature, and at 0° relative to the normal to the surface. Spectra were recorded by a Sun SPARC Station 4 with Vision software (Kratos) using a step of 0.1 eV. Data were fitted with a Shirley background Gaussian-Lorentzian products for component peaks. No charge compensation (flood-gun) was used. Binding energies were corrected by using C 1s binding energy equal to 285 eV. X-ray source satellites were subtracted. For quantification purposes, sensitivity factors were 0.66 for O 1s, 0.25 for C 1s, 0.27 for Si 2p, 0.42 for N 1s.

### ***Microbial adhesion to solvents (MATS) assay***

This method, originally developed by Rosenberg et al. (1980) and derived to the study of cyanobacteria and green micro-algae by Fattom and Shilo (1984) and Lamenti et al. (2000), was modified by Bellon-Fontaine et al. (1996). The MATS assay is based on the comparison between micro-organisms cell affinity to polar and non-polar solvents. The differences in affinities, once knowing solvents surface tension properties (Table 1), can thus lead to the identification of electron-donor / electron-acceptor interactions at micro-organisms cell surface and reveal hydrophobic or hydrophilic properties. Briefly, 0.4 mL of the appropriate solvent (chloroform, hexadecane, ethyl acetate or decane) were added to 2.4 mL of a suspension of algal cells in BBM and vortexed for 60 s. The solution was then allowed to stand for 15 min to allow the phases to cleanly separate. A sample of 1 mL was then removed from the aqueous phase and the optical density at 750 nm was measured. The percentage of cell affinity was calculated with the following equation:

$$\% \text{ affinity} = (A_0 - A) / A_0 \times 100 \quad (1)$$

where  $A_0$  was the optical density of the suspension before mixing and  $A$  the absorbance after mixing. Each essay was performed in triplicate.

### ***Contact angle measurements***

Contact angle measurements on algal lawns filtered on cellulose acetate membranes could not be achieved, although being a commonly used protocol for bacteria studies (Busscher et al. 1984). Indeed, this technique appeared inappropriate as solvent drops were adsorbed by the membrane without attending equilibrium. Instead of this method, drops of algal cultures were successively let to dry on glass slides, to obtain a sufficient thickness of cells, so as to completely mask the underlying surface. So-called plateau contact angles on algal lawns were then measured by the sessile-drop technique using water ( $W$ ), formamide ( $F$ ) and 1-

bromonaphtalene (*B*). Contact angles were also measured on freshly prepared model surfaces, by the sessile-drop technique and using the same solvents. All measurements were repeated four times and were carried out on a Krüss PT 100 polarimeter with temperature fixed at 25°C.

Table 1. Surface tension properties of MATS solvents and contact angle liquids used in this study.

Method of interest	Solvent	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma^-$
MATS assay	Decane	23.9	0	0
	Hexadecane	27.7	0	0
	Ethyl acetate	23.9	0	19.4
	Chloroform	27.2	3.8	0
Contact angle measurements	Water	21.8	25.5	25.5
	Formamide	39.0	2.3	39.6
	1-bromonaphtalene	44.4	0	0

### ***Hydrophobicity and free energy of adhesion***

Hydrophobicity and free energies of adhesion were evaluated from algae and model surfaces tension components, derived from contact angle measurements. The surface free energy  $\gamma$  was composed of a Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ) and a Lewis acid-base ( $\gamma^{AB}$ ) component according to:

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (2)$$

where  $\gamma^{AB}$  could be separated into an electron-donor ( $\gamma^-$ ) and an electron-acceptor ( $\gamma^+$ ) components:

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} . \quad (3)$$

The components of the surface tension of algae and model surfaces (*S*) were then calculated with the equation developed by (VAN OSS et al. 1988):

$$\cos \theta_L = -1 + 2\left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}\right) / \gamma_L , \quad (4)$$

where  $\theta_L$  accounted for the contact angle value and *L* for the liquid used (Table 1).

The degree of hydrophobicity of a surface, expressed as the free energy of interaction between two entities of that surface when immersed in water was calculated through the surface tension components of the interacting entities:

$$\Delta G_{SWS} = -2\left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}}\right)^2 + 4\left(\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_W^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_W^+} - \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_W^+ \gamma_W^-}\right) \quad (5)$$

The surface can be considered as hydrophobic if the interaction between the two entities is stronger than the interaction of each entity with water, i.e. if  $\Delta G_{SWS} < 0$ . Conversely, if  $\Delta G_{SWS} > 0$ , the surface is considered hydrophilic.

Finally, VAN OSS (1994) described the total free energy of interaction between microorganisms, here algae (*A*), and a model surface (*S*) through water by the sum of the Lifshitz-van der Waals (*LW*) and acid-base (*AB*) interactions as:

$$\Delta G^{Total} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} , \quad (6)$$

where

$$\Delta G^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_A^{LW}} - \sqrt{\gamma_S^{LW}}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_A^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}}\right)^2 \quad (7)$$

and

$$\Delta G^{AB} = 2\left[\sqrt{\gamma_W^+} \left(\sqrt{\gamma_A^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_W^-}\right) + \sqrt{\gamma_W^-} \left(\sqrt{\gamma_A^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_W^+}\right) - \sqrt{\gamma_A^- \gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_A^+ \gamma_S^-}\right]. \quad (8)$$

### *Parallel plate flow chamber*

The principle of the parallel plate flow chamber system has been described before (Sjollema et al. 1989). The chamber was a rectangular cavity having dimensions  $26 \times 76 \times 1$  mm, composed of a permanent glass top plate and a removable bottom plate, separated by a 1 mm-thick rubber joint. The removable bottom plate was used as a substrate onto which adhesion experiments were led. The fluid entered the chamber through a 1 mm-wide hole pierced at one side of the upper plate and exited from the chamber through another 1 mm-wide hole pierced at the other side of the plate (Figure 1). In such a chamber, the flow is theoretically laminar and the wall shear stress at the centre of the device is expressed as:

$$\sigma = \frac{6Q}{wd^2} \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad (9)$$

where  $Q$  is the flow rate ( $\text{mm}^3 \text{ s}^{-1}$ ) and  $w$  and  $d$  are the flow chamber width and thickness respectively (mm).

The flow rate was supplied by a peristaltic pump 504 U (Watson Marlow). For enumeration of the adhering cells in the centre of the device, the flow chamber was placed on the stage of a microscope (Olympus BH-2) equipped with a  $20\times$  working distance objective. Images of the observation window were registered by a camera (IVC 800 BC) and the cells adhering to the bottom plate were counted manually. For *S. bacillaris* and *C. cf. mirabilis* experiments, counted cells were about 200 at the beginning of the experiment. However, for *K. flaccidum* experiments, counts were more approximate due to the filamentous nature of this alga; the strain was composed of short filaments of 2-5 cells which were counted for 1 each filament, leading to counts of about 50 filaments at the beginning of the experiment.

For the experiments, the model surfaces were inserted in place of the bottom plate. 2 mL of algal cultures were then introduced in the flow chamber with the help of a 10 mL syringe (Terumo) and the cells were let to sediment and attach to model surfaces for 10 min. Deionised water was circulated at increasing rates for 2 min; between each stage, a picture of the observation window was registered to count for adhering cells. The percentage of cell adhesion was then defined as:

$$\% \text{ adhesion} = N/N_0 \times 100 \quad (10)$$

where  $N_0$  was the number of cells counted at the beginning of the experiment and  $N$  the number of cells remaining on model surfaces after each flow imposition.

To investigate for possible ionic interactions during the adhesion process of algae on APS surfaces,  $12 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$  were added to the circulating solution to increase ionic strength. In this case,  $-\text{NH}_2$  groups at APS surfaces should interact with ions from the solution, thus disfavours possible electrostatic interaction between algae and the surface. Lastly, to investigate for hydrophobic interactions,  $12 \text{ mL L}^{-1}$  of a tensioactive (TA) were added to the circulating solution to hide hydrophobic entities. Experiments were repeated at least three times.

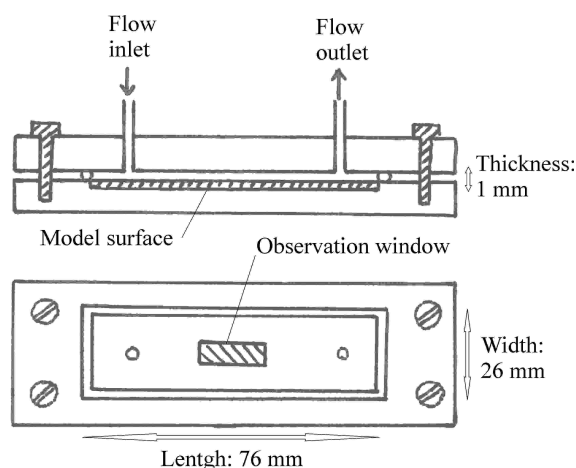


Figure 1. Schematic representation of the parallel plate flow chamber.

## Results

### *Algae and model surfaces characterization*

The MATS assay was developed to evaluate bacterial cell surface properties. Due to their dimensions, bacteria do not sediment in solution. Conversely, algae cells evaluated exhibited dimensions from 2 to 10  $\mu\text{m}$ , and in case of strain 749B, cells were arranged in filaments. As a consequence slight sedimentation was observed, which may explain measurements instabilities leading to rather high standard deviations (Figure 2). The higher affinity displayed by all strains for chloroform, the acidic (i.e. electron-donating) solvent, was due to strong electron-donating properties of algal cells. Conversely, their lower affinity for the basic (i.e. electron-accepting) solvent, ethyl acetate, was due to weaker electron-accepting properties. Finally, algal affinities for *n*-alkanes, apolar solvents, were low and almost equivalent for all strains, whereas being slightly higher for 772B strain.

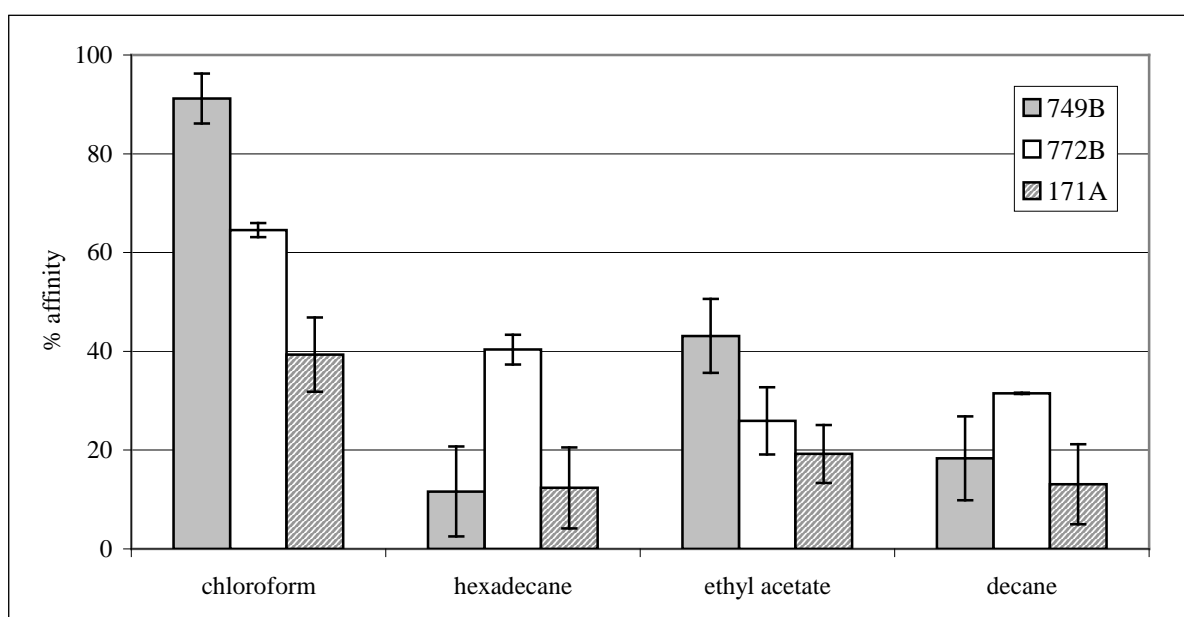


Figure 2. Adhesion of the three algal strains to various solvent-water interfaces.

The table 2 shows the contact angles derived surface tension components and hydrophobic degrees of algal strains and model surfaces investigated. Algal strains showed high electron-donating properties ( $\gamma^-$ ), the strain 171A showing a more pronounced tendency. Electron-acceptor properties ( $\gamma^+$ ) were very low, while Lifshitz-van der Waals properties ( $\gamma^{LW}$ ) were equivalent for all strains. Thus, MATS interpretations were in accordance with surface characteristics derived from contact angle measurements.

Moreover, surface tension components allowed the determination of the hydrophobic degree. Although being positive for all surfaces,  $\Delta G_{SWS}$  values could lead to nuance interpretations. Thus amongst algae, the strain 749B exhibited the strongest hydrophobic character, the other strains showing a rather hydrophilic one, this tendency being the most pronounced for the strain 171A. Amongst model surfaces, the hydrophobic degree decreased following the trend: OTS > HMDZ > APS > glass.

Table 2. Contact angles derived surface tension components and hydrophobic degree of algal strains and model surfaces investigated.

	Contact angles (°)			Surface tension components (mJ m <sup>-2</sup> )			Hydrophobic degree (mJ m <sup>-2</sup> )	
	$\theta_w$	$\theta_F$	$\theta_B$	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	$\Delta G_{SWS}$	
Strains	749B	42.0 ± 7.5	31.5 ± 4.7	46.2 ± 2.3	31.8	2.4	33.8	8.8
	772B	45.8 ± 5.6	42.9 ± 3.5	35.8 ± 4.0	36.4	0.3	37.7	118.0
	171A	24.8 ± 3.4	33.9 ± 2.4	37.2 ± 4.8	35.8	0.5	56.9	142.1
Surfaces	glass	0	0	39.1 ± 1.0	35.0	2.5	54.5	131.3
	APS	52.2 ± 3.1	40.9 ± 1.4	34.2 ± 0.8	37.1	0.6	27.0	100.5
	HMDZ	64.8 ± 2.7	53.7 ± 0.5	53.0 ± 2.6	28.5	1.0	18.9	89.8
	OTS	108.3 ± 4.5	90.7 ± 1.5	60.0 ± 1.5	25.0	0.4	0.9	29.8

Finally, the extent of glass slides modification was evaluated by XPS analysis. Table 3 displays the peak positions and Table 4 the atomic percentage of the components detected. All the model surfaces exhibited the presence of silicon, carbon, oxygen and nitrogen. Si composition of model surfaces APS, HMDZ and OTS appeared to be lower than that of glass, showing the efficient covering of the glass substrate by SAMs. Carbon was fittable with two components: the main one was assigned to aliphatic carbon and the smaller one to C=O groups (WAGNER et al. 2003). Aliphatic carbon composition was higher for OTS surfaces, due to the molecule C18 chain. Oxygen had a large main peak assignable to silica and organic oxygen and a small component at larger binding energies corresponding to water. A component at smaller binding energies was also detected: since samples were smaller than the holder, this oxygen may be an organic oxygen present on the holder. Finally, although being detected on all surfaces, the nitrogen percentage was higher for APS surfaces than others, and was attributable to the functionalization by aminopropyltriethoxysilane molecule.

Table 3. Peak positions ( $\pm 0.2$  eV) and assignments deduced from XPS analysis of model surfaces.

	glass	APS	HMDZ	OTS
Si 2p 3/2	103.3	103.0	103.1	103.4
Si 2p 1/2	103.9	103.6	103.7	104.0
Aliphatic carbon	285.0	285.0	285.0	285.0
Carboxylic group	288.6	288.5	288.7	288.3
(silica + organic) oxygen	532.5	532.4	532.6	532.8
H <sub>2</sub> O	536.4	536.1	536.4	536.4
Nitrogen	400.8	400.1	400.6	401.5

Table 4. Surface chemical composition of model surfaces (atomic %) as determined by XPS analysis.

	glass	APS	HMDZ	OTS
Si	20.6	14.8	13.7	13.6
Aliphatic carbon	22.8	27.8	29.0	44.0
Carboxylic group	4.4	4.6	4.3	1.1
(silica + organic) oxygen	18.4	13.3	11.9	11.8
H <sub>2</sub> O	0.02	0.04	0.03	0.01
Nitrogen	0.6	1.7	1.0	1.1

### ***Adhesion of algae to model surfaces: predictions and observations***

The free energies of adhesion components were evaluated from the surface free energies of algae and model surfaces (Table 5).  $\Delta G^{LW}$  components were found negatives and almost constant for adhesion of algal strains to all surfaces. Conversely,  $\Delta G^{AB}$  values were found to increase following the trend: OTS > HMDZ > APS > glass, as for the hydrophobic degree (Table 2). As a consequence, the total free energy of adhesion was also found to increase according to the same trend.  $\Delta G^{Total}$  was only negative, thus favourable, for adhesions of algae to OTS surfaces. However, taking into account that the highest was  $\Delta G^{Total}$ , the least adhesions would be favourable, predicted favourable adhesions for all algal strains to surfaces followed this trend: OTS > HMDZ > APS > glass.

Figure 3 shows examples of the three algal strains under study, as observed in the parallel plate flow chamber. These *in vitro* adhesion experiments led to several observations. It was found that the longest was the initial contact time of algal strains with model surfaces, the strongest was the adhesion strength (Figure 4), as already observed for other micro-organisms (Hazen & Glee 1995). Moreover, the adhesion strength of algae depended on the culture age, older strains adhesion being weaker than younger strains one (Figure 5). Thus, algal strains adhesions to model surfaces shown in Table 6 were realised within a few days in order to avoid introducing uncertainties in adhesion process due to different culture ages. The adhesion of the three algal strains to model surfaces followed this trend: APS > OTS > HMDZ > glass. These results were plotted as a Baier Curve to investigate the influence of surface energy of model surfaces on algal adhesion (Figure 6). Moreover, the addition of a tensioactive in the circulating solution decreased algae adhesion on APS, OTS and HMDZ surfaces. The addition of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in the solution seemed to be without effect on adhesion of 749B and 772B strains on APS surfaces, but it led to a slight adhesion decrease for 171A strain.

Table 5. Lifshitz-van der Waals ( $\Delta G^{LW}$ ), acid-base ( $\Delta G^{AB}$ ), and total ( $\Delta G^{Total}$ ) interaction free energies of adhesion between algal strains and model surfaces, when immersed in water ( $\text{mJ m}^{-2}$ ).

		Strains			
		749B	772B	171A	
Surfaces	glass	$\Delta G^{LW}$	-2.4	-3.4	-3.3
		$\Delta G^{AB}$	21.6	28.7	37.7
		$\Delta G^{Total}$	19.2	25.3	34.4
	APS	$\Delta G^{LW}$	-2.8	-3.9	-3.7
		$\Delta G^{AB}$	7.5	10.6	22.5
		$\Delta G^{Total}$	4.8	6.8	18.8
	HMDZ	$\Delta G^{LW}$	-1.3	-1.8	-1.8
		$\Delta G^{AB}$	1.3	2.5	14.1
		$\Delta G^{Total}$	0	0.7	12.4
OTS	$\Delta G^{LW}$	-0.6	-0.9	-0.9	
	$\Delta G^{AB}$	-22.0	-27.4	-13.8	
	$\Delta G^{Total}$	-22.6	-28.3	-14.6	

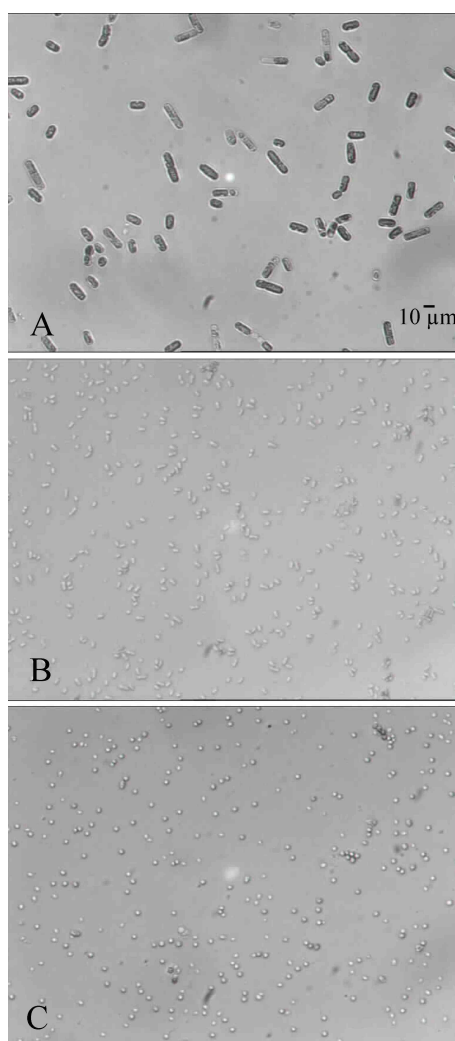


Figure 3. Adhering algal cells as observed in the parallel plate flow chamber: (A) *Klebsormidium flaccidum*, (B) *Stichococcus bacillaris*, (C) *Chlorella cf. mirabilis*.

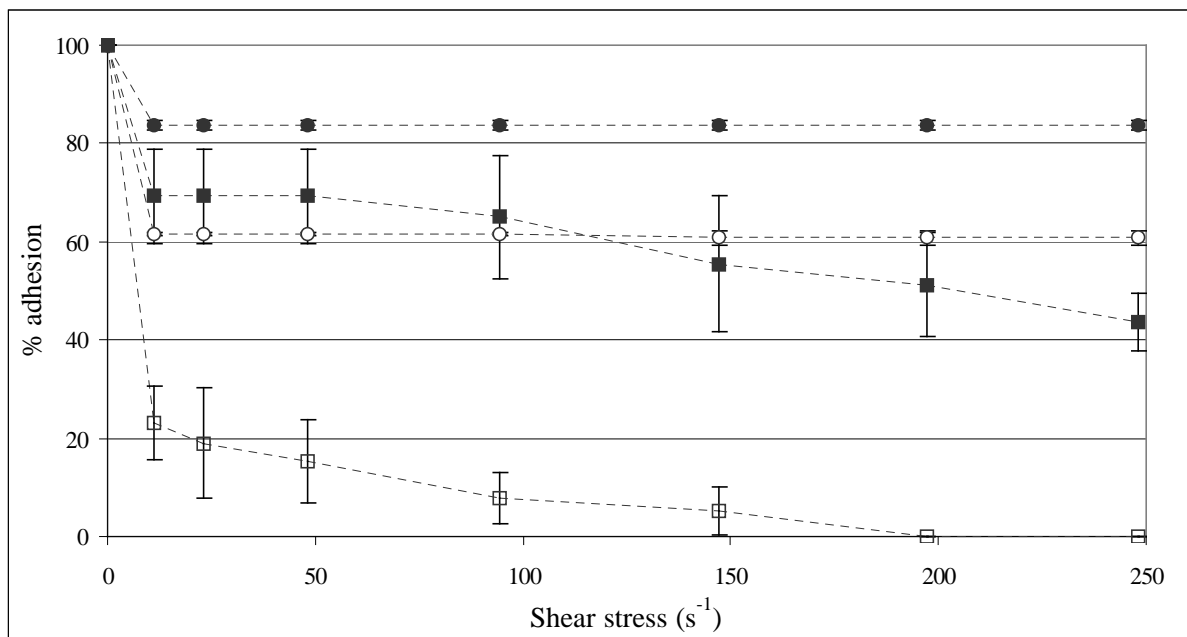


Figure 4. Adhesion of *Klebsormidium flaccidum* (strain 749B) depending on the contact time on surfaces (●: HMDZ, 15 min; ○: HMDZ, 5 min; ■: glass, 95 min; □: glass, 15 min).

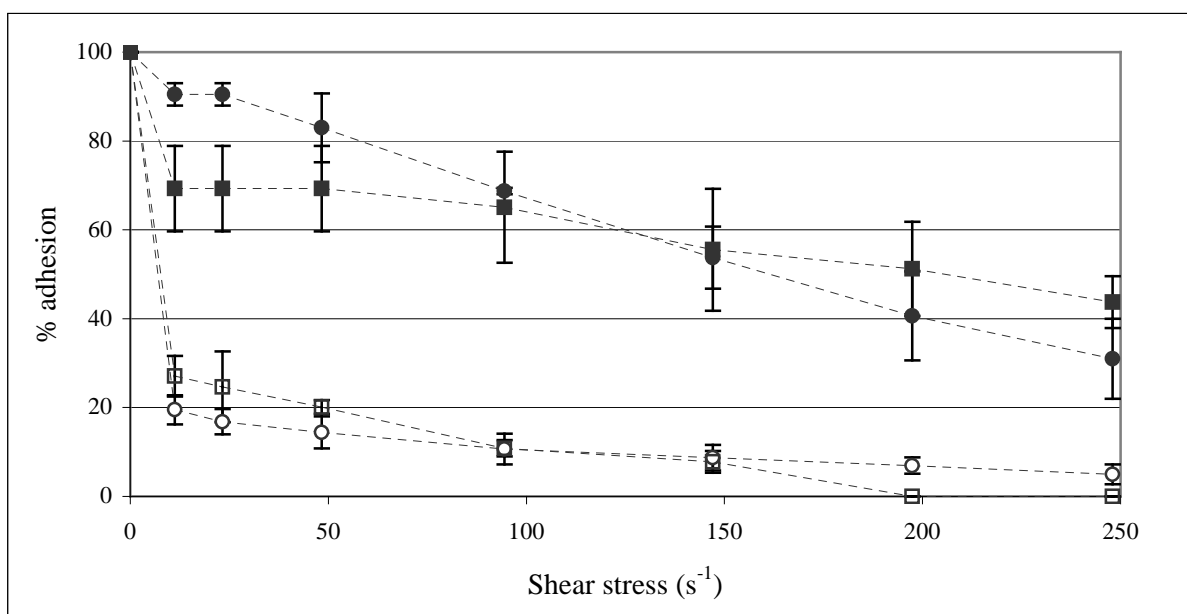


Figure 5. Adhesion of *Klebsormidium flaccidum* (strain 749B) and *Stichococcus bacillaris* (strain 772B) as a function of the culture age (●: 772B, 45 days; ○: 772B, 73 days; ■: 749B, 30 days; □: 749B, 120 days).



Table 6. Adhesion percentage of the three algal strains on model surfaces at shear stress  $\sigma = 200 \text{ s}^{-1}$ , as an average of three measurements.

	Strains		
	749B	772B	171A
glass	$47 \pm 9$	$5 \pm 3$	$29 \pm 9$
APS	$93 \pm 4$	$83 \pm 1$	$89 \pm 6$
APS + TA	$9 \pm 3$	0	$33 \pm 3$
APS + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$96 \pm 5$	$78 \pm 3$	$66 \pm 5$
HMDZ	$68 \pm 1$	$13 \pm 2$	$65 \pm 8$
HMDZ + TA	0	$2 \pm 2$	0
OTS	$79 \pm 7$	$48 \pm 2$	$64 \pm 7$
OTS + TA	0	0	0

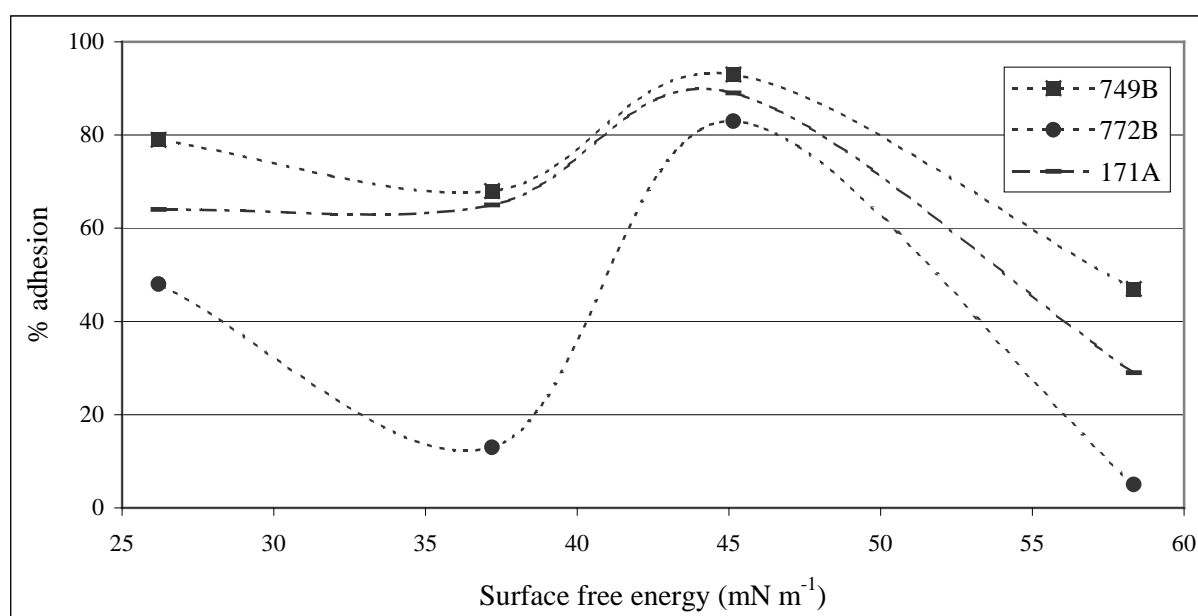


Figure 6. Effect of surface free energies of model surfaces on algal cells adhesion.

## Discussion

### *Limitations of this study*

Most of the methods used to achieve this work were derived from bacteria or yeast studies (i.e. the MATS method, the parallel plate flow chamber) and even the extended DLVO model of colloid stability, which describes the behaviour of inert particles (van Oss et al. 1986) is criticized as a model for living micro-organisms (Hermansson 1999). Indeed, Gallardo-Moreno et al. (2004b) noted that as in living systems more specific interactions can be present between cells and substrata, the thermodynamic description of the adhesion process may have weaknesses and has to be taken as qualitative. Micro-algae are even more complex organisms than bacteria, due to their size and possible evolution during their life cycle. However, knowing these limitations, the methods and models cited above were derived to the study of

micro-algae adhesion. The results obtained were reproducible and they followed the same trend for the three micro-algal strains investigated, suggesting that the methods could be derived, with care, to other micro-organisms study. As a proof, the microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) method, originally developed to bacteria studies, was successfully used by Fattom and Shilo (1984) and by Lamenti et al. (2000) to evaluate the hydrophobic character of cyanobacteria and green micro-algae.

### ***Electrostatic interactions***

In order to predict the adhesion process, the total free energy of adhesion had to be evaluated. In the expression (6) of the thermodynamic approach, the Brownian motion and electrostatic (*EL*) interactions were neglected, whereas these interactions are taken into account in the extended DLVO approach (Bos et al. 1999). *EL* interactions are generally low in fluids with high ionic strength, thus their importance versus the sum of  $\Delta G^{LW}$  and  $\Delta G^{AB}$  can be neglected, but in suspending liquids with low ionic strength, their importance is greater and has to be considered (Bos et al. 1999). In this study, algal cultures were maintained in BBM, a high ionic strength suspending liquid. In MATS analysis, *EL* interaction free energies negligence was thus coherent as algae remained in BBM. However, for adhesion assays in the parallel plate flow chamber, whereas algae were introduced in the device in their culture medium, they then supported deionised water as circulating and detaching fluid. This low ionic strength liquid was chosen as the most representative of the rain ionic strength, when it streams along façades and permits algae cells to settle on the coating. But this choice introduced a doubt in whether *EL* interactions could really be neglected. Electrophoretic mobility measurements, that would have gave us an estimation of  $\Delta G^{EL}$  value, did not give any interpretable information maybe due to algae dimensions.

The predicted adhesion trend  $OTS > HMDZ > glass$  was verified by *in vitro* measurements, meaning that *EL* interactions were with low effect on such low charged surfaces. However, the unpredicted high algae adhesion on APS surfaces may be attributed to *EL* interactions between negatively charged algae surfaces and the positively charged APS surface. In this case, *EL* interactions would have been attractive, thus consolidating the adhesion process. The decrease in adhesion for 171A strain on APS surface in higher ionic strength fluid, thus decreasing *EL* interactions due to shielding of surface charges, would confirm this hypothesis.

### ***Hydrophobic interactions***

The adhesion trend  $OTS > HMDZ > glass$  may be attributed to hydrophobic interactions. Indeed, tensioactive molecules added to the circulating fluid interacted with OTS and HMDZ hydrophobic surfaces by their hydrophobic entity. Molecules hydrophilic entities were so presented to algae, which resulted in adhesion decrease. Hydrophobic interactions are driven by *AB* interactions (van Oss 1993), and the measured hydrophobic degree  $\Delta G_{SWS}$  and acid-base interaction of adhesion  $\Delta G^{AB}$  effectively varied in the same trend for algae and model surfaces,  $\Delta G^{LW}$  remaining almost constant.

### ***General considerations***

The adhesion trends, plotted as a function of total surface energies of the model surfaces investigated, showed a different behaviour than the theoretical Baier curve for bioadhesion (Baier 1980). In fact, algal adhesion was weaker on high surface energies, as already observed for different micro-organisms (Busscher 1989, Becker 1998, Everaert et al. 1998, Terada et al. 2005), while the reverse, described by the Baier curve, was also observed for some marine micro-organisms (Callow & Fletcher 1994, Tsibouklis et al. 1999, Youngblood et al. 2003).

Finally, one may think that algal adhesion process was linked to their metabolic activity, as when strains got older and may have begun to degrade, their adhesion was weaker. These observations pointed out the possibility for the intervention of extracellular polymers as mediators of the adhesion, as commonly suggested for bacterial adhesion (Lind et al. 1997, Tsuneda et al. 2003). This hypothesis was investigated by characterizing extracellular polymers secreted by algae and cyanobacteria isolated from façade coatings, and by evaluating their adsorption to model surfaces (Barberousse et al. In press-b). This study showed that the adsorption of the polymer extracted from the strain 749B of *Klebsormidium flaccidum* was higher to hydrophobic surfaces than to hydrophilic ones, which correlated with the adhesion experiments of the whole cells exposed here. The role of that kind of extracellular polymers in algal adhesion to surfaces may thus explain why adhesion strengths were stronger after longer contact times of algae with the surfaces, due to initiation of polymers contact to the surface.

### **Concluding remarks**

The adhesion process of these three algal strains on model surfaces was mainly mediated by hydrophobic interactions, adhesion on charged surfaces being also strengthened by electrostatic interactions. This adhesion strength appeared to be dependent on the culture age as well as on the contact time with surfaces, thus suggesting the intervention of extracellular polymers to consolidate the adhesion (Barberousse et al. In press-b).

### **Acknowledgements**

Authors would like to thank Rhodia PPMC, Hexion Specialty Chemicals and the Association Nationale de la Recherche Technique (grant No. 294/2003) who funded this work. They are also indebted to Patrick Lasnet de Lanty (Rhodia) for his help in parallel plate flow chamber analysis and to Dr. Mireille Turmine (Université Paris VI) for the tensiometer accessibility.

### **Bibliography**

- Aubert H, Brook AJ and Shephard KL. 1989. Measurement of the adhesion of a desmid to a substrate. *British Phycological Journal* 24: 293-295.
- Baier RE. 1980. Adsorption of micro-organisms to surfaces. Wiley-Interscience Publishers, New-York, pp. 59-104.
- Barberousse H, Tell G, Yéprémian C and Couté A. 2006a. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France. *Algological Studies* 120: 83-110.
- Barberousse H, Lombardo RJ, Tell G and Couté A. 2006b. Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. *Biofouling* 22(2): 69-77.
- Barberousse H, Ruot B, Yéprémian C and Boulon G. In press-a. An assessment of façade coatings against colonisation by aerial algae and cyanobacteria. *Building and Environment*.
- Barberousse H, Ruiz G, Gloaguen V, Lombardo RJ, Djediat C, Mascarell G and Castaing JC. In press-b. Capsular polysaccharides secreted by building façade colonisers: characterization and adsorption to surfaces. *Biofouling*.

- Becker K. 1998. Detachment studies on microfouling in natural biofilms on substrata with different surface tensions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41: 93-100.
- Bellon-Fontaine M-N, Rault J and van Oss CJ. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7(1-2): 47-53.
- Bos R, van der Mei HC and Busscher HJ. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 179-230.
- Bos R, van der Mei HC, Gold J and Busscher HJ. 2000. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 189(2): 311-315.
- Bruinsma GM, van der Mei HC and Busscher HJ. 2001. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22(24): 3217-3224.
- Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AWJ, de Jong HP and Arends J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 48(5): 980-983.
- Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Steenberghe D, Quirynen M, Pratt IH, Marechal M and Rouxhet PG. 1989. Physico-chemical properties of oral streptococcal cell surfaces and their relation with adhesion to solid substrata *in vitro* and *in vivo*. *Colloids and Surfaces* 42: 345-353.
- Busscher HJ, Bos R and van der Mei HC. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters* 128(3): 229-234.
- Callow ME and Fletcher RL. 1994. The influence of low-surface energy materials on bioadhesion - a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 34: 333-348.
- Cao L, Chai Y, Li P, Shen Z & Wu J. 2005. Efficient self-assembly of transition metal oxide nanoclusters on silicon substrates. *Thin Solid Films* 492(1-2): 13-18.
- Dubosc A, Escadeillas G, Blanc PJ. 2001. Characterization of biological stains on external concrete walls and influence of concrete as underlying material. *Cement and Concrete Research* 31(11): 1613-1617.
- Everaert EPJM, van der Mei HC and Busscher HJ. 1998. Adhesion of yeasts and bacteria to fluoro-alkylsiloxane layers chemisorbed on silicone rubber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 10(4): 179-190.
- Fattom A and Shilo M. 1984. Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47(1): 135-143.
- Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, Bruque JM and Perez-Giraldo C. 2004a. The adhesion strength of *Candida parapsilosis* to glass and silicone as a function of hydrophobicity, roughness and cell morphology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 249(1-3): 99-103.
- Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, Perez-Giraldo C, Bruque JM and Gomez-Garcia AC. 2004b. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *Journal of Colloid and Interface Science* 271(2): 351-358.
- Guilbeau BP, Harry FP, Gambrell RP, Knopf FC and Dooley KM. 2003. Algae attachment on carbonated cements in fresh and brackish waters--preliminary results. *Ecological Engineering* 20(4): 309-319.
- Hazen KC and Glee PM. 1995. Adhesion of fungi. *Methods in Enzymology* 253: 414-424.

- Holland R, Dugdale TM, Wetherbee R, Brennan AB, Finlay JA, Callow JA and Callow ME. 2004. Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. *Biofouling* 20(6): 323-329.
- John DM. 1988. Algal growths on buildings: a general review and methods of treatment. *Biodeterioration Abstracts* 2(2): 81-102.
- Lamenti G, Tiano P and Tomaselli L. 2000. Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Gardens (Florence, Italy). *Journal of Applied Phycology* 12: 427-433.
- Lind JL, Heimann K, van Bliet C, Hoogenraad NJ and Wetherbee R. 1997. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta* 203: 213-221.
- Millsap KW, Bos R, Busscher HJ and van der Mei HC. 1999. Surface aggregation of *Candida albicans* on glass in the absence and presence of adhering *Streptococcus gordonii* in a parallel-plate flow chamber: a surface thermodynamical analysis based on acid-base interactions. *Journal of Colloid and Interface Science* 212: 495-502.
- Pierres A, Benoliel AM and Bongrand P. 1996. Experimental study of the rate of bond formation between individual receptor-coated spheres and ligand-bearing surfaces. *J. Phys. III France* 6: 807-824.
- Rindi F and Guiry MD. 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43(3): 225-235.
- Roosjen A, Boks NP, van der Mei HC, Busscher HJ and Norde W. 2005. Influence of shear on microbial adhesion to PEO-brushes and glass by convective-diffusion and sedimentation in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46(1): 1-6.
- Rosenberg M, Gutnick D and Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9(1): 29-33.
- Scheuerman TR, Camper AK and Hamilton MA. 1998. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Journal of Colloid and Interface Science* 208(1): 23-33.
- Schultz MP, Finlay JA, Callow ME and Callow JA. 2000. A turbulent channel flow apparatus for the determination of the adhesion strength of microfouling organisms. *Biofouling* 15(4): 243-251.
- Sekar R, Venugopalan VP, Satpathy KK, Nair KVK & Rao VNR. 2004. Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates. *Hydrobiologia* 512: 109-116.
- Sjollema J, Busscher HJ and Weerkamp AH. 1989. Real-time enumeration of adhering microorganisms in a parallel plate flow cell using automated image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 9: 73-78.
- Terada A, Yuasa A, Tsuneda S, Hirata A, Katakai A and Tamada M. 2005. Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 43: 99-107.
- Tsibouklis J, Stone M, Thorpe AA, Graham P, Peters V, Heerlien R, Smith JR, Green KL and Nevell TG. 1999. Preventing bacterial adhesion onto surfaces: the low-surface-energy approach. *Biomaterials* 20: 1229-1235.
- Tsuneda S, Aikawa H, Hayashi H, Yuasa A and Hirata A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surfaces. *FEMS Microbiology Letters* 223: 287-292.
- Vacheethasane K and Marchant RE. 2000. Nonspecific *Staphylococcus epidermidis* adhesion. In: An YH & Friedman RJ, editors. *Handbook of bacterial adhesion - principles, methods and applications*. Totowa, New-Jersey: Humana Press. pp. 73-90.

- van Oss CJ. 1993. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 78: 1-49.
- van Oss CJ. 1994. *Interfacial forces in aqueous media*. New York.
- van Oss CJ, Chaudhury MK and Good RJ. 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews* 88(6): 927-941.
- Wagner CD, Naumkin AV, Kraut-Vass A, Allison JW, Powell CJ & Rumble JR. 2003. NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, NIST Standard Reference Database 20, Version 3.3.
- Youngblood JP, Andruzzi L, Ober CK, Hexemer A, Kramer EJ, Callow JA, Finlay JA and Callow ME. 2003. Coatings based on side-chain ether-linked poly(ethylene glycol) and fluorocarbon polymers for the control of marine biofouling. *Biofouling* 19: 91-98.

#### **IV.3.2. Synthèse et commentaires de l'article 4**

##### ***Choix du milieu d'étude des algues***

Les interactions en milieu aqueux sont généralement fortement influencées par la force ionique du milieu. Il en va de même lors de l'établissement de phénomènes adhésifs, où la force ionique peut, par exemple, modifier totalement l'effet d'interactions électrostatiques. Le choix du milieu dans lequel ces études ont été menées n'a donc pas été évident. Notre but était de sélectionner un milieu de composition assez proche de l'eau de pluie, puisque c'est elle qui en ruisselant sur les façades transporte les algues et les cyanobactéries. L'eau de pluie est donc le milieu dans lequel vont s'établir les liens adhésifs des micro-organismes avec le revêtement. La composition de l'eau de pluie varie en fonction de la localisation géographique (MIQUEL 2001). En effet, l'eau de pluie issue de la condensation des molécules d'eau contenues dans l'air, se charge des particules et gaz présents dans l'atmosphère. Une eau de pluie en façade maritime sera par exemple très chargée en chlorures, quand l'eau de pluie d'une région industrielle sera chargée de polluants et plutôt acide. Cependant en moyenne, l'eau de pluie est légèrement acide (pH ~ 5) et faiblement chargée en minéraux. Nous avons donc choisi d'effectuer les essais d'adhésion dans de l'eau désionisée, milieu finalement utilisé dans la plupart des études d'adhésion en chambre à flux laminaire (GALLARDO-MORENO et al. 2004a, 2004b, MERCIER-BONIN et al. 2004).

##### ***Interactions menant à l'adhésion***

Les essais d'adhésion ont permis d'observer des comportements variés en fonction de la nature des surfaces modèles. Ainsi, l'adhésion des trois souches d'algues étudiées décroît selon cet ordre : APS > OTS > HMDZ > verre. L'ajout de molécules tensioactives ou l'augmentation de la force ionique du milieu circulant dans la cellule à flux laminaire a ainsi permis de mettre en évidence l'importance d'interactions de nature hydrophobe et électrostatique dans le

processus d'adhésion. Par ailleurs, l'exploitation des caractéristiques physico-chimiques de surface des algues et des surfaces modèles a permis, selon l'approche thermodynamique de l'adhésion, de prédire ces variations d'adhésion. Cependant, la négligence des interactions électrostatiques dans des milieux faiblement ioniques peut mener à des erreurs de prédiction de l'adhésion, comme cela a été le cas pour la surface APS.

#### *L'adhésion serait consolidée par sécrétion de polymères adhésifs*

Les essais menés ont également montré que l'adhésion est renforcée lorsque la souche d'algue est jeune et en phase exponentielle de croissance, ainsi que lorsque le temps de contact avec le substrat augmente. L'adhésion des algues serait consolidée au cours du temps, cette faculté étant diminuée chez les souches en voie de dégradation. Cette phase de consolidation de l'adhésion semblerait donc liée au métabolisme des micro-organismes et pourrait être déclenchée par la sécrétion de polymères adhésifs, comme cela est communément observé au sein de biofilms bactériens.

#### **IV.4. Conclusion du chapitre IV**

L'étude statistique des données recueillies lors des prélèvements de biofilms, ainsi que les expériences de colonisation de matériaux et d'adhésion sur des surfaces modèles de souches d'algues isolées de ces biofilms, ont montré que **certains éléments favorisent l'implantation des algues et cyanobactéries sur les revêtements :**

- ↳ les paramètres environnementaux favorisant la proximité de micro-organismes à la façade ainsi que l'apport d'humidité,
- ↳ les paramètres architecturaux induisant la création de zones humides,
- ↳ les paramètres des revêtements tels que rugosité, porosité et pH peu alcalins,
- ↳ les paramètres physico-chimiques de surfaces induisant des interactions hydrophobes et/ou électrostatiques attractives,

Par ailleurs, **des revêtements au pH alcalin ainsi que des surfaces hydrophiles ont montré une efficacité contre l'implantation des algues.**

---

## V. Étude de la contribution de polymères algaux à l'étape d'adhésion

---

Les essais d'adhésion d'algues sur des surfaces modèles nous ont permis d'observer une consolidation de l'adhésion au cours du temps. Par analogie avec les connaissances disponibles sur les biofilms bactériens, le processus d'adhésion pourrait être renforcé par la sécrétion de polymères adhésifs, de nature polysaccharidique. Dans l'hypothèse où de tels polymères seraient sécrétés de façon permanente à la surface des micro-organismes, ils pourraient également être l'interface d'adhésion avec le support. La surface cellulaire des micro-organismes a donc été étudiée grâce à des techniques de microscopie électronique et la nature des sécrétions observées a ensuite été caractérisée. Finalement, les capacités d'adsorption sur des surfaces modèles des polymères extraits ont été évaluées à l'aide d'une cellule de réflectivité. Ces résultats sont présentés dans l'article 5. Par ailleurs, des essais de dégradation enzymatique des polymères de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B ont été effectués afin d'évaluer les variations de l'adhésion de cette souche lorsque les polymères sont intacts et lorsqu'ils sont dégradés. Ces observations font l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

### V.1. Article 5 : Capsular polysaccharides secreted by building façade colonisers: characterization and adsorption to surfaces

Hélène Barberousse<sup>a,b</sup>, Gaël Ruiz<sup>c</sup>, Vincent Gloaguen<sup>c</sup>, Ruben J. Lombardo<sup>d</sup>,  
Chakib Djediat<sup>b</sup>, Gérard Mascarell<sup>b</sup>, Jean-Christophe Castaing<sup>e</sup>  
In press in *Biofouling*

<sup>a</sup> Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), Département Enveloppe et Revêtements, 84, avenue Jean Jaurès - Champs-sur-Marne - 77447 Marne-la-Vallée Cedex 2 - France

<sup>b</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Département RDDM, USM 505 Écosystèmes et Interactions Toxiques, 57, rue Cuvier / case 39 - 75005 Paris - France

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université des Sciences et Techniques, 123 avenue Albert Thomas - 87000 Limoges - France

<sup>d</sup> Laboratorio Limnología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Buenos Aires - Argentina

<sup>e</sup> Rhodia Recherches et Technologies, 52, rue de la Haie Coq - 93308 Aubervilliers Cedex - France



## Abstract

Exopolymers secreted by algal and cyanobacterial strains isolated from building façades were imaged by microscopy techniques. They were extracted and characterized to investigate their possible contribution to interactions with solid surfaces. The polymers were polysaccharides, with anionic and hydrophobic properties varying between the various strains. Capsular polysaccharides extracted from a strain of *Klebsormidium flaccidum* adsorbed in higher amounts on hydrophobic surfaces than on hydrophilic ones. These results tend to confirm the hypothesis that exopolymers are important in the colonisation process of micro-organisms to surfaces.

*Keywords:* Algae; Cyanobacteria; Biofilms; Buildings; Polysaccharides; Adsorption.

## Introduction

Biofilms are communities of micro-organisms associated with a surface and typically encapsulated in an extracellular gel-like matrix (Christensen 1989). This matrix is mainly composed of carbohydrates, often associated with proteins, nucleic acids or humic constituents which are thought to remain from lysed cells degradation (Christensen 1989, Purevdorj-Gage & Stoodley 2004). The matrix is believed to possess several functions and it might contribute to the colonisation of various surfaces, in the initial phase of adhesion or in the consolidation of micro-organisms attachment (Robins et al. 1986, Christensen 1989, Lind et al. 1997, An et al. 2000, Callow et al. 2003, Tsuneda et al. 2003).

On building façades, the main constituents of biofilms are green micro-algae and cyanobacteria (Barberousse et al. 2006a, 2006b). They induce aesthetic damages of the building aspect and favour the deterioration of the underlying material by their development and the subsequent recruitment of other micro-organisms (Ortega-Calvo et al. 1991, Morton & Surman 1994, Sand 1997, Welton et al. 2003). It is thus interesting to study the polymers secreted by those micro-organisms, that might intervene in the process of adhesion, in order to develop anti-adhesive coatings. However, while much information is available on algae or cyanobacteria developing in aquatic environments (Bertocchi et al. 1990, Gloaguen et al. 1995, Morvan et al. 1997, De Philippis & Vincenzini 1998, Nicolaus et al. 1999), little is known about polymers produced by terrestrial micro-organisms. Some studies were conducted on polymers secreted by soil algae (Lewin 1956), by cyanobacteria developing in desert (Flaibani et al. 1989, Hokputsa et al. 2003, Hu et al. 2003), and on roman hypogea (Bellezza et al. 2003), but there is little in the literature concerning secretions by micro-organisms colonising buildings.

Our first approach was to examine the ultrastructure of algae isolated from building biofilms to check the presence of exopolymers. We then determined the monosaccharide composition of polymers extracted from a selection of algal and cyanobacterial strains, as well as their degree of charge and hydrophobicity. Finally, the adsorption of polysaccharides extracted from a *Klebsormidium flaccidum* strain was investigated, as this algal species was found to be the most abundant on buildings previously sampled in France (Barberousse et al. 2006a).

## Materials and methods

### *Origin and culture of the strains*

The 12 algal and 11 cyanobacterial strains investigated in this work were all isolates of building façade biofilms in France. The origin of these strains is detailed in Table 1 and a more complete description of the environment of the biofilms sampled can be found in Barberousse et al. (2006b). The strains were selected as being representatives of species frequently identified in such samples (Barberousse et al. 2006a). Batch cultures of each of these strains were grown in Bold Basal medium (Bold 1949) for two months in a chamber with a photoperiod of 16 h/8 h light/dark, light intensity of  $15 \pm 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF (Photosynthetic Photon Flux) and a temperature of  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Algae and cyanobacteria were harvested during the stationary phase of culture for polymer extractions.

Table I. Origin of the biofilms from which algal and cyanobacterial strains were isolated in France (in between brackets, zip code of the department), nature of the colonised coating and exposure of the façade sampled.

	Strains	Taxon	Origin	Type of colonised coating	Façade exposure
Cyanobacteria	743D	<i>Phormidium corium</i>	Anecy (74)	traditional mortar	W
	674A	<i>Phormidium corium</i>	Strasbourg (67)	stone	E
	442D	<i>Phormidium corium</i>	Nantes (44)	one-coat rendering mortar	W
	444A	<i>Phormidium corium</i>	Nantes (44)	one-coat rendering mortar	W
	746B	<i>Phormidium corium</i>	Archamps (74)	concrete	NE
	7712E	<i>Phormidium cf. usteri</i>	Champs/Marne (77)	one-coat rendering mortar	N
	672B	<i>Phormidium ambiguum</i>	Strasbourg (67)	stone	SW
	671B	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	Strasbourg (67)	traditional mortar	S
	679B	<i>Leptolyngbya tenuis</i>	Boersch (67)	paint	E
	745A	<i>Calothrix pulvinata</i>	Archamps (74)	one-coat rendering mortar	SW
	7713E	<i>Calothrix pulvinata</i>	Champs/Marne (77)	one-coat rendering mortar	S
Algae	749B	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Archamps (74)	one-coat rendering mortar	W
	446C	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Nantes (44)	one-coat rendering mortar	NE
	748A	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Archamps (74)	traditional mortar	S
	772B	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Champs/Marne (77)	stone	N
	774E	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Champs/Marne (77)	plaster	N
	747C	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Archamps (74)	one-coat rendering mortar	NW
	677A	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Boersch (67)	paint	N
	678F	<i>Chlorella minutissima</i>	Boersch (67)	traditional mortar	E
	7410G	<i>Chlorella cf. mirabilis</i>	Archamps (74)	one-coat rendering mortar	E
	776A	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Champs/Marne (77)	Organic finish	W
	679E	<i>Bracteacoccus</i> sp.	Boersch (67)	paint	E
7713G	<i>Geminella terricola</i>	Champs/Marne (77)	one-coat rendering mortar	S	

### *Microscopic examinations*

Algal cultures were examined by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). For SEM observations, cultures were filtered on  $1.2 \mu\text{m}$  membrane filters (Millipore). After dehydration in ethanol, followed by subsequent

vaporization of the ethanol by the critical point drying technique (Emitech K850), the samples were coated with gold (Jeol JFC-1200). Observations were then carried out on a Jeol JSM-840A scanning microscope. For TEM observations, algal cultures were fixed for one hour in 1 % acroleine / 2.5 % glutaraldehyde buffered at pH 7.4 with 0.1 M cacodylate buffer. They were then washed three times in 0.4 M sodium cacodylate buffer enriched with 0.2 % ruthenium red, and dehydrated in ethanol. Cell pellets were then embedded in Spurr epoxy resin, which was let to polymerise at 47 °C for two days. Resins were then cut at 700 Å sections using a microtome (Ultracut E, Reichert-Jung), and the material was contrasted with 2 % uranyl acetate in 50 % ethanol. Muco-substances and polysaccharides were then stained with the help of a bismuth staining kit (Ref. #11436, Electron Microscopy Sciences), containing a solution A composed of periodic acid, ethanol and sodium acetate and a solution B composed of sodium tartrate, sodium hydroxide and bismuth subnitrate. Bismuth may effectively have applications in biofilm TEM studies, as it has previously been used to stain polysaccharides in fungi or bacteria extracellular tissues (Burton et al. 1975, Akashi et al. 1993), in a similar way in which ruthenium red is used (Fassel & Edmiston 1999). Observations were carried out on a Hitachi H-7100 transmission microscope.

### ***Polymers extraction***

After Gloaguen et al. (1995), the polysaccharides excreted in the culture medium were named released polysaccharides (RPS), while the ones constituting the external envelope of cyanobacteria and algae (capsule and slime) were called capsular polysaccharides (CPS). They were extracted according to the procedure described in Bertocchi et al. (1990). The algal or cyanobacterial cultures were harvested by filtration through a Whatman No. 1 filter paper when micro-organisms were aggregated, or by centrifugation for 10 min at 4000 rpm. The resulting filtrates or supernatants were concentrated under reduced pressure at 35 °C, and kept at 4 °C overnight after the addition of three volumes of absolute ethanol. The precipitated RPS were then collected by centrifugation for 10 min at 4000 rpm. The resulting pellets were dissolved in the minimum of deionised water, and dialyzed against deionised water for 24 h (Spectrapor MWCO 6000-8000). Lastly, the RPS were lyophilised for further analyses. The cell pellets obtained by filtration or centrifugation of the cultures were extracted with deionised water, at 100 °C for 1 h. After cooling, algae or cyanobacteria residues were collected by centrifugation of the culture broth and lyophilised for dry weight determination. The supernatants were concentrated under reduced pressure and the CPS were precipitated as above by addition of three volumes of absolute ethanol. After centrifugation, the pellets were dissolved in deionised water, dialysed for 24 h and lyophilised for further analyses. Extractions were led once for each strain.

### ***Carbohydrate and sulphate titration***

Total carbohydrate was measured by the phenol sulphuric method (Dubois et al. 1956) and uronic acids content by the meta-hydroxydiphenyl method (Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973). Relative concentrations of neutral sugars and uronic acids were obtained from the formula proposed by Montreuil & Spik (1963). The sulphation rate was determined by the turbidimetric method developed by Dodgson & Price (1962). Traces of sulphate groups were also investigated by infrared spectroscopy (Chopin et al. 1999).

### ***Monosaccharide composition***

The monosaccharide composition of extracted polymers was investigated by gas chromatography (GC). 1 mL of dialyzed RPS or CPS extract, together with 20 µg of myo-Inositol standard were hydrolysed by addition of 1 mL of a 1 M solution of acetyl chloride in anhydrous methanol (Instant methanolic HCl; Alltech), for 24 h at 80 °C. The hydrolysates were then brought to dryness by flushing with nitrogen. Methylglycosides were then trimethylsilylated for 2 h at room temperature by addition of 80 µL of a v/v mixture of pyridine and *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) in 1 % trimethylchlorosilane (TMCS). Extracts were then identified and quantified by GC with a Perichrom PR-2100 equipped with an FID detector on a CP-SIL-5CB capillary column (50 m, 0.32 mm id) from Chrompack. The carrier gas was nitrogen and the temperature gradient was 130 → 210 °C at 2 °C min<sup>-1</sup> with a 5 min stop at 190 °C and then 210 → 260 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>. The output was analysed with the Winilab v.3 program from Perichrom. Mixtures of sugars were used to calibrate the method.

### ***Statistics***

Correlation analysis between the composition of RPS and CPS for each strain were performed using the Pearson correlation coefficient (*r*). An arcsine transformation of the monosaccharide proportions was applied to assess normality for significance tests.

### ***Physico-chemical characterization***

The zeta potential of polymers in solution measured their electrical potential. Negative values would indicated that the polymer presented chemical groups with negative charges i.e. that it would be rather anionic. In contrary, positive values would be expected for cationic polymers. Zeta potential ( $\zeta$ ) measurements were performed with a Zeta Plus zetameter from BTC. Suspensions were prepared using about 2 mg of lyophilised CPS dispersed in deionised water (pH: 6.5; ionic strength: 4.10<sup>-4</sup> M). The zeta potential value was given as an average of ten measurements.

Surface tensions ( $\gamma$ ) were measured with a Krüss K10 tensiometer using a platinum plate, and equipped with a thermostatic bath that allowed the solution temperature to be fixed at 25 °C. Same suspensions as for zeta potential determination were used and measurements were made in triplicate.

### ***Reflectometry***

Reflectometry analyses were based on the measurement of the relative change of intensities of polarized reflected light on a planar substrate caused by the adsorption of polymers (Dijt et al. 1990, 1994, Roques-Carmes et al. 2002). The reflected beam from an incident polarized He-Ne laser was split into a parallel ( $I_p$ ) and a perpendicular ( $I_s$ ) components, with respect to the plane of incidence. The output signal  $S$  (V) was defined as the ratio of those components:  $S = I_p/I_s$ , and  $S_0$  was the baseline value before introduction of the polymers.

The change in  $S$  value could be related to the adsorbed or desorbed amount of polymer per surface unit,  $\Gamma$  (mg m<sup>-2</sup>):

$$\Gamma = \frac{(S - S_0)}{S_0 \times A_s} \quad (1)$$

$A_s$  was the sensibility factor ( $\text{m}^2 \text{mg}^{-1}$ ) defined as:

$$A_s = \frac{1}{S_0} \frac{dS}{d\Gamma} \quad (2)$$

Its value can be estimated from the polymers  $dn/dC$  value, with the help of an optical model of the interface of adsorption, developed at the laboratory.

### ***Polymers adsorption measurements***

The reflectometric instrument was constructed after the description of Dijt et al. (1990).  $1 \times 4$  cm strips of silica wafers (Silicon Inc.) were used as adsorption surfaces because of their strong light reflecting properties. The wafers were cleaned by immersion 10 min in piranha solution (3:1 (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ ) and then rinsed thoroughly in deionised water and dried under a nitrogen stream. A portion of wafers was used as is ( $\text{SiO}_2$ ), and another portion was functionalised with  $-\text{CH}_3$  groups by placing the wafers in sealed compartments containing a few drops of hexamethyldisilazane (HMDZ) for 2 h. The surfaces characterization was performed by measuring water contact angles  $\theta_w$  by the sessile-drop technique on a Krüss PT 100 polarimeter with temperature fixed at  $25^\circ\text{C}$ , on four different samples of wafers.

Adsorption measurements were performed at  $25^\circ\text{C}$  in an impinging flow cell (volume of the apparatus:  $2 \text{ cm}^3$ ) with a stagnation point. Experiments were carried out with deionised water (pH: 6.5; ionic strength:  $4.10^{-4} \text{ M}$ ) or with a 50 ppm solution of CPS 749B in deionised water. Flow rates were about  $0.6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Briefly, a wafer was placed in the cavity submitted to liquid flow, then a laser beam ( $\lambda = 632 \text{ nm}$ ) was emitted on the wafer and the reflected component was measured. A blank measurement was done when the wafer was submitted to deionised water flow, which gave the value  $S_0$ . Then, the CPS 749B solution was introduced in the cavity, allowing polymers to adsorb to the wafer, and the evolution of the reflected component  $S$  with time was registered. Lastly, deionised water was flowed on wafers surface, allowing a quantification of desorbed polymers.

The  $dn/dC$  value was the slope of refractive indexes ( $n$ ) of polymer solutions in deionised water of concentrations ( $C$ ) varying from 0.1 to  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , evaluated at  $25^\circ\text{C}$  with a Digital Universal Refractometer (Schmidt & Haensch). Experiments were made in triplicate.

## **Results**

### ***Extracellular polymer images***

Sheaths, capsules or slimes are common constituents of cyanobacteria ultrastructure but their occurrence is not systematic amongst green micro-algae and was thus hypothetical amongst façade colonisers. The ultrastructure of some algal strains investigated hereafter was then imaged to check for the presence of cell wall associated secretions. That kind of material was not clearly visible for all strains examined, but Figure 1 shows images of extracellular polymers secreted by five of the strains. In these samples the layer of exopolymers diffused as far as 200 nm around the cells, which theoretically makes it a good contact interface for solid surfaces.

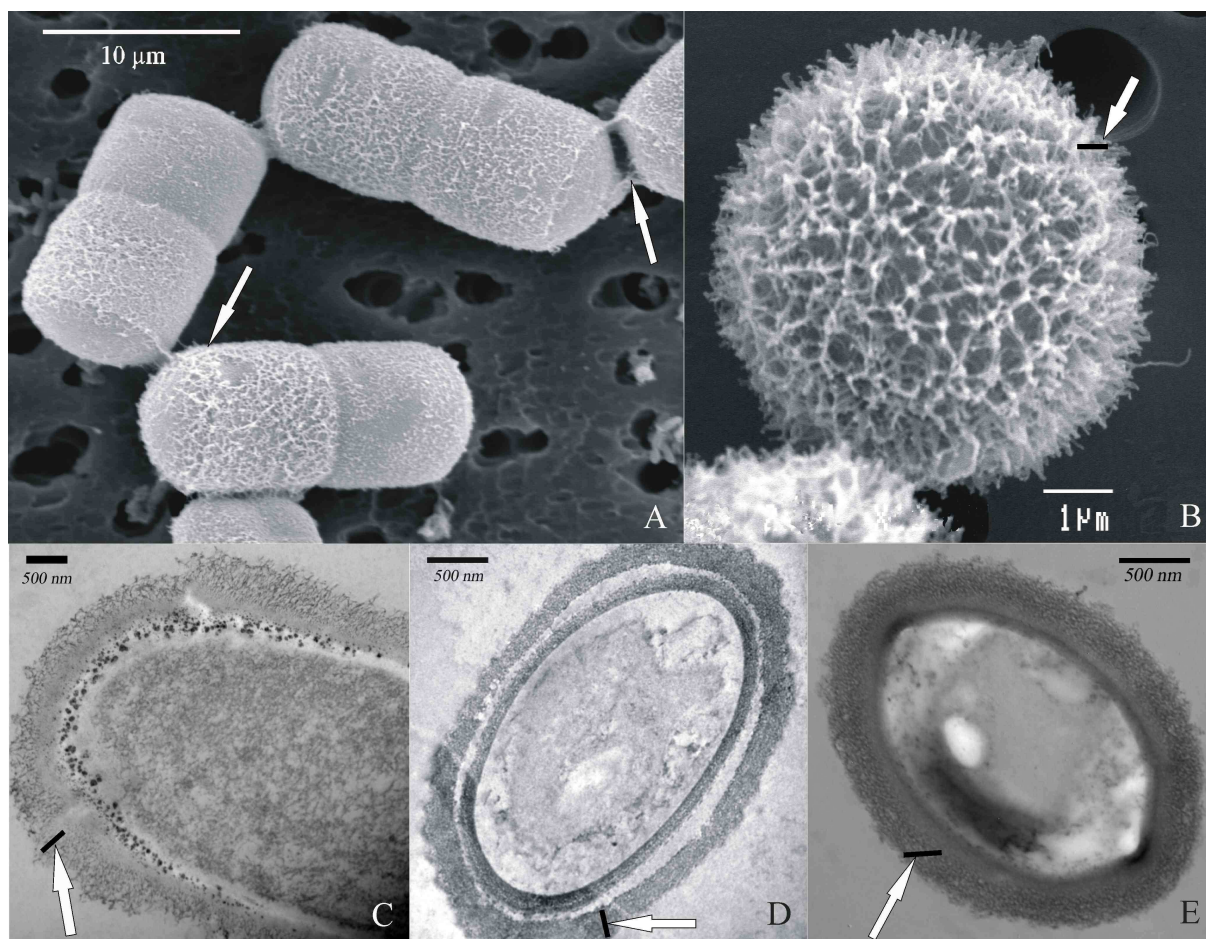


Figure 1. SEM images (A: *Klebsormidium flaccidum*, strain 749B; B: *Geminella terricola*, strain 7713G) and TEM images (C: *Klebsormidium flaccidum*, strain 748A; D: *Stichococcus bacillaris*, strain 772B; E: *Chlorella ellipsoidea*, strain 776A) of CPS investigated in this work, indicated with arrows.

### ***Polymers extraction and chemical composition***

The yield of extracted polymers varied from one strain to another and even between strains of the same identification (Table 2). The yield of RPS was generally higher than that of CPS. For most of cyanobacterial strains, the extractable CPS represented 20 to 30 % of the total dry weight, except for strains 743D, 674A, 671B and 672B which exhibited a yield below 11 %. However, algal CPS were less abundant and represented less than 10 % of the total dry weight.

The extracted CPS and RPS were composed of the hexoses glucose (Glc), galactose (Gal) and mannose (Man), the 6-deoxy-hexoses rhamnose (Rha) and fucose (Fuc) and the pentoses xylose (Xyl) and arabinose (Ara) (Tables 3 and 4). The main monosaccharide components differed between specimens belonging to cyanobacteria or algae, and between genera. Amongst cyanobacteria, glucose (13-32 %) and galactose (11-45 %) were the main components of *Phormidium* polysaccharides, whereas *Leptolyngbya* and *Calothrix* extracts were mainly composed of glucose (21-49 %). Amongst algae, mannose was the major

component of the genera *Klebsormidium* (25-38 %), with rhamnose for strain 446C (32-50 %). Polysaccharides of the genera *Stichococcus* were mainly composed of rhamnose (17-38 %) with high amounts of mannose and glucose in some samples, whereas galactose (14-63 %) was the major component of *Chlorella* extracts. Thus, major components of polysaccharide extracts were neutral residues: mannose, rhamnose and galactose for algae, and glucose and galactose for cyanobacteria. Arabinose, xylose and fucose were in most of extracts minor residues which rarely made up more than 15 % of the molar composition. In some *Phormidium* and *Leptolyngbya* extracts, arabinose and fucose were even not detected. Lastly, the same sugars were generally identified in the RPS and CPS extracts, except for arabinose and fucose in two *Phormidium* and one *Leptolyngbya* strains. A significant correlation between RPS and CPS composition was found on 6 strains of cyanobacteria and 5 strains of algae (Table 5).

The uronic acid contents was highly varied from one strain or alga or cyanobacteria to another: they represented 1 to 40 % wt. of the polysaccharide extracts. Glucuronic and galacturonic acids were detected by GC as being the main constituents of uronic acids but were not quantified, as uronic acid linkages resisted degradation. Lastly, whereas all strains exhibited traces of sulphate groups, the sulphation rate was quantifiable for few of them, in majority algae strains. In this case, the rate varied between 0.2 and 7.6 %.

Table 2. Yield of RPS and CPS in % of total dry weight of cyanobacteria and algae extracted (nd = not determined).

	Strains	Taxon	RPS (% wt.)	CPS (% wt.)
Cyanobacteria	743D	<i>Phormidium corium</i>	nd	7.1
	674A	<i>Phormidium corium</i>	nd	3.2
	442D	<i>Phormidium corium</i>	24.9	19.5
	444A	<i>Phormidium corium</i>	25.2	19.6
	746B	<i>Phormidium corium</i>	20.3	19.9
	7712E	<i>Phormidium cf. usteri</i>	32.2	23.4
	672B	<i>Phormidium ambiguum</i>	16.1	5.4
	671B	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	nd	10.8
	679B	<i>Leptolyngbya tenuis</i>	50.1	nd
	745A	<i>Calothrix pulvinata</i>	27.5	29.2
	7713E	<i>Calothrix pulvinata</i>	7.0	15.0
Algae	749B	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	4.3	6.3
	446C	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	16.5	1.7
	748A	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	16.3	1.0
	772B	<i>Stichococcus bacillaris</i>	33.2	3.8
	774E	<i>Stichococcus bacillaris</i>	nd	5.9
	747C	<i>Stichococcus bacillaris</i>	31.6	5.5
	677A	<i>Stichococcus bacillaris</i>	14.8	4.2
	678F	<i>Chlorella minutissima</i>	31.0	4.9
	7410G	<i>Chlorella cf. mirabilis</i>	14.3	5.4
	776A	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	16.3	4.7
	679E	<i>Bracteacoccus</i> sp.	10.4	4.5
	7713G	<i>Geminella terricola</i>	18.2	8.0

Table 3. Monosaccharide composition (% mol.), uronic acids (UA) content (% wt.) and sulphation rate (% wt.) of cyanobacteria RPS and CPS extracts (t = traces; nd = not determined).

Strains	Taxon	Extract	(% mol.)							UA	Sulphation
			Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	(% wt.)	rate (% wt.)
743D	<i>Phormidium corium</i>	RPS	0	17.4	0	16.6	21.9	16.1	28.0	1.3	nd
		CPS	22.9	12.9	6.3	7.0	4.1	28.8	18.0	5.2	t
674A	<i>Phormidium corium</i>	RPS	0	23.6	0	27.4	23.9	11.7	13.4	40.7	nd
		CPS	11.2	14.7	0	5.9	5.5	44.7	17.9	2.5	t
442D	<i>Phormidium corium</i>	RPS	3.9	22.1	12.7	15.3	5.9	11.6	28.5	11.1	0.7
		CPS	3.7	25.7	12.6	13.2	4.4	16.6	23.8	10.8	t
444A	<i>Phormidium corium</i>	RPS	3.8	10.4	6.3	14.3	12.9	28.3	24.1	14.6	t
		CPS	14.5	18.2	6.1	4.5	3.6	33.2	19.9	15.1	t
746B	<i>Phormidium corium</i>	RPS	4.1	18.0	4.2	12.6	15.0	14.3	31.8	17.5	t
		CPS	24.1	7.7	9.7	6.8	2.9	28.6	20.1	12.9	t
7712E	<i>Phormidium cf. usteri</i>	RPS	2.6	3.9	12.5	7.4	16.6	31.2	25.8	15.4	t
		CPS	4.6	11.4	3.2	9.6	12.3	28.6	30.3	10.7	t
672B	<i>Phormidium ambiguum</i>	RPS	6.7	23.7	10.5	15.9	6.1	18.0	19.0	13.9	t
		CPS	4.5	21.5	8.9	16.5	8.3	17.6	22.6	14.0	t
671B	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	RPS	0	21.6	0	15.7	20.5	18.5	23.6	6.4	nd
		CPS	1.6	10.7	3.3	5.0	15.6	15.0	48.9	8.5	t
679B	<i>Leptolyngbya tenuis</i>	RPS	0	19.0	6.4	6.1	17.8	17.1	33.7	12.4	t
		CPS	3.2	17.7	4.3	10.9	18.4	23.0	22.4	14.8	t
745A	<i>Calothrix pulvinata</i>	RPS	7.1	14.6	8.2	15.9	9.7	16.6	28.0	11.3	t
		CPS	10.2	9.3	6.5	12.5	15.0	14.1	32.3	19.4	0.2
7713E	<i>Calothrix pulvinata</i>	RPS	5.5	15.9	14.6	12.7	13.9	13.5	23.8	11.9	t
		CPS	9.4	23.3	6.5	11.5	15.9	4.2	29.1	29.2	t



Table 4. Monosaccharide composition (% mol.), uronic acids (UA) content (% wt.) and sulphation rate (% wt.) of algae RPS and CPS extracts (t = traces; nd = not determined).

Strains	Taxon	Extract	Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	UA	Sulphation
			(% mol.)							(% wt.)	
749B	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	RPS	7.8	20.9	12.4	8.9	37.8	7.4	4.8	9.3	0
		CPS	3.8	12.5	13.4	8.8	25.9	8.3	27.2	11.8	t
446C	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	RPS	2.2	49.3	3.9	8.2	31.5	3.4	1.5	15.0	0.3
		CPS	4.3	31.9	10.1	9.3	27.1	10.4	7.1	8.7	7.6
748A	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	RPS	17.0	13.0	24.3	14.6	28.2	1.9	1.0	22.1	2.1
		CPS	10.2	13.4	15.5	11.4	25.3	9.7	14.4	18.1	t
772B	<i>Stichococcus bacillaris</i>	RPS	7.1	37.8	1.0	19.2	12.0	17.3	5.6	14.6	t
		CPS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22.4	t
774E	<i>Stichococcus bacillaris</i>	RPS	10.4	27.4	5.4	7.2	16.1	22.0	11.5	12.0	t
		CPS	6.4	35.6	2.8	10.4	8.2	19.4	17.1	9.4	t
747C	<i>Stichococcus bacillaris</i>	RPS	9.7	32.2	2.6	15.1	14.4	19.8	6.2	20.0	t
		CPS	7.5	18.2	3.7	11.5	21.4	11.1	26.5	13.7	t
677A	<i>Stichococcus bacillaris</i>	RPS	8.4	33.2	2.0	20.6	11.1	20.7	4.0	11.6	t
		CPS	3.3	17.4	7.9	12.7	16.8	15.3	26.5	40.3	1.6
678F	<i>Chlorella cf. mirabilis</i>	RPS	19.1	15.5	7.0	15.1	10.6	27.8	4.9	13.6	2.3
		CPS	13.9	31.6	2.6	11.9	15.2	14.2	10.7	14.1	t
7410G	<i>Chlorella cf. mirabilis</i>	RPS	3.3	4.5	18.2	4.0	6.2	49.2	14.5	14.7	t
		CPS	2.8	8.8	4.7	4.6	5.2	62.9	3.0	14.1	t
776A	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	RPS	7.1	2.0	7.1	4.1	14.3	53.9	11.5	14.1	t
		CPS	8.5	10.2	4.5	12.3	20.2	32.4	11.9	9.2	t
679E	<i>Bracteacoccus sp.</i>	RPS	4.7	18.2	8.8	14.6	15.6	18.6	19.5	11.0	6.9
		CPS	8.0	23.0	5.2	9.8	19.6	18.1	16.4	10.3	t
7713G	<i>Geminella terricola</i>	RPS	11.2	15.6	9.9	14.0	36.3	6.6	6.4	8.8	3.4
		CPS	10.4	16.9	15.0	17.2	14.3	19.4	7.0	11.7	t

Table 5. Significant correlation coefficients between CPS and RPS compositions evaluated for strains of cyanobacteria and algae ( $r$ : Pearson correlation coefficient).

	Strains	Taxon	$r$	Significance level
Cyanobacteria	442D	<i>Phormidium corium</i>	0.94	0.001
	7712E	<i>Phormidium cf. usteri</i>	0.77	0.012
	672B	<i>Phormidium ambiguum</i>	0.94	0.001
	671B	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	0.70	0.027
	679B	<i>Leptolyngbya tenuis</i>	0.90	0.001
	745A	<i>Calothrix pulvinata</i>	0.76	0.015
Algae	446C	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	0.93	0.001
	774E	<i>Stichococcus bacillaris</i>	0.85	0.004
	7410G	<i>Chlorella cf. mirabilis</i>	0.86	0.003
	776A	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	0.82	0.007
	679E	<i>Bracteacoccus</i> sp.	0.80	0.009

### ***Polymers physico-chemical characterization***

Every extracted CPS showed an anionic character, *Phormidium* strain 672B, *Leptolyngbya* strain 671B, *Klebsormidium* strains 446C and 748A and *Geminella* strain 7713G presenting the highest anionic natures (Table 6). Moreover, surface tension of most of CPS extracts was quite similar to deionised water surface tension, thus indicating a rather hydrophilic nature of the polymers. An exception was noted for *Phormidium* strains 674A, 442D and 444A, *Leptolyngbya* strain 679B, *Klebsormidium* strain 749B and *Stichococcus* strain 772B, which presented a higher hydrophobic character (Table 6).

### ***Adsorption evaluation***

The water contact angle measurements (Table 7) showed that the SiO<sub>2</sub> wafers were hydrophilic, whereas the wafers modified with HMDZ presented a more hydrophobic surface. The  $dn/dC$  value of the CPS 749B was equal to 0.11, which corresponded to an  $A_S$  value of 0.01903 m<sup>2</sup> mg<sup>-1</sup>. As assayed by reflectometry, the amount of CPS 749B adsorbed on hydrophobic wafers was more important than on hydrophilic wafers (Figure 2). Moreover, the imposition of deionised water then desorbed 24 % of polymers on hydrophilic wafers and only 14 % on hydrophobic ones, showing a higher adsorption strength on hydrophobic surfaces (Table 7).

Table 6. Zeta potential  $\zeta$  (mV) and surface tension  $\gamma$  (mJ m<sup>-2</sup>) values of CPS extracted from cyanobacteria and algae.

Strains	Taxon	$\zeta$ (mV)	$\gamma$ (mJ m <sup>-2</sup> )
743D	<i>Phormidium corium</i>	-10.3 ± 1.4	57.8 ± 1.2
674A	<i>Phormidium corium</i>	-14.7 ± 0.5	50.7 ± 3.0
442D	<i>Phormidium corium</i>	-23.0 ± 1.6	52.4 ± 0.4
444A	<i>Phormidium corium</i>	-11.7 ± 2.1	49.6 ± 1.9
746B	<i>Phormidium corium</i>	-6.4 ± 0.9	57.2 ± 1.6
Cyanobacteria 7712E	<i>Phormidium cf. usteri</i>	-13.1 ± 1.1	60.7 ± 1.3
672B	<i>Phormidium ambiguum</i>	-34.5 ± 2.7	61.3 ± 0.1
671B	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	-29.9 ± 2.3	66.9 ± 0.8
679B	<i>Leptolyngbya tenuis</i>	-18.2 ± 1.9	44.9 ± 0.8
745A	<i>Calothrix pulvinata</i>	-14.3 ± 1.3	54.0 ± 2.2
7713E	<i>Calothrix pulvinata</i>	-17.5 ± 1.6	66.0 ± 1.2
749B	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	-25.2 ± 2.2	45.4 ± 0.6
446C	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	-35.7 ± 0.7	68.7 ± 0.9
748A	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	-32.6 ± 1.6	66.3 ± 0.2
772B	<i>Stichococcus bacillaris</i>	-12.2 ± 0.8	52.4 ± 0.7
774E	<i>Stichococcus bacillaris</i>	-21.4 ± 1.2	65.6 ± 2.8
Algae 747C	<i>Stichococcus bacillaris</i>	-21.9 ± 2.4	70.7 ± 0.6
677A	<i>Stichococcus bacillaris</i>	-14.9 ± 2.3	66.1 ± 1.1
678F	<i>Chlorella minutissima</i>	-19.4 ± 1.6	65.3 ± 0.8
7410G	<i>Chlorella cf. mirabilis</i>	-11.3 ± 2.5	64.6 ± 1.8
776A	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	-23.1 ± 2.0	66.6 ± 0.1
679E	<i>Bracteacoccus</i> sp.	-13.8 ± 1.1	68.2 ± 0.4
7713G	<i>Geminella terricola</i>	-29.3 ± 1.4	67.9 ± 0.6

Table 7. Water contact angle values  $\theta_w$  (°) of silica wafers, amount of CPS 749B adsorbed on silica wafers after 8 min,  $\Gamma$  adsorbed (mg m<sup>-2</sup>), and amount of CPS 749B desorbed under water flux,  $\Gamma$  desorbed (mg m<sup>-2</sup>).

		$\theta_w$ (°)	$\Gamma$ adsorbed (mg m <sup>-2</sup> )	$\Gamma$ desorbed (mg m <sup>-2</sup> )
Silica wafer	SiO <sub>2</sub>	0	0.89 ± 0.05	0.21 ± 0.05
	HMDZ	64.8 ± 2.7	1.35 ± 0.03	0.19 ± 0.08

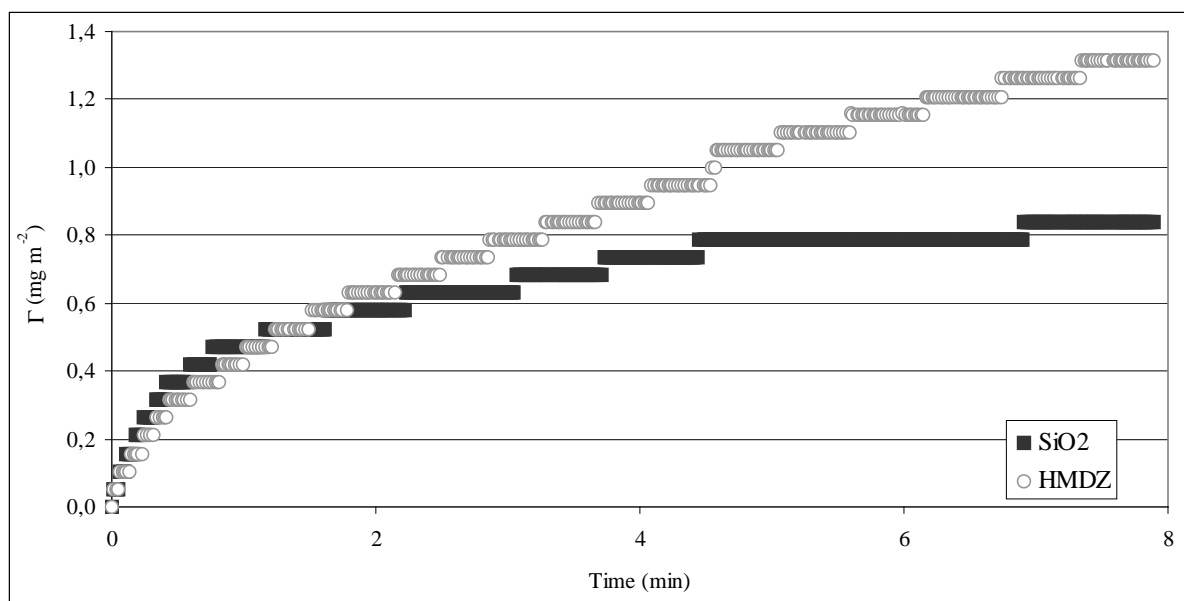


Figure 2. Adsorption kinetic of the CPS 749B to surface modified silica wafers, assayed by reflectometry;  $\Gamma$ (mg m<sup>-2</sup>) represents the amount of polymer adsorbed on the wafers.

## Discussion

### *Limitations of the biofilm studies*

Although we would have preferably conducted our studies of CPS contribution to the colonisation of solid surfaces in air, in their natural state, this work was derived from studies of liquid cultures in laboratory due to the fact that only limited samples were available from façades and these were composed of mixed species, which would complicate the interpretation. Thus, a limitation of our study may derive from the fact that cells attached on building coatings could have different activities as compared to cultured cells (Christensen 1989). Indeed, Neu & Marshall (1990) indicated that polymers synthesized as a response to an interface might be different to those found permanently associated with cell surfaces and might possess the properties that allow the cells to adhere irreversibly to a surface. However, since adhesion to the glass walls of the culture vessels was observed for most of the strains investigated, we assume that the adhesion mechanism of those strains was active under laboratory culture conditions. On the other hand, Morvan et al. (1997) and Vebret (1999) observed that oligosaccharides extracted from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* developing *in vitro* and *in vivo* had the same composition. Thus, we assumed, for our protocols, that studying polymers extracted from liquid cultures and not from the original biofilm was a valid approach for a baseline study. Lastly, strains subcultured in rich media may lose their physiological protections against environmental challenges, which may lead to low secretions of CPS as was observed on SEM and TEM images.

### *CPS and RPS characterization*

The monosaccharides detected in our extracts were also commonly identified as constituents of algal exopolymers (Gloaguen et al. 1995, De Philippis et al. 2001), and more especially amongst edaphic and epilithic algae (Lewin 1956, Flaibani et al. 1989, Bellezza et al. 2003,

Hokputsa et al. 2003, Hu et al. 2003). Moreover, the RPS and CPS exhibited the same monosaccharide composition for most of the strains and there was a significant correlation between RPS and CPS compositions for some of the extracts, which tend to validate the hypothesis that CPS dissolve to form RPS (Vincenzini et al. 1990, Gloaguen et al. 1995, Bellezza et al. 2003). Smestad, Paulsen & Vieira (1994) postulated the theory that at a certain stage in the growth of the desmid *Spondylosium panduriforme*, the solubilization and release of CPS in the medium was facilitated by the addition of glucuronic acids to the polymer. Such a tendency was not verified in CPS investigated here, as the amount of uronic acids was not systematically more important in RPS. In addition, RPS release might be an indication of micro-organisms metabolic activity, since Lewin (1956) showed that the production of polysaccharides of *Chlamydomonas parvula* was concomitant with growth. This could, explain the high yield extracted from cultures harvested during the stationary growth phase. The yield of extracted polysaccharides are known to depend on both culture age (Gloaguen et al. 1995) and culture conditions (De Philippis & Vincenzini 1998, De Philippis et al. 2005), even though Vincenzini et al. (1993) found that *Cyanospira capsulata* RPS composition and rheological properties were not affected by culture conditions.

The decrease in water surface tension by adding CPS pointed out the possibility for hydrophobic interactions due to methyl groups of rhamnose and fucose, as already observed by Christensen (1989). The same author found that the adhesion of a marine *Pseudomonas* species was associated with the elaboration of an hydrophobic polysaccharide (Christensen et al. 1985, Flaibani et al. 1989). Moreover, CPS extracts contained negatively charged monosaccharides such as uronic acids and sulphate groups, but they might also be composed of other charged entities such as amino sugars or proteins, which were not investigated here. Neutral and negative charges might thus be distributed over the whole molecule and the CPS regarded as polyelectrolytes, as bacterial polysaccharides (Neu & Marshall 1990). When dissolved in water, CPS might have rearranged to adopt the conformation that exposed negative charges to the solvent and masked neutral entities, thus showing rather anionic and hydrophilic properties. Neu & Marshall (1990) stated that if those polyelectrolyte polymers were responsible for adhesion, the ionic strength of the solution would be of influence, as counterions could alter the degree of hydrophobicity / hydrophilicity of the polymers. Thus, the CPS physical characterizations were carried out in deionised water, the ionic strength of this solvent being quite representative of the ionic strength of rain, when it streams on façade coatings and hydrates algae and cyanobacteria.

### *Adsorption of CPS*

The CPS of *Klebsormidium flaccidum* (strain 749B) showed a higher adsorption on hydrophobic surfaces than on hydrophilic ones. This was in accordance with previous studies on bacterial polymers (Christensen 1989). Adhesive properties of polymers usually depend on their conformational state, as they rearrange to minimise unfavourable interactions. Thus, after Christensen (1989), differences in adhesion strength can be observed whether the polymers are either in solution or linked to micro-organisms cells, as the entropy is reduced when polymer movements are restricted, thus favouring adsorption. However, the trend of adsorption of CPS extracted from strain 749B was in accordance with the trend of adhesion of the whole algae, as the strain 749B also showed higher adhesion on hydrophobic surfaces than on hydrophilic ones (Barberousse et al. submitted). Lastly, the polymers could also adsorb on hydrophilic surfaces due to their complex composition, showing the ability to favour contact on a variety of surfaces.

## Concluding remarks

The characterization of exopolymers secreted by algae and cyanobacteria colonising building façades opens new perspectives in order to control these micro-organisms. For example, the chemical composition of polysaccharides allows investigations of enzymatic degradation pathways of the matrix, able to affect the development of biofilms on façades. Moreover, we found that the extracted polymers adsorbed in higher amount on hydrophobic surfaces, which might have been favoured by interactions of hydrophobic entities with the surface. Experiments with algae showed that their adhesion was also greater on hydrophobic surfaces (Barberousse et al. submitted). Therefore, CPS might intervene in the initial contact of micro-organisms to the surface, as polymers were permanently associated with the cells. The CPS might also consolidate the biofilm cohesiveness, as their adsorption over time. Thus, in order to delay the colonisation of building façades by micro-organisms, it would be interesting to investigate coatings properties that could minimise adsorption interactions of specific polysaccharides.

## Acknowledgements

This study was funded by Rhodia PPMC, Hexion Specialty Chemicals and by grant No. 294/2003 from ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique). The authors would like to thank Dr. T. Coradin and Dr. M. Turmine (Université Paris VI) for, respectively, zetameter and tensiometer accessibility, and Dr. V. Geoffroy (Rhodia) for her help in reflectometry analysis.

## Bibliography

- Akashi T, Homma M, Kanbe T and Tanaka K. 1993. Ultrastructure of proteinase-secreting cells of *Candida albicans* studied by alkaline bismuth staining and immunocytochemistry. *Journal of General Microbiology* 139(9): 2185-2195.
- An YH, Dickinson RB and Doyle RJ. 2000. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. In: An YH & Friedman RJ, editors. *Handbook of bacterial adhesion - principles, methods and applications*. Totowa, New Jersey : Humana Press. pp. 1-28.
- Barberousse H, Tell G, Yéprémian C and Couté A. 2006a. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France. *Algological Studies* 120: 83-110.
- Barberousse H, Lombardo RJ, Tell G and Couté A. 2006b. Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. *Biofouling* 22(2): 69-77.
- Barberousse H, Brayner R, Botelho do Rego AM, Castaing J-C, Beurdeley-Saudou P and Colombet J-F. Submitted. Adhesion of façade colonisers, as mediated by physicochemical properties. *Biofouling*.
- Bellezza S, Paradossi G, De Philippis R and Albertano P. 2003. *Leptolyngbya* strains from Roman hypogea: cytochemical and physico-chemical characterisation of exopolysaccharides. *Journal of Applied Phycology* 15: 193-200.
- Bertocchi C, Navarini L, Cesaro A and Anastasio M. 1990. Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbohydrate Polymers* 12(2): 127-153.
- Blumenkrantz N and Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54: 484-489.

- Bold HC. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bulletin of the Torrey Botanical Club 76(2): 101-108.
- Burton PR, Stueckemann J and Paretsky D. 1975. Electron microscopy studies of the limiting layers of the rickettsia *Coxiella burneti*. Journal of Bacteriology 122(1): 316-324.
- Callow JA, Osborne MP, Callow ME, Baker F and Donald AM. 2003. Use of environmental scanning electron microscopy to image the spore adhesive of the marine alga *Enteromorpha* in its natural hydrated state. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 27: 315-321.
- Chopin T, Kerin BF and Mazerolle R. 1999. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: a review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. Phycological Research 47: 167-188.
- Christensen BE, Kjosbakken J and Smidsrod O. 1985. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. Applied and Environmental Microbiology 50(4): 837-845.
- Christensen BE. 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. Journal of Biotechnology 10(3-4): 181-202.
- De Philippis R and Vincenzini M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. FEMS Microbiology Reviews 22: 15-175.
- De Philippis R, Sili C, Paperi R and Vincenzini M. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. Journal of Applied Phycology 13: 293-299.
- De Philippis R, Faraloni C, Sili C and Vincenzini M. 2005. Populations of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago). Science of The Total Environment 353(1-3): 360-368.
- Dijt JC, Cohen Stuart MA, Hofman JE and Fleer GJ. 1990. Kinetics of polymer adsorption in stagnation point flow. Colloids and Surfaces 51: 141-158.
- Dijt JC, Cohen Stuart MA and Fleer GJ. 1994. Reflectometry as a tool for adsorption studies. Advances in Colloid and Interface Sciences 50: 79-101.
- Dodgson KS and Price RG. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochemical Journal 84: 106-110.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.
- Fassel TA and Edmiston CE Jr. 1999. Bacterial biofilms: strategies for preparing glycocalyx for electron microscopy. Methods in enzymology 310: 194-203.
- Flaibani A, Olsen Y and Painter TJ. 1989. Polysaccharides in desert reclamation: Compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. Carbohydrate Research 190(2): 235-248.
- Gloaguen V, Morvan H and Hoffmann L. 1995. Released and capsular polysaccharides of Oscillatoriaceae (Cyanophyceae, Cyanobacteria). Algological Studies 78: 53-69.
- Hokputsa S, Hu C, Paulsen BS and Harding SE. 2003. A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae. Carbohydrate Polymers 54: 27-32.
- Hu C, Liu Y, Paulsen BS, Petersen D and Klaveness D. 2003. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. Carbohydrate Polymers 54: 33-42.
- Lewin RA. 1956. Extracellular polysaccharides of green algae. Canadian Journal of Microbiology 2: 665-672.

- Lind JL, Heimann K, van Bliet C, Hoogenraad NJ and Wetherbee R. 1997. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta* 203: 213-221.
- Montreuil J and Spik G .1963. Méthodes colorimétriques des glucides totaux - Microdosage des glucides. In Monographie N°1. Lille. pp. 1-131.
- Morton LHG and Surman SB. 1994. Biofilms in biodeterioration - a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 203-221.
- Morvan H, Gloaguen V, Vebret L, Joset F and Hoffmann L. 1997. Structure-function investigations on capsular polymers as a necessary step for new biotechnological applications: the case of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 35(9): 671-683.
- Neu TR and Marshall KC. 1990. Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *Journal of Biomaterials Applications* 5: 107-133.
- Nicolaus B, Panico A, Lama L, Romano I, Manca MC, De Giulio A and Gambacorta A. 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 52: 639-647.
- Ortega-Calvo JJ, Hernandez-Marine M and Saiz-Jimenez C. 1991. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International Biodeterioration* 28: 165-185.
- Purevdorj-Gage LB and Stoodley P. 2004. Biofilm structure, behaviour and hydrodynamics. In: O'Toole MGA, Editor. *Microbial biofilms*. Washington: ASM Press. pp. 160-173.
- Robins RJ, Hall DO, Shi D-J, Turner RJ and Rhodes MJC. 1986. Mucilage acts to adhere cyanobacteria and cultures plant cells to biological and inert surfaces. *FEMS Microbiology Letters* 34: 155-160.
- Roques-Carnes T, Membrey F, Filiatre C and Foissy A. 2002. Potentiality of reflectometry for the study of the adsorption on dielectric and metal substrates: application to the adsorption of polyvinylimidazole on silica and gold. *Journal of Colloid and Interface Science* 245(2): 257-266.
- Sand W. 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates - a general mechanistic overview. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40(2-4): 183-190.
- Smestad Paulsen B and Vieira AAH. 1994. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 30: 638-641.
- Tsuneda S, Aikawa H, Hayashi H, Yuasa A and Hirata A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* 223(2): 287-292.
- Vebret L. 1999. Production *in vitro* de polymères extracellulaires par la cyanobactérie thermophile *Mastigocladus laminosus*. PhD Thesis, University of Limoges, 181 p.
- Vincenzini M, De Philippis R, Sili C and Materassi R. 1990. Studies on exopolysaccharide release by diazotrophic batch cultures of *Cyanospira capsulata*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34: 392-396.
- Vincenzini M, De Philippis R, Sili C and Materassi R. 1993. Stability of molecular and rheological properties of the exopolysaccharide produced by *Cyanospira capsulata* cultivated under different growth conditions. *Journal of Applied Phycology* 5: 539-541.
- Welton RG, Cuthbert SJ, McLean R, Hursthouse A and Hughes J. 2003. A preliminary study of the phycological degradation of natural stone masonry. *Environmental Geochemistry and Health* 25: 139-145.



## V.2. Synthèse et commentaires de l'article 5

### *Incertitudes liées à l'étude de polymères sécrétés en culture*

Selon CHRISTENSEN (1989), des micro-organismes fixés n'ont pas la même activité métabolique que des micro-organismes cultivés en milieu liquide. Par ailleurs, des micro-organismes se développant dans un milieu favorable peuvent évoluer physiologiquement. Lors de l'établissement du protocole d'extraction, des incertitudes ont donc émanées quant au fait que des CPS sécrétés par une algue adhérant sur un revêtement de façade n'aient peut-être pas la même nature que des CPS extraits de cultures de cette algue. Cependant, GLOAGUEN (communication personnelle) ayant déjà observé que des oligosaccharides extraits de cyanobactéries développées *in vitro* et *in vivo* avaient la même composition, il a été décidé d'effectuer les extractions à partir de cultures en milieu liquide. Il est en outre difficile d'étudier les polymères sécrétés au sein de biofilms dans leur agencement naturel. En effet, de trop faibles quantités de polymères pourraient en être extraites pour permettre leur analyse. Par ailleurs, ces biofilms sont généralement constitués d'une communauté de micro-organismes qui sécrètent des métabolites variés, d'où la difficulté d'étudier précisément les polymères des souches nous intéressant. Finalement, il a été observé que pour la plupart des cultures extraites, une partie des micro-organismes adhérait aux parois en verre, confortant l'idée que les polymères ainsi étudiés pourraient être de même nature que les polymères observés chez des algues colonisant des revêtements de façade.

### *Choix du milieu d'étude des CPS*

Le choix du milieu d'étude des CPS a ici aussi son importance. En effet, ces polymères étant chargés, la force ionique de la solution va avoir un effet sur l'éventuelle fixation de contre-ions, induisant des variations dans les mesures de zétamétrie et de tensiométrie. Les polymères ont donc également été étudiés dans de l'eau désionisée, milieu de force ionique proche de celle de l'eau de pluie, qui est également le milieu d'étude de l'adhésion d'algues en cellule à flux laminaire.

### *Considérations à propos des polymères extraits*

Les CPS et RPS extraits sont principalement d'origine polysaccharidique, comme indiqué dans de précédents travaux sur des souches d'algues et de cyanobactéries (Lewin 1956, Kaplan et al. 1987, Panoff et al. 1988, Flaibani et al. 1989, Martin et al. 1989, Bertocchi et al. 1990, Vincenzini et al. 1990, 1993, Smestad Paulsen & Vieira 1994, Gloaguen et al. 1995,

Forni et al. 1997, Morvan et al. 1997, De Philippis & Vincenzini 1998, Garozzo et al. 1998, Nicolaus et al. 1999, Brüll et al. 2000, Geresh et al. 2002, Hokputsa et al. 2003, Hu et al. 2003, Metaxatos et al. 2003, Bellezza et al. 2003, 2005). Plusieurs hypothèses peuvent être émises suite à la caractérisation des polymères extraits. Tout d'abord, il semble que les CPS se dissolvent pour former des RPS. La quantité de RPS produite, dérivant ainsi de la sécrétion de CPS, serait donc un témoin de l'activité métabolique des micro-organismes. Ainsi, le fait que l'adhésion des algues soit plus importante quand les souches sont jeunes, pourrait être lié à un métabolisme actif des souches et à une plus grande sécrétion de polymères. Par ailleurs, les CPS sont plus ou moins hydrophobes et anioniques, en fonction des souches. La présence de tels polymères associés à la paroi cellulaire pourrait donc favoriser des interactions hydrophobes et ioniques (donc électrostatiques) avec des surfaces de même nature. Ces hypothèses sont corroborées par l'expérience de réflectométrie qui a montré que le polymère CPS 749B adsorbait plus fortement et en plus grande quantité sur la surface hydrophobe. Par ailleurs, cette adsorption a été progressive au cours des 8 min qu'ont duré les expériences, ce qui montre bien que l'adhésion de la souche 749B observée en cellule à flux laminaire après 10 min de contact avec les surfaces modèles pourrait être consolidée par l'intervention des polymères dans le processus d'adhésion.

### **V.3. Dégradation enzymatique des polymères**

Afin d'évaluer le rôle joué par les polymères associés aux parois cellulaires dans l'adhésion, des essais de dégradation enzymatique\* de ces polymères ont été menés sur des cultures de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B. L'adhésion des souches d'algues, au CPS dégradé ou non, a ensuite été évaluée sur des surfaces modèles.

#### **V.3.1. Protocole**

En se basant sur notre connaissance de la composition monosaccharidique du CPS 749B (Tableau 3 de l'article 5), une sélection d'enzymes a été testée à deux gammes de concentrations (Tableau 6).

Tableau 6. Sélection d'enzymes et concentrations C1 et C2 (U mL<sup>-1</sup>) auxquelles elles ont été utilisées (hespéridinase :  $\alpha$ -L-rhamnosidase +  $\beta$ -D-glucosidase; laminarinase :  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-endoglucanase).

		Concentrations (U mL <sup>-1</sup> )	
		C1	C2
Enzyme	$\alpha$ -mannosidase	0,129	6,45
	$\beta$ -mannosidase	0,016	0,8
	$\alpha$ -L-fucosidase	0,015	0,15
	$\alpha$ -glucosidase	0,462	41,6
	$\beta$ -glucosidase	0,106	9,5
	hespéridinase	0,00015	0,014
	laminarinase	0,00178	0,16

Les solutions enzymatiques ont été préparées dans de l'eau désionisée et ajoutées séparément à des cultures de la souche 749B dans du milieu Bold de base. Un témoin a été réalisé en ajoutant un volume d'eau désionisée équivalant au volume de solution enzymatique ajouté aux autres cultures. Les cultures, en phase exponentielle de croissance, ont été incubées pendant trois jours dans une cellule climatisée à  $20,0 \pm 0,5$  °C et soumise à une intensité lumineuse de  $15 \pm 3$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF selon la photopériode 16 h/8 h éclairage/obscurité. Les algues ont ensuite été observées au MEB afin de sélectionner les cultures ayant subi une dégradation enzymatique des CPS. La quantité de sucres libérés en solution a été dosée dans le surnageant de la culture sélectionnée selon les méthodes de DUBOIS et al. (1956) et BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973). L'adhésion des algues a finalement été évaluée sur du verre non traité ou traité au HMDZ, en utilisant la cellule à flux laminaire décrite dans l'article 4.

### V.3.2. Résultats

#### *Observations des algues*

Des images prises au MEB montrent que les CPS n'ont pas été dégradés par voie enzymatique dans la plupart des cultures (Figure 26). Des filaments collapsés ont par ailleurs été observés (images F, G, L et M) chez les cultures incubées en présence de  $\alpha$ -L-fucosidase et hespéridinase, signe d'une dégradation de la souche. Seule la  $\beta$ -glucosidase à  $9,5 \text{ U mL}^{-1}$  semble avoir dégradé une partie des CPS de la souche 749B. La culture ayant subi cette dégradation enzymatique a donc été sélectionnée pour les essais d'adhésion.

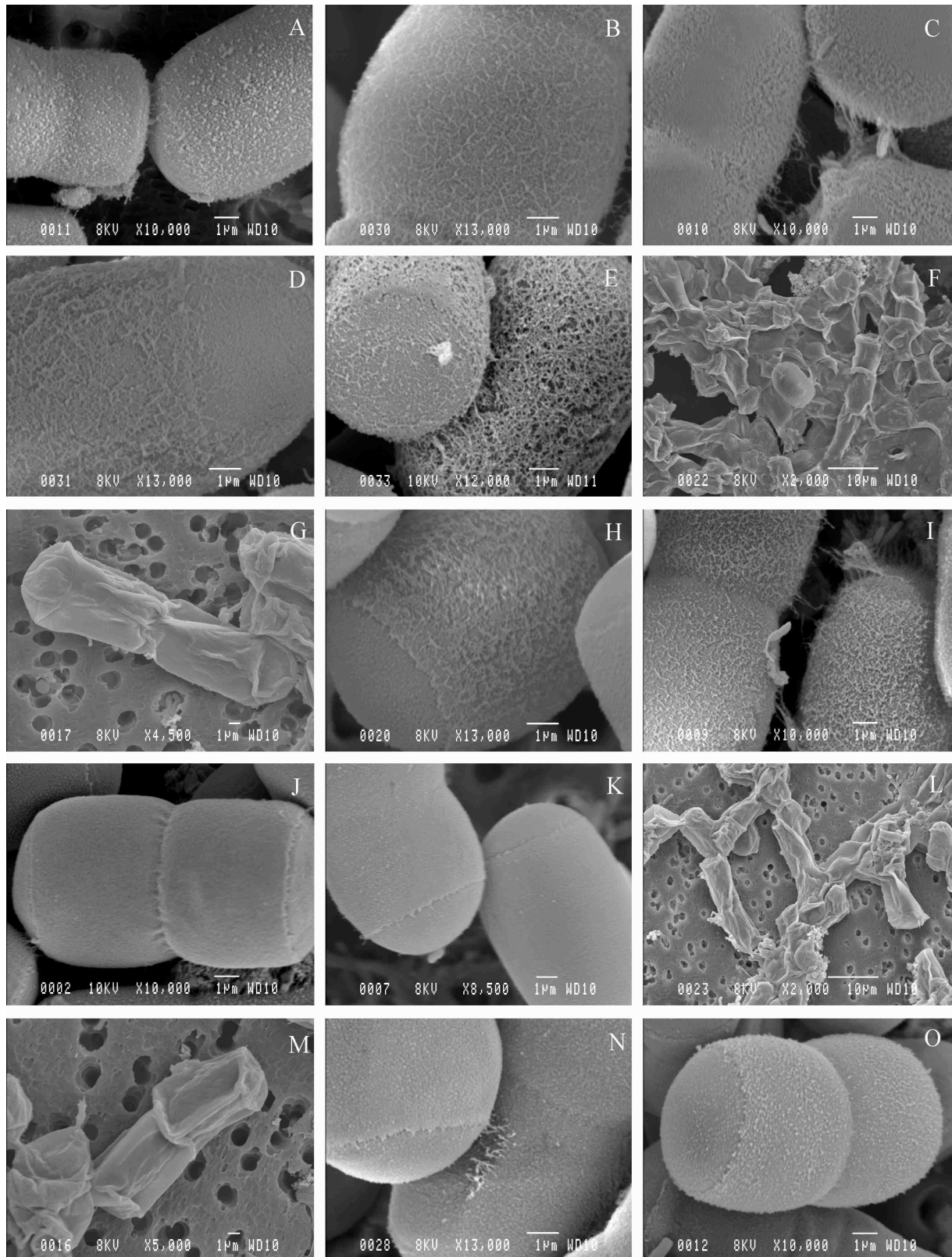


Figure 26. Images MEB des cultures de *Klebsormidium flaccidum* 749B incubées en présence d'enzymes. A : culture témoin; B et C :  $\alpha$ -mannosidase à C1 et C2, resp.; D et E :  $\beta$ -mannosidase à C1 et C2; F et G :  $\alpha$ -L-fucosidase à C1 et C2; H et I :  $\alpha$ -glucosidase à C1 et C2; J et K :  $\beta$ -glucosidase à C1 et C2; L et M : hespéridinase à C1 et C2; N et O : laminarinase à C1 et C2.

### ***Dosage des sucres libérés en solution***

La comparaison des concentrations de sucres libérés dans le milieu par une culture témoin de *Klebsormidium flaccidum* 749B et par la même souche incubée avec la  $\beta$ -glucosidase à  $9,5 \text{ U mL}^{-1}$  montre que les teneurs en acides uroniques sont similaires dans les deux cas, mais que la concentration d'oses neutres libérés est plus importante chez la culture incubée en présence de l'enzyme (Tableau 7). Il semblerait donc que les CPS aient été au moins partiellement dégradés, comme semblaient l'indiquer les images MEB.

Tableau 7. Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) des sucres libérés en solution chez une culture témoin de *Klebsormidium flaccidum* 749B et chez la même souche incubée en présence de  $\beta$ -glucosidase.

		Culture 749B	
		Témoin	+ $\beta$ -glucosidase
Concentration	Acides uroniques	8,6	7,7
	Oses neutres	37,3	48,5
	Sucres totaux	45,9	56,1

### ***Comparaison des adhésions***

Les pourcentages d'adhésion d'une culture témoin de *Klebsormidium flaccidum* 749B et de la même souche incubée en présence de  $\beta$ -glucosidase à  $9,5 \text{ U mL}^{-1}$  sont similaires sur surfaces traitées au HMDZ (Figure 27). Toutefois, une adhésion d'environ 30 % des algues témoins est observée sur le verre, alors que l'adhésion sur la même surface des algues incubées en présence de l'enzyme est nulle. Il semblerait donc qu'une dégradation des CPS de la souche 749B soit sans effet sur l'adhésion sur surface hydrophobe, mais qu'elle rende l'adhésion sur surface hydrophile nulle.

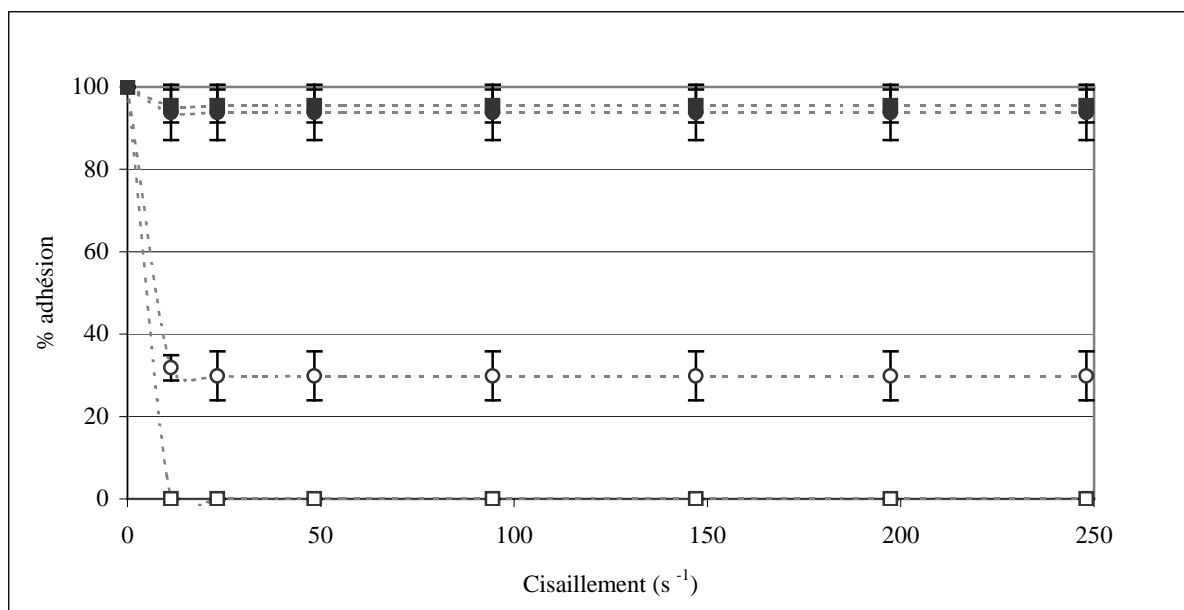


Figure 27. Comparaison de l'adhésion de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B, en culture témoin et en culture incubée en présence de  $\beta$ -glucosidase, après 10 min de contact sur deux surfaces modèles (○ : témoin sur verre; ● : témoin sur HMDZ; □ : enzyme sur verre; ■ : enzyme sur HMDZ).

### V.3.3. Synthèse et commentaires

#### *Choix de la voie de dégradation enzymatique*

Deux voies de dégradation des oligosaccharides sont communément utilisées, notamment en analyse structurale : la voie chimique et la voie enzymatique. La voie chimique a été écartée par crainte que les molécules, les solvants ou encore les conditions opératoires à appliquer n'altèrent le développement des algues. La voie enzymatique est également couramment utilisée afin de dégrader sélectivement des oligosaccharides (JACOB & SCUDDER, 1994). Par ailleurs, l'utilisation d'enzymes en vue de dégrader la matrice polymérique au sein même de biofilms est assez courante. Ainsi en milieu aqueux, des bactéries sont connues pour synthétiser des enzymes qui permettent de détacher une partie du biofilm lorsque l'accessibilité aux nutriments devient faible, afin de coloniser une surface vierge à l'accès aux nutriments plus aisée (BOYD & CHAKRABARTY 1994, LEE ET AL. 1996, SUTHERLAND 1995, 1999, OTT ET AL. 2001). C'est donc la voie enzymatique qui a été retenue pour tenter de dégrader les CPS de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B.

### ***Choix des enzymes***

Des difficultés se sont posées lors de la mise en place de cette expérience. En effet, la composition centésimale monosaccharidique du CPS 749B extrait était connue (Tableau 3 de l'article 5), mais pas l'agencement des oses entre eux. N'ayant pas connaissance d'informations telles que la structure des polymères, leur degré de polymérisation ou encore la nature des liaisons osidiques mises en jeu, il s'est avéré difficile de sélectionner les enzymes appropriées. En effet, les enzymes ont une activité catalytique spécifique d'un substrat et de sa conformation. La sélection d'enzymes a donc été effectuée en se basant uniquement sur les indications fournies par la caractérisation du CPS. Quand le choix a été possible, les enzymes ayant une activité endo-catalytique, c'est-à-dire ayant la capacité de dégrader un polymère en milieu de chaîne, ont été préférées aux enzymes à activité exo-catalytique, dégradant plutôt les polymères en extrémité de chaîne ou de ramification. Par ailleurs, les branchements de glucoses en  $\beta$ -1,3 étant les plus fréquemment rencontrés, le choix d'une  $\beta$ -1,3-glucosidase a été privilégié à celui d'une  $\beta$ -1,4-glucosidase. En outre, le fait que le CPS 749B soit soluble dans l'eau indique que les glucoses ne doivent pas être, ou peu, agencés selon un branchement  $\beta$ -1,4, plus spécifique d'un agencement cellulosique (William Helbert, station de biologie marine de Roscoff, communication personnelle).

### ***Choix des conditions de dégradation enzymatique***

Le choix du protocole a également été délicat. En effet, l'activité catalytique d'une enzyme est optimale à un pH et à une température donnés, ainsi que dans un milieu précis. Ces conditions d'activité varient pour chaque enzyme et sont généralement de l'ordre d'un pH  $\sim$  4-5 et de températures  $T \sim$  30-35 °C. Des souches d'algues incubées dans de telles conditions risqueraient de se dégrader. Il a donc été décidé de préparer les solutions enzymatiques dans de l'eau désionisée et de les ajouter immédiatement au milieu de culture classique de la souche 749B. Toutefois, en adoptant ce protocole, le risque de dénaturation des enzymes n'est pas négligeable.

Par ailleurs, l'efficacité de l'activité enzymatique dépendant de la facilité avec laquelle les enzymes sont mises en contact avec leur substrat, la concentration des enzymes nécessaire est donc liée à la concentration de substrat à dégrader. L'évaluation de la quantité d'enzymes nécessaire à la dégradation des CPS n'étant pas évidente, deux concentrations différant l'une de l'autre par un facteur de 50 ou 100 ont donc été testées pour chaque enzyme. Ces expériences ont également été réalisées dans le plus faible volume possible de culture d'algues.

### ***Interprétation des résultats***

Le fait que la plupart des enzymes n'aient apparemment pas dégradé les CPS de la souche 749B peut être interprété de multiples façons. Ainsi, il se pourrait que la spécificité des enzymes en question n'ait aucun lien avec la structure du polymère. Les conditions d'activité imposées aux enzymes, en terme de pH, de température et de milieu de culture pourraient ne pas être adaptées. Enfin, la concentration des enzymes ajoutées pourrait également être trop faible pour permettre une dégradation visible des CPS. Les conditions opératoires de cette expérience préliminaire auront donc à être ajustées en vue d'approfondir l'étude des capacités de dégradation de ces enzymes.

Il semblerait cependant que la  $\beta$ -glucosidase à la concentration de  $9,5 \text{ U mL}^{-1}$  permettrait la dégradation des CPS 749B, comme observé au MEB et confirmé par dosage des oligosaccharides libérés en solution. La souche au CPS dégradé a montré une incapacité d'adhésion sur surface hydrophile, alors que l'adhésion demeurait égale à celle d'une culture témoin sur surface hydrophobe. Ces observations pourraient signifier que l'adhésion des algues n'est vraiment pas favorable sur surface hydrophile, mais qu'elle est consolidée par l'adsorption des polymères. L'adhésion des algues serait à l'inverse plus favorable sur surface hydrophobe, si bien que la dégradation des polymères n'influerait pas sur la capacité des algues à adhérer sur une telle surface.

### **V.4. Conclusion du chapitre V**

- ➔ Les polymères extraits, de nature polysaccharidique, sont plus ou moins hydrophobes et anioniques en fonction des souches qui les sécrètent.
- ➔ Le CPS extrait de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B adsorbe plus fortement et en plus grande quantité sur surface hydrophobe que sur surface hydrophile.
- ➔ Une dégradation enzymatique des CPS de la souche 749B induit une absence d'adhésion sur surface hydrophile.
- ➔ Les polymères sécrétés par les algues et associés à leur paroi cellulaire semblent donc bien intervenir dans l'adhésion de ces micro-organismes à une surface.



---

## Synthèse générale et perspectives

---

Le bilan des résultats obtenus, en réponse aux questions posées au début de ces travaux, permet de proposer quelques voies de développement...

### *Quels sont les micro-organismes qui se développent en façade?*

Les micro-organismes qui constituent les biofilms étudiés sont principalement des algues et des cyanobactéries (article 1). 22 espèces d'algues vertes et 25 espèces de cyanobactéries, ou algues bleues-vertes, ont ainsi été identifiées parmi les 71 prélèvements effectués dans 18 départements français. Les algues apparaissent majoritaires dans ces biofilms. Il semble, par ailleurs, que ces organismes s'implantent avant les cyanobactéries et favorisent, par leur présence, l'établissement d'une communauté de micro-organismes divers. Les algues se sont donc avérées être des organismes cibles dans cette étude. Trois espèces d'algues modèles ont ainsi été sélectionnées en fonction de leur représentativité en façade : *Klebsormidium flaccidum*, *Stichococcus bacillaris* et *Chlorella cf. micrabilis*, identifiées respectivement dans 55 %, 46 % et 27 % des prélèvements.

### *Quels sont les facteurs qui influencent leur implantation?*

Les différentes voies d'étude explorées ont permis d'identifier les facteurs qui favorisent l'implantation d'algues et de cyanobactéries en façade :

- des **paramètres environnementaux**, tels que la proximité de végétation ou la disponibilité en eau (article 2),
- des **paramètres architecturaux**, favorisant la rémanence d'humidité (article 2),
- des **paramètres liés au revêtement**, tels que la rugosité, la porosité, un pH de surface neutre et une chimie de surface favorisant des interactions hydrophobes et électrostatiques entre les micro-organismes et le substrat (articles 3 et 4).

En revanche, des paramètres tels qu'une surface hydrophile ou un pH de surface alcalin défavorisent l'adhésion des algues et peuvent même inhiber leur implantation.

### ***Comment colonisent-ils le revêtement?***

Il a été montré que le processus d'adhésion des trois souches d'algues sélectionnées à des surfaces modèles est favorisé par l'initiation d'interactions hydrophobes et électrostatiques (article 4). L'adhésion semble en outre dépendre du métabolisme des micro-organismes puisqu'elle diminue lorsqu'une souche devient sénescence\* et elle augmente en relation avec le temps de contact de l'organisme à la surface. Les polysaccharides capsulaires sécrétés en permanence au niveau de la paroi cellulaire interviendraient dans cette étape d'adhésion, sans doute lors du contact initial avec la surface, puis lors de la consolidation de l'adhésion. Le polymère extrait de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B a en effet montré une plus forte adsorption sur surface hydrophobe que sur surface hydrophile (article 5). La dégradation enzymatique de ce même polymère a, en outre, induit une absence d'adhésion des algues sur surface hydrophile, ce qui montre que l'adhésion de cette souche à ce type de surface est grandement défavorisée.

### ***Quelles voies de recherche seraient à développer?***

Différentes voies de recherche ont donc été explorées pour tenter de mener à bien ce projet. Leur approfondissement permettrait cependant d'obtenir plus d'informations.

#### **↳ Les algues et les cyanobactéries colonisant les façades :**

Si, à l'avenir, d'autres prélèvements sont réalisés en France pour compléter les zones géographiques étudiées ou étoffer l'étude des organismes en relation avec le type de revêtement, d'autres espèces d'algues et de cyanobactéries seront sans doute identifiées. L'inventaire qui a été effectué n'est, en effet, sans doute pas exhaustif. L'utilisation d'outils phylogénétiques permettrait ainsi certainement une identification plus complète et plus fiable des colonisateurs de façade.

Par ailleurs, il serait intéressant d'isoler certaines souches afin d'étudier plus spécifiquement leur comportement. Différentes espèces de *Trebouxia* ont ainsi été observées dans la moitié des prélèvements : c'est donc une algue communément observée en façade et qu'il faut prendre en compte! L'espèce *Chlorosarcinopsis minor* a également été observée comme étant le colonisateur majoritaire des peintures en France. Bien que les peintures soient le revêtement résistant le mieux à l'implantation des micro-organismes étudiés, il aurait été utile de montrer quelles caractéristiques permettent à *C. minor* de coloniser tout particulièrement ce type de revêtement. Peut-être est-ce la structure de sa paroi cellulaire, composée de picots

micrométriques (Figure 28)? De même, l'algue *Trentepohlia iolithus*, identifiée uniquement sur des revêtements de type enduit, forme des salissures rouges caractéristiques, notamment le long des façades maritimes (Figure 28). Bien qu'il paraît indispensable d'étudier le mode de colonisation de cette algue, en vue de développer des revêtements spécifiques à ces régions, il est très difficile d'obtenir une culture viable et axénique\* de cette espèce. Citons également les cyanobactéries de type "chroococcal", abondantes dans les biofilms mais difficiles à isoler. La disponibilité de telles souches permettrait leur étude dans le banc d'essai par ruissellement d'eau. Un effort particulier et du temps, pourraient donc être consacrés à l'isolement et la culture de ces micro-organismes. Il faut à nouveau souligner l'importance d'étudier le comportement de souches qui soient isolées de revêtements de façades. En effet, quelques algothèques proposent des souches d'espèces qui seraient intéressantes dans cette étude. Cependant, la plupart ont été isolées de milieux aquatiques et ne présentent peut être donc pas les caractères épilithiques qui leur permettent de coloniser une façade.

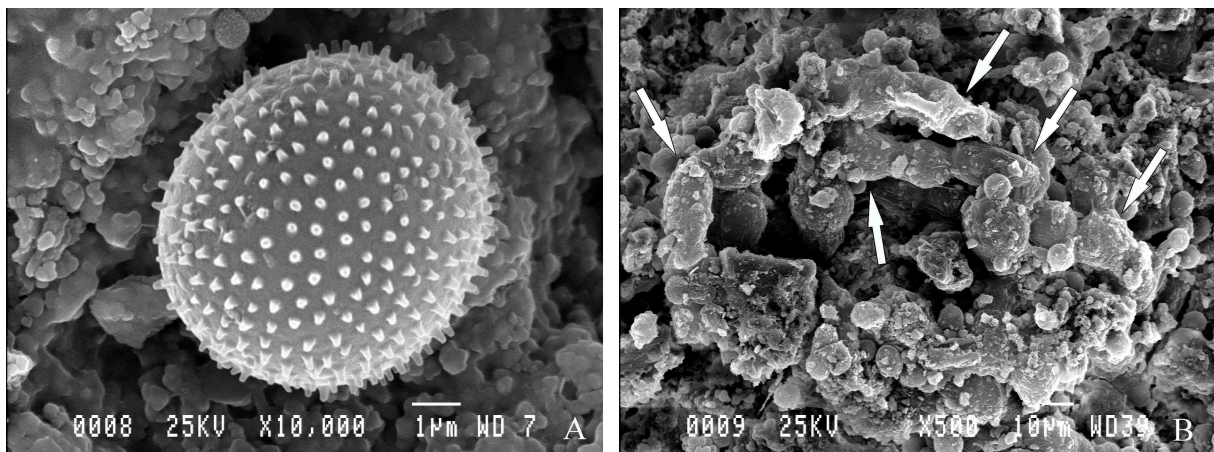


Figure 28. Clichés réalisés au MEB. A : cellule de *Chlorosarcinopsis minor* colonisant un film de peinture; B : filament de *Trentepohlia iolithus* incrusté dans un enduit monocouche (cellules difficilement visibles indiquées par des flèches).

Enfin, il serait intéressant de pouvoir évaluer la cinétique de colonisation d'un bâtiment sur lequel un revêtement vient juste d'être mis en œuvre. Des prélèvements à intervalles réguliers du biofilm se développant permettraient de valider les hypothèses émises concernant la succession des organismes colonisateurs.

#### ↳ Caractéristiques des revêtements :

Le banc d'essai par ruissellement d'eau est un outil particulièrement utile puisqu'il permet d'étudier simultanément, donc dans les mêmes conditions, la colonisation de différents

revêtements. À la suite de cette thèse, l'étude des caractéristiques des revêtements défavorisant l'implantation des algues et des cyanobactéries pourrait être affinée à l'aide de ce banc d'essai. Les études préliminaires ont déjà montré que rugosité, porosité et pH de surface influent sur l'implantation de ces micro-organismes. Puisque les essais d'adhésion ont montré que des surfaces modèles hydrophiles défavorisaient l'adhésion d'algues, pourquoi ne pas développer des matériaux qui présenteraient des groupements chimiques leur conférant une forte mouillabilité de surface ? Dans cette voie de recherche, on pourrait envisager le greffage de polymères hydrophiles. Le spectre d'action est large si l'on souhaite par exemple développer des formulations qui défavorisent des interactions de nature hydrophobe et/ou électrostatique entre les micro-organismes et le matériau. Il serait également intéressant d'évaluer quelle caractéristique du revêtement est la plus importante concernant l'implantation de micro-organismes : la rugosité, la porosité ou bien la chimie de surface ?

Enfin, le banc d'essai par ruissellement d'eau peut également être utilisé pour évaluer la résistance à la colonisation de matériaux disponibles sur le marché, tels que des revêtements hydrophobes ou encore des matériaux auto-nettoyants ou à "effet lotus".

↳ Adhésion d'algues sur des surfaces modèles :

Dans cette voie de recherche, les observations peuvent également être affinées. La fonctionnalisation de lames de verre par silanisation à l'aide d'autres molécules permettrait d'élargir le choix des surfaces à étudier. L'impact d'un film conditionnant sur l'adhésion des algues pourrait également être évalué. Le film formé pourrait ainsi modéliser des polluants déposés sur des revêtements, ou encore un biofilm préexistant sur le revêtement, afin d'observer si l'adhésion des micro-organismes est ainsi favorisée.

↳ Rôle des polymères capsulaires dans l'adhésion à une surface :

Si cette voie de recherche devait être exploitée, il faudrait étudier la variation de la composition et de la quantité des polymères sécrétés au cours des différentes phases de croissance des souches de micro-organismes, et ce en fonction de leur activité. Ainsi, la composition des polymères varie-t-elle en fonction du rôle qui leur est conféré, entre la nécessité d'adhérer à une surface (cas de jeunes organismes) puis de se protéger de l'environnement (jeunes organismes et organismes fixés se développant au sein d'une communauté de micro-organismes) ? De même, la quantité de polymères sécrétés a-t-elle un lien avec la nécessité d'adhérer à une surface ?

Par ailleurs, l'extraction en grande quantité de ce type de polymères permettrait la détermination de leur structure tridimensionnelle. Une meilleure connaissance de l'agencement des entités osidiques et de leur conformation pourrait peut-être permettre de faire le lien avec des capacités adhésives.

Il est également nécessaire de compléter les expériences d'adsorption de polymères sur des surfaces modèles à l'aide d'autres extraits, afin de pouvoir en dégager une tendance générale.

Par ailleurs, une fois connue la structure des polymères, le protocole de dégradation enzymatique pourrait être optimisé, afin de mieux étudier l'impact de la présence ou de l'absence de polymères capsulaires dans le processus d'adhésion à une surface. Si cette voie de recherche s'avère prometteuse, serait-il envisageable d'un point de vue économique de greffer des enzymes à la surface de revêtements afin de limiter l'adhésion de micro-organismes ?

Enfin, une autre voie de recherche serait d'identifier et de chercher à bloquer l'expression des gènes responsables de la synthèse des polymères capsulaires.

Pour conclure, ce travail apporte des connaissances sur l'identité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et sur les facteurs favorisant leur implantation. Comme dans beaucoup de projets de thèse, des interrogations nouvelles ont été soulevées au cours de ces travaux. Cependant, certaines voies de recherche intéressantes se dégagent afin de tenter de lutter contre le développement naturel des biofilms en façade.

---

## Références

---

- ADAMCZYK Z., SZYK L. & WARSZYNSKI, P.** 1999. Colloid particle adsorption in the slot impinging jet cell. *Journal of Colloid and Interface Science* 209: 350-361.
- ADAMCZYK Z. & VAN DE VEN T.G.M.** 1981. Deposition of particles under external forces in laminar flow through parallel-plate and cylindrical channels. *Journal of Colloid and Interface Science* 80: 340-356.
- AKASHI T., HOMMA M., KANBE T. & TANAKA K.** 1993. Ultrastructure of proteinase-secreting cells of *Candida albicans* studied by alkaline bismuth staining and immunocytochemistry. *Journal of General Microbiology* 139(9): 2185-2195.
- AN Y.H., DICKINSON R.B. & DOYLE R.J.** 2000. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. In *Handbook of bacterial adhesion - principles, methods and applications* (Y. H. An and R. J. Friedman, eds.), pp. 1-28. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- ANAGNOSTIDIS K., ECONOMOU-AMILI A. & ROUSSOMOUSTAKAKI M.** 1983. Epilithic and chasmolithic microflora (Cyanophyta, Bacillariophyta) from marbles of the Parthenon (Acropolis-Athens, Greece). *Nova Hedwigia* 38: 227-287.
- AUBERT H., BROOK A.J. & SHEPHARD K.L.** 1989. Measurement of the adhesion of a desmid to a substrate. *British Phycological Journal* 24: 293-295.
- AZEREDO J., VISSER J. & OLIVEIRA R.** 1999. Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14: 141-148.
- BAIER R.E.** 1980. Adsorption of micro-organisms to surfaces. Wiley-Interscience Publishers, New-York, pp. 59-104.
- BAKKER D.P., HUIJS F.M., DE VRIES J., KLIJNSTRA J.W., BUSSCHER H.J. & VAN DER MEI H.C.** 2003. Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32: 179-190.
- BAUMGARTNER J.N., YANG C.Z. & COOPER S.L.** 1997. Physical property analysis and bacterial adhesion on a series of phosphonated polyurethanes. *Biomaterials* 18: 831-837.
- BECKER K.** 1998. Detachment studies on microfouling in natural biofilms on substrata with different surface tensions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41: 93-100.
- BEGUIN D.** 1986. Étude pour la France du risque de mouillage par la pluie des parois verticales des constructions. Cahiers du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment, Paris.
- BELLEZZA S., PARADOSSI G., DE PHILIPPIS R. & ALBERTANO P.** 2003. *Leptolyngbya* strains from Roman hypogea: cytochemical and physico-chemical characterisation of exopolysaccharides. *Journal of Applied Phycology* 15: 193-200.
- BELLEZZA S., ALBERTANO P., DE PHILIPPIS R. & PARADOSSI, G.** 2005. Exopolysaccharides in cyanobacterial biofilms from Roman catacombs. *Algological Studies* 117: 117-132.

- BELLINZONI A.M., CANEVA G. & RICCI S.** 2003. Ecological trends in travertine colonisation by pioneer algae and plant communities. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51: 203-210.
- BELLON-FONTAINE M.-N., RAULT J. & VAN OSS C.J.** 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7: 47-53.
- BERGLIN M. & GATENHOLM P.** 2003. The barnacle adhesive plaque: morphological and chemical differences as a response to substrate properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28: 107-117.
- BERTOCCHI C., NAVARINI L., CESARO A. & ANASTASIO M.** 1990. Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbohydrate Polymers* 12: 127-153.
- BLUMENKRANTZ N. & ASBOE-HANSEN G.** 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54: 484-489.
- BOLD H.C.** 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 76(2): 101-108.
- BOS R., VAN DER MEI H.C. & BUSSCHER H.J.** 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 179-230.
- BOS R., VAN DER MEI H.C., GOLD J. & BUSSCHER H.J.** 2000. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 189: 311-315.
- BOURRELLY P.** 1966. Les algues d'eau douce. 1. Algues vertes, N. Boubée & Cie, Paris.
- BOURRELLY P.** 1985. Les algues d'eau douce. 3. Algues bleues et rouges, N. Boubée & Cie, Paris.
- BOYD A. & CHAKRABARTY A.M.** 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(7): 2355-2359.
- BROOKS S.B. & TOZEREN A.** 1996. Flow past an array of cells that are adherent to the bottom plate of a flow channel. *Computers and Fluids* 25: 741-757.
- BROWN R.M., LARSON D.A. & BOLD H.C.** 1964. Airborne algae: their abundance and heterogeneity. *Science* 143: 583-585.
- BRUINSMAN G.M., VAN DER MEI H.C. & BUSSCHER H.J.** 2001. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22: 3217-3224.
- BUSSCHER H.J., BELLON-FONTAINE M.-N., MOZES N., VAN DER MEI H.C., SJOLLEMA J., CERF O. & ROUXHET P.G.** 1990. Deposition of *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus thermophilus* to solid substrata in a parallel plate flow cell. *Biofouling* 2: 55-63.
- BUSSCHER H.J., BOS R. & VAN DER MEI H.C.** 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters* 128: 229-234.
- BUSSCHER H.J., WEERKAMP A.H., VAN DER MEI H.C., VAN PELT A.W.J., DE JONG H.P. & ARENDS J.** 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 980-983.
- BUSSCHER H.J., WEERKAMP A.H., VAN DER MEI H.C., VAN STEENBERGHE D., QUIRYNEN M., PRATT I.H., MARECHAL M. & ROUXHET P.G.** 1989. Physico-chemical properties

- of oral streptococcal cell surfaces and their relation with adhesion to solid substrata *in vitro* and *in vivo*. *Colloids and surfaces* 42: 345-353.
- CALLOW J.A., CRAWFORD S.A., HIGGINS M.J., MULVANEY P. & WETHERBEE R.** 2000a. The application of atomic force microscopy to topographical studies and force measurements on the secreted adhesive of the green algae *Enteromorpha*. *Planta* 211: 641-647.
- CALLOW J.A., OSBORNE M.P., CALLOW M.E., BAKER F. & DONALD A.M.** 2003. Use of environmental scanning electron microscopy to image the spore adhesive of the marine alga *Enteromorpha* in its natural hydrated state. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27: 315-321.
- CALLOW M.E., CALLOW J.A., ISTA L.K., COLEMAN S.E., NOLASCO A.C. & LOPEZ G.P.** 2000b. Use of self-assembled monolayers of different wettabilities to study surface selection and primary adhesion processes of green algal (*Enteromorpha*) zoospores. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3249-3254.
- CALLOW M.E., CALLOW J.A., PICKETT-HEPS J. & WETHERBEE R.** 1997. Primary adhesion of *Enteromorpha* (Chlorophyta, Ulvales) propagules: quantitative settlement studies and video microscopy. *Journal of Phycology* 33: 938-947.
- CALLOW M.E. & FLETCHER R.L.** 1994. The influence of low surface energy materials on bioadhesion - a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 333-348.
- CALLOW M.E., JENNINGS A.R., BRENNAN A.B., SEEGERT C.E., GIBSON A., WILSON L., FEINBERG A., BANEY R. & CALLOW J.A.** 2002. Microtopographic cues for settlement of zoospores of the green fouling alga *Enteromorpha*. *Biofouling* 18: 237-245.
- CAO L., CHAI Y., LI P., SHEN Z. & WU J.** 2005. Efficient self-assembly of transition metal oxide nanoclusters on silicon substrates. *Thin Solid Films* 492: 13-18.
- CERCA N., PIER G.B., VILANOVA M., OLIVEIRA R. & AZEREDO J.** 2005. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology* 156: 506-514.
- CHEW M.Y.L. & PING T.P.** 2003. *Staining of facades*. World Scientific Publishing, Singapore.
- CHOPIN T., KERIN B. F. & MAZEROLLE R.** 1999. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: a review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research* 47: 167-188.
- CHRISTENSEN B.E.** 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology* 10: 181-202.
- COSTERTON J.W. & LAPPIN-SCOTT H.M.** 1995. Introduction to microbial biofilms. In *Microbial biofilms* (J. M. Lynch, ed.), pp. 1-11. Cambridge University Press, Cambridge.
- CRISPIM C.A., GAYLARDE C.C. & GAYLARDE P.M.** 2004. Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 121-124.
- CRISPIM C.A., GAYLARDE P.M. & GAYLARDE C.C.** 2003. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. *Current Microbiology* 46: 79-82.
- DE PHILIPPIS R., FARALONI C., SILI C. & VINCENZINI M.** 2005. Populations of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic



- aggregates of the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago). *Science of The Total Environment* 353: 360-368.
- DE PHILIPPIS R. & VINCENZINI M.** 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 15-175.
- DE REVIERS B.** 2002. *Biologie et phylogénie des algues*, tome 1. Belin, Paris.
- DE REVIERS B.** 2003. *Biologie et phylogénie des algues*, tome 2. Belin, Paris.
- DIJT J.C., COHEN STUART M.A. & FLEER G.J.** 1994. Reflectometry as a tool for adsorption studies. *Advances in Colloid and Interface Sciences* 50: 79-101.
- DIJT J.C., COHEN STUART M.A., HOFMAN J.E. & FLEER G.J.** 1990. Kinetics of polymer adsorption in stagnation point flow. *Colloids and surfaces* 51: 141-158.
- DODGSON K.S. & PRICE R.G.** 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal* 84: 106-110.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. & SMITH F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- DUBOSC A.** 2000. Étude du développement de salissures biologiques sur les parements en béton: mise au point d'essais accélérés de vieillissement. Thèse, Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse.
- DUBOSC A., ESCADEILLAS G. & BLANC P.J.** 2001. Characterization of biological stains on external concrete walls and influence of concrete as underlying material. *Cement and Concrete Research* 31: 1613-1617.
- DUFFAURE-GALLAIS I.** 2006. Les revêtements s'attaquent à la pollution. *Le Moniteur* 2: 82-85.
- DUFRENE Y.F., BOONAERT C.J.P., VAN DER MEI H.C., BUSSCHER H.J. & ROUXHET P.G.** 2001. Probing molecular interactions and mechanical properties of microbial cell surfaces by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 86: 113-120.
- ESTOUP J.-M.** 1997. Salissures et nettoyage des façades d'immeubles (II). *Sycodès Informations* 4: 67-72.
- ETTL H. & GÄRTNER G.** 1995. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New-York.
- EVERAERT E.P.J.M., VAN DER MEI H.C. & BUSSCHER H.J.** 1998. Adhesion of yeasts and bacteria to fluoro-alkylsiloxane layers chemisorbed on silicone rubber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 10: 179-190.
- FANG H.H.P., CHAN K.-Y. & XU L.-C.** 2000. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *Journal of Microbiological Methods* 40: 89-97.
- FASSEL T.A. & EDMISTON C.E.JR.** 1999. Bacterial biofilms: strategies for preparing glycocalyx for electron microscopy. *Methods in enzymology* 310: 194-203.
- FATTOM A. & SHILO M.** 1984. Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47(1): 135-143.
- FINLAY J.A., CALLOW M.E., ISTA L.K., LOPEZ G.P. & CALLOW J.A.** 2002a. The influence of surface wettability on the adhesion strength of settled spores of the green alga *Enteromorpha* and the diatom *Amphora*. *Integrative and Comparative Biology* 42: 1116-1122.

- FINLAY J.A., CALLOW M.E., SCHULTZ M.P., SWAIN G.W. & CALLOW J.A.** 2002b. Adhesion strength of settled spores of the green alga *Enteromorpha*. *Biofouling* 18: 251-256.
- FLAIBANI A., OLSEN Y. & PAINTER T.J.** 1989. Polysaccharides in desert reclamation: Compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydrate Research* 190: 235-248.
- FLETCHER R.L. & CALLOW M.E.** 1992. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *British Phycological Journal* 27: 303-329.
- FLORES M., LORENZO J. & GOMEZ-ALARCON G.** 1997. Algae and bacteria on historic monuments at Alcala de Henares, Spain. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40: 241-246.
- GALLARDO-MORENO A.M., GONZALEZ-MARTIN M.L., BRUQUE J.M. & PEREZ-GIRALDO C.** 2004a. The adhesion strength of *Candida parapsilosis* to glass and silicone as a function of hydrophobicity, roughness and cell morphology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 249: 99-103.
- GALLARDO-MORENO A.M., GONZALEZ-MARTIN M.L., PEREZ-GIRALDO C., BRUQUE J.M. & GOMEZ-GARCIA A.C.** 2004b. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *Journal of Colloid and Interface Science* 271: 351-358.
- GAYLARDE C.C. & GAYLARDE P.M.** 2005. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55: 131-139.
- GAYLARDE C.C., GAYLARDE P.M., COPP J. & NEILAN B.** 2004. Polyphasic detection of cyanobacteria in terrestrial biofilms. *Biofouling*. 20(2): 71-79.
- GAYLARDE P.M. & GAYLARDE C.C.** 1999. Algae and cyanobacteria on painted surfaces in Southern Brazil. *Revista de Microbiologia* 30: 209-213.
- GAYLARDE P.M. & GAYLARDE C.C.** 2000. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 93-97.
- GEITLER L.** 1932. *Cyanophyceae*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- GENEL F.** 2005. Salissures de façade : comment les éviter? Guide Pratique CSTB.
- GILLATT J.W.** 1991. The need for antifungal and antialgal additives in high performance surface coatings. *Additives* 6: 197-203.
- GLOAGUEN V., MORVAN H. & HOFFMANN L.** 1995. Released and capsular polysaccharides of Oscillatoriaceae (Cyanophyceae, Cyanobacteria). *Algological Studies* 78: 53-69.
- GOMEZ-ALARCON G., MUÑOZ M., ARIÑO X. & ORTEGA-CALVO J.J.** 1995. Microbial communities in weathered sandstones: the case of Carrascosa del Campo church, Spain. *The Science of Total Environment* 167: 249-254.
- GÖRANSSON A. & TRÄGÅRDH C.** 2002. Mechanisms responsible for sub-micron particle deposition in a laminar wall-jet. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 211: 133-144.
- GRANT C.** 1982. Fouling of terrestrial substrates by algae and implications for control - A review. *International Biodeterioration Bulletin* 18: 57-65.
- GRANT C. & BRAVERY A.F.** 1985a. Laboratory evaluation of algicidal biocides for use on constructional materials. 3. Use of the vermiculite bed technique to evaluate toxic

- washes, surface coatings and surface treatments. *International Biodeterioration* 21: 285-293.
- GRANT C. & BRAVERY A.F.** 1985b. A new method for assessing the resistance of stone to algal disfigurement and the efficacy of chemical inhibitors. 5th International congress on deterioration and conservation of stone (G. Félix, ed.) 2: 653-662. Presses polytechniques romandes, Lausanne.
- GRIVET M., MORRIER J.J., BENAY G. & BARSOTTI O.** 2000. Effect of hydrophobicity on *in vitro* streptococcal adhesion to dental alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 11: 637-642.
- GROSSIN F. & DUPUY P.** 1978. Méthode simplifiée de détermination des constituants des salissures *in* Deterioration and protection of stone monuments. pp. 41, Paris.
- GUILBEAU, B.P., HARRY F.P., GAMBRELL R.P., KNOPF F.C. & DOOLEY K.M.** 2003. Algae attachment on carbonated cements in fresh and brackish waters - preliminary results. *Ecological Engineering* 20: 309-319.
- GUILLETTE O.** 1993. Cinétique de la colonisation végétale de matériaux composites de construction, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux (Belgique).
- GUILLETTE, O.** 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *The Science of the Total Environment* 167: 215-220.
- GUILLETTE O. & DREESEN R.** 1995. Laboratory chamber studies and petrographical analysis as bioreceptivity assessment tools of building materials. *The Science of the Total Environment* 167: 365-374.
- HAZEN K.C. & GLEE P.M.** 1995. Adhesion of fungi. *Methods in Enzymology* 253: 414-424.
- HERMANSSON, M.** 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14: 105-119.
- HOKPUTSA S., HU C., PAULSEN B.S. & HARDING S.E.** 2003. A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae. *Carbohydrate Polymers* 54: 27-32.
- HOLLAND R., DUGDALE T.M., WETHERBEE R., BRENNAN A.B., FINLAY J.A., CALLOW J.A. & CALLOW M.E.** 2004. Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. *Biofouling* 20(6): 323-329.
- HU C., LIU Y., PAULSEN B.S., PETERSEN D. & KLAVENESS D.** 2003. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydrate Polymers* 54: 33-42.
- HUECK J. & ADEMA D.M.M.** 1967. Some problems in the testing of materials with algae. *Material und Organismen* 2: 141-152.
- JACOB G.S. & SCUDDER P.** 1994. Glycosidases in structural analysis. *Methods in Enzymology* 230: 280-299.
- JOHN D.M.** 1988. Algal growths on buildings: a general review and methods of treatment. *Biodeterioration Abstracts* 2: 81-102.
- JOHN D.M., WHITTON B.A. & BROOK A.J.** 2002. The freshwater algal flora of the British isles - an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press, Cambridge.
- JOSHI C.D. & MUKUNDAN U.** 1997. Algal disfigurement and degradation of architectural paints in India. *Paintindia* 47: 27-32.

- JOUAN M.P.** 2004. Les micro-organismes en façade. *Qualité Construction* 82: 35-41.
- KASTIEN H.** 1999. Algues et champignons sur les façades minérales. *Journal de la Construction* 9: 35-43.
- KNIGHT T.L. & HAMMETT M.** 1993. The interaction of design and weathering masonry constructions. *Masonry International* 7(1): 9-13.
- KOMAREK J. & ANAGNOSTIDIS K.** 1999. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota 1. Chroococcales. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New-York.
- KOMAREK J. & ANAGNOSTIDIS K.** 1999. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota 2. Oscillatoriales. Elsevier GmbH, München.
- KOMAREK J. & FOTT B.** 1983. Das Phytoplankton des Süßwassers - 7. Teil, 1. Hälfte. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
- KUENZEL H.M. & SEDLBAUER K.** 2001. Biological growth on stucco. *Buildings VIII / Proceedings. ASHRAE Publications, Atlanta.*
- KÜNTZ M. & VAN MIER J.G.M.** 1997. Field evidences and theoretical analysis of the gravity-driven wetting front instability of water runoffs on concrete structures. *Heron* 42(2): 231-244.
- LAMENTI G., TIANO P. & TOMASELLI L.** 2000. Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Gardens (Florence, Italy). *Journal of Applied Phycology* 12: 427-433.
- LEE M.H., BRASS D.A., MORRIS R., COMPOSTO R.J. & DUCHEYNE P.** 2005. The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. *Biomaterials* 26: 1721-1730.
- LEE S.F., LI Y.H. & BOWDEN G.H.** 1996. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infection and Immunity* 64(3): 1035-1038.
- LEWIN R.A.** 1956. Extracellular polysaccharides of green algae. *Canadian Journal of Microbiology* 2: 665-672.
- LIND J.L., HEIMANN K., VAN BLIET C., HOOGENRAAD N.J. & WETHERBEE R.** 1997. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta* 203: 213-221.
- LOUTZ S. & DINNE K.** 2000. Salissures et altérations des matériaux pierreux par les micro-organismes. *CSTC Magazine* 3-13.
- LÜTHI Y. & RICKA J.** 1998. Colloidal particles at water-glass interface: analyzing videomicroscopic data. *Journal of colloid and Interface Science* 206: 302-313.
- MERCIER-BONIN M., OUAZZANI K., SCHMITZ P. & LORTHOIS S.** 2004. Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of Colloid and Interface Science* 271: 342-350.
- MILLSAP K.W., BOS R., BUSSCHER H.J. & VAN DER MEI H.C.** 1999. Surface aggregation of *Candida albicans* on glass in the absence and presence of adhering *Streptococcus gordonii* in a parallel-plate flow chamber: a surface thermodynamical analysis based on acid-base interactions. *Journal of colloid and Interface Science* 212: 495-502.
- MILLSAP K.W., BOS R., VAN DER MEI H.C. & BUSSCHER H.J.** 2000. Dot assay for determining adhesive interactions between yeasts and bacteria under controlled hydrodynamic conditions. *Journal of Microbiological Methods* 40: 225-232.

- MIQUEL G.** 2001. Rapport sur la qualité de l'eau et de l'assainissement en France. Assemblée Nationale, Paris.
- MONTREUIL J. & SPIK G.** 1963. Méthodes colorimétriques des glucides totaux - Microdosage des glucides. Monographie N°1: 1-131, Lille.
- MORISAKI H., NAKAGAWA K. & SHIRAISHI H.** 1996. Measurement of attachment force of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 6: 347-352.
- MORTON L.H.G. & SURMAN S.B.** 1994. Biofilms in biodeterioration - a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 203-221.
- MORVAN H., GLOAGUEN V., VEBRET L., JOSET F. & HOFFMANN L.** 1997. Structure-function investigations on capsular polymers as a necessary step for new biotechnological applications: the case of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 35: 671-683.
- MOY V.T., FLORIN E.-L. & GAUB H.E.** 1994. Adhesive forces between ligand and receptor measured by AFM. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 93: 343-348.
- NEINHUIS C. & BARTHLOTT W.** 1997. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany* 79: 667-677.
- NEU T.R. & MARSHALL K.C.** 1990. Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *Journal of Biomaterials Applications* 5: 107-133.
- NF EN ISO 4287.** 1998. Geometrical Product Specifications (GPS). Surface texture: profile method. Terms, definitions and surface texture parameters.
- NICOLAUS B., PANICO A., LAMA L., ROMANO I., MANCA M.C., DE GIULIO A. & GAMBACORTA, A.** 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 52: 639-647.
- NOGUEROL-SEOANE A. & RIFON-LASTRA A.** 1997. Epilithic phycoflora on monuments. A survey of San Esteban de Ribas de Sil Monastery (Ourense, NW Spain). *Cryptogamie Algologie* 18: 351-361.
- OHSHIMA 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.
- ORTEGA-CALVO J.J., ARIÑO X., HERNANDEZ-MARINE M. & SAIZ-JIMENEZ C.** 1995. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *The Science of Total Environment* 167: 329-341.
- ORTEGA-CALVO J.J., HERNANDEZ-MARINE M. & SAIZ-JIMENEZ C.** 1991. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International Biodeterioration* 28: 165-185.
- ORTEGA-CALVO J.J., SANCHEZ-CASTILLO P.M., HERNANDEZ-MARINE M. & SAIZ-JIMENEZ C.** 1993. Isolation and characterization of epilithic chlorophytes and cyanobacteria from two Spanish cathedrals (Salamanca and Toledo). *Nova Hedwigia* 57: 239-253.
- OTT C.M., DAY D.F., KOENIG D.W. & PIERSON D.L.** 2001. The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Current Microbiology* 42: 78-81.

- PALMER R.J. & HIRSCH P.** 1991. Photosynthesis-based microbial communities on two churches in Northern Germany: weathering of granite and glazed brick. *Geomicrobiology Journal* 9: 103-118.
- PERRICHET A.** 1991. Développement de micro-organismes à la surface des bétons et enduits. *Sycodès Informations* 11: 19-24.
- PIERRES A., BENOLIEL A.M. & BONGRAND P.** 1996. Experimental study of the rate of bond formation between individual receptor-coated spheres and ligand-bearing surfaces. *Journal de Physique III France* 6: 807-824.
- PRIETO B., RIVAS T. & SILVA B.** 1999. Environmental factors affecting the distribution of lichens on granitic monuments in the Iberian peninsula. *The Lichenologist* 31: 291-305.
- PUREVDORJ-GAGE L.B. & STOODLEY P.** 2004. Biofilm structure, behavior and hydrodynamics. In *Microbial biofilms* (M. G. a. G. A. O'Toole, ed.), pp. 160-173. ASM Press, Washington, DC.
- RASMUSSEN K. & OSTGAARD K.** 2003. Adhesion of the marine bacterium *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 to different hydrogel surfaces. *Water Research* 37: 519-524.
- RIFON-LASTRA A. & NOGUEROL-SEOANE A.** 2001. Green algae associated with the granite walls of monuments in Galicia (NW Spain). *Cryptogamie-Algologie* 22: 305-326.
- RINDI F. & GUIRY M.D.** 2002. Diversity, life history, and ecology of *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta) in urban habitats in western Ireland. *Journal of Phycology* 38: 39-54.
- RINDI F. & GUIRY M.D.** 2003. Composition and distribution of subaerial algal assemblages in Galway city, western Ireland. *Cryptogamie-Algologie* 24: 245-267.
- RINDI F. & GUIRY M.D.** 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43: 225-235.
- RINDI F., GUIRY M.D., CRITCHLEY A.T. & AR GALL E.** 2003. The distribution of some species of Trentepohliaceae (Trentepohliales, Chlorophyta) in France. *Cryptogamie-Algologie* 24: 133-144.
- ROBINS R.J., HALL D.O., SHI D.-J., TURNER R.J. & RHODES M.J.C.** 1986. Mucilage acts to adhere cyanobacteria and cultures plant cells to biological and inert surfaces. *FEMS Microbiology Letters* 34: 155-160.
- ROOSJEN A., BOKS N.P., VAN DER MEI H.C., BUSSCHER H.J. & NORDE W.** 2005. Influence of shear on microbial adhesion to PEO-brushes and glass by convective-diffusion and sedimentation in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46: 1-6.
- ROSENBERG M., ROSENBERG E., JUDES H. & WEISS E.I.** 1983. Bacterial adherence to hydrocarbons and to surfaces in the oral cavity. *FEMS Microbiology Letters* 20: 1-5.
- RUBIO C.** 2002. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention, Paris 6, Paris.
- RUSCH T.E., PRITCHETT E.A., SMITH R.A. & ARBIR F.W.** 1977. Algal Defacement: Evaluating algicidal properties of latex paints containing nonmercurial mildewcides. *Canadian Paint and Finishing* 84-89.
- SAND W.** 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates - a general mechanistic overview. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40: 183-190.

- SCHEUERMAN T.R., CAMPER A.K. & HAMILTON M.A.** 1998. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Journal of Colloid and Interface Science* 208: 23-33.
- SCHLICHTING H.E.** 1975. Some subaerial algae from Ireland. *British Phycological Journal* 10: 257-261.
- SCHULTZ M.P., FINLAY J.A., CALLOW M.E. & CALLOW J.A.** 2000. A turbulent channel flow apparatus for the determination of the adhesion strength of microfouling organisms. *Biofouling* 15: 243-251.
- SEKAR R., VENUGOPALAN V.P., SATPATHY K.K., NAIR K.V.K. & Rao V.N.R.** 2004. Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates. *Hydrobiologia* 512: 109-116.
- SHARMA P.K. & HANUMANTHA RAO K.** 2003. Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 29: 21-38.
- SJOLLEMA J., BUSSCHER H.J. & WEERKAMP A.H.** 1989. Real-time enumeration of adhering microorganisms in a parallel plate flow cell using automated image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 9: 73-78.
- SKINNER C.E.** 1972. Laboratory test methods for biocidal paints. In *Biodeterioration of Materials* (A. H. Walters and H.-v. d. P. E.H., eds.), pp. 346-354. Applied Science Publishers Ltd., London.
- SMESTAD PAULSEN B. & VIEIRA A.A.H.** 1994. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 30: 638-641.
- SPRINGLE W.R.** 1975. Testing biocidal paints. In *Some Methods of Microbiological Assay* (R. G. Board and D. W. Lovelock, eds.), pp. 191-220. Academic Press London.
- STENSTRÖM T.** 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 142-147.
- SUTHERLAND I.W.** 1995. Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiology Reviews* 16(4): 323-347.
- SUTHERLAND I.W.** 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 38(4): 319-328.
- TEGOULIA V.A. & COOPER S.L.** 2002. *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 24: 217-228.
- TEIXEIRA P., LOPES Z., AZEREDO J., OLIVEIRA R. & VIEIRA M.J.** 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology* 22: 247-251.
- TER BRAAK C.J.F. & SMILAUER P.** 1988. CANOCO reference manual and User's guide. Microcomputer Power, New York.
- TERADA A., YUASA A., TSUNEDA S., HIRATA A., KATAKAI A. & TAMADA M.** 2005. Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 43: 99-107.

- TOMASELLI L., LAMENTI G., BOSCO M. & TIANO P.** 2000. Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 251-258.
- TRIPATHI S.N., TIWARI B.S. & TALPASAYI E.R.S.** 1991. Growth of cyanobacteria (blue-green algae) on urban buildings. *Energy and Buildings* 15-16: 499-505.
- TROTET G., DUPUY P. & GROSSIN F.** 1973. Étude écologique des Cyanophycées des parois calcaires : cas particulier des abris. *Bulletin de la Société Botanique de France* 120: 407-434.
- TSIBOUKLIS J., STONE M., THORPE A.A., GRAHAM P., PETERS V., HEERLIEN R., SMITH J.R., GREEN K.L. & NEVELL T.G.** 1999. Preventing bacterial adhesion onto surfaces: the low-surface-energy approach. *Biomaterials* 20: 1229-1235.
- TSUNEDA S., AIKAWA H., HAYASHI H., YUASA A. & HIRATA A.** 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* 223: 287-292.
- VACHEETHASANEE K. & MARCHANT R.E.** 2000. Nonspecific *Staphylococcus epidermidis* adhesion. In *Handbook of bacterial adhesion - principles, methods and applications* (Y. H. An and R. J. Friedman, eds.), pp. 73-90. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- VADILLO-RODRIGUEZ V., BUSSCHER H.J., NORDE W., DE VRIES J. & VAN DER MEI H.C.** 2004. Atomic force microscopic corroboration of bond aging for adhesion of *Streptococcus thermophilus* to solid substrata. *Journal of Colloid and Interface Science* 278: 251-254.
- VADILLO-RODRIGUEZ V., BUSSCHER H.J., VAN DER MEI H.C., DE VRIES J. & NORDE W.** 2005. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41: 33-41.
- VAN OSS C.J.** 1993. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 78: 1-49.
- VAN OSS C.J.** 1994. *Interfacial forces in aqueous media*, New York.
- VAN OSS C.J., CHAUDHURY M.K. & GOOD R.J.** 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews* 88: 927-941.
- VAN OSS C.J., GOOD R.J. & CHAUDHURY M.K.** 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in 'hydrophobic interactions' between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of colloid and Interface Science* 111: 378-390.
- VEBRET L.** 1999. Production *in vitro* de polymères extracellulaires par la cyanobactérie thermophile *Mastigocladus laminosus*. PhD Thesis, University of Limoges, 181 p.
- VIDELA H.A., GUIAMET P.S. & GOMEZ DE SARAVIA S.** 2000. Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 335-341.
- VINCENZINI M., DE PHILIPPIS R., SILI C. & MATERASSI R.** 1993. Stability of molecular and rheological properties of the exopolysaccharide produced by *Cyanospira capsulata* cultivated under different growth conditions. *Journal of Applied Phycology* 5: 539-541.
- VINCENZINI M., DE PHILIPPIS R., SILI C. & MATERASSI R.** 1990. Studies on exopolysaccharide release by diazotrophic batch cultures of *Cyanospira capsulata*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34: 392-396.



- WAGNER C.D., NAUMKIN A.V., KRAUT-VASS A., ALLISON J.W., POWELL C.J. & RUMBLE J.R.** 2003. NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, NIST Standard Reference Database 20, Version 3.3.
- WECKESSER J. & JÜRGENS U.J.** 1988. Cell walls and external layers. *Methods in Enzymology* 167: 173-188.
- WEE Y.C.** 1988. Growth of algae on exterior painted masonry surfaces. *International Biodeterioration* 24: 368-371.
- WEE Y.C. & LEE K.B.** 1980. Proliferation of algae on surfaces of buildings in Singapore. *International Biodeterioration Bulletin* 16: 113-117.
- WELTON R.G., CUTHBERT S.J., MCLEAN R., HURSTHOUSE A. & HUGHES J.** 2003. A preliminary study of the phycological degradation of natural stone masonry. *Environmental Geochemistry and Health* 25: 139-145.
- WHITELEY P. & BRAVERY A.F.** 1982. Masonry paints and cleaning methods for walls affected by organic growth. *Journal of Oil and Colloids Chemistry Association* 65: 25-27.
- WIT P.J., POORTINGA A., NOORDMANS J., VAN DER MEI H.C. & BUSSCHER H.J.** 1999. Deposition of polystyrene particles in a parallel plate flow chamber under attractive and repulsive electrostatic conditions. *Langmuir* 15: 2620-2626.
- WRIGHT I.C.** 1984. The deterioration of paint films by algae and lichens. 6th International Biodeterioration Symposium (S. Barry and D. R. Houghton, eds.), pp. 637-643. International Mycological Institute and the Biodeterioration Society, Washington.
- YANG J., BOS R., POORTINGA A., WIT P.J., BELDER G.F. & BUSSCHER H.J.** 1999. Comparison of particle deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Langmuir* 15: 4671-4677.
- YOUNGBLOOD J.P., ANDRUZZI L., OBER C.K., HEXEMER A., KRAMER E.J., CALLOW J.A., FINLAY J.A. & CALLOW M.E.** 2003. Coatings based on side-chain ether-linked poly(ethylene glycol) and fluorocarbon polymers for the control of marine biofouling. *Biofouling* 19: 91-98.
- ZAR J.H.** 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- ZINN M.S., KIRKEGAARD R.D., PALMER R.J. & WHITE D.C.** 1999. Laminar flow chamber for continuous monitoring of biofilm formation and succession. *Methods in Enzymology* 310: 224-232.

## ANNEXE

Souches d'algues vertes et de cyanobactéries isolées de revêtements de façades et déposées en collection à l'Algothèque du Muséum National d'Histoire Naturelle (contact : Claude Yéprémian).

	Espèces	Souches	Lieu de prélèvement	Revêtement	Micro-humidité	Exposition	Végétation < 3 m
	<i>Calothrix pulvinata</i>	223C	Dinan (22)	Monocouche	forte	SO	x
	<i>Leptolyngbya tenuis</i>	679B	Boersch (67)	Peinture	faible	E	
Cyanobactéries	<i>Microcoleus vaginatus</i>	662C	Banyuls (66)	Peinture	forte	N	
	<i>Nostoc commune</i>	311G	Escalquens (31)	Mortier traditionnel	faible	NE	x
	<i>Phormidium corium</i>	674B	Strasbourg (67)	Pierre	forte	E	
		693C, 693B	St Pierre la Palud (69)	Mortier traditionnel	faible	N	x
	<i>Bracteacoccus</i> sp.	401E	Landes (40)	Monocouche	faible	O	x
		679E, 679F	Boersch (67)	Peinture	faible	E	
		871E	Limoges (87)	Monocouche	forte	S	
Algues vertes	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	402C	Landes (40)	Monocouche	faible	O	
	<i>Chlorella minutissima</i>	678F	Boersch (67)	Mortier traditionnel	faible	E	
		7714A	Champs-sur-Marne (77)	Monocouche	faible	N	
		876A	Limoges (87)	Bardage en plastique	faible	N	x

Espèces	Souches	Lieu de prélèvement	Revêtement	Micro-humidité	Exposition	Végétation < 3 m	
<i>Chlorella cf. mirabilis</i>	171A	Ste Marie en Ré (17)	Monocouche	faible	O		
	221F	Plouër-sur-Rance (22)	Peinture	faible	SE	x	
	222I	Plouër-sur-Rance (22)	Monocouche	faible	SE	x	
	224E	Dinan (22)	Monocouche	faible	SO		
	311C, 311I	Escalquens (31)	Mortier traditionnel	faible	NE	x	
	331F	Merignac (33)	Peinture	faible	O	x	
	451A	Orléans (45)	Mortier traditionnel	faible	SO		
	631A	Royat (63)	Peinture	faible	N		
	663B	Banyuls (66)	Monocouche	faible	N	x	
	7410G	Archamps (74)	Monocouche	faible	O	x	
	774E	Champs-sur-Marne (77)	Bardage en plastique	faible	N	x	
Algues vertes	875D	Limoges (87)	Peinture	forte	O	x	
	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	172C	Ste Marie en Ré (17)	Monocouche	faible	N	
		441A	Nantes (44)	Peinture	faible	S	x
		442C	Nantes (44)	Monocouche	faible	O	x
		663A	Banyuls (66)	Monocouche	faible	N	x
		672D	Strasbourg (67)	Pierre	forte	SO	
		679C	Boersch (67)	Peinture	faible	E	
		692C	Ecully (69)	Ciment	faible	N	x
		694D	Lyon (69)	Ciment	faible	N	
		749B	Archamps (74)	Monocouche	faible	W	x
		778A	Champs-sur-Marne (77)	RPE	forte	S	x
7716B		Champs-sur-Marne (77)	Monocouche	faible	O	x	
872C	Limoges (87)	Monocouche	forte	N			

Espèces	Souches	Lieu de prélèvement	Revêtement	Micro-humidité	Exposition	Végétation < 3 m
<i>Stichococcus bacillaris</i> Algues vertes	227B	Dinan (22)	Monocouche	faible	SO	
	331C, 331D	Merignac (33)	Peinture	faible	O	x
	401C	Landes (40)	Monocouche	faible	O	
	402E	Landes (40)	Monocouche	faible	O	
	677D	Boersch (67)	Peinture	faible	N	
	747E	Archamps (74)	Monocouche	faible	NO	x
	772B	Champs-sur-Marne (77)	Pierre	faible	N	x
	874A	Limoges (87)	RPE	forte	N	x

